

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.003

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.003>

## 微小 RNA-504 对非小细胞肺癌细胞增殖及凋亡的作用

高昕<sup>1</sup>, 杨智<sup>1</sup>, 于海波<sup>1</sup>, 才陆贤<sup>1</sup>, 王知勇<sup>1</sup>, 刘洪汐<sup>1</sup>, 王利斌<sup>1</sup>, 刘博<sup>2</sup>

(1. 东北国际医院胸外科, 沈阳 110623; 2. 沈阳军区总医院胸外科, 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的: 探讨微小RNA-504(microRNA-504, miR-504)对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞增殖及凋亡的影响及其机制。方法: 以定量PCR检测3种NSCLC细胞株A549, H1299, HCC827及对对照人支气管上皮细胞株BEAS-2B中miR-504的表达。选取miR-504变化最明显的细胞株(HCC827)用于后续实验。用Lipofectamine RNAiMAX分别将miR-504类似物(miR-504 mimic)、miR-504抑制物(miR-504 inhibitor)及非靶向miRNA对照(miR-control)转染至HCC827细胞中。以CCK-8试剂盒检测上述3组细胞增殖情况。用Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒检测3组细胞凋亡情况。以Western印迹法检测3组细胞P53表达。结果: 与对照组BEAS-2B细胞相比, miR-504在3种NSCLC细胞株中表达水平均显著增加, 其中以HCC827细胞增加幅度最大。与miR-control组相比, 过表达miR-504(miR-504 mimic)后HCC827细胞增殖加快、凋亡减少, 而抑制miR-504表达(miR-504 inhibitor)后HCC827增殖减慢、凋亡增加。Western印迹检测结果显示: 与miR-control组相比, P53在miR-504 mimic组表达水平降低, 而在miR-504 inhibitor组表达水平增加。结论: miR-504具有促进NSCLC细胞增殖、抑制凋亡的作用, 其机制可能与下调P53表达有关。

**[关键词]** 微小RNA-504; 非小细胞肺癌; 增殖; 凋亡

## Effect of microRNA-504 on proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer cells

GAO Xin<sup>1</sup>, YANG Zhi<sup>1</sup>, YU Haibo<sup>1</sup>, CAI Luxian<sup>1</sup>, WANG Zhiyong<sup>1</sup>, LIU Hongxi<sup>1</sup>, WANG Libin<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>2</sup>

(1. Department of Thoracic Surgery, Northeast International Hospital, Shenyang 110623; 2. Department of Thoracic Surgery, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the effect and possible mechanism of microRNA-504 (miR-504) in proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods:** Expression of miR-504 in three NSCLC cell lines (A549, H1299 and HCC827) and control human bronchial epithelial cell line BEAS-2B were determined by real-time PCR. The cell line (HCC827) with the most significant change of miR-504 expression was used in the following study. Then HCC827 cells were transfected with miR-504 mimic, miR-504 inhibitor and non-targeting miR-control by using Lipofectamine RNAiMAX. Cell proliferation of the three above-mentioned groups

收稿日期 (Date of reception): 2018-01-04

通信作者 (Corresponding author): 刘博, Email: liubo\_thoracics@163.com

基金项目 (Foundation item): 辽宁省科学技术计划项目 (2012225019). This work was supported by the Science and Technology Project of Liaoning Province, China (2012225019).

was detected by CCK-8 kit. Cell apoptosis of the three groups was measured by Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit. Expression of P53 of the three groups was determined by Western blot. **Results:** Compared with BEAS-2B control cells, expression of miR-504 was significantly increased in all three NSCLC cell lines. HCC827 cells were used in the following study due to its most significant increase of miR-504. Compared with miR-control group, over-expression of miR-504 (miR-504 mimic) resulted in accelerated proliferation and decreased apoptosis of HCC827 cells. While down-regulation of miR-504 (miR-504 inhibitor) led to retarded proliferation and increased apoptosis. In addition, expression of P53 was decreased in miR-504 mimic group but increased in miR-504 inhibitor group. **Conclusion:** miR-504 could promote proliferation and inhibit apoptosis of NSCLC cells, which was possibly mediated by down-regulating P53 expression.

**Keywords** microRNA-504; non-small cell lung cancer; proliferation; apoptosis

肺癌是一种严重威胁人类生命的重大疾病, 其病死率为癌症相关死亡之首。非小细胞肺癌(non-small cancer lung cancer, NSCLC)是肺癌的主要类型之一, 约占所有肺癌的80%。尽管近年来NSCLC的治疗手段有一定进展, 但其5年生存率仍较低<sup>[1]</sup>。因此, 亟需阐明NSCLC发生发展的分子机制, 从而为其临床诊断及治疗提供有效靶点。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种内源性的长度为约22个核苷酸的非编码RNA。近年研究<sup>[2]</sup>发现: miRNA可作为癌基因或抑癌基因对恶性肿瘤发挥调控作用。miR-504是新发现的一种miRNA, 与胶质母细胞瘤<sup>[3]</sup>、鼻咽癌<sup>[4]</sup>等恶性肿瘤密切相关。但miR-504在NSCLC中的作用尚不明确。因此, 本研究拟利用NSCLC细胞株, 在体外观察miR-504对其增殖及凋亡的影响, 并初步探讨其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人NSCLC细胞株A549, H1299, HCC827及正常人支气管上皮细胞株BEAS-2B购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。人miR-504模拟物(miR-504 mimic)、抑制物(miR-504 inhibitor)、miRNA非靶向对照(miR-control)及红色荧光标志寡核苷酸对照(Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo)购自美国Thermo公司。Lipofectamine RNAiMAX购自美国Invitrogen公司。胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购自杭州四季青公司。F-12K培养基、RPMI-1640培养基、丙酮酸钠、谷氨酰胺购自美国Gibco公司。支气管上皮细胞生长培养基BEGM购自美国LONZA/Clonetics公司。miRNA提取试剂盒miRNeasy Mini试剂盒、反转录试剂盒miScript II RT试剂盒、实时定量PCR试剂盒miScript SYBR Green

PCR试剂盒购自美国Qiagen公司。实时定量PCR引物由大连Takara公司合成。CCK-8试剂盒购自上海碧云天公司。Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司。小鼠抗人P53抗体及兔抗人 $\beta$ -tubulin抗体购自美国Abcam公司。辣根过氧化物酶标记的驴抗小鼠及驴抗兔二抗购自美国Jackson公司。增强型化学发光试剂盒购自美国GE公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

人NSCLC细胞株A549, H1299, HCC827及正常人支气管上皮细胞株BEAS-2B分别在如下培养基中培养(均添加终浓度为100 U/mL的青霉素及100 mg/mL的链霉素)。A549细胞培养于含10% FBS的F-12K培养基。H1299和HCC827细胞培养于含10% FBS, 1%谷氨酰胺和1 mmol/L丙酮酸钠的RPMI-1640培养基。BEAS-2B细胞培养于支气管上皮细胞生长培养基BEGM。在37 °C、含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养细胞, 待细胞达到80%~90%融合时用0.25%胰酶消化传代。

#### 1.2.2 细胞转染

将细胞传代至6孔板中, 当生长至60%~80%融合时可进行转染。采用Lipofectamine RNAiMAX试剂盒, 按照说明书所述方法, 将miR-504 mimic, miR-504 inhibitor, miR-control及Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo(用于确定转染效率)各30 pmol, 分别与9  $\mu$ L RNAiMAX转染试剂混合, 制备复合物。于室温放置5 min。将复合物加入到细胞中, 转染48 h。每组设置复孔2个。转染48 h后, 更换正常培养基, 进行后续分析。

#### 1.2.3 实时荧光定量PCR检测 miR-504 表达

采用miRNA提取试剂盒miRNeasy Mini试剂盒, 用QIAzol裂解液裂解各组细胞, 按说明书方

法提取总RNA(包括miRNA)。分光光度计测定总RNA浓度。取1  $\mu\text{g}$ 总RNA为模板,采用反转录试剂盒miScript II RT Kit进行反转录,获得cDNA。采用含有通用反向引物的实时定量PCR试剂盒miScript SYBR Green PCR Kit,在7300型定量PCR仪(美国ABI公司)上进行反应并检测。反应条件为:先95  $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min,后进行40个循环的扩增(95  $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,55  $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,70  $^{\circ}\text{C}$ 延伸34 s)。将U6基因作为内参。miR-504正向引物序列:5'-AGACCCUGGUCUGCACUCUAUC-3';反向引物序列:包含于试剂盒的通用引物。U6正向引物序列:5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3';反向引物序列:5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'。miR-504表达水平用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算(以U6为内参,并将正常对照BEAS-2B细胞的表达定为1)。每组设2个复孔,实验重复3次。

#### 1.2.4 CCK-8 方法测定细胞增殖

HCC827细胞在转染miR-504 mimic, miR-504 inhibitor及miR-control 48 h后,用胰酶消化制成细胞悬液。计数2 000个细胞,重悬于100  $\mu\text{L}$ 培养基中,接种于96孔板中。分别在12, 24, 48及72 h时,向待测孔中加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8溶液。在培养箱中培养4 h。用酶标仪在450 nm处,测量各孔培养液的OD值。每组设2个复孔,实验重复3次。

#### 1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

HCC827细胞在转染miR-504 mimic, miR-504 inhibitor及miR-control 48 h后,更换正常培养基继续培养72 h。将3组细胞用胰酶消化,以冷的磷酸盐缓冲液洗涤,离心后弃上清。将细胞悬液重悬于Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒中配备的Annexin结合缓冲液中,计数细胞并调整浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。向100  $\mu\text{L}$ 细胞悬液中加入5  $\mu\text{L}$  FITC标记的Annexin V和1  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PI,于室温孵育15 min。孵育后补加400  $\mu\text{L}$ 缓冲液,立即用流式细胞仪FACSCalibur(美国BD公司)检测细胞凋亡。

#### 1.2.6 Western 印迹检测 P53 表达

HCC827细胞在转染miR-504 mimic, miR-504 inhibitor及miR-control 48 h后,以冷的磷酸盐缓冲液冲洗。用细胞刮刀收集细胞,重悬于含蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中,置于冰上裂解细胞。低温4  $^{\circ}\text{C}$ 离心机12 000 r/min离心20 min。用BCA法测定蛋白浓度。各组取等量20  $\mu\text{g}$ 蛋白上样,行SDS/PAGE。用湿转法将蛋白转印至PVDF膜上。用含5%脱脂奶粉的TBS-T缓冲液室温摇晃封闭1 h。P53及 $\beta$ -tubulin一抗(均为1:1 000稀释)4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBS-T洗3遍后,用辣根过氧化物酶标记

的相应二抗(均为1:20 000稀释)室温摇晃孵育1 h。用化学发光试剂盒在X线胶片上显影。扫描图像后,用Quantity-One软件(美国BD公司)对条带进行灰度分析并定量。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间均数比较采用Student's *t*检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-504 在 NSCLC 细胞株中的表达水平

实时定量PCR结果显示:与正常肺支气管上皮细胞BEAS-2B相比,miR-504在3种NSCLC细胞株A549, H1299及HCC827中的表达水平均显著升高,其中HCC827细胞miR-504表达水平最高。故选取HCC827细胞用于后续研究(图1)。

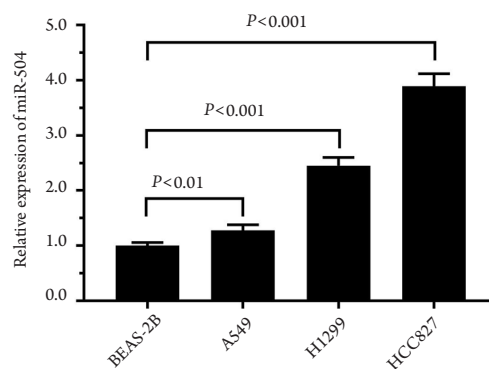


图1 定量PCR检测miR-504在人NSCLC细胞株(A549, H1299, HCC827)及支气管上皮细胞株(BEAS-2B)中的表达  
Figure 1 Expression of miR-504 was determined by quantitative PCR in human NSCLC cell lines (A549, H1299 and HCC827) and bronchial epithelial cell line (BEAS-2B)

### 2.2 细胞转染及定量 PCR 验证 miR-504 表达

采用Lipofectamine RNAiMAX将miR-504 mimic, miR-504 inhibitor, miR-control转染HCC827细胞,以红色荧光标记的Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo作为转染效率对照。转染48 h后,荧光显微镜下可见,转染Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo对照后,表达红色荧光的细胞占相差显微镜同一视野下全部细胞的80%~90%,表明转染效率高(图2)。

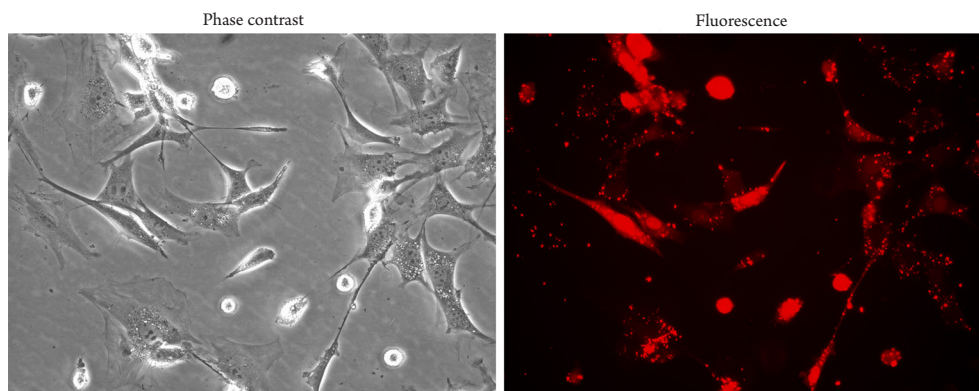


图2 HCC827细胞转染Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo 48 h后评价转染效率( $\times 200$ )

Figure 2 Assessing the transfection efficiency after HCC827 cells were transfected with Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo for 48 h ( $\times 200$ )

进一步用定量PCR检测各组miR-504表达, 结果发现: 与对照组miR-control相比, HCC827细胞转染miR-504 mimic后miR-504表达水平明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ ), 而转染miR-504 inhibitor后miR-504表达水平明显降低( $P < 0.001$ , 图3)。表明在HCC827细胞中成功实现了miR-504过表达(miR-504 mimic)及表达抑制(miR-504 inhibitor)。

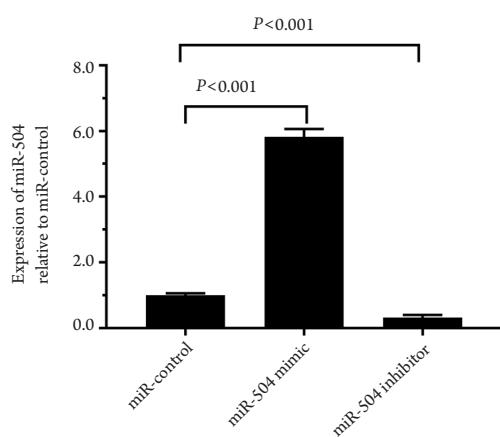


图3 定量PCR检测HCC827细胞转染miR-504 mimic, miR-504 inhibitor及miR-control后miR-504表达

Figure 3 Expression of miR-504 was determined by quantitative PCR in HCC827 cells transfected with miR-504 mimic, miR-504 inhibitor and miR-control

### 2.3 各组细胞增殖能力

采用CCK-8细胞增殖试剂盒测定各组细胞增殖情况, 结果显示: miR-504 mimic组在24, 48及72 h

时, 其450 nm处的吸光度值与对照组miR-control相比, 均明显增加( $P < 0.05$ ); 而miR-504 inhibitor组D(450 nm)在24, 48及72 h时, 较对照组均显著降低( $P < 0.05$ , 图4)。表明miR-504具有促进HCC827细胞增殖的作用。

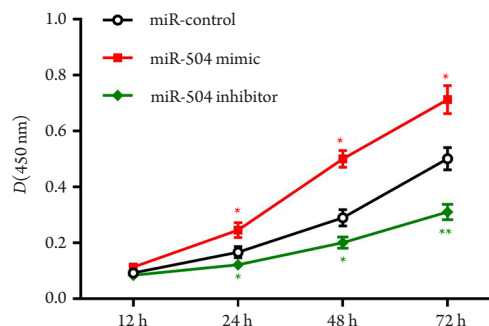


图4 CCK-8试剂盒测定转染miR-504 mimic, miR-504 inhibitor及miR-control的HCC827细胞的增殖

Figure 4 Cell proliferation was determined by CCK-8 kit in HCC827 cells transfected with miR-504 mimic, miR-504 inhibitor and miR-control

与miR-control组相比,  $*P < 0.05$ 。

Compared with the miR-control group,  $*P < 0.05$ .

### 2.4 各组细胞凋亡情况

采用Annexin V-FITC/PI双染试剂盒, 用流式细胞术检测各组细胞凋亡情况。检测结果以双色散点图呈现, 位于右下象限Annexin V-FITC(+)/PI(-)的细胞代表早期凋亡细胞, 位于右上象限Annexin V-FITC(+)/PI(+)的细胞代表晚期凋亡细胞, 两个象限之和代表全部凋亡细胞(图5)。结果发



现: 与对照组miR-control[(10.66±0.81)%]相比, miR-504 mimic组凋亡显著减少[(5.57±0.63)%], 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 而miR-504 inhibitor组凋亡显著增加[(24.54±1.30)%], 差异有统计学意义( $P<0.001$ )。表明miR-504具有抑制HCC827细胞凋亡的作用。

## 2.5 各组细胞 P53 蛋白表达水平

采用Western印迹法检测各组细胞p53蛋白表达水平。结果显示: 与对照组miR-control相比, miR-504 mimic组P53蛋白表达水平显著降低, 而miR-504 inhibitor组P53蛋白表达水平显著增加( $P<0.001$ , 图6)。

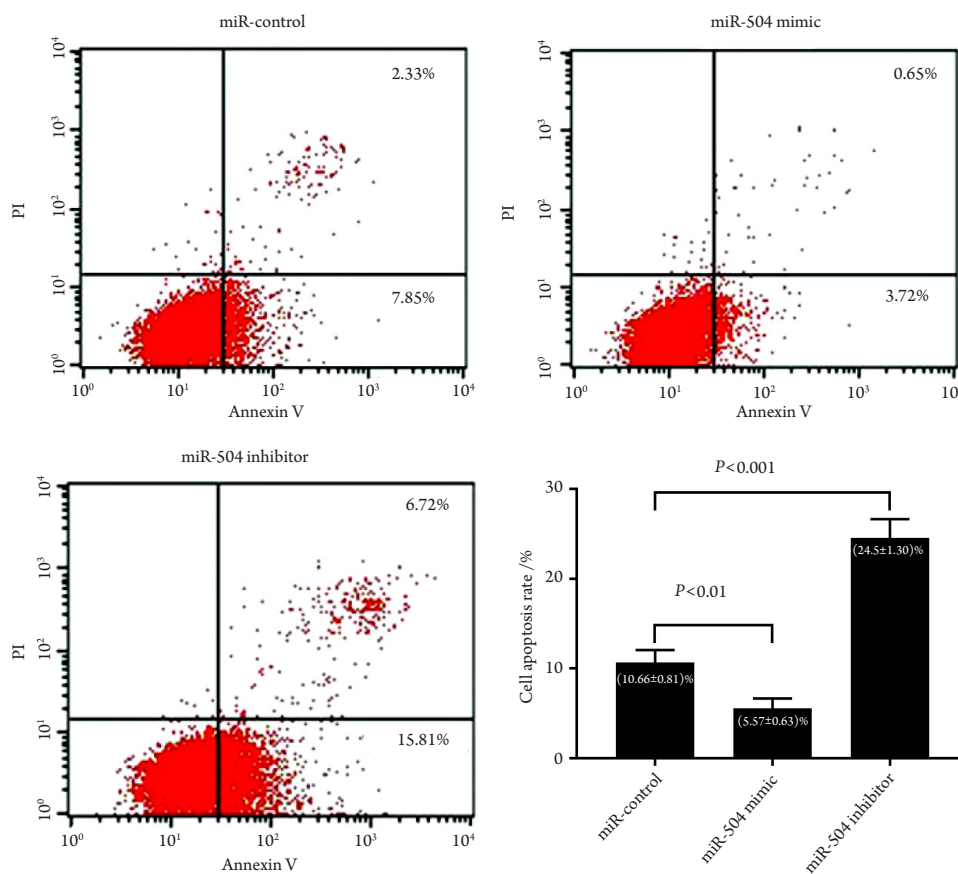


图5 流式细胞术测定转染miR-504 mimic, miR-504 inhibitor及miR-control的HCC827细胞的凋亡

Figure 5 Cell apoptosis was determined by flow cytometry in HCC827 cells transfected with miR-504 mimic, miR-504 inhibitor and miR-control

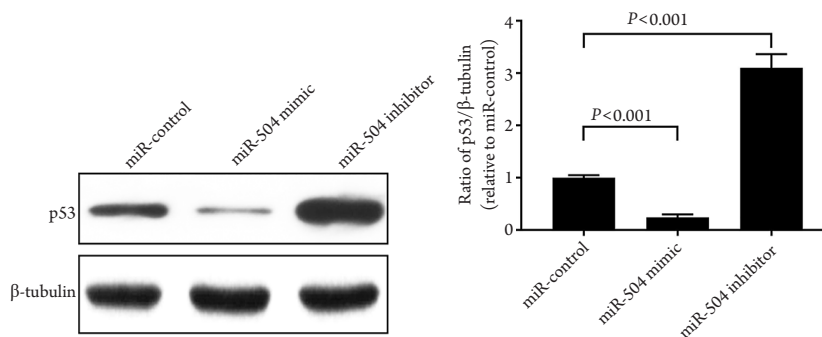


图6 Western印迹检测转染miR-504 mimic, miR-504 inhibitor及miR-control的HCC827细胞中P53表达

Figure 6 Expression of P53 protein was determined by Western blot in HCC827 cells transfected with miR-504 mimic, miR-504 inhibitor and miR-control

### 3 讨论

尽管临床上对NSCLC的诊断、化学治疗及靶向治疗技术不断更新,但目前NSCLC的5年生存率仍较低<sup>[1]</sup>。对NSCLC发病机制认识的不足,是导致临床缺少干预靶点的主要原因。MiRNA作为新发现的一类具有转录后基因调控功能的非编码RNA分子,在恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用。已有研究<sup>[5-8]</sup>发现:多种miRNA,如let-7<sup>[5]</sup>, miR-138<sup>[6]</sup>, miR-221<sup>[7]</sup>, miR-21<sup>[8]</sup>等具有抑制或促进NSCLC发生发展的作用,并可能作为早期诊断、靶向治疗及疗效判断的靶点或标志物。miR-504被发现与胶质母细胞瘤<sup>[3]</sup>、胃癌<sup>[9]</sup>、鼻咽癌<sup>[4]</sup>等多种癌症相关,但其在NSCLC中的作用尚未明确。本研究发现,miR-504在多种NSCLC细胞株中表达上调;过表达miR-504可促进NSCLC细胞增殖、抑制其凋亡,降低miR-504表达可抑制NSCLC细胞增殖、促进其凋亡,推测miR-504可能通过负性调控P53蛋白表达发挥作用。本研究结果表明:miR-504对NSCLC细胞的存活具有促进作用,因此可能在NSCLC发生发展中发挥重要作用。

本研究首先在3种不同NSCLC细胞株(A549, H1299及HCC827)中,检测miR-504的表达。上述3种细胞虽均属NSCLC细胞株,但均携带不同的基因异常:A549细胞株K-Ras基因存在突变<sup>[10]</sup>,H1299细胞株p53基因存在部分缺失突变<sup>[11]</sup>,HCC827细胞表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)基因的酪氨酸激酶区域存在突变<sup>[12]</sup>。上述3种细胞代表临床上不同的NSCLC类型。结果发现miR-504在上述3种细胞中的表达水平较对照组均明显升高,提示:1)miR-504升高可能参与NSCLC的发病;2)miR-504对于区分不同类型NSCLC意义可能不大。由于在HCC827细胞中miR-504升高最明显,故选择该细胞进行后续实验。

既往研究<sup>[13-18]</sup>发现:miR-504在不同恶性肿瘤中可发挥完全相反的作用。一方面,miR504可发挥致癌基因作用。例如,miR-504过表达可诱导口腔鳞状细胞癌发生侵袭及淋巴转移<sup>[13]</sup>;miR-504表达上调与胰腺导管腺癌患者预后差显著相关<sup>[14]</sup>;miR-504与鼻咽癌患者的放疗抵抗相关<sup>[4]</sup>;miR-504在头颈鳞状细胞癌组织中表达显著增加<sup>[15]</sup>。另一方面,miR504可发挥抑癌基因作用。例如,miR504对脑胶质瘤具有抑制作用<sup>[16-17]</sup>;miR-504在下咽鳞状细胞癌中表达降低,过表达则可抑制癌细胞增殖<sup>[18]</sup>。本研究发现:在HCC827细

胞中过表达miR-504(miR-504 mimic)可促进细胞增殖、抑制凋亡,而下调miR-504表达可抑制细胞增殖、促进凋亡。因此,miR-504在NSCLC中发挥致癌作用。

由于其结构特点,miRNA可与多个基因的3'非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)直接结合,从而调控这些下游基因的表达<sup>[19]</sup>。研究<sup>[20]</sup>发现:miR-504可上调多巴胺D1受体(dopamine D1 receptor, DRD1)表达,并与患者对尼古丁的依赖性相关。miR-504可下调叉头框蛋白P1(forkhead box protein P1, FOXP1)的表达,参与脑胶质细胞瘤和口腔鳞状细胞癌的发生<sup>[3,13]</sup>。此外,多个研究<sup>[9,21]</sup>发现:miR-504可与p53基因3' UTR上的两个部位直接结合,下调p53基因表达,参与胃癌<sup>[9]</sup>及结肠癌<sup>[21]</sup>等的发生发展。p53基因是目前发现的最重要的一种抑癌基因之一,p53表达降低或活性下降可引起细胞增殖、凋亡及DNA修复异常,从而引起肿瘤的发生并加速其进展<sup>[22]</sup>。本研究发现:过表达miR-504抑制p53基因表达,而低表达miR-504则可促进p53基因表达。因此,miR-504在NSCLC细胞中对p53基因具有负性调控作用,这与既往研究结论一致。

本研究尚有许多不足之处:1)未从在体水平,对人NSCLC肿瘤组织进行miR-504的检测,验证体外细胞学结果;2)未对miR-504的其他下游分子(如FOXP1)进行检测。此外,仍有多个问题值得深入探讨,如miR-504在NSCLC细胞中表达增加的上游调控机制;miR-504是否可作为NSCLC治疗靶点、早期诊断标志物及预后预测因子等,均有待在将来的研究中阐明。

综上所述,本研究发现miR-504在NSCLC细胞株中高表达,且可能通过下调p53基因促进NSCLC细胞株的存活。本研究结果可能为NSCLC的防治提供实验依据及新的干预靶点。

### 参考文献

1. McIntyre A, Ganti AK. Lung cancer—a global perspective[J]. *J Surg Oncol*, 2017, 115(5): 550-554.
2. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-222.
3. Cui R, Guan Y, Sun C, et al. A tumor-suppressive microRNA, miR-504, inhibits cell proliferation and promotes apoptosis by targeting FOXP1 in human glioma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(1): 1-11.

4. Zhao L, Tang M, Hu Z, et al. miR-504 mediated down-regulation of nuclear respiratory factor 1 leads to radio-resistance in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18): 15995-16018.
5. Alam M, Ahmad R, Rajabi H, et al. MUC1-C induces the LIN28B-LET-7-HMGA2 axis to regulate self-renewal in NSCLC[J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(3): 449-460.
6. Ye Z, Fang B, Pan J, et al. miR-138 suppresses the proliferation, metastasis and autophagy of non-small cell lung cancer by targeting Sirt1[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6): 3244-3252.
7. Yamashita R, Sato M, Kakumu T, et al. Growth inhibitory effects of miR-221 and miR-222 in non-small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Med*, 2015, 4(4): 551-564.
8. Xue X, Liu Y, Wang Y, et al. miR-21 and miR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51): 84508-84519.
9. Soutto M, Chen Z, Saleh MA, et al. TFF1 activates p53 through down-regulation of miR-504 in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14): 5663-5673.
10. Wang Y, Hedblom A, Koerner SK, et al. Novel synthetic chalcones induce apoptosis in the A549 non-small cell lung cancer cells harboring a KRAS mutation[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(23): 5703-5706.
11. Lien JC, Huang CC, Lu TJ, et al. Naphthoquinone derivative PPE8 induces endoplasmic reticulum stress in p53 null H1299 cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 453679.
12. Jakobsen KR, Demuth C, Madsen AT, et al. MET amplification and epithelial-to-mesenchymal transition exist as parallel resistance mechanisms in erlotinib-resistant, EGFR-mutated, NSCLC HCC827 cells[J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(4): 307.
13. Yang MH, Lin BR, Chang CH, et al. Connective tissue growth factor modulates oral squamous cell carcinoma invasion by activating a miR-504/FOXP1 signalling[J]. *Oncogene*, 2012, 31(19): 2401-2411.
14. Jiang B, Gu Y, Chen Y. Identification of novel predictive markers for the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Invest*, 2014, 32(6): 218-225.
15. Tu HF, Lin SC, Chang KW. MicroRNA aberrances in head and neck cancer: pathogenetic and clinical significance[J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013, 21(2): 104-111.
16. Ma X, Yoshimoto K, Guan Y, et al. Associations between microRNA expression and mesenchymal marker gene expression in glioblastoma[J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14(9): 1153-1162.
17. Guan Y, Chen L, Bao Y, et al. Downregulation of microRNA-504 is associated with poor prognosis in high-grade glioma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 727-734.
18. Kikkawa N, Kinoshita T, Nohata N, et al. microRNA-504 inhibits cancer cell proliferation via targeting CDK6 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(6): 2085-2092.
19. Fukao A, Aoyama T, Fujiwara T. The molecular mechanism of translational control via the communication between the microRNA pathway and RNA-binding proteins[J]. *RNA Biol*, 2015, 12(9): 922-926.
20. Huang W, Li MD. Differential allelic expression of dopamine D1 receptor gene (DRD1) is modulated by microRNA miR-504[J]. *Biol Psychiatry*, 2009, 65(8): 702-705.
21. Kumar M, Lu Z, Takwi AA, et al. Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs[J]. *Oncogene*, 2011, 30(7): 843-853.
22. Yue X, Zhao Y, Xu Y, et al. Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function, and therapy[J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(11): 1595-1606.

**本文引用:** 高昕, 杨智, 于海波, 才陆贤, 王知勇, 刘洪汐, 王利斌, 刘博. 微小RNA-504对非小细胞肺癌细胞增殖及凋亡的作用[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(2): 239-245. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.003

**Cite this article as:** GAO Xin, YANG Zhi, YU Haibo, CAI Luxian, WANG Zhiyong, LIU Hongxi, WANG Libin, LIU Bo. Effect of microRNA-504 in proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(2): 239-245. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.003