

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.22.006

miR-134-5p 靶向抑制 PAK3 表达增强多发性骨髓瘤细胞的化疗敏感性的研究 *

袁瑞丽¹ 柳娟² 刘妮¹ 赵娜¹ 尹晶晶¹ 郭炫^{1Δ}

(西安交通大学第一附属医院 1 检验科;2 血液内科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:研究 miR-134-5p 对多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)化疗敏感性的影响及其可能的作用机制。**方法:**CCK-8 法测定人多发性骨髓瘤细胞 KM3 及其耐硼替佐米(bortezomib, BTZ)细胞株 KM3/BTZ 对 BTZ 的化疗敏感性,RT-PCR 法检测 KM3 和 KM3/BTZ 细胞株中 miR-134-5p 和 p21 活化激酶 3(p21 activated kinase 3, PAK3)mRNA 的表达,生物信息学软件分析 miR-134-5p 的靶基因,荧光素酶报告实验进行验证,CCK-8 法检测分别抑制 miR-134-5p 和 PAK3 后 KM3/BTZ 的化疗敏感性,Western-blot 法检测抑制 miR-134-5p 后 KM3/BTZ 细胞株中 PAK3 蛋白的表达。**结果:**KM3/BTZ 细胞株对 BTZ 的化疗敏感性显著低于 KM3 细胞株($P<0.05$)。MiR-134-5p 在 KM3 细胞株的表达显著高于 KM3/BTZ 细胞株,而 PAK3 mRNA 在 KM3 细胞株的表达显著低于 KM3/BTZ 细胞株($P<0.05$)。PAK3 为 miR-134-5p 的靶基因。MiR-134-5p inhibitor 组和 PAK3 siRNA 组 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性显著低于对照组($P<0.05$)。MiR-134-5p inhibitor 组 PAK3 蛋白的相对表达显著高于对照组($P<0.05$)。**结论:**MiR-134-5p 可提高 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性,其机制可能与抑制 PAK3 的表达有关。

关键词:多发性骨髓瘤;化疗敏感性;miR-134-5p;p21 活化激酶 3

中图分类号:R733.3;R730.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)22-4229-05

Study of miR-134-5p Enhances Chemosensitivity in Multiple Myeloma Cells by Inhibiting Expression of PAK3*

YUAN Rui-li¹, LIU Juan², LIU Ni¹, ZHAO Na¹, YIN Jing-jing¹, GUO Xuan^{1Δ}

(1 Department of Laboratory Medicine; 2 Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University School, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of miR-134-5p on chemosensitivity in multiple myeloma (MM) cells and its potential mechanism. **Methods:** The chemosensitivity of KM3 and KM3/BTZ cells were detected by CCK-8 method, the expression of miR-134-5p and p21 activated kinase 3(PAK3) mRNA in KM3 and KM3/BTZ cells were detected by RT-PCR, bioinformatics prediction software was used to predict potential target gene to miR-134-5p, and luciferase report experiment was used to verified, the chemosensitivity of KM3 and KM3/BTZ cells after inhibiting miR-134-5p and PAK3 were detected by CCK-8 method, the expression of PAK3 protein in KM3/BTZ cell after inhibiting miR-134-5p were detected by western-blot. **Results:** The chemosensitivity of KM3/BTZ cell was lower than KM3 cell ($P<0.05$). The expression of miR-134-5p in KM3 cell was higher than KM3/BTZ, while PAK3 mRNA was lower ($P<0.05$). PAK3 was a target gene of miR-134-5p. The chemosensitivity of KM3/BTZ cell of miR-134-5p inhibitor group and PAK3 siRNA group were lower than control group ($P<0.05$). The expression of PAK3 protein in miR-134-5p inhibitor group was higher than control group ($P<0.05$). **Conclusion:** MiR-134-5p could increase the chemosensitivity of KM3/BTZ cell, the potential mechanism might be via inhibiting expression of PAK3.

Key words: Multiple myeloma; Chemosensitivity; miR-134-5p; p21 activated kinase 3

Chinese Library Classification(CLC): R733.3; R730.53 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)22-4229-05

前言

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种恶性浆细胞增殖性疾病,以骨髓中克隆性浆细胞的异常增殖和蓄积、单克隆免疫球蛋白过度生成为主要特征,从而引发贫血、血钙升高、

骨痛、肾损伤和免疫功能异常等症状,是发病率仅次于恶性淋巴瘤的血液系统恶性肿瘤,严重影响患者的生命健康和生活质量^[1,2]。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类高度保守的单链小分子内源性非编码 RNA,广泛存在于各种真核生物体内,是重要的基因调控分子,参与生物体细胞的增殖、分化、凋亡、信号

* 基金项目:陕西省国际科技合作交流计划项目(2016KW-007)

作者简介:袁瑞丽(1985-),女,硕士,主管技师,研究方向:临床生化及生化免疫学,电话:15309268606, E-mail: yrl0211001@163.com

Δ 通讯作者:郭炫(1965-),女,硕士,主任技师,研究方向:临床检验学,电话:13087582823, E-mail: yrl0211001@163.com

(收稿日期:2021-03-04 接受日期:2021-03-28)

转导、疾病的发生发展等诸多过程^[3]。已有多项研究^[4,5]证实, miRNA 参与了多种肿瘤的发生发展进程之中, 在肿瘤细胞的增殖、凋亡、分化及转移中发挥重要作用。既往研究^[6,7]发现, miR-134-5p 在诸如胰腺癌、肝癌、乳腺癌、子宫内膜癌等多种恶性肿瘤组织中呈现异常表达, 然而, miR-134-5p 是否参与了 MM 的调控, 目前国内外均鲜有报道。因此本研究通过分析 miR-134-5p 在人多发性骨髓瘤 KM3 细胞及其耐硼替佐米 (bortezomib, BTZ) 细胞株 KM3/BTZ 中的表达以及对化疗敏感性的影响, 并探究其可能的作用机制通路, 为临床治疗 MM 寻找新的生物学靶点提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 BTZ: BSP Pharmaceuticals S.p.A. (国药准字 J20171067), 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清: 美国 Gibco 公司; miR-134-5p inhibitor 及其对照物: 美国 Gene Pharma 公司; PAK3 抗体、GAPDH 抗体、Trizol 试剂、逆转录试剂盒: 美国 Invitrogen 公司; miRNA、siRNA 转染试剂盒: 美国 Promega 公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒: 上海碧云天生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器 超低温冰箱: 美国 Thermo Scientific 公司; 生物安全柜: 北京东联哈尔仪器制造有限公司; 细胞培养箱: Thermo Fisher Scientific; 超低温冰箱: 美国 Thermo Scientific 公司; 离心机: 美国 Sigma 公司; 实时荧光定量 PCR 仪: 美国

Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 KM3 和 KM3/BTZ 细胞株冻存于我院医学实验中心, 将复苏后的 KM3 和 KM3/BTZ 细胞株用高糖 DMEM+10%胎牛血清培养基培养, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中, 每三天更换一次培养基, 应用 0.4%胰蛋白酶消化传代, 待传至第 3 代后可用于后续实验。

1.2.2 CCK-8 法测定 KM3 和 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性 取对数生长期的 KM3 和 KM3/BTZ 细胞株, 以 DMEM 培养基调整至密度为 10⁵ 个/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 置于细胞培养箱内培养, 待细胞贴壁生长至 75%左右时, 分别加入浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0 和 20.0 μg/mL 的 BTZ 溶液, 并设置不加 BTZ 组为对照组, 每个浓度设置 6 个复孔, 置于培养箱中培养 48 h, 然后各孔内加入 100 μL 的 CCK-8, 继续孵育 2 h, 于 450 nm 下测定各孔的吸光度值(A), 并计算两种细胞株的 IC₅₀ 值。

1.2.3 RT-PCR 法检测 KM3 和 KM3/BTZ 细胞株中 miR-134-5p 和 PAK3 mRNA 的表达 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 于 260 nm 和 280 nm 波长下测定紫外吸光度 A, 并计算纯度和浓度。参照逆转录试剂盒说明书, 将总 RNA 逆转录为 cDNA 文库, 进行 PCR 反应, 条件如下: 95℃ 预变性, 1 min; 95℃ 25 s, 60℃ 30 s 共 45 个循环。以 u6 作为内参, 引物序列见表 1。用 2^{-ΔΔCt} 法计算各组中 miR-134-5p 和 PAK3 mRNA 的相对表达。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

Definition	Upstream primer(5'→3')	Downstream primer(5'→3')
u6	AACGCTTCACGAATTTCGCT	CTCGCTTCGGCAGCACA
miR-134-5p	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC
PAK3	CCAGGCTTCGCTCTATCTTCC	TCAAACCCACATGAATCGTATG

1.2.4 荧光素酶报告实验 靶基因在线预测软件 Targetscan 分析显示, PAK3 可能为 miR-134-5p 潜在的靶基因, 应用 Lipofectamine 2000 作质粒转染, 将 miR-134-5p 模拟物和空白对照与 PAK3-3'UTR-WT 和 PAK3-3'UTR-Mut 共转染, 参照荧光素酶试剂盒说明书检测荧光素酶活性。

1.2.5 miR-134-5p inhibitor 的转染及化疗敏感性的测定 取对数生长期的 KM3/BTZ 细胞株, 接种于 96 孔板中, 浓度为 1×10⁵ 个/孔, 置于培养箱中培养至细胞贴壁生长后, 参照转染试剂盒说明书转染 miR-134-5p inhibitor, 并设置空白转染对照组, 采用 CCK-8 测定 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性。

1.2.6 PAK3 siRNA 的转染及化疗敏感性的测定 取对数生长期的 KM3/BTZ 细胞株, 接种于 96 孔板中, 浓度为 1×10⁵ 个/孔, 置于培养箱中培养至细胞贴壁生长后, 参照 siRNA 转染试剂盒说明书转染 PAK3 siRNA, 并设置空白对照组, 采用 CCK-8 测定 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性。

1.2.7 miR-134-5p inhibitor 转染后 KM3/BTZ 细胞株中 PAK3 蛋白的表达 取转染 miR-134-5p inhibitor 后的 KM3/BTZ 细胞株, 以 RIPA 裂解液裂解提取总蛋白, 以 BCA 法测定蛋白浓度, 取 30 μg 总蛋白, 12%SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜

上, 5%脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗后于 37℃下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 继续加入二抗孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 加入 E-CL 发光液, 应用 Image Lab 软件计算 PAK3 蛋白的相对表达。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 KM3 和 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性比较

KM3/BTZ 细胞株的 IC₅₀ 显著高于 KM3 细胞株, 说明 KM3/BTZ 细胞株对 BTZ 的化疗敏感性显著低于 KM3 细胞株 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.2 KM3 和 KM3/BTZ 细胞株中 miR-134-5p 和 PAK3 mRNA 的表达

MiR-134-5p 在 KM3 细胞株的表达显著高于 KM3/BTZ 细胞株, 而 PAK3 mRNA 在 KM3 细胞株的表达显著低于 KM3/BTZ 细胞株 ($P < 0.05$), 见图 1。

表 2 KM3 和 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of chemosensitivity of KM3 and KM3/BTZ cells($\bar{x} \pm s$)

Cell line	n	IC ₅₀ (ug/mL)
KM3	6	0.19± 0.02*
KM3/BTZ	6	0.37± 0.05

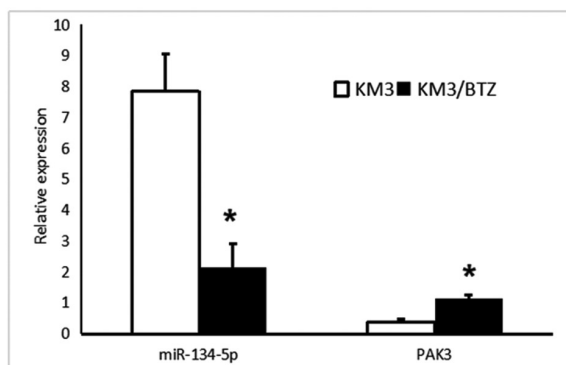
Note: compare with the KM3/BTZ, * $P < 0.05$.

图 1 KM3 和 KM3/BTZ 细胞株中 miR-134-5p 和 PAK3 mRNA 的表达

Fig.1 Expression of miR-134-5p and PAK3 mRNA in KM3 and KM3/BTZ cells

Note: * $P < 0.05$ vs KM3 cells.

2.3 miR-134-5p 靶基因检测

靶基因在线预测软件 Targetscan 分析显示,PAK3 可能为 miR-134-5p 潜在的靶基因,其结合位点如图 2 所示;荧光素酶报告显示,miR-134-5p 可显著抑制野生型 PAK3-3'UTR 的荧光素酶活性 ($P < 0.05$),而对突变型 PAK3-3'UTR 无明显影响 ($P > 0.05$),见图 3。

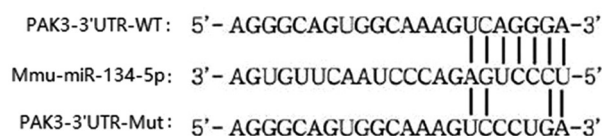


图 2 miR-134-5p 和 PAK3 的结合位点

Fig.2 Binding sites of miR-134-5p and PAK3

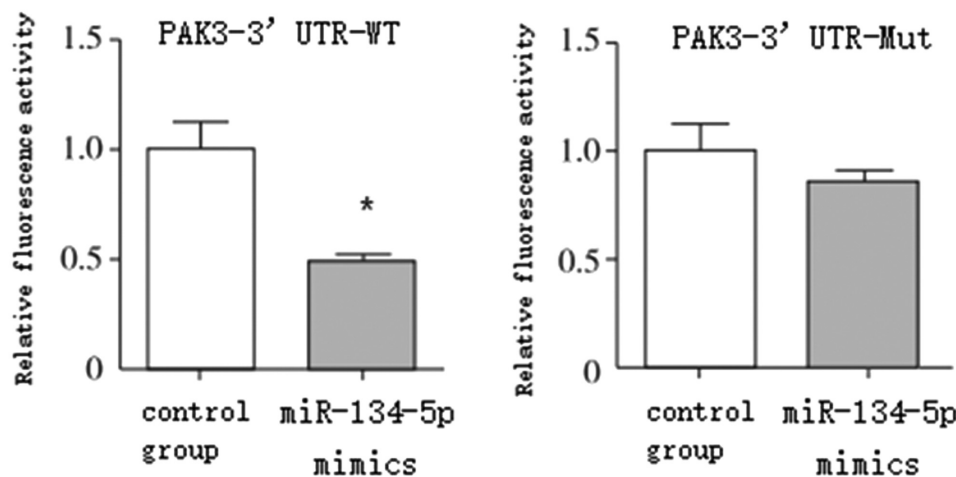


图 3 荧光素酶报告验证 miR-134-5p 和 PAK3 的靶向关系

Fig.3 Targeting relationship between miR-134-5p and PAK3 by luciferase report

Note: * $P < 0.05$ vs control group.

2.4 抑制 miR-134-5p 后 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性

miR-134-5p inhibitor 组的 IC₅₀ 显著高于对照组,说明抑制 miR-134-5p 后 KM3/BTZ 细胞株对 BTZ 的化疗敏感性显著降低($P < 0.05$),见表 3。表 3 抑制 miR-134-5p 后 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性($\bar{x} \pm s$)Table 3 Chemosensitivity of KM3/BTZ cells after inhibiting of miR-134-5p($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	IC ₅₀ (μg/mL)
miR-134-5p inhibitor group	6	0.54± 0.11*
Control group	6	0.36± 0.05

Note: compare with the control group, * $P < 0.05$.

2.5 抑制 PAK3 的表达后 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性

miR-134-5p inhibitor 组的 IC₅₀ 显著低于对照组,说明抑制 PAK3 后 KM3/BTZ 细胞株对 BTZ 的化疗敏感性显著升高 ($P < 0.05$),见表 4。

2.6 抑制 miR-134-5p 后 PAK3 蛋白的表达水平

与对照组相比,miR-134-5p inhibitor 组 PAK3 蛋白的相对表达显著升高($P < 0.05$),见图 4 和表 5。

表 4 抑制 PAK3 的表达后 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Chemosensitivity of KM3/BTZ cells after inhibiting of PAK3($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
miR-134-5p inhibitor group	6	0.23 $\pm$ 0.05*
Control group	6	0.37 $\pm$ 0.07

Note: compare with the control group, * $P < 0.05$.

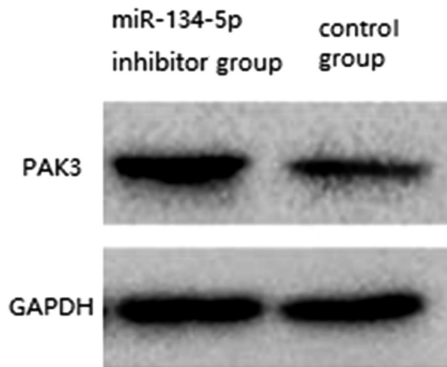


图 4 抑制 miR-134-5p 后 PAK3 蛋白的表达水平

Fig.4 Expression level of PAK3 protein after inhibiting of miR-134-5p

3 讨论

表 5 抑制 miR-134-5p 后 PAK3 蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Expression level of PAK3 protein after inhibiting of miR-134-5p($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Relative expression of PAK3 protein
miR-134-5p inhibitor group	6	1.42 $\pm$ 0.25*
Control group	6	1.03 $\pm$ 0.13

Note: compare with the control group, * $P < 0.05$.

达,对细胞的增殖、凋亡以及线粒体的功能产生影响^[13]。近年来,miRNA 已成为受到密切关注的恶性肿瘤中的重要基因调控原件,miRNA 可靶向抑制原癌基因如 MYC、MDM2 等而发挥抑癌作用;相反的,miRNA 亦可靶定抑癌基因如 PTEN、TP53 等的表达而产生致癌作用^[14,15]。对于 miRNA 的研究为揭示肿瘤细胞的耐药性及发现肿瘤治疗的新靶标提供了巨大的潜力,越来越多的研究^[16,17]证实,基于 miRNA 介导的基因调控与肿瘤的发生发展密切相关。

既往研究^[18,19]表明,miR-134-5p 在诸如胰腺癌、肝癌、乳腺癌、子宫内膜癌等多种恶性肿瘤组织中呈现低表达,且通过对 miR-134-5p 的调控可达到促肿瘤细胞凋亡的作用。然而,miR-134-5p 在 MM 中的表达情况与耐药性的关系及其中可能的机制鲜有报道,因此,本研究旨在探究 miR-134-5p 与 KM3 细胞耐药性的关系及其中可能的机制。

本研究结果显示,KM3/BTZ 细胞株的 IC₅₀ 显著高于 KM3 细胞株,KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性显著低于 KM3 细胞株,同时 miR-134-5p 在 KM3/BTZ 细胞株的表达显著低于 KM3 细胞株,与李为光等^[20]的研究类似,该学者发现 miR-134-5p 在人胰腺癌组织中的表达水平低于癌旁正常胰腺组织,miR-134-5p 可抑制胰腺癌细胞的增殖和迁移,并促进其凋亡,从而发挥抗胰腺癌的作用,其机制可能与抑制 Ras 相关

MM 为常见血液系统恶性肿瘤之一,可造成贫血、骨质破坏、骨痛、肾脏组织损伤、全身感染以及免疫功能障碍等,迄今为止该病至今仍无法完全治愈,且预后较差,较易复发,终末期患者可发生全身衰竭,完全失去生活自理能力,严重威胁患者的生活质量和生命健康^[8,9]。MM 的发病机制尚不明确,且暂无根治的方法,目前临床对于 MM 的治疗多采取骨质破坏治疗、化疗、新型靶向药物治疗和自身造血干细胞移植等的治疗方案^[10,11],其中 BTZ 为治疗 MM 的一线化疗药物,对 MM 具有良好的临床疗效,然而,由于肿瘤细胞对化疗药物耐药性的出现,可导致化疗失败的发生^[12]。因此,对提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性及其有关机制的探究,成为目前亟待解决的问题。

miRNA 是真核生物体内重要的基因表达调控分子,可与靶 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)特异性相结合,沉默靶基因,抑制其翻译过程,进而抑制蛋白的表

核(Ras-related nuclear, RAN)基因的表达有关。汤继英等^[21]的研究同样也显示,miR-134-5p 可通过抑制表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因的表达及其通路的活化,从而抑制宫颈癌细胞的增殖,并促进其凋亡。提示 miR-134-5p 可能在调控 KM3/BTZ 化疗耐药中发挥了一定作用;进一步的研究显示,在抑制 miR-134-5p 的表达之后,KM3/BTZ 细胞株的 IC₅₀ 进一步升高,化疗敏感性进一步降低,证实了 miR-134-5p 可作为抑癌 miRNA 提高 KM3 细胞的化疗敏感性。miRNA 通过与靶基因的互补结合,抑制或降解靶基因的 mRNA 而发挥调控作用^[22]。本研究首先借助靶基因预测软件进行分析,结果发现 PAK3 可能为 miR-134-5p 潜在的靶基因;通过荧光素酶报告实验验证,证实了 PAK3 为 miR-134-5p 的靶基因。此外,本研究转染 miR-134-5p inhibitor 后检测 KM3/BTZ 细胞株中 PAK3 蛋白的相对表达,结果发现 miR-134-5p inhibitor 组 PAK3 蛋白的相对表达显著高于对照组,说明 miR-134-5p 可抑制 KM3/BTZ 细胞株中 PAK3 的表达,而抑制 miR-134-5p 后,PAK3 的表达显著上调,二者存在一定的相关性。目前临床缺乏 miR-134-5p 与 PAK3 的表达的相关性的研究,这为后续其他学者的研究提供了思路。

PAKs 是一类高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的

上游调控因子和小 G 蛋白家族的下游靶基因^[23],肿瘤的发生发展过程即为抑癌基因和致癌基因的突变引发的生长调控失衡^[24],而过往研究^[25,26]发现,PAKs 是调控致癌基因和抑癌基因突变生长的重要因子,在促进细胞信号转导、调节细胞骨架重排、血管新生、细胞增生及死亡等方面发挥关键作用。另有大量研究^[27,28]表明,PAKs 在结肠癌、乳腺癌、胃癌等多种肿瘤的发生发展中发挥重要作用,在肿瘤细胞增殖方面,PAKs 可激活 Ras/Raf/Mek/ERK 通路的激酶级联反应;在抗肿瘤细胞凋亡方面,PAKs 又可激活 BAD/Bcl-2 通路^[29]。化疗药物的治疗效果与恶性肿瘤细胞对该药物的敏感性密不可分,肿瘤细胞的抗凋亡作用是其形成耐药性的重要机制之一,而 PAKs 在化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡过程中发挥重要作用^[30]。其中 PAK3 为 PAKs 家族的重要一员,可调控包括丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)级联反应在内的多种信号通路^[31],可能为潜在的突变激发器,可调节细胞周期进展、神经元迁移和凋亡等^[32]。Lin 等^[33]的研究发现,上调 miR-423-5p 的表达可抑制 PAK3 在甲状腺癌细胞中的表达水平,同时甲状腺癌细胞对化疗药物的耐药性有所减弱。Hsing 等^[34]的研究同样显示,抑制 PAK3 可达到抑制胰腺癌细胞的增殖和迁移的作用,并提高对化疗药物的敏感性,其机制可能与激活 Akt-GSK3 β - β -catenin 信号通路有关。在本研究中,KM3/BTZ 细胞株的 IC₅₀ 显著高于 KM3 细胞株,KM3/BTZ 细胞株化疗敏感性显著低于 KM3 细胞株,同时 PAK3 mRNA 在 KM3/BTZ 细胞株的表达显著高于 KM3 细胞株,提示 PAK3 的表达水平可能与 KM3/BTZ 细胞株的化疗敏感性存在一定的相关性;进一步的研究显示,在抑制 PAK3 的表达之后,KM3/BTZ 细胞株化疗敏感性显著升高,证实了抑制 PAK 的表达可提高 KM3/BTZ 细胞的化疗敏感性。

综上所述,本研究显示,miR-134-5p 可提高 KM3/BTZ 细胞株对 BTZ 的化疗敏感性,其机制可能与抑制 PAK3 的表达有关,对 miR-134-5p 的调控有望成为临床治疗 MM 发现新型生物学靶点提供一定的理论支持。

参考文献(References)

- [1] Xu Z, Huang C, Hao D. MicroRNA-1271 inhibits proliferation and promotes apoptosis of multiple myeloma cells through inhibiting smoothened-mediated Hedgehog signaling pathway[J]. *Oncology Reports*, 2017, 37(2): 1261-1269
- [2] Tsukamoto S, Hirotsu K, Kumazoe M, et al. Multiple Myeloma Cells [J]. *Biochemical Journal*, 2019, 443(2): 525-534
- [3] Ting W, Wei T, Lei Z, et al. Oncogenic role of microRNA-20a in human multiple myeloma [J]. *Oncotargets & Therapy*, 2017, 10: 4465-4474
- [4] Jacob, Jeffries, Wenqing, et al. miRNA-223 at the crossroads of inflammation and cancer[J]. *Cancer Letters*, 2019, 451(1): 136-141
- [5] Duy N. Do a b, Pier-Luc Dudemaine a, Bridget E. Fomenky a c, et al. Integration of miRNA weighted gene co-expression network and miRNA-mRNA co-expression analyses reveals potential regulatory functions of miRNAs in calf rumen development[J]. *Genomics*, 2019, 111(4): 849-859
- [6] Chen T, Gao F, Feng S, et al. MicroRNA-134 regulates lung cancer cell H69 growth and apoptosis by targeting WWOX gene and suppressing the ERK1/2 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(3): 748-754
- [7] Liu Y, Zhang M, Qian J, et al. miR-134 functions as a tumor suppressor in cell proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition by targeting KRAS in renal cell carcinoma cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2015, 34(6): 429-436
- [8] Shang-Yi, Huang, Cheng-Shyong, et al. Pharmacokinetic study of bortezomib administered intravenously in Taiwanese patients with multiple myeloma[J]. *Hematological Oncology*, 2018, 36(1): 238-244
- [9] Jing Y, Liang W, Liu J, et al. Autophagy-mediating microRNAs in cancer chemoresistance [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2020, (3): 1-20
- [10] 李玉鹏, 张建国, 方梓青, 等. 补肾养骨汤对人多发性骨髓瘤耐药细胞 KM3/BTZ 多药耐药性的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(2): 482-488
- [11] Mewawalla P, Chilkulwar A. Maintenance therapy in multiple myeloma[J]. *Therapeutic Advances in Hematology*, 2017, 8(2): e71
- [12] Zaal EA, Wu W, Jansen G, et al. Bortezomib resistance in multiple myeloma is associated with increased serine synthesis [J]. *Cancer & Metabolism*, 2017, 5(1): e7
- [13] Bhattacharyya NP, Das E, Bucha S, et al. Regulation of cell cycle associated genes by microRNA and transcription factor [J]. *Microna*, 2016, 5(3): 180-200
- [14] Lian Q, Ma L, Liu ZT, et al. Targeting microRNAs: a new action mechanism of natural compounds [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (9): 15961-15970
- [15] Gulla A, Di Martino MT, Gallo Cantafio ME, et al. A 27mer LNA-i-miR-221 Inhibitor Restores Drug Sensitivity in Melphalan-Refractory Multiple Myeloma Cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(12): 1222-1233
- [16] Jillian W, Xiyin W, Shannon H. The Endometriotic Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer[J]. *Cancers*, 2018, 10(8): e261
- [17] Sandiford OA, Moore CA, Du J, et al. Human Aging and Cancer: Role of miRNA in Tumor Microenvironment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1056: 137-152
- [18] Fest J, Ruiter R, van Rooij FJ, et al. Underestimation of pancreatic cancer in the national cancer registry-reconsidering the incidence and survival rates[J]. *Eur J Cancer*, 2017, 72: 186-191
- [19] Bouvier AM, Bossard N, Colonna M, et al. Trends in net survival from pancreatic cancer in six European Latin countries: results from the SUDCAN population-based study[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2017, 26: S63-S69
- [20] 李为光, 李晓丽, 钱爱华, 等. 人胰腺癌组织中微 RNA-134-5p 的异常表达及其作用研究[J]. *内科理论与实践*, 2019, 14(2): 63-68
- [21] 汤继英, 蔡晓军, 汪选斌, 等. miR-134-5p 对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响及其分子机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(7): 742-747
- [22] C.A. Cedillo-Jimenez, C. Mondragon-Jacobo, Cruz-Ramirez LA, et al. miRNA and target interaction in ethylene biosynthesis pathway for prickly pear ripening[J]. *Acta Horticulturae*, 2020, 1297: 521-526
- [23] Rifu X, Ning Q, Xiaoxing X, et al. Inhibitory effect of SLIT2 on granulosa cell proliferation mediated by the CDC42-PAKs-ERK1/2 MAPK pathway in the prehierarchal follicles of the chicken ovary [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): e9168

- 465-478
- [15] 周智, 彭彬, 卢祖能. 糖尿病周围神经病电生理特点及与血糖水平的关系[J]. 卒中与神经疾病, 2014, 21(6): 343-346
- [16] Zilliox LA. Diabetes and Peripheral Nerve Disease [J]. Clin Geriatr Med, 2021, 37(2): 253-267
- [17] 孙晶, 邵加庆. 血糖波动与糖尿病神经病变的关系[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2018, 38(3): 204-208
- [18] 王晓薇. 血糖波动与 2 型糖尿病患者周围神经病变的相关性研究[J]. 河北医学, 2016, 22(5): 727-730
- [19] Jiang DQ, Xu LC, Jiang LL, et al. Fasudil combined with methylcobalamin or lipoic acid can improve the nerve conduction velocity in patients with diabetic peripheral neuropathy: A meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(27): e11390
- [20] 吴艳, 喻荷淋, 曾绍凡, 等. 羟苯磺酸钙联合硫辛酸治疗 2 型糖尿病周围神经病变临床疗效观察 [J]. 成都医学院学报, 2014, 9(5): 595-597
- [21] 官维峰, 王颜刚. 木丹颗粒联合羟苯磺酸钙治疗糖尿病周围神经病变的临床效果[J]. 中国医药, 2020, 15(5): 716-720
- [22] 冯彦景, 李艳君. 肌氨肽苷联合羟苯磺酸钙对糖尿病周围神经病变患者外周血 ET、NO 水平的影响 [J]. 山东医药, 2015, 55(46): 48-49
- [23] 申满竹, 田昌荣, 王新, 等. 羟苯磺酸钙联合单唾液酸四己糖神经节苷脂钠对老年痛性糖尿病周围神经病变患者血清白细胞介素 6 和单核细胞趋化蛋白 -1 的影响 [J]. 中国基层医药, 2019, 26(4): 392-395
- [24] 尹占霞, 赵丹阳. 羟苯磺酸钙联合甲钴胺治疗糖尿病周围神经病变的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4): 323-325
- [25] 冯俊, 徐逸群, 王冰清. 木丹颗粒改善糖尿病周围神经病变临床观察[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(4): 130-132
- [26] 赵步长, 赵涛, 赵明中. 糖尿病周围神经病变的发病机制及中药木丹颗粒干预研究新进展[J]. 中国医药导报, 2013, 10(12): 33-35
- [27] 李艳君, 冯彦景. 肌氨肽苷联合羟苯磺酸钙治疗糖尿病周围神经病变 20 例临床观察[J]. 山东医药, 2014, 54 (39): 51-52, 53
- [28] Sinzinger H, Rauscha F, Vinazzer H. Platelet function and prostaglandins in patients with peripheral vascular disease treated with calcium dobesilate [J]. Prostaglandins Leukot Med, 1987, 29(1): 1-9
- [29] 郭丽敏, 林珊珊, 田应芳, 等. 舒血宁注射液联合羟苯磺酸钙治疗糖尿病周围神经病变的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33 (10): 2594-2598
- [30] 王立娜, 杜娟, 董明, 等. 木丹颗粒联合贝前列素钠、依帕司他治疗糖尿病周围神经病变的疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(11): 2354-2357

(上接第 4233 页)

- [24] 满枋霖, 赵良智, 孙新. p21 活化激酶在肿瘤中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(6): 579-585
- [25] Kai Wang, Graham S Baldwin, Mehrdad Nikfarjam, Hong He. p21-activated kinase signalling in pancreatic cancer: New insights into tumour biology and immune modulation[J]. World Journal of Gastroenterology, 2018, 24(33): 3709-3723
- [26] Kumar R, Paul AM, Amjesh R, et al. Coordinated dysregulation of cancer progression by the HER family and p21-activated kinases[J]. Cancer and metastasis reviews, 2020, 39(1): 1-19
- [27] Zeng Y, Hahn S, Stokes J, et al. Pak2 regulates myeloid-derived suppressor cell development in mice [J]. Blood Advances, 2017, 1(22): e1923
- [28] Wu HY, Yang MC, Chu PC, et al. Abstract 1360: Novel function of p21-activated kinase 3 (PAK3) in regulating Akt phosphorylation and pancreatic cancer stem cell phenotypes[J]. Cancer Research, 2017, 77 (13 Supplement): 1360-1360
- [29] 王雪, 张评. Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路参与自噬调控作用的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(1): 110-116
- [30] Tian C, Min D, Yao Y. Research progress of p21-activated kinases 7 on tumour[J]. Oncol Prog, 2014, 12(1): 45-48
- [31] Rifu X, Ning Q, Xiaoxing X, et al. Inhibitory effect of SLIT2 on granulosa cell proliferation mediated by the CDC42-PAKs-ERK1/2 MAPK pathway in the prehierarchal follicles of the chicken ovary [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 9168
- [32] Rane C K, Minden A. P21 activated kinase signaling in cancer[J]. Seminars in Cancer Biology, 2018, 54: 40-49
- [33] Lin Q Y, Qi Q L, Hou S, et al. LncRNA PVT1 Acts as a Tumor Promoter in Thyroid Cancer and Promotes Tumor Progression by Mediating miR-423-5p-PAK3[J]. Cancer Management and Research, 2020, Volume 12: 13403-13413
- [34] Hsing-Yu, Ming-Chen, Yang, et al. p21-Activated Kinase 3 Promotes Cancer Stem Cell Phenotypes through Activating the Akt-GSK3 β - β -Catenin Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Cells [J]. Cancer letters, 2019, 1(456): 13-22