



# 环境污染物 As 及 SHP2<sup>D61G/+</sup> 激活对小鼠成纤维母细胞 miRNA 表达谱的影响

崔花芹<sup>1</sup> 汪心怡<sup>2</sup> 陈吉<sup>1</sup> 陈卓<sup>1</sup> 赵华<sup>1</sup> 瞿成奎<sup>1,3</sup> 汪思应<sup>1</sup>

(1. 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032; 2. 安徽医科大学临床学院, 合肥 230032;  
3. Case Western Reserve University, Cleveland, USA 44106)

**【摘要】** 目的 建立环境致癌物与基因突变联合因素影响下的 miRNA 表达谱,为肿瘤发生机制的进一步研究提供新线索。方法 同等条件下,首先制备 SHP2<sup>+/+</sup> 野生型(wild type, Wt)及 SHP2<sup>D61G/+</sup> 激活突变(gain-of-function mutation, GOF mutation)小鼠永生化的成纤维母细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)细胞,之后以 0.5 μmol/L 的三氧化二砷急性处理 MEFs 细胞 48 h 后提取细胞总 RNA,用小鼠 miRNA 芯片杂交/分析,建立 miRNA (microRNA, miRNA, miR) 表达谱,筛选差异表达显著者,用 RT-PCR 进行验证。结果 重金属化合物三氧化二砷处理 SHP2<sup>+/+</sup> 野生型和 SHP2<sup>D61G/+</sup> 突变的 MEFs 细胞 48h 后,数十个 miRNAs 出现差异性表达,miRNA 在三氧化二砷诱导前后的细胞或 SHP2 激活突变与否的细胞出现表达增加或减少,且发现受三氧化二砷和 SHP2 激活突变影响变化一致的 miRNAs,如 mmu-miR-100(表达下降)、mmu-miR-1907(表达升高)等,RT-PCR 检测发现 mmu-miRNA-100、mmu-miRNA-1907 的表达趋势与芯片结果是一致的。结论 基因突变与环境污染可以影响 MEFs 细胞的 miRNA 表达谱出现明显改变,这些改变可能是细胞恶性转化及肿瘤发生的基础。

**【关键词】** SHP2; miRNA; 环境污染; 基因突变; 肿瘤

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013) 07-0001-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.007.001

## Effect of environmental pollutant-As and SHP2<sup>D61G/+</sup> activation on miRNA expression profiles in MEFs

CUI Hua-qin<sup>1</sup>, WANG Xin-yi<sup>2</sup>, CHEN Ji<sup>1</sup>, CHEN Zhuo<sup>1</sup>, ZHAO Hua<sup>1</sup>, QU Cheng-kui<sup>1,3</sup>, WANG Si-ying<sup>1</sup>

(1. School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. Dept of Clinical medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

3. Case Western Reserve University, Cleveland, 44106, USA)

**【Abstract】 Objective** Establish the miRNA expression profiling under environmental carcinogens and gene mutations, to provide some new clues for further study on the mechanism of tumorigenesis. **Methods** Under the same condition, mice were first prepared in SHP2<sup>+/+</sup> normal (wild type, Wt) and SHP2<sup>D61G/+</sup> activating mutation (gain-of-function mutation, GOF mutation) of immortalized fibroblast cells (mouse embryonic fibroblasts, MEFs), acute treat MEFs cells with 0.5 μmol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 48 hours, then extract the cell total RNA. Use the analysis of miRNA hybridization to establish the miRNA (microRNA, miRNA, miR) expression profiling, screening the miRNAs which differential expression

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81272258); 安徽省留学回国人员科研项目(编号: 2009-2011); 安徽省学科学术带头人基金。

[作者简介] 崔花芹(1986年11月),女,硕士研究生。E-mail: cuihuaqinonly1@163.com.

[通讯作者] 汪思应。E-mail: sywang@ahmu.edu.cn.

significantly, then validated by RT-PCR. **Results** After treated the SHP2<sup>+/+</sup> MEFs and SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, dozens of miRNAs showed differential expression. The expression of miRNAs increase or decrease in different SHP-2<sup>+/+</sup> MEFs or SHP-2<sup>D61G/+</sup> MEFs when treat with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or not, at the same time, we discovered some miRNAs show the same change along with the As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treating and SHP2<sup>D61G/+</sup> activating mutation, such as mmu-miRNA-100 (down regulation) and mmu-miRNA-1907 (up regulation). **Conclusion** Gene mutation and environmental pollution can effect the miRNAs expression profiling of MEFs significantly, these change maybe the basis of cells malignant transformation and tumourgenesis.

**【Key words】** SHP-2; miRNA; Environmental pollution; Mutation; Tumor

近年来,我国肿瘤发病呈现明显的高发早发趋势,怀疑系环境污染及基因突变相互作用的结果。一方面环境污染通过引发基因突变致癌,另一方面,基因突变的机体可能对环境污染更加敏感而易发生肿瘤。环境污染物有很多种,其中包括因采矿、废气污染、污水灌溉及使用重金属制品导致的重金属污染<sup>[1]</sup>。根据流行病学调查,我国水源污染物中砷和镉排在首位。重金属污染物主要通过氧化应激,激活 NF- $\kappa$ B、AP-1、HIF-1 等的信号分子及氧化损伤造成基因突变,导致细胞恶性转化,促发肿瘤,基因突变也可能通过信号途径异常活化及遗传不稳定性导致细胞恶性转化促发肿瘤<sup>[2]</sup>。但这些仅仅初步解释了肿瘤高发的一些问题,对于肿瘤早发并没有答案。我们推断:环境污染促发基因突变,而携带基因突变的细胞或机体对环境污染更加敏感,可能是促进肿瘤早发的主要原因。我们前期研究已经发现 SHP-2 激活突变的细胞在重金属污染物诱导下,更容易发生恶性转化,携带 SHP-2 激活突变的小鼠在环境因素诱导下更易发生肿瘤<sup>[3]</sup>。SHP-2 是一个含有两个 SH2 结构域的酪氨酸磷酸酶,在各组织中广泛表达,被激活时,活化的蛋白通过酪氨酸磷酸化位点与 SH2 结构域结合或 C 端的 2 个酪氨酸位点磷酸化活化结合自身的 SH2 结构域发挥活性<sup>[4,5]</sup>,影响 NF- $\kappa$ B、JAK-START、PI3K 等信号途径。已经发现 SHP2 多种激活突变参与多种肿瘤的发生发展<sup>[6-8]</sup>。但激活突变 SHP2 与环境污染污染物联合协同作用的机制不清,阐明之有助于解决肿瘤高发和早发问题。但肿瘤发生的分子机制很复杂,其中 miRNA 是新近发现的可能参与包括肿瘤在内的多种疾病发生发展的主要分子之一,miRNA 也就是通常所说的微小核糖核苷酸,是一类非编码的单链 RNA,大约含有 18~25 个核苷酸<sup>[9]</sup>。研究发现,它主要是通过靶 mRNA 的 3'-UTR 区完全或部分结合从而使靶基因降解或沉默,进而影响

肿瘤的发生和发展,发挥了类似于癌基因或抑癌基因的作用,同一个 miRNA 可能同时调控几个不同的 mRNA,同一个 mRNA 也可以受到几个不同的 miRNA 的调节,类似于基因密码子的匹配机制,因此,人体内大约有 30% 的蛋白受到 miRNA 的调控,在细胞内形成了一个非常大的网络<sup>[10]</sup>,MiRNA 的发现为肿瘤的研究提供了一个新视野,很多研究发现,miRNAs 与肿瘤细胞的增殖、凋亡及迁移等都有着密切的关系<sup>[11]</sup>,miRNAs 异常表达可能参与了环境因素促发肿瘤的过程。因此,本研究为了初步探测 miRNAs 在肿瘤形成中的作用,建立了环境及基因突变的 MEFs 细胞,基因芯片技术检测砷处理 48h 后的 MEFs 细胞和 SHP2<sup>D61G/+</sup> 突变的 MEFs 细胞的 miRNA 表达谱,探讨 miRNAs 表达变异情况,并选取两个变异趋势随砷处理和基因突变一致的两个 miRNA 做 RT-PCR 检测,发现 mmu-miRNA-100 的表达随处理递减;mmu-miRNA-1907 的表达随处理递增,为我们进一步研究 miRNA 在致瘤中的机制做准备。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂与仪器

DMEM、FBS(均为 GIBCO 公司生产,美国)、三氧化二砷(为 Sigam 公司生产,美国)、RT-PCR 试剂盒、引物(为上海吉玛公司生产,中国上海)、总 RNA 提取试剂和 Trizol(为 Invitrogen 公司生产,美国)、倒置显微镜(Olympus IX71,日本)、CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(Thermos 公司,美国)。

#### 1.1.2 实验动物

SPF 级 C57BL/6 品系 SHP2<sup>D61G/+</sup> 小鼠,6 周龄,雌/雄,体重 18~20 g,美国 Case Western Reserve 大学瞿成奎教授赠送,由安徽医科大学动物中心繁育【SCXK(皖)2011-002】在安徽医科大学实验动物中心无特定病原体(specific-pathogen free,SPF)的饲

养间【SYXK(皖)2011-007】饲养,所有实验操作程序均经过实验动物研究所实验动物使用管理委员会批准(LLSC211-002)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

MEFs 细胞以 DMEM + 10% FBS 培养,培养基内含 100IU/mL 青霉素和链霉素,细胞在 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 恒温细胞培养箱内培养。

### 1.2.2 MEFs 细胞建立及永生化的

取雌雄小鼠合笼交配,第二天早上观察雌鼠的阴道口,若有阴道栓表明已怀孕 0.5 d,待胚胎 6.5 d 后解剖雌鼠,在超净台操作,以高压灭菌的 PBS 清洗分离胚胎,制备胚胎组织块,分别接种不同的培养皿,细胞在 10% FBS 的 DMEM 培养基中,37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h, SHP2<sup>+/+</sup> MEF 即组织周围伸展生长出的细胞,留取细胞继续培养并以 SV40T 抗原进行永生化的备用; SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs 细胞制备方法类似:取雌雄 SHP2<sup>D61G/+</sup> 小鼠合笼交配,同样的分离 6.5 d 的胚胎,制备组织块接种不同的细胞培养皿,并且留取部分组织做基因型鉴定,根据基因型鉴定结果留取 SHP2<sup>D61G/+</sup> 的 MEFs 细胞,继续培养并以 SV40T 抗原进行永生化的备用。

### 1.2.3 重金属化合物 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 MEFs 细胞

取 1 × 10<sup>6</sup> 对数期生长的 MEFs 细胞接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶,待细胞贴壁后,以 0.5 μmol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 48 h,以 PBS 洗三遍,加胰酶消化细胞,待细胞变圆后加入细胞培养基终止消化,吹打细胞后收集至离心管中 900 r/min 离心,弃上清,以 PBS 冲洗三次。以 Trizol 试剂盒提取细胞及组织总 RNA,1 mL 的 Trizol 裂解 1 × 10<sup>7</sup> 个细胞,之后,在 1 mL 的 Trizol 中加入 200 μL 氯仿,震荡 10 s,冰置 3 min,4℃, 12000 r/min 离心 10 min,小心吸取上层水相至 1.5 mL 管中,加等量或稍多的异丙醇,轻轻颠倒混匀 3 次,冰置 10 min,4℃, 12000 r/min 离心 10 min,弃上清,加 75% 乙醇,4℃, 7500 r/min 离心 15 min,弃上清,75% 乙醇重复洗涤一次,弃上清,室温晾约 5 min,加入约 50 μL DEPC 水冰上溶解,紫外分光光度计测定其浓度,-80℃ 保存。

### 1.2.4 miRNA 芯片杂交分析

因为 miRNA 仅含有二十个碱基左右,特异性很高,因此,每个 miRNA 需用两条引物才能识别,每条引物只能识别 miRNA 序列的一半,一条引物携带标示序列 Tag,另一条引物携带 T7 启动子序列,只有

两条序列都与 miRNA 完全匹配才能形成 RNA/DNA 杂合体。之后,以磁珠分离出 RNA/DNA 杂合体,在 T4 连接酶的作用下,连接为一个 DNA 片段再转录,转录的 RNA 序列再与含有不同 miRNA 序列的膜杂交,加入含有辣根过氧化物酶 HRP 的亲合素反应,最后加入发光底物进行测定。

### 1.2.5 聚合酶链式反应 RT-PCR

以吉玛提供的 MiR-RT primers 引物、2 μL RNA、4 μL RT Buffer、0.75 μL dNTP、0.2 μL MMLV 或 AMV、DEPC 水配成 20 μL 反应体系,反应条件为 16℃, 30 min, 42℃, 30 min, 85℃, 10 min, 逆转录产物保存在 -20℃。逆转录产物稀释 3~4 倍后取 2 μL 或 4 μL 作为模板,作体系为 20 μL 或 40 μL 的 PCR 反应,20 μL 体系的反应混合物包含 2 × PCR Buffer 10 μL、miR specific Primer set (5 μM) 0.35 μL、miRNA RT product、2 μL、Taq DNA polymerase (5 u/μL) 0.2 μL、加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应条件为: 95℃ 变性 3 min 后, 95℃, 12 s, 62℃, 50 s, 40 个循环, 5% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2.6 统计分析

SPASS13.0 统计软件对数据进行方差分析,数据采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm S$ ) 表示,每个试验指标均重复 3 次,数据进行方差分析,以  $P < 0.05$  为差异显著。

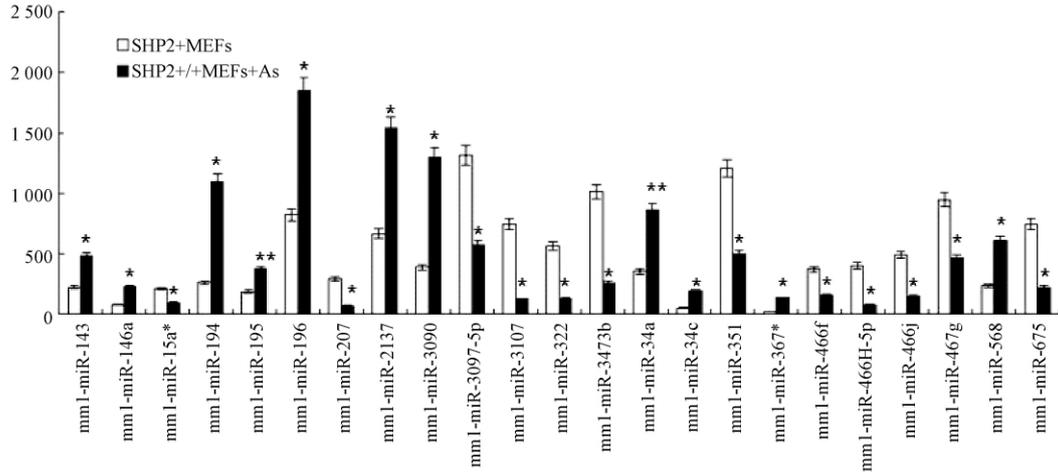
## 2 结果

### 2.1 miRNA 芯片杂交分析 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 SHP2<sup>+/+</sup> MEFs 细胞 miRNA 表达谱的影响

提取 0.5 μmol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 48h 的 SHP2<sup>+/+</sup> MEFs 细胞总 RNA,做 miRNAs 芯片杂交分析,观察 miRNAs 表达谱变化情况,筛选出表达差异明显者,并选取二十三个变异明显的 miRNA 做前期报道,如图 1 所示,23 个 miRNAs 表达出现明显变化,且变异皆在两倍以上。

### 2.2 miRNA 芯片杂交分析 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs miRNA 表达谱的影响

收集 0.5 μmol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 48 h 的 SHP2<sup>D61G/+</sup> 突变的 MEFs 细胞,提取总 RNA,做 miRNAs 芯片杂交分析,观察 miRNAs 表达谱变化情况,筛选出表达差异明显者,并选取二十个变异明显的 miRNAs 做前期报道,如图 2 所示,20 个 miRNA 表达出现明显变化,且变异亦皆在两倍以上。

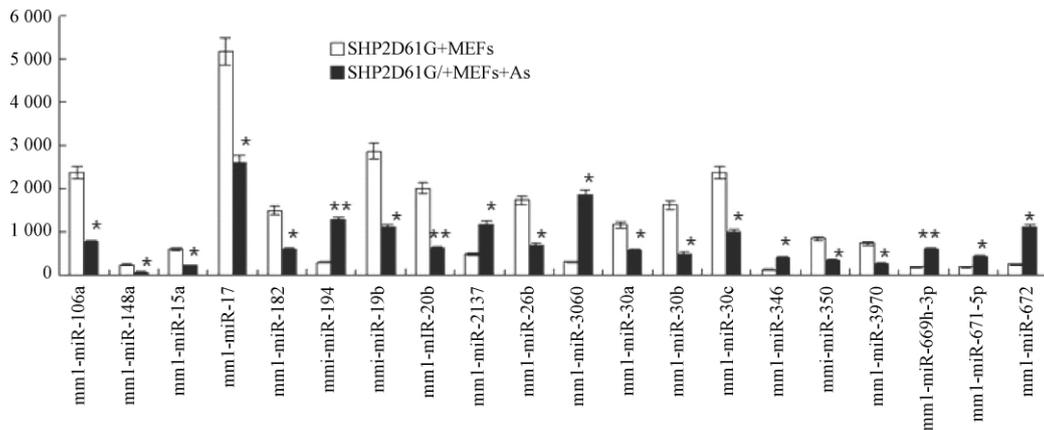


注:提取经过三氧化二砷处理 48 h 的 SHP2<sup>+/+</sup> MEFs 细胞总 RNA 进行 miRNAs 表达谱分析,数个 miRNAs 表达发生变化,图示有 23 个变异明显的 miRNAs,实验结果重复三次,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

图 1 miRNAs 表达谱芯片杂交分析结果

Note: Extraction the total RNA of SHP2<sup>+/+</sup> MEFs treated by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> after 48 h, then do miRNAs expression profile analysis a lot of miRNAs' expression changed, there are 23 miRNAs changed obviously in the figure, the experimental results were repeated three times,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Fig. 1 The result of miRNAs expression profiling of SHP2<sup>+/+</sup> MEFs



注:提取经过三氧化二砷处理 48 h 的 SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs 细胞总 RNA 进行 miRNAs 表达谱分析,数个 miRNAs 表达发生变化,图示有 20 个变异明显的 miRNAs,实验结果重复三次,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

图 2 miRNAs 表达谱芯片杂交分析结果

Note: Extraction the total RNA of SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs treated by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> after 48h, then do miRNAs expression profile analysis a lot of miRNAs' expression changed, there are 230miRNAs changed obviously in the figure, the experimental results were repeated three times,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Fig. 2 The result of miRNAs expression profiling of SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs

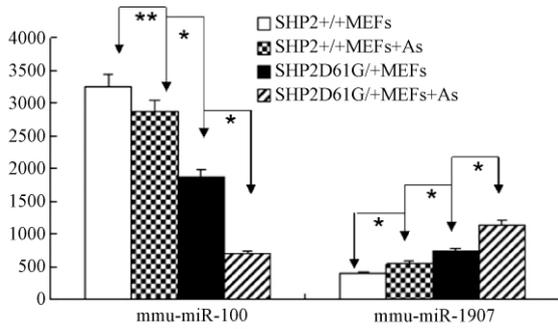
### 2.3 受环境因素和基因因素影响一致的 miRNAs

在对 miRNAs 表达谱进行分析的过程中发现有的 miRNA 在三氧化二砷诱导和基因突变影响下出现一致的变化,如图 3,在 SHP2<sup>+/+</sup> MEFs、SHP2<sup>+/+</sup> MEFs + As、SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs、SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs + As 四种细胞中 mmu-miR-100 表达递减,mmu-miR-1907

表达递增。

### 2.4 聚合酶链式反应 RT-PCR 检测 mmu-miRNA-100 和 mmu-miRNA-1907 表达

提取 SHP2<sup>+/+</sup> MEFs、SHP2<sup>+/+</sup> MEFs + As、SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs、SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs + As 四种细胞的总 RNA,不同的引物扩增 mmu-miR-100 和 mmu-



注:在几种细胞中 mmu-miR-100 和 mmu-miR-1907 表达呈现一致的变化趋势,实验结果重复三次,\* P < 0.05,\*\*P < 0.01。

图 3 miRNAs 变异趋势分析

Note: In several cell lines, the expression of mmu-miRNA-100 and mmu-miRNA-1907 exhibit a same trend, the experimental results were repeated three times, \* P < 0.05, \*\*P < 0.01.

Fig. 3 The analysis of miRNAs trend

miR-1907 以 5% 的琼脂糖凝胶电泳拍照分析,如图 4, mmu-miRNA-100 表达在 SHP2<sup>+/+</sup> MEFs、SHP2<sup>+/+</sup> MEFs + As、SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs、SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs + As 四种细胞中表达递减,mmu-miRNA-1907 表达递增。

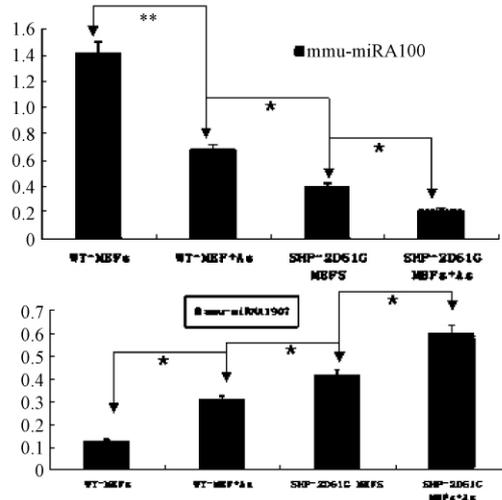
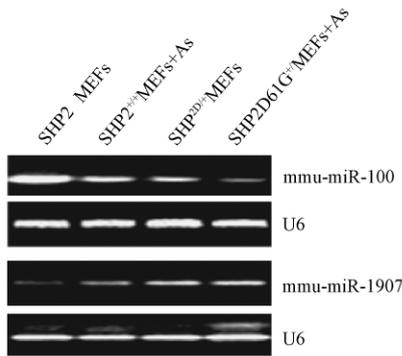
### 3 讨论

肿瘤是近几年的一个研究热点,是一类严重威

胁人类健康的疾病,全世界每年有癌症病人约 4500 万,新发病例 1300 万,每年因癌症死亡的约 800 万,我国的癌症发病率居世界第二<sup>[12]</sup>。肿瘤从本质上说是细胞的基因失去对正常生长和凋亡控制导致的异常增生,据卫生部统计显示,我国恶性肿瘤发病率一直呈上升趋势,患病人数不断增加,且有年轻化的趋势,对人类健康的危害极大,因此,探讨肿瘤发生机制是医学研究领域的一个热点问题。

诸多研究表明,肿瘤发生是环境因素和遗传因素共同作用的结果,其中环境因素主要包括环境污染和不良生活习惯等,环境因素中的某些有害物质如重金属污染物、尼古丁和酒精等可通过诱发机体的氧化应激,产生大量氧自由基,损伤细胞遗传物质,激活体内某些信号途径,导致细胞的异常增殖和凋亡障碍<sup>[13,14]</sup>。随着现代化进程的加速,环境污染日益严重,人们面临的的生活压力和生活习惯也发生了重大变化,致使肿瘤发病率不断提高,但肿瘤早发的原因并不清楚,我们推断:一方面环境污染通过促进基因突变致瘤,另一方面基因突变的机体或对环境因素更加敏感,可能是导致肿瘤发病人群年轻化的主要原因,对于探讨肿瘤发生发展的机制意义重大。

MicroRNA 是人类基因组计划实施以来作为基因非编码序列一员受到最多关注的一个,最早发现



注:RT-PCR 实验检测 mmu-miR-100 和 mmu-miR-1907 表达情况,与芯片杂交分析的结果相一致,mmu-miR-100 表达递减,mmu-miR-1907 表达递增,实验结果重复三次,\* P < 0.05,\*\*P < 0.01。

图 4 RT-PCR 结果分析

Note: RT-PCR assay to detect mmu-miR-100 and mmu-miR-1907 expression, consistent with the micro-array analysis results, the mmu-miR-100 expression was decreased, mmu-miR-1907 expression increased, the experimental results were repeated three times, \* P < 0.05, \*\*P < 0.01.

Fig. 4 The results of RT-PCR analysis

的 miRNA 是在线虫中的 let-4 和 let-7<sup>[15,16]</sup>。自被发现以来,诸多研究者通过实验研究发现上千种 miRNA。MiRNA 表达上具有阶段性和组织特异性,这种特异性对机体正常生长发育起到重要调节作用,对发挥其自身的调控作用也意义重大<sup>[17]</sup>,研究表明,它与多种肿瘤的发生密切相关,如白血病、乳腺癌、宫颈癌等<sup>[18]</sup>。MiRs 主要是通过与其靶 mRNA 的 3'-UTR 区完全或部分互补结合从而使靶基因降解或沉默,进而影响肿瘤的发生和发展,发挥了类似癌基因或抑癌基因作用。MiRs 与多条信号通路密切相关,比如重要的抑癌基因 P53,又如细胞抗凋亡 BCL-2 蛋白家族等<sup>[19]</sup>。在我们的研究中,首先是以 miRNA 芯片杂交技术筛选出数十种变异明显的 miRNA,并分析变化趋势,有的 miRNA 在 SHP2<sup>+/+</sup> MEFs、SHP2<sup>+/+</sup> MEFs + As、SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs、SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs + As 四种细胞中呈现一致的变化趋势,如 mmu-miR-100 表达逐渐减少、mmu-miR-1907 表达逐渐增多,通过 RT-PCR 实验验证得到的结果与芯片杂交分析结果一致,验证了芯片杂交结果的可靠性。

三氧化二砷处理的 SHP2<sup>+/+</sup> MEFs 细胞和 SHP2<sup>D61G/+</sup> MEFs 细胞中变化趋势一致的两个 miRNA (mmu-miRNA-100、mmu-miRNA-1907),其生物学功能在国内外文献中都尚未报道,这是我们寻找参考资料的一个难点,同时也是我们研究的一个创新所在,我们将通过生物学信息预测及荧光素酶报告基因等方法寻找其作用靶点,探讨它们所参与的信号通路,进一步了解它们在细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭等生物学行为中发挥的作用。此外,我们将探讨这两个 miRNA 在临床病人癌组织相对癌旁组织中的表达差异,对其在人类肿瘤发生中的作用进行验证,阐明它们在肿瘤形成、发展中的作用及机制,使得本文的研究有所新发现。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 重金属污染综合防治分析. 中国投资研究网. 2012 [2012 - 09 - 14]. <http://baike.baidu.com/view/282970.htm>.
- [ 2 ] Veuger Stephany J, Durkacz Barbara W. Persistence of unrepaired DNA double strand breaks caused by inhibition of ATM does not lead to radio-sensitisation in the absence of NF- $\kappa$ B activation [J]. Discover Ref doc, 2011, 10(2): 235 - 244.
- [ 3 ] Siying Wang, Wen-Mei Yu, Wanming Zhang, et al. Noonan syndrome/leukemia-associated gain-of-function mutations in SHP-2 phosphatase ( PTPN11 ) enhance cell migration and angiogenesis [J]. J. Biol. Chem. , 2009, 284( 2 ): 913 - 920.
- [ 4 ] Zhong-Qing Shi, Carmen R. Sunico, et al. Lipton S-nitrosylated SHP-2 contributes to NMDA receptor-mediated excitotoxicity in acute ischemic stroke [J]. PNAS, 2013, 110 ( 8 ): 3137 - 3142.
- [ 5 ] Dan Xu, Siying Wang, Wen-Mei Yu, et al. A germline gain-of-function mutation in Ptpn11 ( Shp-2 ) phosphatase induces myeloproliferative disease by aberrant activation of hematopoietic stem cells [J]. Blood 2010, 116( 18 ): 3611 - 3621.
- [ 6 ] Grossmann KS. The tyrosine phosphatase Shp2 in development and cancer [J]. Cancer Res, 2010, 106: 53 - 89.
- [ 7 ] Bouyain S, Watkins DJ. Identification of tyrosine phosphatase ligands for cont-actin cell adhesion molecules [J]. Commune Integer Biol 2010, 3(3): 284 - 286.
- [ 8 ] Serra V, Scaltriti, L Prudkin, et al. PI3K inhibition results in enhanced HER Signaling and acquired ERK dependency in HER2-over-expressing breast cancer [J]. Oncogene, 2011, 30, 2547 - 2557.
- [ 9 ] 王海林,刘嘉琳,宗园媛,等. Mir-106b 对阿尔茨海默病昼夜节律调控的初步研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20( 4 ): 19 - 23.
- [ 10 ] David P. Bartel. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions [J]. Cell. , 2009, 136, ( 2 ): 215 - 233.
- [ 11 ] Carlo M. Croce. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer [J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10: 704 - 714.
- [ 12 ] Ne Long, Malcolm Moore, Wanqing Chen, et al. Cancer Epidemiology and Control in North-East Asia - Past, Present and Future [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2010, 10: 107 - 148.
- [ 13 ] Zdenko Herceg, Thomas Vaissière. Epigenetic mechanisms and cancer: An interface between the environment and the genome [J]. Epigenetics, 2011, 6( 7 ): 804 - 819.
- [ 14 ] JE Klauinig, LM Kamendulis, BA Hocevar. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis [J]. Toxicol Pathol, 2010, 38: ( 1 ) 96 - 109.
- [ 15 ] Shruti, K. Shrey, R. Vibha. MicroRNAs: Tiny sequences with enormous potential [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications 2011, 407 ( 3 ), 15: 445 - 449.
- [ 16 ] Pai-Sheng Chen, Jen-Liang Su, Shih-Ting Cha, et al. MiR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans [J]. J Clin Invest. , 2011, 121( 9 ): 3442 - 3455.
- [ 17 ] Joshua T. Mendell, Eric N. Olson. MicroRNAs in Stress Signaling and Human Disease [J]. Cell, 2012, 148( 6 ): 1172 - 1187.
- [ 18 ] Thaliana Farazi, Jessica I Spitzer, Pavel Morozov, et al. miRNAs in human cancer [J]. The Journal of Pathology, 2011, 223, ( 2 ): 102 - 115.
- [ 19 ] 刘鹏,王晓映,高宁,等. G 蛋白偶联受体激酶 5 在稳定表达  $\alpha$ -Synuclein 的 SHSY5 Y 细胞中的基因表达调控功能 [J]. 2010, 20( 2 ): 6 - 11.

(修回日期) 2013-04-16