

miR-128-3p 靶向 TCF4 抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖、侵袭和上皮-间充质转化*

侯绍蔚¹△, 张连清², 席海英², 赵爱玲³, 侯恒¹

(¹山西大同大学医学院, ²大同市第五人民医院皮肤科, ³大同市第五人民医院神经内科, 山西 大同 037009)

[摘要] 目的: 探究微小 RNA-128-3p(miR-128-3p) 对人黑色素瘤 A375 细胞增殖、侵袭和上皮-间充质转化的作用及其机制。方法: 用 miR-128 mimic 和/或转录因子 4(TCF4) 表达质粒 pcDNA-TCF4(pc-TCF4) 转染 A375 细胞, RT-qPCR 检测 miR-128-3p 的表达, Western blot 法检测 TCF4 的表达, 萤光素酶报告实验证明 miR-128-3p 和 TCF4 的靶向关系; Transwell 检测细胞的侵袭能力; Western blot 法检测上皮标志蛋白 E-cadherin 和间充质标志蛋白 vimentin 的表达及 TCF4 下游靶分子 cyclin D 和 c-Myc 的蛋白表达水平。结果: 过表达 miR-128-3p 能显著抑制 TCF4 的表达($P < 0.01$), 而转染 pc-TCF4 能明显减弱 miR-128-3p 对 TCF4 表达的抑制作用, miR-128-3p 能显著减弱 TCF4 野生型质粒的萤光素酶活性($P < 0.01$); miR-128-3p 能显著抑制 A375 细胞增殖($P < 0.01$), 显著减少侵袭细胞数($P < 0.01$); 除此之外, miR-128-3p 还能显著降低 vimentin、cyclin D 和 c-Myc 的表达水平($P < 0.01$), 显著升高 E-cadherin($P < 0.01$) 的表达水平。结论: miR-128-3p 能抑制黑色素瘤 A375 细胞的增殖、侵袭和上皮-间充质转化, 作用机制与靶向 TCF4 及抑制其下游靶基因的表达有关。

[关键词] 黑色素瘤; 微小 RNA-128-3p; 细胞侵袭; 上皮-间充质转化; 转录因子 4

[中图分类号] R730.23; R739.5

[文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.11.012

miR-128-3p targeting TCF4 in melanoma A375 cells inhibits proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition

HOU Shao-wei¹, ZHANG Lian-qing², XI Hai-ying², ZHAO Ai-ling³, HOU Heng¹

(¹Shanxi Datong University Medical College, ²Dermatology Department of Datong Fifth People's Hospital, ³Neurology Department of Datong Fifth People's Hospital, Datong 037009, China. E-mail: hsw0352@126.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To explore the effects of microRNA-128-3p (miR-128-3p) on proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human melanoma A375 cells and the possible mechanisms. **METHODS:** miR-128 mimic and/or transcription factor 4 (TCF4) expression plasmid pcDNA-TCF4 (pc-TCF4) were transfected into the A375 cells. The expression of miR-128-3p was detected by RT-qPCR, and the expression of TCF4 was determined by Western blot. Luciferase reporter assay was used to confirm the relationship between miR-128-3p and TCF4. The invasion ability of A375 cells was measured by Transwell assay. The expression levels of EMT-related proteins, including E-cadherin and vimentin, and the down-stream target molecules of TCF4, including cyclin D and c-Myc, were determined by Western blot. **RESULTS:** Over-expression of miR-128-3p significantly inhibited the expression of TCF4 ($P < 0.01$), while transfection of pc-TCF4 significantly reduced the inhibitory effect, and miR-128-3p also significantly reduced luciferase activity of wild-type TCF4 plasmid ($P < 0.01$). miR-128-3p significantly reduced positive cells labeled by EdU ($P < 0.01$). Meanwhile, miR-128-3p significantly decreased the number of invasive A375 cells ($P < 0.01$). In addition, the protein levels of vimentin, cyclin D and c-Myc ($P < 0.01$) were down-regulated by miR-128-3p, but the protein level of E-cadherin was up-regulated ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** miR-128-3p inhibits proliferation, invasion and EMT of A375 cells by inhibiting the expression of TCF4 and its downstream target genes.

[KEY WORDS] Melanoma; MicroRNA-128-3p; Cell invasion; Epithelial-mesenchymal transition; Transcription factor 4

黑色素瘤是一种恶性程度很高的肿瘤,是最致命的皮肤癌,其2年生成率为15%,5年生成率仅为5%。病理研究表明,黑色素瘤内有很多免疫细胞,可以据此开发针对免疫系统的治疗药物。近年来,利用人体自身免疫系统靶向治疗的方法已初见成效^[1-3]。研究表明,机体内各种肿瘤都存在对应的原癌基因和抑癌基因,原癌基因被激活、抑癌基因被抑制与肿瘤的发生有直接关系^[4]。研究表明,微小RNA-128-3p (microRNA-128-3p, miR-128-3p) 可以通过靶向抑癌基因抑制 T 淋巴细胞白血病、肝癌细胞和神经胶质瘤的增殖,其低表达可能提示患者的不良预后^[5-8]。Wnt 信号通路通常与机体器官发生相关,转录因子4 (transcription factor 4, TCF4) 是其重要调节蛋白,高表达 TCF4 可异常激活该通路使 β -catenin 转移到细胞核内,竞争性结合 TCF4,形成 β -catenin/TCF4 复合物,与此同时聚集且激活 TCF4 下游的转录因子,最终导致细胞异常增殖和肿瘤发生^[9-12]。本文以人黑色素瘤 A375 细胞为研究对象,探究高表达 miR-128-3p 对黑色素瘤 A375 细胞增殖、侵袭和上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的调控作用及其作用机制。

材 料 和 方 法

1 试剂与仪器

DMEM 细胞培养液、0.25% 胰酶和胎牛血清均购自 Gibco; miR-128 mimic 和 pcDNA-TCF4 (pc-TCF4) 由上海吉玛生物设计合成; Lipofectamine 2000 转染试剂盒、TRIzol 试剂盒、反转录试剂盒和荧光定量试剂盒购自 Thermo Fisher; I 抗和 II 抗均购自 Abcam; RIPA 裂解液购自 Sigma; BCA 试剂盒购自碧云天生物科技公司; Dual-Luciferase[®] Report 报告基因试剂盒购自 Promega; EdU 试剂盒购自广州锐博生物有限公司; Matrigel 购自 Invitrogen。

PCR 仪、电泳仪及半干转膜仪均购自美国伯乐公司; Gel View 6000 化学发光凝胶成像系统购自广州云星仪器有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养 人恶性黑色素瘤 A375 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,根据细胞生长情况,融合率达到 85% 以上进行传代培养。

2.2 细胞转染 将细胞传代培养于 12 孔板中,用培养液将细胞密度调整为 1×10^9 /L,每孔接种 1 mL 细胞悬液。将培养板置于上述培养条件下培养 24 h

后,根据转染试剂盒说明书采用 Lipofectamine 2000 将 miR-128 mimic 和/或 pc-TCF4 转染到 A375 细胞,转染 4 h 后更换正常培养液继续培养,48 h 后进行相关检测。

2.3 RT-qPCR 将细胞随机分为对照 (control) 组和 miR-128 mimic 组。control 组加入正常细胞培养液进行培养,miR-128 mimic 组加入含有 miR-128 mimic 的转染液进行培养。48 h 后用 Trizol 试剂提取细胞 RNA,用反转录试剂盒合成 miR-128-3p 的 cDNA,进行 PCR 扩增后,根据荧光定量 PCR 试剂盒对 cDNA 进行检测,以 GAPDH 为内参照。实验所用引物由上海生工设计合成。miR-128-3p 上游引物序列为 5'-UCACAGUGAACCGGUCUCUUU-3',下游引物序列为 5'-AGAGACCGGUUCACUGUGAUU-3'; GAPDH 的上游引物序列为 5'-GAGTCAACGGATTTGCTCGT-3',下游引物序列为 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'。

2.4 萤光素酶报告基因实验 首先,通过生物信息预测 TCF4 在 miR-128-3p 上的结合位点,并对结合位点片段进行扩增。随后将扩增片段插入 pcDNA 载体上,构建 TCF4 野生型质粒。利用基因位点突变技术将结合位点片段中部分核苷酸突变,构建 TCF4 突变型质粒。用 TCF4 野生型质粒或 TCF4 突变型质粒和 miR-128 mimic 对 A375 细胞进行共转染,根据 Dual-Luciferase[®] Report 报告基因试剂盒说明书检测各组萤光素酶活性。

2.5 EdU 染色检测细胞增殖 取第 3 代 A375 细胞,接种于 96 孔板内,每孔接种 2×10^7 /L 细胞悬液 200 μ L,细胞贴壁后,换终浓度为 10 μ mol/L 的 EdU 培养液,孵育 48 h,每组设 3 个重复孔。弃去培养液,PBS 清洗,多聚甲醛固定 30 min,按照说明书加入 Apollo 染色反应液 30 min 后,再加入 Hoechst 染色反应液 30 min,最后用 PBS 清洗 1 遍。每组每个孔随机取 3 个视野在荧光显微镜下观察计数并拍照。EdU 阳性细胞在绿光激发下发红色荧光,Hoechst 阳性细胞在紫外光激发下发蓝色荧光。EdU 阳性细胞标记率 (%) = 发红色荧光细胞数/发蓝色荧光细胞数 $\times 100\%$ 。

2.6 细胞侵袭实验 将转染后细胞传代接种于提前用 Matrigel 包被的 Transwell 小室上层,细胞密度为 4×10^8 /L,用不含胎牛血清的培养液培养,Transwell 小室下层则加入正常细胞培养液。连续培养 48 h 后用无菌棉签拭去小室上层细胞,用结晶紫将迁移至小室下层的 A375 细胞染色,每组随机选取 5 个视野对染色细胞进行基数统计。实验至少重复 3 次,每组 6 个复孔。

2.7 Western blot 实验 将细胞随机分为 control 组、miR-128 mimic 组、pc-TCF4 组和 miR-128 mimic + pc-TCF4 (mimic + pc-TCF4) 组,用 miR-128 mimic 和/或 pc-TCF4 转染 A375 细胞后,用 RIPA 蛋白裂解液于冰上提取各组细胞总蛋白,用 BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度并调平。每组取等量蛋白质用 12% SDS-PAGE 分离蛋白后,转移蛋白质到 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶室温封闭蛋白质 2 h,以 1 : 1 000 的浓度加入抗 TCF4、E-cadherin、vimentin、cyclin D 和 c-Myc 的 I 抗,4 ℃ 孵育过夜。第 2 天弃去 I 抗,用缓冲液清洗 PVDF 膜后,加入 II 抗,室温封闭 1 h 后,滴加 ECL 于暗室曝光显影。以 GAPDH 为内参照。

3 统计学处理

用统计软件 SPSS 19.0 对所有实验数据进行统

计分析,组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行检验。实验结果以均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 miR-128-3p 与 TCF4 的靶向关系

生物信息预测结果显示,miR-128-3p 序列上存在连续的 TCF4 结合位点,见图 1A。同时,采用萤光素酶报告实验进一步确定了 miR-128-3p 和 TCF4 的靶向关系。实验结果显示 miR-128-3p 能显著降低 TCF4 野生型质粒的萤光素酶活性 ($P < 0.01$),当 TCF4 上结合位点突变后,miR-128-3p 对 TCF4 质粒萤光素酶活性的抑制作用消失,见图 1D。

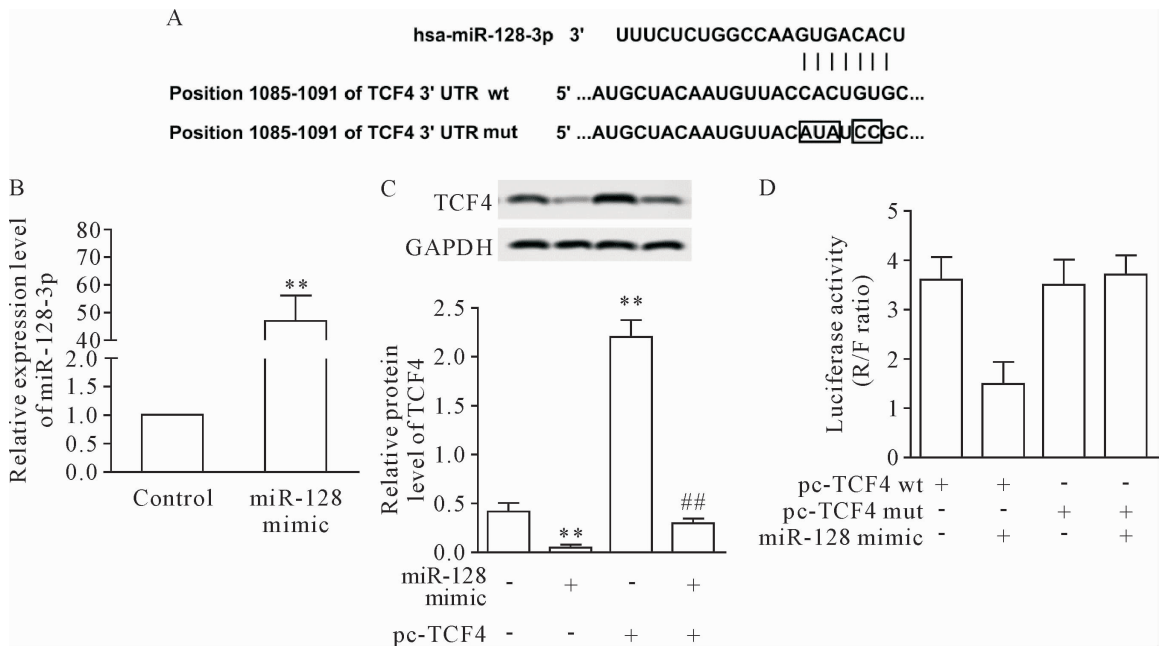


Figure 1. Targeting relationship between miR-128-3p and TCF4. Mean ± SD. $n = 9$. ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs pc-TCF4 group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs pc-TCF4 wt group.

图1 miR-128-3p 与 TCF4 的靶向关系

2 过表达 miR-128-3p 对黑色素瘤 A375 细胞表达 TCF4 的影响

RT-qPCR 和 Western blot 实验结果表明,miR-128 mimic 组 miR-128-3p 的表达水平较 control 组显著升高 ($P < 0.01$),见图 1B,说明过表达成功。与 control 组比较,miR-128 mimic 组的 TCF4 相对蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$),pc-TCF4 组的 TCF4 相对蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$);同时,miR-128 mimic + pc-TCF4 组与 pc-TCF4 组相比较,TCF4 的相对蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$),见图 1C,提示过表达 miR-128-3p 可以靶向抑制黑色素瘤

A375 细胞 TCF4 的蛋白表达。

3 过表达 miR-128-3p 抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖

Edu 标记的 A375 细胞孵育 48 h 后,镜下观察 Edu 阳性细胞数量。结果显示,与 control 组比较,miR-128 mimic 组的阳性细胞标记率显著降低 ($P < 0.01$),而 pc-TCF4 组的阳性细胞标记率显著升高 ($P < 0.01$),同时,mimic + pc-TCF4 组的阳性细胞标记率较 pc-TCF4 组显著降低 ($P < 0.01$),见图 2。这提示 miR-128-3p 可以通过靶向调节 TCF4 的表达抑制黑色素瘤 A375 细胞的增殖。

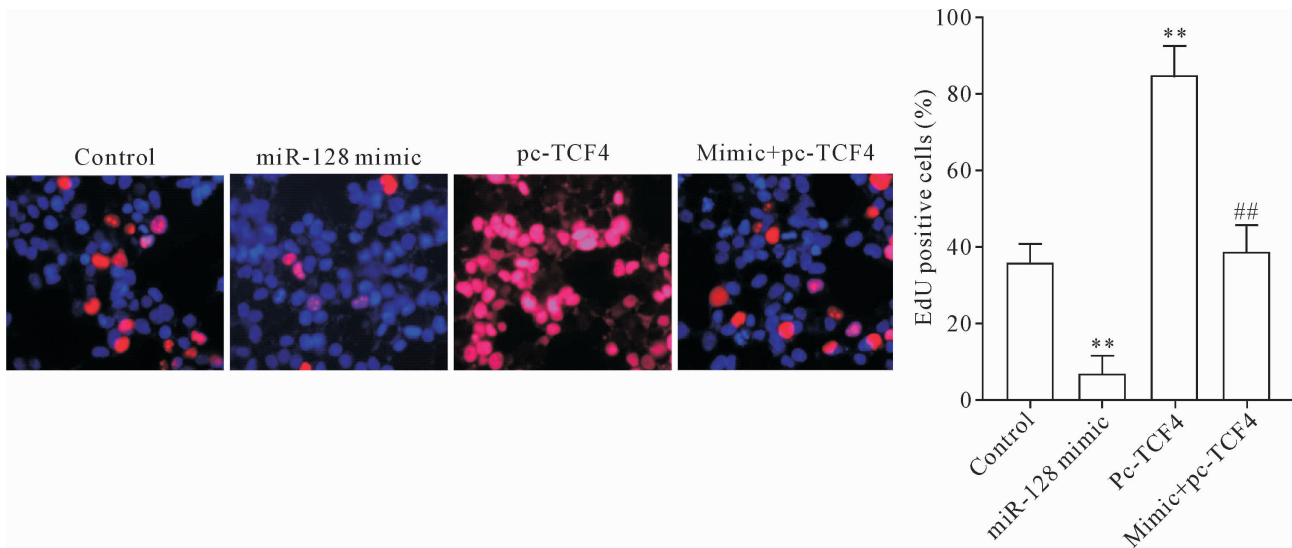


Figure 2. The effect of miR-128-3p on the proliferation of melanoma A375 cells (Apollo and Hoechst staining, $\times 400$). Mean \pm SD. $n = 9$. ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs pc-TCF4 group.

图2 miR-128-3p对黑色素瘤A375细胞增殖的影响

4 过表达 miR-128-3p 抑制黑色素瘤 A375 细胞的侵袭能力

采用侵袭实验检测过表达 miR-128-3p 对黑色素瘤 A375 细胞侵袭能力的影响,结果表明与 control 组比较,miR-128 mimic 组的侵袭细胞数显著减少($P <$

0.01),而 pc-TCF4 组侵袭细胞数显著增加($P < 0.01$);同时,mimic + pc-TCF4 组与 pc-TCF4 组比较,侵袭细胞数显著减少($P < 0.01$),见图 3。这表明 miR-128-3p 可通过抑制 TCF4 的表达降低黑色素瘤 A375 细胞的侵袭能力。

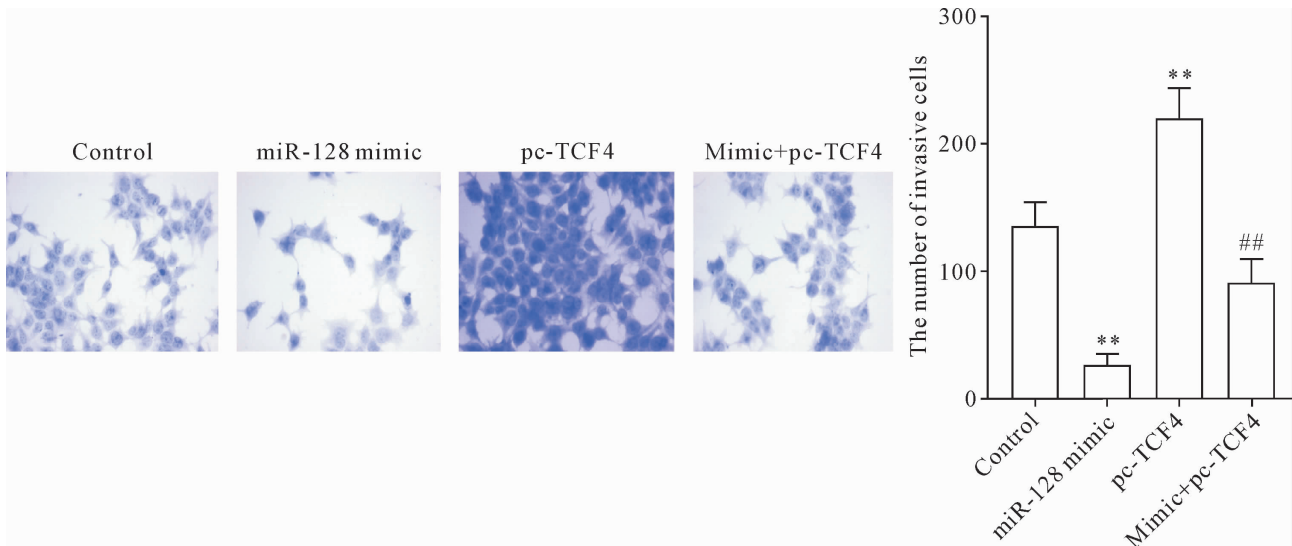


Figure 3. The effect of miR-128-3p on the invasion ability of melanoma A375 cells (crystal violet staining, $\times 400$). Mean \pm SD. $n = 9$. ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs pc-TCF4 group.

图3 miR-128-3p对黑色素瘤A375细胞侵袭能力的影响

5 过表达 miR-128-3p 抑制黑色素瘤 A375 细胞 EMT 的发生

将各组细胞置于倒置显微镜下观察细胞形态可见,与 control 组比较,miR-128 mimic 组细胞形态多呈卵圆形或方形,排列紧密;pc-TCF4 组细胞形态多呈长梭形,排列疏松;而 mimic + pc-TCF4 组较 pc-TCF4 组相比,细胞形态多呈梭形,但细胞排列更为

紧密,见图 4A。

Western blot 检测转染 miR-128-3p 后对黑色素瘤 A375 细胞 EMT 标志物表达的影响,结果显示与 control 组比较,miR-128 mimic 组的 E-cadherin 表达水平显著升高,vimentin 表达水平显著降低($P < 0.01$)。而与 control 组比较,pc-TCF4 组 E-cadherin 表达水平显著降低,vimentin 表达水平显著升高

($P < 0.01$)。与 pc-TCF4 组相比, mimic + pc-TCF4 组 E-cadherin 表达水平显著升高, vimentin 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$), 见图 4B。

综上所述, miR-128-3p 可通过抑制间充质标志蛋白 vimentin、增加上皮标志蛋白 E-cadherin 的表达而抑制 A375 细胞的 EMT 能力。

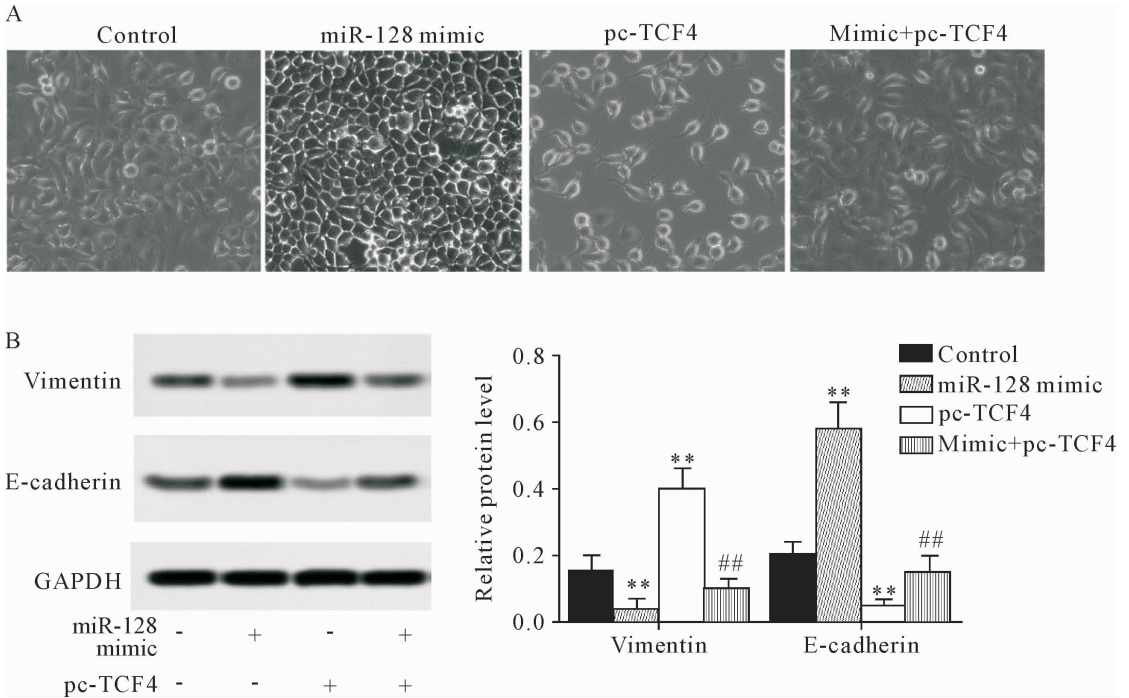


Figure 4. The effect of miR-128-3p on EMT of melanoma A375 cells. Mean \pm SD. $n = 9$. ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs pc-TCF4 group.

图 4 miR-128-3p 对黑色素瘤 A375 细胞 EMT 的影响

6 过表达 miR-128-3p 抑制黑色素瘤 A375 细胞 TCF4 下游靶基因的蛋白表达

Western blot 检测转染 miR-128-3p 后对黑色素瘤 A375 细胞 TCF4 下游分子 cyclin D 和 c-Myc 表达的影响, 结果显示, 与 control 组比较, miR-128-mimic 组 cyclin D 和 c-Myc 的蛋白表达水平均显著降低

($P < 0.01$), 而 pc-TCF4 组两者的表达水平均显著升高($P < 0.01$); 同时, mimic + pc-TCF4 组两者的表达水平较 pc-TCF4 组显著降低($P < 0.01$), 见图 5。这提示过表达 miR-128-3p 可以显著抑制 TCF4 下游分子 cyclin D 和 c-Myc 的表达水平。

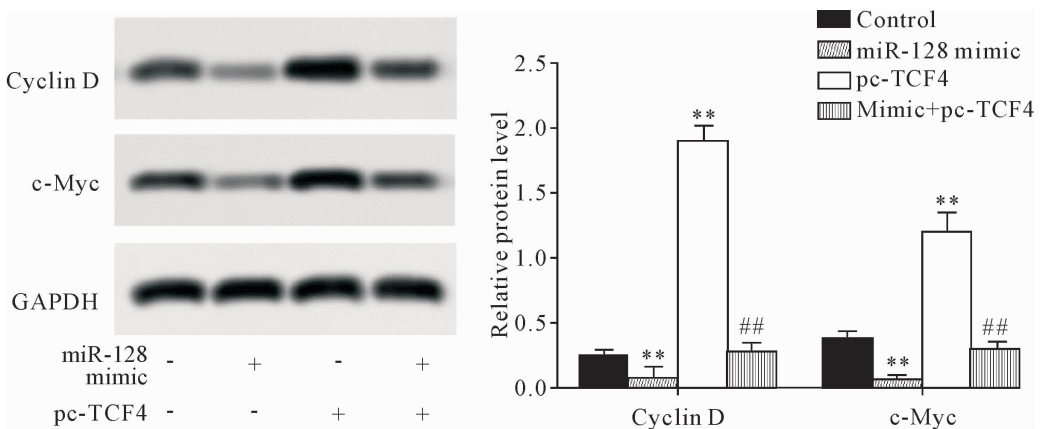


Figure 5. The effects of miR-128-3p on the protein expression of cyclin D and c-Myc in the melanoma A375 cells. Mean \pm SD. $n = 9$. ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs pc-TCF4 group.

图 5 miR-128-3p 对黑色素瘤 A375 细胞 cyclin D 和 c-Myc 蛋白表达的影响

讨 论

研究表明,人体有超过 60% 的蛋白质编码基因上都具有 miRNAs 的结合位点,在细胞生长、增殖、凋亡和迁移过程中具有重要的调控作用,同时可以通过调控蛋白编码基因的表达影响癌症的发生和发展^[13-14]。但是 miR-128-3p 与 TCF4 的靶向关系还未得到证实。本实验研究表明,miR-128-3p 可以靶向结合 TCF4 而抑制其表达,而 pc-TCF4 能明显减弱 miR-128-3p 对 TCF4 表达的抑制作用。

影响肿瘤细胞增殖是 miRNAs 抑制肿瘤/癌症发生发展的重要机制。大量研究表明,miR-199a/b-3p 在多种癌症中表现出抑癌基因和抑制细胞增殖的作用,包括肝癌、甲状腺乳头状癌、子宫内膜腺癌、肾细胞癌、骨肉瘤、卵巢癌和胃癌^[4]。双荧光素酶报告分析证实 miR-330-3p 靶向 TPX2,负向调节 TPX2 的表达,从而抑制黑色素瘤细胞的增殖^[15]。miR-128-3p 也可以通过靶向抑癌基因抑制 T 淋巴细胞白血病、肝癌细胞和神经胶质瘤的增殖^[5-8]。靶向调控 TCF4 可以抑制人成纤维细胞的增殖^[16]。为了探讨 miR-128-3p 能否通过靶向 TCF4 调控黑色素瘤 A375 细胞的增殖能力,本实验发现,TCF4 能促进 A375 细胞增殖,但 miR-128-3p 能通过靶向抑制 TCF4 的表达而降低黑色素瘤 A375 细胞的增殖。

另外,研究表明,可通过调控 miR-128-3p 的表达抑制基底细胞样乳腺癌细胞迁移^[17],同时 miR-128-3p 的过表达也可以靶向调节 *DJ-1* 基因的表达而促进肝癌细胞的凋亡,从而对抗癌药索拉菲尼产生较好的反应^[18],且 miR-128-3p 可以抑制高度恶性非小细胞肺癌的转移和耐药性^[19]。但 miR-128-3p 对黑色素瘤细胞迁移能力的影响还未见报道。本文研究发现,黑色素瘤 A375 细胞过表达 miR-128-3p 后侵袭细胞数量明显减少,说明 miR-128-3p 能抑制黑色素瘤 A375 细胞的侵袭,同时,过表达 TCF4 后,侵袭细胞数量明显增加。说明,TCF4 能增强 A375 细胞的侵袭能力,但 miR-128-3p 能通过靶向抑制 TCF4 的表达而抑制 A375 细胞的侵袭能力。

EMT 是指上皮细胞失去极性和细胞获得间充质特性从而增加细胞转移和侵袭能力的过程^[20-21],是多种肿瘤发生转移和侵袭的重要过程。E-cadherin 被认为是此过程的基础,E-cadherin 参与并介导细胞之间相互黏附,是一种重要的细胞黏附因子,与多种肿瘤的侵袭和转移有不可分割的联系,它的低表达或者表达缺失被认为是肿瘤 EMT 的关键步骤^[22]。研究发现^[23],犬肾脏上皮细胞过度表达 TCF4 能增

加细胞侵袭能力,从而加速肿瘤 EMT 的发生,其中可见上皮标志蛋白 E-cadherin 的明显下调和间充质标志蛋白 vimentin 的表达上升。miR-128-3p 能作为肿瘤抑制因子通过靶向 ZEB1 抑制食管鳞状细胞癌的转移和 EMT^[24]。另有报道称,通过下调 Wnt/ β -catenin 信号通路,miR-128-3p 可以抑制非小细胞肺癌 EMT^[19]。为了证明 miR-128-3p 能否靶向 TCF4 抑制黑色素瘤细胞的 EMT,我们通过实验发现:在倒置显微镜下,过表达 miR-128-3p 的细胞形态呈卵圆形或方形并且排列紧密;同时可高表达上皮标志蛋白 E-cadherin,低表达间充质标志蛋白 vimentin,而 TCF4 可以减弱 miR-128-3p 对 E-cadherin 和 vimentin 的调节作用。这说明在 A375 细胞中 miR-128-3p 可抑制 A375 细胞之间极性丧失,阻止其向间充质细胞发展,降低细胞的侵袭和转移能力,抑制 A375 细胞 EMT 的发生。

当 Wnt 信号通路激活时, β -catenin 转移到核内竞争性结合 TCF4 形成 β -catenin/TCF4 复合物,激活 TCF4 下游的转录因子,如 cyclin D 和 c-Myc,最终导致细胞异常增殖和肿瘤发生^[10]。研究表明,Wnt 信号的突变异常激活 TCF4 靶基因可以促进结直肠癌的恶性转化^[25]。本实验过表达 miR-128-3p 后发现黑色素瘤 A375 细胞内 cyclin D 和 c-Myc 蛋白表达水平均有明显下调,但同时表达 TCF4 后,两者的表达水平明显上调。这说明 miR-128-3p 能靶向抑制 TCF4 对 cyclin D 和 c-Myc 蛋白表达水平的上调作用。

综上所述,本文初步探讨了 miR-128-3p 在黑色素瘤 A375 细胞增殖、侵袭和 EMT 中的作用,说明 miR-128-3p 可以通过靶向抑制 TCF4 表达而实现对 A375 细胞增殖、侵袭和 EMT 的抑制作用,为进一步研究 miR-128-3p 在肿瘤发生发展过程中的作用提供了新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Owens B. Melanoma [J]. Nature, 2014, 515 (7527): S109.
- [2] Ko JS. The immunology of melanoma [J]. Clin Lab Med, 2017, 37(3):449-471.
- [3] Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, et al. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(8):463-482.
- [4] Zeng B, Shi W, Tan G. MiR-199a/b-3p inhibits gastric cancer cell proliferation via down-regulating PAK4/MEK/ERK signaling pathway [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 34.

- [5] Mets E, Van Peer G, Van der Meulen J, et al. MicroRNA-128-3p is a novel oncomiR targeting PHF6 in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Haematologica*, 2014, 99(8):1326-1333.
- [6] Huang CY, Huang XP, Zhu JY, et al. miR-128-3p suppresses hepatocellular carcinoma proliferation by regulating PIK3R1 and is correlated with the prognosis of HCC patients[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6):2889-2898.
- [7] Yu D, Green B, Marrone A, et al. Suppression of CYP2C9 by microRNA hsa-miR-128-3p in human liver cells and association with hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:8534.
- [8] Fu C, Li D, Zhang X, et al. LncRNA PVT1 facilitates tumorigenesis and progression of glioma via regulation of miR-128-3p/GREMI axis and BMP signaling pathway [J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(4):1139-1157.
- [9] Xu Z, Chen Y, Yu J, et al. TCF4 mediates the maintenance of neuropathic pain through Wnt/ β -catenin signaling following peripheral nerve injury in rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(2):397-408.
- [10] Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin [J]. *EMBO J*, 2012, 31(12):2714-2736.
- [11] Guturi KK, Sarkar M, Bhowmik A, et al. DEAD-box protein p68 is regulated by β -catenin/transcription factor 4 to maintain a positive feedback loop in control of breast cancer progression[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(6):496.
- [12] Schuijers J, Mokry M, Hatzis P, et al. Wnt-induced transcriptional activation is exclusively mediated by TCF/LEF [J]. *EMBO J*, 2014, 33(2):146-156.
- [13] Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9:287-314.
- [14] Xu W, San Lucas A, Wang Z, et al. Identifying microRNA targets in different gene regions[J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15(Suppl 7):S4.
- [15] Shin HW, Choi H, So D, et al. ITF2 prevents activation of the β -catenin-TCF4 complex in colon cancer cells and levels decrease with tumor progression[J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(2):430-442.
- [16] Wang Y, Lin P, Wang Q, et al. Wnt3a-regulated TCF4/ β -catenin complex directly activates the key Hedgehog signalling genes Smo and Gli1[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3):2101-2107.
- [17] Breunig C, Erdem N, Bott A, et al. TGF β 1 regulates HGF-induced cell migration and hepatocyte growth factor receptor MET expression via C-ets-1 and miR-128-3p in basal-like breast cancer[J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(9):1447-1463.
- [18] Guo XL, Wang HB, Yong JK, et al. MiR-128-3p overexpression sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib induced apoptosis through regulating DJ-1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(20):6667-6677.
- [19] Cai J, Fang L, Huang Y, et al. Simultaneous overactivation of Wnt/ β -catenin and TGF β signalling by miR-128-3p confers chemoresistance-associated metastasis in NSCLC [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15870.
- [20] Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2):131-142.
- [21] Przybyl L, Muncie JM, Weaver VM. Mechanical control of epithelial-to-mesenchymal transitions in development and cancer[J]. *Annu Rev Cell Biol*, 2016, 32:527-554.
- [22] Che XM, Hokita S, Nuruki K, et al. The expression of cadherin-catenin complex in association with the clinicopathologic features of early gastric cancer[J]. *Surg Today*, 1998, 28(6):587-594.
- [23] Sobrado VR, Moreno-Bueno G, Cubillo E, et al. The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 7):1014-1024.
- [24] Zhao L, Li R, Xu S, et al. Tumor suppressor miR-128-3p inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 in esophageal squamous-cell cancer [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(2):171-180.
- [25] Yao Y, Zuo J, Wei Y. Targeting of TRX2 by miR-330-3p in melanoma inhibits proliferation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107:1020-1029.

(责任编辑: 宋廷君, 罗 森)