

miRNA-374 靶向 PTTG 基因抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭能力

张 媛¹, 沈云龙², 崔玉婷², 李和珍², 杨 勇², 王雪娟², 刘丽红²

(1. 广州市妇女儿童医疗中心临床检验部, 广东广州 510623; 2. 南方医科大学第五附属医院神经外科, 广东广州 510900)

摘要:【目的】研究微小 RNA-374(microRNA-374, miR-374)对胶质瘤细胞增殖和侵袭能力的影响,并探讨其可能的机制。【方法】观察慢病毒过表达 miR-374 载体转染 U251 和 U87 细胞株后对肿瘤细胞增殖和侵袭能力的影响;双荧光素酶报告基因检测 miR-374 与 PTTG 基因的靶标关系;Western blot 检测 PTTG 基因下游相关信号通路蛋白的表达水平。【结果】过表达 miR-374 可以显著抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭能力。双荧光素酶报告实验证实 PTTG 基因是 miR-374 的潜在靶基因,其下游的 bFGF 和 PI3K 信号通路等关键基因的表达也相应下调。【结论】miR-374 高表达可通过靶向 PTTG 基因抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭。这一机制有可能为胶质瘤的基因治疗提供新的策略。

关键词:胶质瘤;miR-374;PTTG

中图分类号:R739.4

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)04-0498-07

MiRNA-374 Inhibits Glioma Cell Growth, Invasion Via Direct Targeting Pituitary Tumor Transforming Gene

ZHAN Yuan¹, SHEN Yun-long², CUI Yu-ting², LI He-zhen², YANG Yong², WANG Xue-juan², LIU Li-hong²

(1. Clinical Laboratory Department, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623; 2. Department of Neurosurgery, The fifth Affiliated Hospital of South Medical University, Guangzhou 510900, China)

Corresponding to: SHEN Yun-long; E-mail: syl238300@sina.com

Abstract: 【Objective】To investigate the possible effect of microRNA-374(miR-374) expression on tumor cells' proliferation and invasion and particular mechanism. 【Methods】MiR-374 overexpression lentiviral vector (Lv-miR-374) and a control lentiviral empty vector (LEV) were stably transfected into human glioma U251 and U87 cells, to evaluate the effect of miR-374 on cell proliferation and invasion ability. Target relationship between miR-374 and PTTG were researched by dual luciferase report gene assay. Expression level of correlative signaling pathways of the downstream gene protein was analyzed by Western blot. 【Results】We revealed that the overexpression of miR-374 dramatically suppressed glioma cell growth and invasion in vitro. Target relationship between miR-374 and PTTG was confirmed by dual luciferase report gene assay. And decreased protein expression of PTTG, bFGF, AKT, MMP2, and p70S6K was consistent with the effect of miR-374 overexpression. 【Conclusion】Decreased miRNA-374 is an unfavorable prognosis marker and promotes glioma cell growth and invasion via direct targeting PTTG. Our findings provide new insights into the role of miR-374 in the development of gliomas, and implicate the potential application of miR-374 in cancer therapy.

Key words: glioma; miR-374; PTTG

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(4): 498-504]

脑胶质瘤是最常见的颅内肿瘤,临床预后差。近年来胶质瘤的疗效和预后并无显著进展,五年生存期仍较低。因此,从分子水平对胶质瘤

发病机制进行深入的研究有助于发现新的诊疗方法,并最终提高胶质瘤的治疗效果。研究发现,非编码小 RNA(miRNA)能通过对一些关键基因的

收稿日期:2017-03-07

基金项目:广东省科技计划项目(2013B021800050;2014A020212727)

作者简介:张媛,主管技师,研究方向:肿瘤的分子诊断和靶向治疗研究,E-mail: 13828405775@163.com;沈云龙,通信作者,博士,研究方向:肿瘤的分子诊断和靶向治疗研究,E-mail: syl238300@sina.com

调控参与多种肿瘤的发生和发展过程。近来有研究证实 miRNA-374 在很多肿瘤如肝癌、乳腺癌、甲状腺癌^[1-3]中可以抑制肿瘤细胞的生长,但其在人胶质瘤中的潜在意义目前仍不清楚。本研究中,我们对 miRNA-374 在胶质瘤中的功能及其调节机制进行了探讨,证实了在人胶质瘤细胞中 miRNA-374 的下调与肿瘤的进展有关。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和试剂选择

人胶质瘤细胞 U251 和 U87 购自上海医学科学院细胞所,细胞培养用含 10% 胎牛血清的 RPMI640(Gibco)培养液。EDU 试剂盒来自广州锐博。Transwell 细胞培养板购自 BD。PTTG、bFGF、AKT、p70S6K 和 MMP2 抗体购自 Santa Cruz 公司。双荧光素酶报告基因载体由本研究室前期保存。CCK-8 试剂盒购自 Kumamoto。FBS 和琼脂糖购自 Fermentas 公司。

1.2 RNA 的分离,逆转录和 RT-PCR

RNA 用 Trizol 从 U251 和 U87 细胞系中提取。miR-374 的 RNA 逆转录成 cDNA 并进行扩增,按我们前期研究^[4]的方法 qRT-PCR 检测 U251 和 U87 细胞中 miRNA-374 含量:小 RNA 提取试剂提取小 RNA,以其为模板,反转录成 cDNA,再按照 qRT-PCRSYBR Green 法步骤进行 PCR 扩增,以 U6 作为内参照。miRNA-374 特异性引物序列:5'-CATCTTAGCCTACAGTGTGGGA-3'(正向);5-GT CCTTAGTTCAGGAGGAATCCCT-3'(反向)。RN U6 B 的引物为:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'(正向);5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'(反向)。qRT-PCR 条件:95℃预变性 5 S,95℃变性 10 S,60℃退火 20 S,72℃延伸 60S 扩增 40 个循环周期。每个样本 3 个复孔,经过 3 次独立实验后得到的数据通过比较 Ct 值法进行定量分析。

1.3 稳定过表达 miRNA-374 的胶质瘤细胞株的构建

按前期研究^[4]的方法构建携带绿色荧光蛋白过表达 miRNA-374 的慢病毒载体感染相应细胞。并设置转染携带绿色荧光蛋白的空载病毒组细胞为阴性对照组。MOI 值为 10-20。采用 Real-Time PCR,并以阴性对照为参考,检测 miRNA-374 的表达情况,方法同上。

1.4 CCK-8 细胞增殖功能实验

采用 CCK-8 试剂盒检测过表达 miRNA-374 后胶质瘤细胞株的增殖能力。取对数期单细胞悬液,调整细胞浓度后每孔 100 μ L 悬液加入 96 孔板中,密度为 1000 个/孔,孵箱中 37℃、体积分数 5% 的 CO₂ 培养过夜。待细胞贴壁后 1、2、3、4、5 天分别加入病毒浓缩液和 Polybrene 继续培养,向每孔加入 10 μ L CCK8 溶液孵育 3 h 后终止培养,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。重复 3 次实验。

1.5 EDU 检测

细胞经常规消化、离心,用含血清培养基重悬制成单细胞悬液,计数后调整细胞浓度为 5×10^4 /mL。然后取 100 μ L 细胞悬液加入 96 孔板中,每组设 6 个复孔,放入孵箱中,37℃,体积分数 5% 的 CO₂ 条件培养。待细胞贴壁后,EDU 标记。再经 40 g/L 甲醛溶液固定后 Apollo 染色、DNA 染色。染色完成后立即置于荧光显微镜下观测图像并分析。重复 3 次实验。

1.6 平板克隆实验

取对数生长期的 Lv-miR-374 组和 LEV 组细胞常规消化后,密度为 200 个/孔,体积 3 mL,接种于 6 孔板中,每组细胞设 3 个复孔,常规培养 2 周后以肉眼可见克隆时终止培养,期间视情况换液。终止培养后吸弃培养液,PBS 洗涤 2 次,甲醇溶液固定 15 min,吉姆萨染液染色后 20 min,自来水冲洗干净,计数克隆数目取平均值。重复 3 次实验。

1.7 流式细胞仪检测细胞周期

将细胞用胰酶消化铺 12 孔板,控制第 2 天细胞汇合度约为 60% ~ 70%。每孔加入 5% 灭活的 FBS 培养基 2 h 后,加入病毒浓缩液 5 μ L 和 Polybrene 5 μ g,感染 8 ~ 12 h 后,换上新鲜的 5% 灭活的 FBS 的 DMEM 培养基,继续置于 37℃ 饱和湿度及体积分数 5% 的 CO₂ 的细胞养箱内培养。48 ~ 96 h 后收集细胞到 2.0 mL 的离心管中;PBS 洗涤、离心沉淀细胞,弃上清。重悬细胞冰乙醇中固定后加入 0.1 mL 含有 0.1 mg/mL RNase A 重悬细胞后 37℃ 水浴孵育 15 min,加入 0.4 mL PI 室温孵育 10 min。应用流式细胞仪测定细胞周期。

1.8 细胞基底膜侵袭实验

将 Matrigel 基质胶按 1:8 的比例稀释后,50 mg/L 包被 Transwell 小室底部膜的上室面,超净台内室温风干。Transwell 小室的下室中加 500 μ L 含 20% 胎牛血清的培养基作为趋化剂,上室中加

入 200 μL 无血清培养基的实验组和阴性对照组细胞悬液(含细胞 5×10^4 个),每组设 3 个复孔,放入 37°C 、体积分数为 0.05 的 CO_2 培养箱内培养 36 h 后,用棉签清除上室底部细胞,用 PBS 漂洗上表面 3 次,以 4°C 预冷的甲醛溶液固定细胞 20 min,取出小室风干,然后用 0.5% 结晶紫染色 20 min,取出小室用 PBS 将染液清洗干净,自然风干后在倒置显微镜下随机选取 10 个视野计数细胞取平均值。

1.9 Western Blot 检测蛋白表达

转染后将细胞用胰酶消化后收集于 EP 管中,加入适量细胞裂解液后混匀,冰上裂解 30 min,离心后吸取上清。Bradford 法测定蛋白浓度,根据所测蛋白样品浓度,计算每个蛋白样品的上样体积。配制浓度为 10% 的 SDS 凝胶,每孔加入 30 μg 的蛋白,稳压进行电泳。待蛋白完全分离后,电转目的条带到 PVDF 膜上,封闭后,加入一抗(1:400)后 4°C 孵育过夜,再加入二抗(1:1000)室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后加入 ECL 化学发光试剂检测。

1.10 靶基因的预测

应用生物信息学软件 TargetScan6.2 预测 miRNA-374 的靶基因,发现 PTTG 基因可能为其潜在的靶基因。预测 miR-374 调控 PTTG 基因的结合序列,设计合成 PTTG 3'-UTR 序列及突变后 PTTG 3'-UTR 序列,将合成的两种目的基因片段,分别克隆到 psiCHECK-2 双荧光素酶报告基因载体,构建 PTTG 3'-UTR 双荧光素酶报告基因野生型载体(psiCHECK-2-wt-PTTG)及其突变型载体(psiCHECK-2-mut-PTTG)。重组载体经 PCR 电泳和基因测序鉴定,以证明重组载体构建成功。使用转染试剂 Lipofectamine™ 2000 分别将这两种重组载体质粒与 miR-374 模拟物(mimics)或 miR-374 阴性对照(Negative Control, NC)共转染 U251 细胞,并利用双荧光素酶检测系统检测其活性。

1.11 统计学分析

应用 GraphPad Prism 5 和 SPSS 20.0 进行数据分析,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据服从正态分布,两组间数据用独立样本 t 检验方法, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

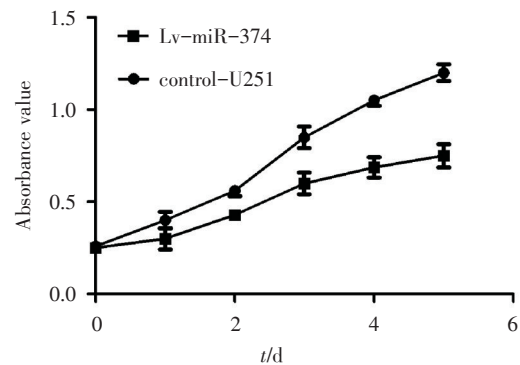
2.1 过表达 miRNA-374 对胶质瘤细胞增殖能力

的影响

将 Lv-miR-374 和 LEV 分别转染胶质瘤细胞株 U251 和 U87,用 CCK-8 细胞计数法每天检测其细胞数。可见 Lv-miR-374 组细胞数明显少于 LEV 对照组($P < 0.05$,图 1 和图 2)。

2.2 EdU 检测过表达 miRNA-374 对胶质瘤细胞增殖能力的影响

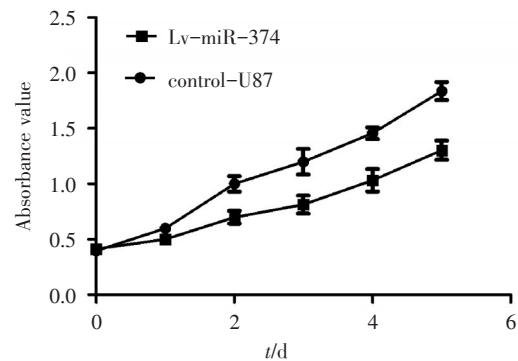
为了进一步证实过表达 miRNA-374 对胶质瘤细胞增殖的影响,我们采用 EdU 渗入实验来检测 DNA 的复制活性,结果显示转染 Lv-miRNA-374 组的 U251 和 U87 细胞受到了明显的抑制,差异有统计学意义(图 3, $P < 0.01$)。



d5: control-U251 vs Lv-miR-374. $n = 3, t = 3.17, P = 0.0248$

图 1 CCK-8 法检测过表达 miRNA-374 对 U251 胶质瘤细胞增殖能力的影响

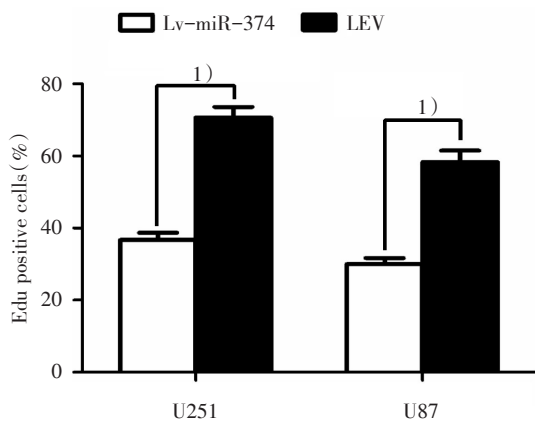
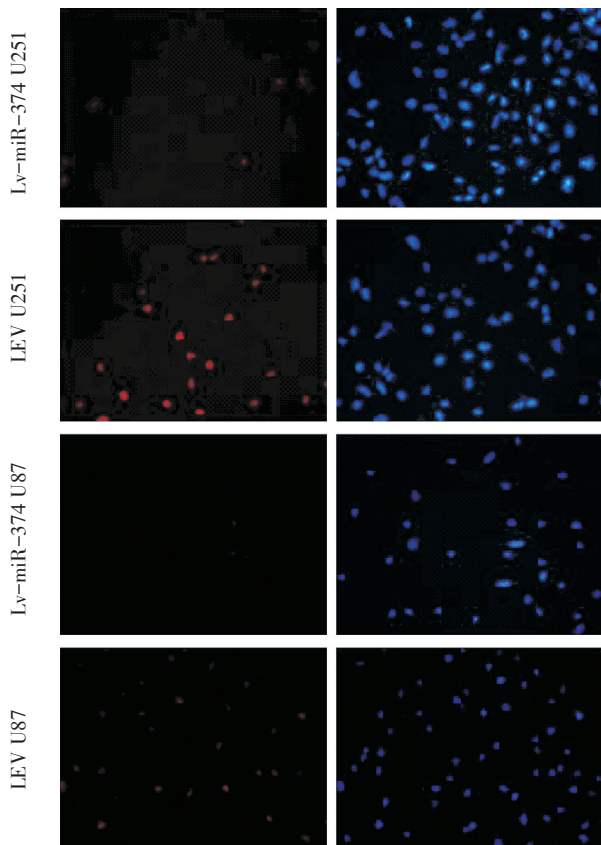
Fig.1 Effect of Lv-miR-374 and controlled lentiviral empty vector (LEV) on U251 cell proliferation was measured by CCK-8 assay



d5: control-U87 vs Lv-miR-374. $n = 3, t = 3.387, P = 0.0195$

图 2 CCK-8 法检测过表达 miRNA-374 对 U87 胶质瘤细胞增殖能力的影响

Fig.2 Effect of Lv-miR-374 and controlled lentiviral empty vector (LEV) on U87 cell proliferation was measured by CCK-8 assay



U251 cells: Lv-miR-374 vs LEV, $n = 3$, $t = -9.43$, $P = 0.001$; U87 cells: Lv-miR-374 vs LEV, $n = 3$, $t = -7.86$, $P = 0.001$; 1) $P < 0.05$

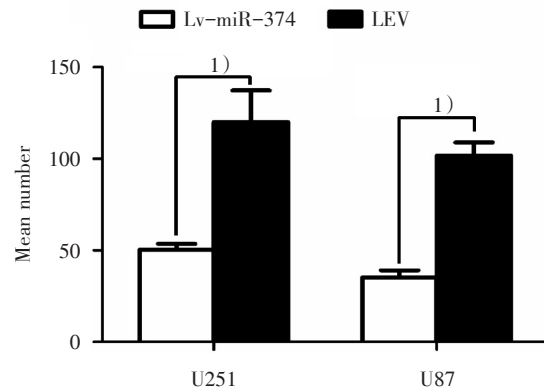
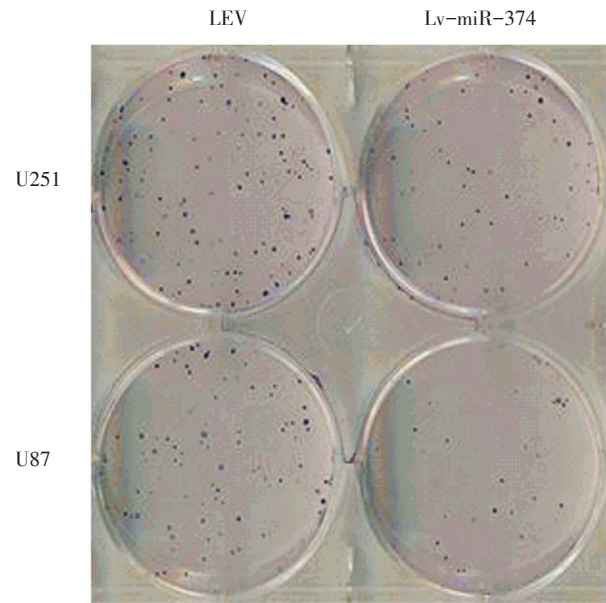
图3 EdU检测过表达miRNA-374对胶质瘤细胞增殖能力的影响

Fig.3 Effect of Lv-miR-374 or LEV on the growth of glioma U251 and U87 cells was examined by EdU incorporation assay

2.3 过表达 miR-374 对胶质瘤细胞克隆形成能力的影响

克隆形成实验是检测单个细胞形成克隆的

能力,从而进一步反映细胞增殖情况。结果表明,miR-374 过表达抑制了胶质瘤细胞的克隆形成能力,差异有统计学意义(图4, $P < 0.01$)。



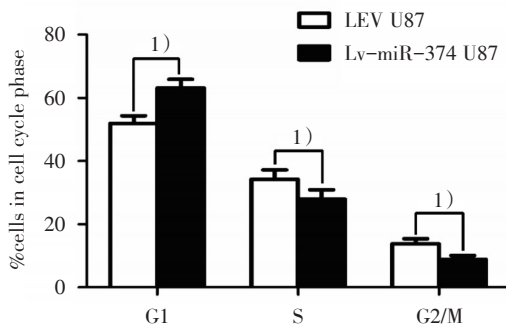
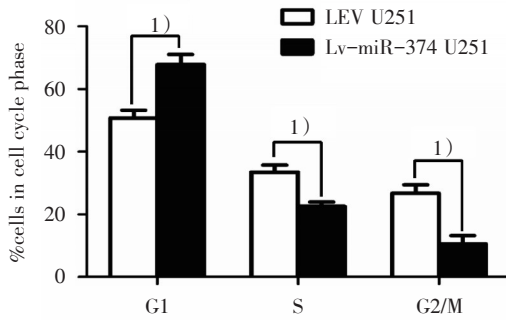
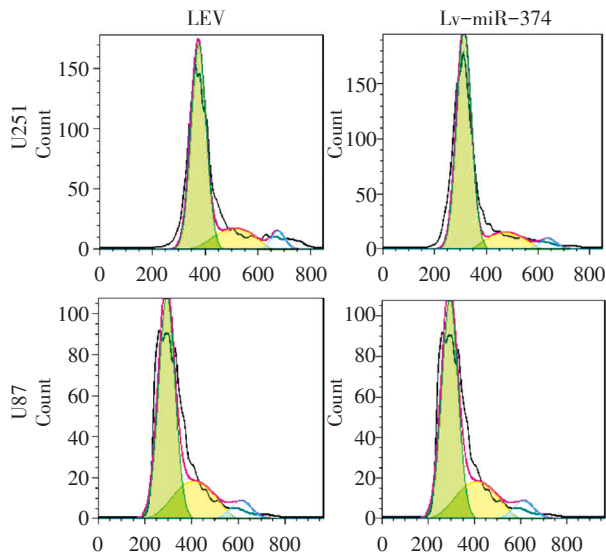
U251 cells: Lv-miR-374 vs LEV, $n = 3$, $t = -5.91$, $P = 0.004$; U87 cells: Lv-miR-374 vs LEV, $n = 3$, $t = -7.83$, $P = 0.001$; 1) $P < 0.05$

图4 过表达 miR-374 对胶质瘤细胞克隆形成能力的影响

Fig.4 Effect of Lv-miR-374 or LEV on the growth of glioma U251 and U87 cells was examined by colony formation assay

2.4 流式细胞仪检测细胞周期

细胞周期的检测结果表明,miR-374 过表达后 U251 和 U87 细胞 G1 期细胞显著增加, G2 期细胞数量减少,细胞周期明显阻滞在 G1 期,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$; 图5)。

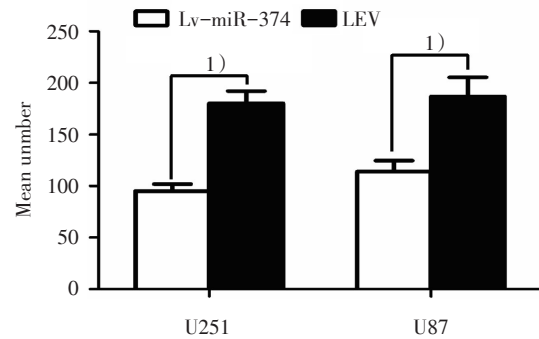
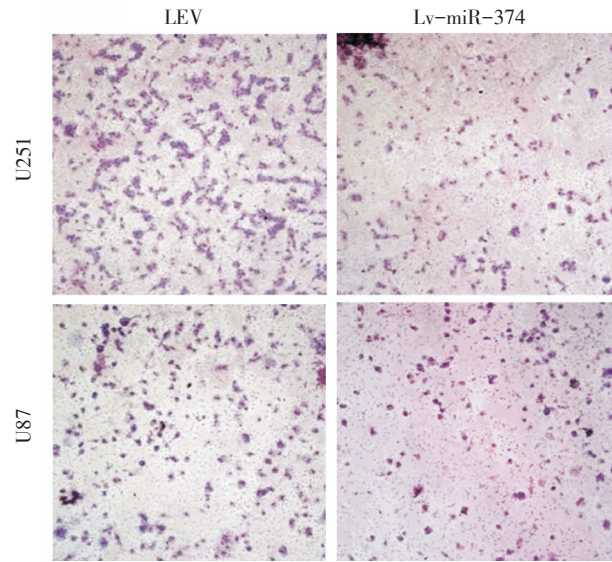


LEV U251 G1, S, G2/M vs Lv-miR-374 U251 G1, S, G2/M, $n = 3, P < 0.05$; LEV U87 G1, S, G2/M vs Lv-miR-374 U87 G1, S, G2/M, $n = 3, P < 0.05$

图5 过表达 miR-374 对胶质瘤细胞周期的影响
Fig.5 Effects of stably upregulating miR-374 on U251 and U87 cells' cell cycle in vitro

2.5 过表达 miR-374 对胶质瘤细胞侵袭能力的影响

Transwell 检测结果显示:转染 Lv-miR-374 的 U251 和 U87 组细胞侵袭能力显著减弱,与对照组相比有统计学差异,说明 miR-374 过表达抑制了胶质瘤细胞的侵袭能力(图6, $P < 0.05$)。



U251 cells: Lv-miR-374 vs LEV, $n = 3, t = -6.26, P = 0.003$; U87 cells: Lv-miR-374 vs LEV, $n = 3, t = -3.36, P = 0.028$ 。

图6 过表达 miR-374 对胶质瘤细胞侵袭能力的影响
Fig.6 Effects of stably upregulating miR-374 on U251 and U87 cells' invasion ability in vitro

2.6 miRNA-374 直接靶向 PTTG 3'-UTR

在 TargetScan6.2 数据库生物信息学分析发现,PTTG 基因 mRNA 3'-UTR 的第 581-588 位碱基序列是与 miRNA-374 可能的结合位点。同时在 miRanda 数据库上也发现 PTTG 基因 mRNA 3'-UTR 与 miRNA-374 有互补结合序列,且二者结合稳定性较好。互补结合序列如图7。

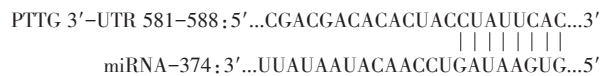


图7 miR-374 和 PTTG 结合序列

Fig.7 The series of miR-374 combined with PTTG

双荧光素酶报告基因检测系统结果显示,转染克隆有 PTTG 3'-UTR 突变型载体质粒实验中,

miR-374组与阴性对照组比较,荧光素酶的活性值差异无显著性($t = 0.58, P > 0.05$);转染克隆有PTTG 3'-UTR载体质粒实验中,miR-374组荧光素酶活性明显受到抑制,与阴性对照组比较,荧光素酶的活性差异有显著性($t = 3.24, P = 0.023$)。转染空白载体质粒psiCHECK-2的实验中,两组荧光素酶活性表达均无显著差异($t = 0.45, P > 0.05$;图8)。

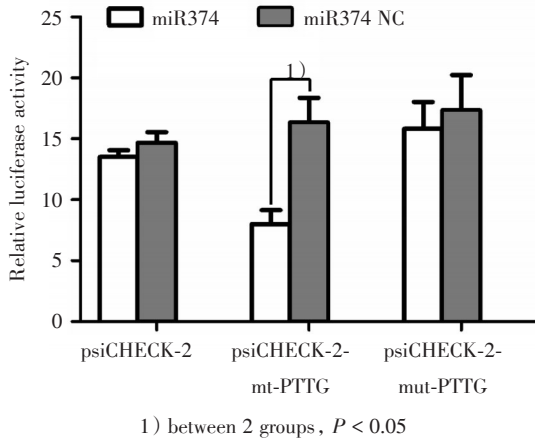


图8 转染不同重组载体质粒荧光素酶活性
Fig.8 The relative luciferase activity of the different vectors in each group

2.7 Western blot 检测结果

对比LEV细胞,过表达miRNA-374显著减少了PTTG蛋白的表达水平(图9),也证实了miRNA的过表达显著下调了bFGF、AKT、MMP2 and p70S6K的表达。

3 讨论

miR-374定位于染色体Xq13,既往的研究研究证实miRNA-374在胃癌、乳腺癌等多种肿瘤中表达异常,对肿瘤细胞有增殖抑制作用,且参与了肿瘤的侵袭和转移。但是它在胶质瘤中的功能仍不清楚。在前期的研究^[4]中,我们对85例脑胶质瘤标本和30例正常脑组织进行了检测,发现与正常脑组织相比,miR-374在胶质瘤中的表达是下降的,miR-374的表达与年龄、性别、KPS评分、肿瘤大小等无关,但与胶质瘤的病理级别呈负相关。且患者miRNA-374表达水平越低,其预后也越差。这些结果提示了miR-374在胶质瘤中可能扮演着抑癌基因的功能。

为了进一步研究miR-374在胶质瘤细胞中的功能,我们构建了过表达miR-374的慢病毒载体

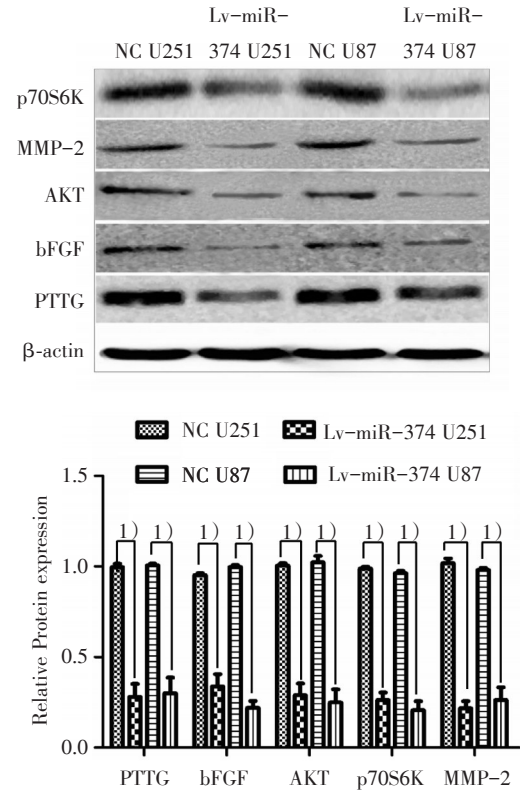


图9 过表达miRNA-374对PTTG等蛋白表达的影响
Fig.9 LV-miR-374 influence on the protein expression of U251 and U87 glioma cells

(Lv-miR-374),和慢病毒空载体(LEV)一起稳转人胶质瘤U251和U87细胞株,发现过表达组细胞的增殖活性均较空载体组明显下降,细胞周期在G1期受到阻滞。EDU实验也证实了过表达组胶质瘤细胞的生长能力较对照组显著下降。而转染过表达载体后U251和U87细胞的克隆形成能力也明显下降。在细胞基底膜侵袭实验中,过表达miR-374的慢病毒载体转染后的U251和U87细胞的侵袭能力也明显下降。这些数据都证实了异常过表达miR-374可以抑制胶质瘤细胞的生长,提示下调miR-374的表达可能会导致胶质瘤细胞生长加速。而且,miR-374的过表达可以在体外明显抑制胶质瘤细胞的侵袭能力。因此,我们推测miR-374的低表达可能与胶质瘤细胞的迅速生长,侵袭和转移的潜能相关。

microRNA主要通过与其靶基因mRNA的3'-UTR端互补结合降解mRNA或是抑制mRNA的翻

译,从而阻遏基因的表达^[5]。而这些靶基因产物,可能是调控细胞增殖、侵袭和放化疗的敏感性^[6-7]的关键。我们的数据显示 miR-374 能直接靶向 PTTG 的 3'-UTR 区域,miR-374 对 PTTG 基因具有调控作用,PTTG 可能是 miR-374 的潜在靶基因。因此,我们利用生物信息学软件,预测 miR-374 调控 PTTG 基因的结合序列,设计合成 PTTG 3'-UTR 序列及突变后 PTTG 3'-UTR 序列,将合成的两种目的基因片段,分别克隆到 psiCHECK-2 双荧光素酶报告基因载体,构建 PTTG 3'-UTR 双荧光素酶报告基因野生型载体 (psiCHECK-2-mt-PTTG) 及其突变型载体 (psiCHECK-2-mut-PTTG)。使用转染试剂 Lipofectamine™ 2000 分别将这两种重组载体质粒与 miR-374 模拟物 (mimics) 或 miR-374 阴性对照 (Negative Control, NC) 共转染 U251 细胞。双荧光素酶报告基因检测系统结果显示: PTTG 基因是 miR-374 直接作用的靶基因,且 miR-374 结合于 PTTG 基因的 3'-UTR 区域,在转录后水平对 PTTG 基因有直接抑制作用。

PTTG 蛋白可通过刺激 bFGF 表达^[8-9]而激活 PI3K/AKT/mTOR 信号转导通路,上调 AKT、p70S6K 等蛋白的表达,从而发挥促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡等作用^[10-11];还可进一步上调 MMP2 蛋白的表达促进细胞外基质的降解,调控肿瘤细胞侵袭和转移。我们发现 miR-374 能直接靶向 PTTG 的 3'-UTR 区域,miR-374 的过表达与文献中敲低胶质瘤细胞的 PTTG 基因具有相似的效果。在此基础上,我们进一步检测了 PTTG 敲低后可能调控的肿瘤相关信号通路和原癌基因。如 bFGF、MMP2 蛋白、PI3K/AKT/mTOR 信号通路的 AKT 和 p70S6K 蛋白的表达水平。结果发现,上调 miR-374 的表达后 PTTG 蛋白的表达水平明显下降,随之也抑制了 bFGF、MMP2、AKT 和 p70S6K 蛋白的表达水平。因此,我们推测,过表达 miR-374 可能是通过直接靶向 PTTG 基因并调节下游的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来抑制胶质瘤细胞生长和侵袭的。对 miR-374 功能的进一步研究,将有利于对胶质瘤发病机制的深入了解并提供新的治疗策略。

参考文献:

[1] Wen D, Danquah M, Chaudhary AK, et al. Small molecules targeting micro RNA for cancer therapy: Promises and obstacles [J]. *J Control Release*, 2015, 219 (9):

- 237-247.
- [2] 初学,沈丽琴,庄志祥,等. MiR-374b 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. *江苏医药*, 2014, 40(15): 1780-1782.
Chu X, Shen LQ, Zhuang ZX, et al. Expression and clinical significance of miR-374b in gastric cancer [J]. *Jiangsu Med J*, 2014, 40(15): 1780-1782.
- [3] Cai J, Guan H, Fang L, et al. MicroRNA374a activates Wnt/ β catenin signaling to promote breast cancer metastasis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 566-579.
- [4] 沈云龙,安泰学,李和珍,等. 胶质瘤中 MicroRNA-374 的表达及其临床意义[J]. *解剖学研究*, 2016, 38(4): 289-293.
Shen YL, An TX, Li HZ, et al. Expression and clinical-significance of miR-374 in glioma tissues [J]. *Anat Res*, 2016, 38(4): 289-293.
- [5] Gambari R, Brognara E, Spandidos DA, et al. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: New trends in the development of miRNA therapeutic strategies in oncology (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2016, 12(2): 137-143.
- [6] Li H, Jia Z, Li A, et al. Resveratrol repressed viability of U251 cells by miR-21 inhibiting of NF- κ B pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 382(1-2): 137-143.
- [7] Xia JT, Chen LZ, Jian WH, et al. MicroRNA-362 induces cell proliferation and apoptosis resistance in gastric cancer by activation of NF- κ B signaling [J]. *J Transl Med*, 2014, 12(1): 33-41.
- [8] Sapochnik M, Nieto LE, Fuertes M, et al. Molecular mechanisms underlying pituitary pathogenesis [J]. *Biochem Genet*, 2016, 54(2): 107-119.
- [9] Shah PP, Kakar SS. Pituitary tumor transforming gene induces epithelial to mesenchymal transition by regulation of Twist, Snail, Slug, and E-cadherin [J]. *Cancer Lett*, 2011, 311(1): 66-76.
- [10] 沈云龙,安泰学,罗巧灵,等. 慢病毒介导 shRNA 抑制垂体腺瘤 PTTG 基因表达及对细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2016, 37(4): 522-529.
Shen YL, An TX, Luo QL, et al. Inhibition of PTTG Expression and Suppression of Tumor Proliferation and Invasion in GH3 and AtT20 Pituitary Adenomas Cells by Lentiviral Vector-Mediated shRNA Targeting PTTG [J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2016, 37(4): 522-529.
- [11] Suojun Z, Feng W, Dongsheng G, et al. Targeting Raf/MEK/ERK pathway in pituitary adenomas [J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(3): 389-395.

(编辑 孙慧兰)