

microRNA-10b 与胰腺癌吉西他滨耐药的相关性及机制研究

顾 燊^{1,2}, 邵欣宇¹, 邹晓平^{3*}

(¹南京医科大学附属鼓楼临床医学院, 江苏 南京 210008; ²启东市人民医院消化内科, 江苏 启东 226200; ³南京大学医学院附属鼓楼医院消化科, 江苏 南京 210008)

[摘要] **目的:**探讨 microRNA-10b(miR-10b)与胰腺癌细胞吉西他滨(gemcitabine, GEM)化疗耐药的相关性及可能机制。**方法:**RT-qPCR 检测吉西他滨相对耐药的胰腺癌细胞株 PANC-1 及吉西他滨相对敏感的 CFPAC-1 中 miR-10b 的表达情况;用不同浓度的吉西他滨作用于上述细胞,RT-qPCR 检测二者 miR-10b 的表达变化;CFPAC-1 细胞转染 miR-10b mimics 上调 miR-10b 表达量,CCK-8 法及流式细胞仪检测细胞对吉西他滨药物敏感性的变化,Western blot 检测抗凋亡相关蛋白(如 PI3K、p-Akt、Bcl-2、Survivin)的表达,RT-qPCR 检测 PTEN 基因的表达变化。**结果:**PANC-1 细胞中 miR-10b 的表达显著高于 CFPAC-1 细胞,且上述两种细胞中 miR-10b 的表达量与吉西他滨呈浓度梯度依赖;高表达 miR-10b 后 CFPAC-1 细胞对吉西他滨的敏感性下降,PI3K、p-Akt、Bcl-2、Survivin 蛋白的表达升高,PTEN mRNA 的表达水平降低。**结论:**miR-10b 可能通过负性调控 PTEN 的表达水平,从而增加 PI3K、p-Akt、Bcl-2、Survivin 蛋白的表达,减少凋亡来降低 CFPAC-1 对吉西他滨的敏感性,最终导致胰腺癌细胞对吉西他滨化疗耐受。

[关键词] microRNA-10b;胰腺癌;吉西他滨;化疗耐药

[中图分类号] R735.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-830-06

doi:10.7655/NYDXBNS20170709

Relationship between microRNA-10b and chemoresistance of pancreatic cancer to gemcitabine and its possible mechanism

Gu Shen^{1,2}, Shao Xinyu¹, Zou Xiaoping^{3*}

(¹Drum Tower School of Medicine, NJMU, Nanjing 210008; ²Department of Gastroenterology, Qidong People's Hospital, Qidong 226200; ³Department of Gastroenterology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objectives:** To reveal the relationship between microRNA-10b and gemcitabine (GEM) resistance of pancreatic cancer and its possible mechanism. **Methods:** The expression of microRNA-10b in PANC-1 cells (which are relatively resistant to GEM) and CFPAC-1 cells (which are relatively sensitive to GEM) were detected by RT-qPCR. PANC-1 and CFPAC-1 cells were treated with different doses of GEM, and then the cells were harvested. The expression of microRNA-10b was detected by RT-qPCR. CCK-8 assay and flow cytometry were performed to evaluate the drug sensitivity of CFPAC-1 cells, which were transfected with microRNA-10b mimics to GEM. The protein expressions of PI3K, p-Akt, Bcl-2 and Survivin in CFPAC-1 cells transfected with microRNA-10b mimics or negative control were demonstrated using Western blotting assay. The gene expressions of PTEN in CFPAC-1 cells transfected with microRNA-10b mimics or negative control were detected by RT-qPCR. **Results:** PANC-1 cells showed significantly increased expression of microRNA-10b as compared to CFPAC-1 cells. The expression of microRNA-10b both in PANC-1 and CFPAC-1 cells increased with the rising of GEM concentration. The sensitivity of CFPAC-1 cells to GEM decreased when microRNA-10b was overexpressed and the expressions of PI3K, p-Akt, Bcl-2, and Survivin were much higher than their control groups. The expression of PTEN mRNA decreased as microRNA-10b increased. **Conclusions:** MicroRNA-10b might negatively regulate the gene expression of PTEN, which increases the protein expressions of PI3K, p-Akt, Bcl-2 and Survivin, thus reduces the sensitivity of CFPAC-1 cells to GEM, and as a result, pancreatic cancer cells become resistant to GEM.

[Key words] microRNA-10b; pancreatic cancer; gemcitabine; chemoresistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07):830-835]

[基金项目] 江苏省医学领军人才与创新团队(LJ201104)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:13770771661@163.com

胰腺癌是常见的消化道恶性肿瘤,具有起病隐匿,早期即出现局部浸润和远处转移等临床特点,大部分患者在明确诊断时就已失去早期手术机会^[1],化疗是治疗胰腺癌重要的辅助手段。吉西他滨(gemcitabine, GEM) 是美国食品和药品监督管理局(FDA)批准的治疗胰腺癌的一线化疗药物^[2],但由于胰腺癌的天然性或获得性耐药,其临床有效率仅约 20%。

microRNA 是一类长约 17~22 个核苷酸的非编码 RNA,它通过和靶 mRNA 的 3'UTR 结合,从而导致靶 mRNA 的降解或抑制其翻译过程^[3]。研究表明, microRNA-10b(miR-10b)在很多肿瘤如乳腺癌、食管癌、胶质瘤等中异常表达,主要与肿瘤的侵袭、转移及预后相关。在乳腺癌细胞中,在转录因子 Twist 的诱导下,miR-10b 的表达增高,通过与靶基因 HOXD10 结合继而抑制其翻译过程,导致侵袭相关蛋白 RhoC 表达上调,从而增强乳腺癌细胞的侵袭转移能力^[4]。此外,淋巴结转移的乳腺癌患者血液中循环 miR-10b 的含量是无淋巴结转移者的 4.4 倍,该检测具有 70%左右的特异性和敏感性,可以作为筛查乳腺癌是否发生淋巴结转移的指标^[5]。这些都提示了 miR-10b 成为今后生物学筛查标志物和基因靶向治疗新靶点的潜能。

然而,miR-10b 在胰腺癌中的研究数据较少。本研究通过比较人胰腺癌细胞株 PANC-1 和 CFPAC-1 中 miR-10b 表达量的差异,以及对胰腺癌细胞转染 miR-10b mimics,检测其对吉西他滨的敏感性及凋亡相关蛋白和靶基因的变化,从而探索 miR-10b 与胰腺癌吉西他滨化疗耐药的相关性及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人胰腺癌细胞株 PANC-1 及 CFPAC-1 (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);DMEM 高糖培养基(Bioind 公司,以色列);胎牛血清(Wisent 公司,加拿大);0.25%胰蛋白酶(含或不含 EDTA)、Opti-MEM 培养基(Gibco 公司,美国);磷酸盐缓冲液(PBS,Invitrogen 公司,美国);吉西他滨购于中国食品药品检定研究院;RNAi fectin 转染试剂、Has-miR-10b mimics 及阴性对照、miR-10b 及内参 U6 上下游引物、microRNA 逆转录试剂盒(ABM 公司,加拿大);逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司,日本);CCK-8 试剂盒(同仁化学公司,日本);细胞凋亡检测试剂盒(BD Biosciences 公司,美国); β -actin

抗体 (Sigma 公司,美国);PI3K 抗体、E-cadherin 抗体、Twist 抗体(Abcam 公司,美国);N-cadherin 抗体 (Santa Cruz 公司,美国);Akt 抗体、p-Akt 抗体、Bcl-2 抗体、Survivin 抗体、鼠源性和兔源性二抗(Cell Signaling 公司,美国)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。 β -actin:5'-CTCTCCAGCCTTCCTTCCT-3' (Forward),5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' (Reverse);PTEN:5'-GCGGAACCTGCAATCCTCAG-3' (Forward),5'-AGGTTTCCTCTGGTCCTGGT-3' (Reverse)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

PANC-1、CFPAC-1 细胞常规贴壁生长,传代培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育,2 d 换液,3 d 传代 1 次。

1.2.2 细胞瞬时转染

转染前 18~24 h 取处于对数生长期的 CFPAC-1 细胞,按每孔 3×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,置于 37 °C 5%CO₂ 孵箱中孵育,直至细胞达到 70%~90% 融合。将 1.25 μ L 5 μ mol/L 的 miR-10b mimics 或阴性对照加入 125 μ L 不含血清及抗菌药物的 Opti-MEM 培养基,室温孵育 5 min;充分混匀 RNAi fectin 转染试剂,吸出 2 μ L 加入 125 μ L Opti-MEM 培养基,室温孵育 5 min;充分混合上述两种液体,室温孵育 20 min;往上述混合液中加入 800 μ L Opti-MEM 培养基,轻轻混匀(即最终 miR-10b mimics 的浓度为 50 nmol/L)。吸出各孔培养基,加入 1 mL 上述转染液,于 37 °C 5%CO₂ 孵箱中孵育,转染 5~8 h 后可换成 2 mL DMEM 完全培养基。

1.2.3 细胞总 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR

吉西他滨处理或未处理的 PANC-1、CFPAC-1 细胞培养至覆盖 80%孔底,或上述转染细胞常规培养 72 h 后收集细胞,每孔加入 1 mL TRIzol 提取总 RNA,氯仿萃取,异丙醇沉淀,检测 RNA 浓度及纯度。配制逆转录体系后实施逆转录,再配制实时荧光定量 PCR 体系并实施 PCR。每组设 3 个复孔,所得结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞存活率

将准备好的细胞常规消化,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔板,每孔体积为 100 μ L,每组设 5 个复孔。等细胞贴壁后,用不含或含有不同浓度的吉西他滨培养基继续培养 48 h。以未经吉西他滨处理的细胞作为对照组。吸弃孔中旧培养基,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液和 90 μ L DMEM 培养基。以

加了相同量 CCK-8 溶液和培养基但没有加入细胞的孔作为空白组。于细胞培养箱中孵育 1.5 h 后在酶标仪 450 nm 波长处读取吸光度值。细胞存活率=(实验组平均吸光度值-空白组平均吸光度值)/(对照组平均吸光度值-空白组平均吸光度值)×100%。

1.2.5 流式细胞分析检测细胞凋亡

在 6 孔板中对 CFPAC-1 细胞转染 miR-10b mimics 或阴性对照后 24 h, 再用不同浓度(0、50、100、200 nmol/L)的吉西他滨处理 48 h; 胰酶消化贴壁细胞, 1 500 r/min 4 ℃, 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗涤后加入 100 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞; 各加入 5 μL Annexin V, 5 μL PI 溶液, 混匀后室温、避光反应 15 min; 加入 400 μL 1×Binding Buffer 终止反应, 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.2.6 划痕试验检测细胞侵袭能力

在孔中加入适量转染后的 CFPAC-1 细胞, 使其过夜能铺满。第 2 天用枪头比着直尺, 作一等宽划痕, 用 PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入无血清培养基。放入孵箱培养, 按 0、24、48 h 取样, 拍照。

1.2.7 细胞蛋白提取及免疫印迹法

取转染 miR-10b mimics 和阴性对照组 48 h 后的两组 CFPAC-1 细胞收集蛋白。吸弃培养基, 将贴壁细胞用预冷的 PBS 洗 2 次, 加入含有蛋白酶抑制剂的完全 RIPA 裂解液, 充分混匀后置于冰上反应 30 min, 每隔 5 min 震荡混匀 1 次。裂解结束后, 12 000 r/min 4 ℃离心 10 min, 将上清分装于 EP 管中。测定蛋白浓度, 取约 30 μg 总蛋白上样, 经 SDS-PAGE 电泳分离, 转印至 PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭后, 按 1:1 000 稀释比例加入 E-cadherin、N-cadherin、Twist、PI3K、p-Akt、Bcl-2、Survivin 一抗及按 1:5 000 稀释的 β-actin 的一抗, 4 ℃孵育过夜, TBST 漂洗后, 加入二抗稀释液孵育, TBST 漂洗后用化学发光成像系统曝光。

1.3 统计学方法

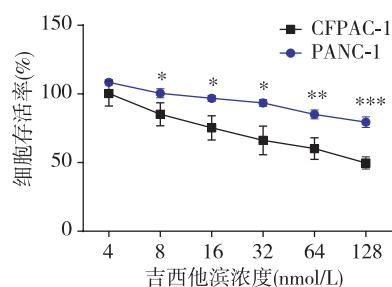
数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 数据处理应用 Graphpad Prism6, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Dunnett-*t* 法, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。每组数据均由 3 次重复实验得到。

2 结果

2.1 吉西他滨相对耐药株 PANC-1 中 miR-10b 表达显著高于吉西他滨相对敏感株 CFPAC-1

两种胰腺癌细胞经吉西他滨处理 48 h 后, 发现

CFPAC-1 细胞的存活率低于 PANC-1 细胞 (图 1), 提示 CFPAC-1 细胞对吉西他滨相对敏感, PANC-1 细胞对吉西他滨相对耐药。这与 Pan 等^[6]既往研究的结果一致。



与 CFPAC-1 细胞比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 1 CCK-8 检测吉西他滨对两种胰腺癌细胞存活率的影响
Figure 1 Influence of GEM to the survival rate of pancreatic cancer cells by CCK-8

用 RT-qPCR 检测两种细胞中 miR-10b 的表达差异性, 可见吉西他滨相对耐药株 PANC-1 细胞中 miR-10b 的表达量是吉西他滨相对敏感株 CFPAC-1 细胞的 1.27 倍, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 PANC-1 细胞和 CFPAC-1 细胞中 miR-10b 的表达量与吉西他滨呈浓度梯度依赖

PANC-1 细胞在 0、500、1 000、2 000 nmol/L 浓度的吉西他滨诱导下, CFPAC-1 细胞在 0、50、100、200 nmol/L 浓度的吉西他滨诱导下, miR-10b 的表达随着吉西他滨浓度升高而明显增加(图 2)。至此, 本实验初步说明 miR-10b 与胰腺癌吉西他滨耐药相关。

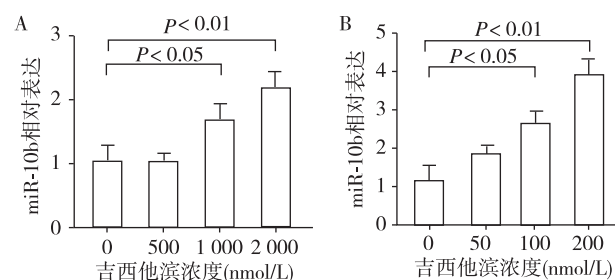


图 2 RT-qPCR 检测 PANC-1(A)与 CFPAC(B)细胞在不同浓度吉西他滨处理 48 h 后 miR-10b 的表达变化

Figure 2 Changes of the expression of miR-10b in pancreatic cancer cells treated with different doses of GEM for 48 hours detected by RT-qPCR

2.3 过表达 miR-10b 对 CFPAC-1 细胞增殖与凋亡的影响

对 CFPAC-1 细胞转染 miR-10b mimics 和阴性对照 (NC), 72 h 后提取 RT-RNA 进行 qPCR, 发现 miR-10b 的表达较阴性对照、空白组明显上升 ($P<$

0.01,图 3A);于第 24、48、72 h 分别计数细胞,绘制细胞增殖曲线,二者未见明显差异(图 3B)。用流式

细胞仪检测细胞的基础凋亡率,与阴性对照组相比,也未见明显改变(图 3C)。

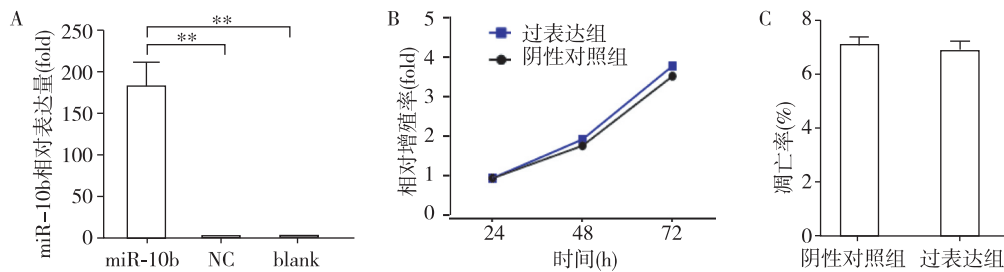


图 3 高表达 miR-10b 对 CFPAC-1 细胞增殖(A)与凋亡(B)的影响
Figure 3 Overexpressing of miR-10b to apoptotic rate in CFPAC-1 cells

2.4 过表达 miR-10b 对 CFPAC-1 细胞侵袭能力的影响

对 CFPAC-1 细胞转染 miR-10b 及阴性对照后,进行划痕试验,如图 4 所示,过表达 miR-10b 后细胞的划痕间距较阴性对照组明显缩小,提示其细胞侵袭能力明显增强。

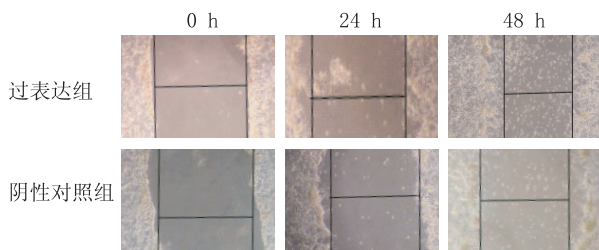


图 4 过表达 miR-10b 后 CFPAC-1 细胞的侵袭能力显著增强
Figure 4 Invasion ability of CFPAC-1 cells enhanced when miR-10b was overexpressed

2.5 过表达 miR-10b 后 CFPAC-1 细胞中 EMT 相关蛋白水平的改变

CFPAC-1 细胞过表达 miR-10b 后,如图 5 所示,与 EMT 相关的蛋白水平发生显著改变,其中 E-cadherin 的表达水平明显下降,而 N-cadherin、Twist 的表达水平明显升高,这与上述结果中细胞侵袭能力增强相一致。

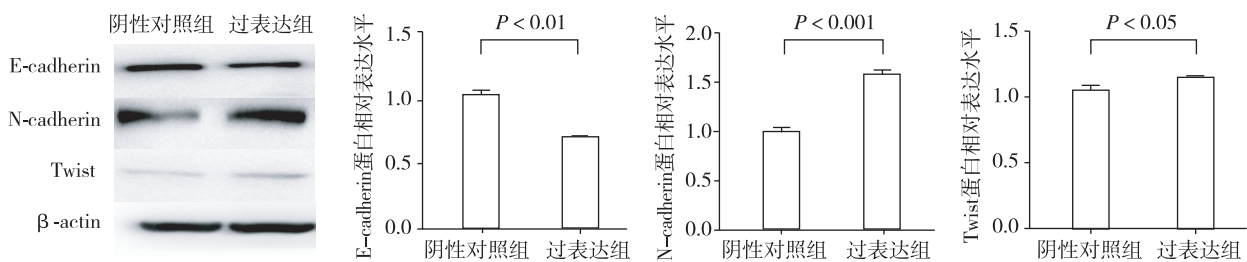


图 5 过表达 miR-10b 对 CFPAC-1 细胞中 EMT 相关蛋白的影响
Figure 5 Changes of EMT related proteins when overexpressed miR-10b in CFPAC-1 cells

2.6 在吉西他滨处理下,过表达 miR-10b 对 CFPAC-1 细胞存活率的影响

如图 6 所示,两组细胞经吉西他滨处理 48 h 后,CCK-8 显示过表达 miR-10b 使吉西他滨相对敏感的 CFPAC-1 细胞存活率明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$),提示 miR-10b 能降低 CFPAC-1 对吉西他滨的敏感性,使 CFPAC-1 细胞对吉西他滨耐药。

2.7 在吉西他滨诱导下,过表达 miR-10b 对 CFPAC-1 细胞凋亡的影响

经不同浓度的吉西他滨诱导 48 h 后,用流式细胞仪检测转染 miR-10b mimics 组及阴性对照组的细胞凋亡情况,发现如图 7 所示,过表达 miR-10b 的 CFPAC-1 细胞的凋亡率明显低于阴性对照组,这同样提示 miR-10b 能降低 CFPAC-1 对吉西他滨的敏感性,使 CFPAC-1 细胞对吉西他滨耐药。至此,本实验进一步证实了 miR-10b 的表达水平与胰腺癌吉西他滨耐药相关,为下面阐述 miR-10b 调控胰腺癌细胞吉西他滨耐药的机制奠定了基础。

2.8 过表达 miR-10b 后,CFPAC-1 细胞中 PI3K、p-Akt、Bcl-2、Survivin 蛋白表达水平的改变

Western blot 检测抗凋亡相关蛋白 PI3K、p-Akt、Bcl-2、Survivin 表达量的变化(图 8),发现高表达 miR-10b 后,上述蛋白的表达均较阴性对照组显著

增加,这与上述高表达 miR-10b 后细胞凋亡减少的结果相一致。

2.9 高表达 miR-10b 后,CFPAC-1 细胞中 PTEN mRNA 表达水平的改变

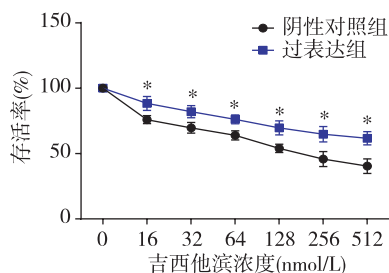
为进一步阐述 miR-10b 的作用机制,需要找到调控 PI3K/Akt 通路上游靶基因。本实验通过查询 TargetScan 数据库,预测 miR-10b 的可能靶基因为 PTEN。于是,对 CFPAC-1 细胞转染 miR-10b mimics 和阴性对照,72 h 后提取总 RNA,通过 RT-qPCR 测定细胞中 PTEN mRNA 的表达量变化,可见过表达 miR-10b 后,PTEN 基因的表达较对照组下降 55.06%,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),这提示 PTEN 可能是 miR-10b 的靶基因。

3 讨论

miR-10b 在胰腺癌中的研究数据较少。现有研究表明,miR-10b 在胰腺导管腺癌术后样本及超声引导下细针穿刺组织中高表达。此外,低水平表达 miR-10b 的患者对以吉西他滨为基础的化疗有反应^[7]。

但是鲜有关于 miR-10b 与吉西他滨耐受的确切关系及调控机制的报道。故本研究着重从细胞学方面阐述 miR-10b 与胰腺癌吉西他滨耐药的相关性。

本研究发现 miR-10b 的表达水平在吉西他滨相对耐药株 PANC-1 中明显高于相对敏感株 CFPAC-1,且其表达水平对吉西他滨呈浓度梯度依赖,初步说明 miR-10b 与胰腺癌吉西他滨耐药相关。采用瞬时转染 miR-10b mimics 以提高 CFPAC-1 细胞中 miR-10b 的表达水平,发现上调 miR-10b 表达量后 CFPAC-1 胰腺癌细胞的增殖、基础凋亡等生物学行为未见明显改变,但能显著增强细胞的侵袭能力,且伴有上皮-间质转化(EMT)相关蛋白表达水平的改变。接着对过表达的细胞和阴性对照组均予以吉西他滨处理 48 h,发现过表达 miR-10b 的 CFPAC-1 细胞存活率高于对照组,吉西他滨诱导的凋亡率低于对照组,这说明过表达 miR-10b 会降低胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性,使胰腺癌细胞对吉西他滨化疗耐受,从而进一步证实 miR-10b 的表达水平与胰腺癌吉西他滨耐药相关。



两组比较,* $P < 0.05$ 。

图6 过表达 miR-10b 对 CFPAC-1 细胞吉西他滨敏感性的影响

Figure 6 Changes of GEM sensitivity to CFPAC-1 cells when overexpressed miR-10b

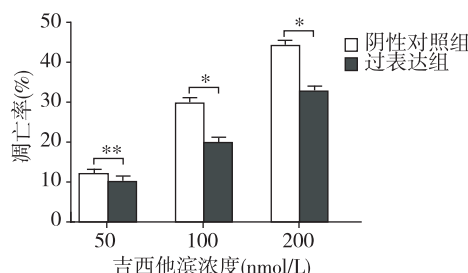


图7 在 200 nmol/L 吉西他滨诱导下,高表达 miR-10b 的 CFPAC-1 细胞凋亡率明显降低

Figure 7 Apoptotic rate of CFPAC-1 cells induced by GEM in a dose of 200 nmol/L significantly decreased when overexpressed miR-10b

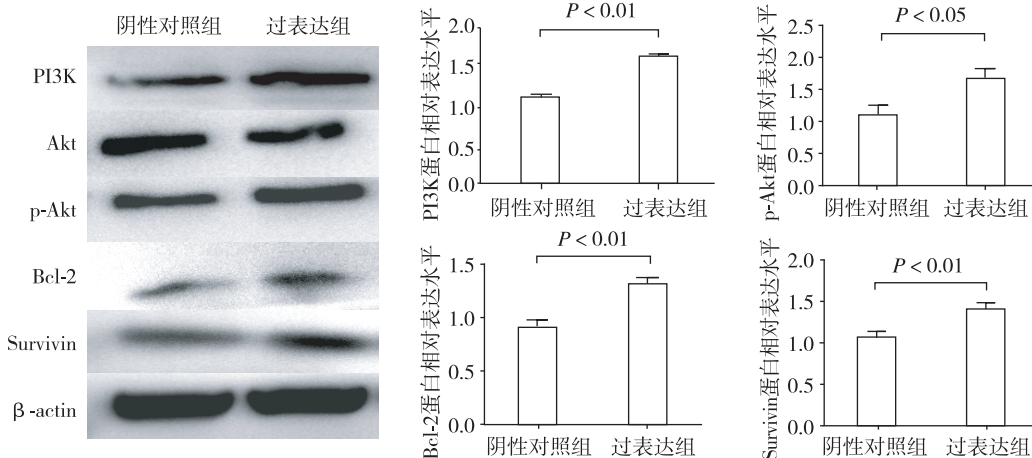


图8 细胞过表达 miR-10b 后 PI3K、p-Akt、Bcl-2、Survivin 蛋白的表达增加

Figure 8 Expressions of PI3K, p-Akt, Bcl-2 and survivin were increased when overexpressed miR-10b in CFPAC-1 cells

PI3K/Akt 信号通路参与抑制细胞凋亡、促进增殖等许多重要的生物学进程,与肿瘤的发生、发展密切相关^[8]。有研究表明,抑制 Akt 通路的激活可以提高胰腺癌对吉西他滨的化疗敏感性^[9]。本研究应用 Western blot 对 PI3K/Akt 信号通路中的相关蛋白检测时发现,PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白的水平在转染 miR-10b mimics 组升高。这说明,miR-10b 可能间接通过激活 PI3K/Akt 信号通路发挥抗凋亡作用,导致胰腺癌细胞对吉西他滨耐药。此外,Survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein,IAP)中抑制凋亡作用最强的一种,其主要作用机制为通过直接或间接抑制凋亡蛋白酶级联通路的终末效应因子 caspase-3 和 caspase-7 的活性,从而抑制细胞凋亡。Survivin 的表达与胰腺癌的转移、耐药等恶性生物学行为相关^[10]。本研究发现高表达 miR-10b 的细胞中 Survivin 蛋白含量明显增加,与已有报道相符。

PTEN 可以阻断 PI3K 信号转导通路的激活,诱导细胞凋亡,增加化疗药物的敏感性,然而它在多种恶性肿瘤中突变或缺失,促进肿瘤的发生、发展^[11]。本研究对胰腺癌细胞过表达 miR-10b 后,发现其 PTEN mRNA 的表达明显下降,提示 miR-10b 可能通过负性调控 PTEN 的表达,从而激活 PI3K/Akt 通路,使相关抗凋亡蛋白的表达增加,从而减少了吉西他滨诱导的胰腺癌细胞凋亡,最终导致胰腺癌细胞对吉西他滨化疗耐药。

综上所述,本研究结果或许能为胰腺癌的个体化治疗提供一个新思路。然而,由于本研究过程中,虽然对 CFPAC-1 细胞尝试转染了 miR-10b 抑制剂,但不能明显敲除 miR-10b 的表达,故没能从功能缺失方面阐述 miR-10b 的作用。此外,要进一步证实 miR-10b 与 PTEN 的确切关系,需通过荧光素酶报告基因实验来检测。

[参考文献]

[1] Chua YJ,Zalberg JR. Pancreatic cancer--is the wall crumbling?[J]. *Ann Oncol*,2008,19(7):1224-1230

[2] Burris HA,Moore MJ,Andersen J,et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial[J]. *J Clin Oncol*,1997,15(6):2403-2413

[3] Carthew RW,Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. *Cell*,2009,136(4):642-655

[4] Ma L,Teruya-Feldstein J,Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer[J]. *Nature*,2007,449(7163):682-688

[5] Chen W,Cai F,Zhang B,et al. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers [J]. *Tumour Biol*,2013,34(1):455-462

[6] Pan X,Arumugam T,Yamamoto T,et al. Nuclear factor-kappaB p65/reIA silencing induces apoptosis and increases gemcitabine effectiveness in a subset of pancreatic cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*,2008,14(24):8143-8151

[7] Preis M,Gardner TB,Gordon SR,et al. MicroRNA-10b expression correlates with response to neoadjuvant therapy and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*,2011,17(17):5812-5821

[8] Sharma N,Nanta R,Sharma J,et al. PI3K/AKT/mTOR and sonic hedgehog pathways cooperate together to inhibit human pancreatic cancer stem cell characteristics and tumor growth[J]. *Oncotarget*,2015,6(31):32039-32060

[9] Wei WT,Chen H,Wang ZH,et al. Enhanced antitumor efficacy of gemcitabine by evodiamine on pancreatic cancer via regulating PI3K/Akt pathway[J]. *Int J Biol Sci*,2012,8(1):1-14

[10] Sagol O,Yavuzsen T,Oztop I,et al. The effect of apoptotic activity,survivin,Ki-67,and P-glycoprotein expression on prognosis in pancreatic carcinoma[J]. *Pancreas*,2005,30(4):343-348

[11] Song MS,Salmena L,Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2012,13(5):283-296

[收稿日期] 2016-04-21

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》编辑部
荣获第四届江苏省科技期刊“金马奖”优秀团队奖!