

miR-640 通过抑制 SLIT1 介导 Wnt/ β -catenin 通路促进脑胶质瘤对替莫唑胺的耐药

陈 静, 董善武, 陈咏丽, 陈海珊, 蒋 姝, 陈 澄, 罗 超

(武汉市第四医院, 湖北 武汉 430000)

摘要: [目的] 评价 miR-640 介导 Wnt/ β -catenin 通路对脑胶质瘤耐药细胞增殖、侵袭及替莫唑胺 (temozolamide, TMZ) 敏感性的影响。[方法] 利用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 测定脑胶质瘤细胞内 miR-640 的表达。U87/TMZ 细胞分为 NC inhibitor 组、miR-640 inhibitor 组和 miR-640 inhibitor+si-SLIT1 组。用不同浓度 (15、30、60、120、240、480 和 960 μ mol/L) TMZ 处理细胞, 检测细胞对 TMZ 的耐药性; 运用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8)、Transwell 实验检测 U87/TMZ 细胞增殖活力和侵袭力; 用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-640 与 SLIT1 的靶向关系。采用 Western blot 检测 Wnt/ β -Catenin 信号通路相关蛋白表达水平。[结果] miR-640 在脑胶质瘤细胞中高表达, 转染后 miR-640 inhibitor 组的 miR-640 表达水平、侵袭细胞数目 (57 ± 23 vs 153 ± 31)、IC₅₀ 值 (131.61 ± 8.97 vs 293.33 ± 11.28)、增殖率 (18.48 ± 4.23 vs 43.84 ± 8.94) 均比 NC inhibitor 组低 ($P < 0.05$)。miR-640 靶向调控 SLIT1 的表达, miR-640 inhibitor+si-SLIT1 组 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 蛋白表达水平均高于 miR-640 inhibitor 组 ($P < 0.05$)。[结论] miR-640 通过 SLIT1 介导 Wnt/ β -catenin 通路促进脑胶质瘤增殖、侵袭及对替莫唑胺的耐药性。

关键词: 脑胶质瘤; 替莫唑胺; miR-640; Wnt/ β -catenin 通路

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2022)07-0568-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2022.07.B007

miR-640 Promote Proliferation, Invasion and Resistance to Temozolomide in Glioma by Inhibiting SLIT1-mediated Wnt/ β -catenin Pathway

CHEN Jing, DONG Shan-wu, CHEN Yong-li, CHEN Hai-shan, JIANG Shu, CHEN Cheng, LUO Chao

(Wuhan No.4 Hospital, Wuhan 430000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of miR-640-mediated Wnt/ β -catenin pathway on proliferation, invasion and sensitivity to temozolomide (TMZ) in glioma cells. [Methods] The expression of miR-640 in glioma cells as determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). TMZ-resistant human glioma U87/TMZ cells were transfected with NC inhibitor, miR-640 inhibitor and miR-640 inhibitor+ si-SLIT1, respectively. U87/TMZ cells were treated with TMZ (15, 30, 60, 120, 240, 480 and 960 μ mol/L). Cell counting Kit 8 (CCK-8) and Transwell assay were used to detect the proliferation and invasion of U87/TMZ cells. Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-640 and SLIT1. Western blot was used to detect the expression levels of Wnt/ β -catenin signaling pathway related proteins. [Results] miR-640 was highly expressed in glioma cells. The miR-640 expression level, number of invaded cells (57 ± 23 vs 153 ± 31), IC₅₀ value (131.61 ± 8.97 vs 293.33 ± 11.28) and proliferation rate (18.48 ± 4.23 vs 43.84 ± 8.94) in miR-640 inhibitor group were significantly lower than those in NC inhibitor group ($P < 0.05$). The miR-640 specifically regulated the expression of SLIT1, and the protein expression levels of β -catenin, c-myc and Cyclin D1 in miR-640 inhibitor+ si-SLIT1 group were higher than those in miR-640 inhibitor group ($P < 0.05$). [Conclusion] miR-640 may promote glioma proliferation, invasion and resistance to TMZ through SLIT1-mediated Wnt/ β -catenin pathway.

Subject words: glioma; temozolomide; miR-640; Wnt/ β -catenin pathway

脑胶质瘤起源于脑神经胶质细胞, 恶性程度高,

治疗复杂且预后差^[1]。尽管有积极的综合治疗, 但恶性脑胶质瘤患者的中位总生存期 (overall survival, OS) 仍约为 12~15 个月^[2]。替莫唑胺 (temozolamide, TMZ) 是胶质瘤化疗中最常用的烷化剂, 然而, TMZ 的耐药

基金项目: 武汉市卫健委科研项目 (WX21C05)

通信作者: 罗 超, E-mail: light02059@126.com

收稿日期: 2021-12-29; **修回日期:** 2022-05-19

性是临床医生的一个主要挑战^[3]。最近的证据强调了微小RNA (miRNA)在肿瘤生物学中的关键调控作用,包括癌症的化疗耐药性。研究报道,miRNA 在胶质母细胞瘤的异常生物学过程中作为癌基因或抑癌基因^[4-6]。近期研究报道 miR-640 与多种癌症的发生发展密切相关。miR-640 抑制乳腺癌的增殖和迁移^[7],且与浆液性卵巢癌紫杉醇耐药相关^[8];但关于 miR-640 表达对脑胶质瘤耐药的影响尚未明确。本研究通过检测 miR-640 在脑胶质瘤耐药细胞中的表达,观察抑制 miR-640 对脑胶质瘤耐药细胞增殖和 TMZ 敏感性的影响,并进一步探讨对 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用,为胶质瘤耐药分子靶向治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

胶质瘤细胞系 U87、U251、A172 和正常细胞系 HA 购自于 ATCC。DMEM 高糖细胞培养基、FBS 和链霉素-青霉素双抗均购自于美国 Gibco 公司; Lipofectamine2000 转染试剂和 Trizol 购自于美国 Invitrogen 公司;蛋白提取试剂盒、细胞计数试剂盒 8 (CCK-8)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Western blot Kit 高灵敏度化学发光检测试剂盒购自于上海碧云天生物技术有限公司。NC inhibitor、miR-640 inhibitor、NC mimic、miR-640 mimic、si-SLIT1 均购自广州锐博,SLIT1 蛋白 siRNA 序列:正义链 5'-GCCUGAUGCUGAGGAACAATT-3',反义链 3'-UUGU-UCCUCAGCAUCAGGCTT-5;甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1、SLIT1 抗体购自于美国 Abcam 公司;Dual-Glo 荧光素酶测定系统购自美国 Promega 公司,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂盒购自大连 Takara 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

将人脑胶质瘤细胞系 U87、U251、A172 和正常细胞系 HA 培养于 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 培养液中,培养条件 37 °C、5% CO₂ 培养箱。

1.2.2 U87/TMZ 耐药细胞培养及转染

采用胰酶消化处于对数生长期的 U87 细胞系,处理后加

入 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中,待细胞贴壁后,加入 15 μ mol/L 诱导剂量的 TMZ,稳定传代 3 次后,药物浓度逐渐递增,分别为 30、60、120、240、480 μ mol/L TMZ 溶液处理细胞,待细胞稳定传代后使用下一个筛选浓度,成功建立稳定生长的 U87/TMZ 耐药细胞系。

取对数生长期 U87/TMZ 细胞进行实验。接种于 6 孔板,当细胞汇合度达约 70%时,应用 Lipofectin TM2000 进行转染,实验分组为:①NC inhibitor, ②miR-640 inhibitor, ③miR-640 inhibitor+si-SLIT1 转染组。

1.2.3 RT-qPCR 检测基因表达

根据制造商的说明书,Trizol 法提取胶质瘤细胞总 RNA,使用 TaqMan MicroRNA 逆转录试剂盒将总 RNA 进行逆转录,使用 SYBR Green PCR Master Mix 进行 miR-640 RT-qPCR,以 U6 基因作为内参 (Table 1)。另外取 10 ng RNA 模板使用第一链 cDNA 合成试剂盒(Promega),按照制造商的说明进行逆转录,逆转录得到 cDNA 后扩增目的基因,以 GAPDH 作为内参基因以确定 SLIT1 的表达。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的表达变化倍数。

1.2.4 Transwell 检测细胞侵袭细胞

用涂基质凝胶的 Transwell 板测定细胞的侵袭性。转染 24 h 后,胰酶消化铺板,取 100 μ L 无血清细胞悬液加入到 Transwell 小室中,在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 24 h,细胞侵入膜下表面。24 h 后,用 4%多聚甲醛固定滤膜表面的细胞,并用 1%结晶紫染色。随机选取 10 倍镜视野,计数细胞数。每组设 3 个复孔。

1.2.5 CCK8 法检测胶质瘤细胞的增殖能力

检测加 TMZ 后的细胞增殖曲线:对数生长期细胞以每孔 5×10^3 个接种至 96 孔板,37 °C、5% CO₂ 环境中孵育 24 h 后吸取上清,加入一定浓度 TMZ 和 DMEM+10%FBS 混合液,TMZ 浓度梯度为 15、30、60、120、240、480 和 960 μ mol/L,每个浓度设 3 个复孔。处理 48 h 后,每孔加入 100 μ L 稀释后的 CCK8

Table 1 Primer sequence

Primer	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
miR-640	ATGATCCAGGAACCTGCCTCT	
SLIT1	TGTGAAGCACGACTGTGTCA	TAGCCCTCAGCACAGAGACA
GAPDH	TGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GCATGTCAGATCCACAACGG
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTTCGT

溶液, 37℃、5%CO₂ 环境孵育 1 h。酶标仪检测 450 nm OD 值。按照细胞生存曲线计算细胞半抑制浓度 (IC₅₀)。实验重复 3 次。

检测转染后细胞增殖曲线: 胰酶消化后, 将转染后的 U87/TMZ 细胞以 5×10³/孔置于 96 孔板中, 每组设 3 个复孔。在每个时间点 (0、24、48、72 h) 加入 100 μL 稀释的 CCK-8 溶液孵育 1 h, 酶标仪检测 450 nm OD 值。

1.2.6 双荧光素酶报告基因

在双荧光素酶报告基因实验中, 构建相应的 *SLIT1* 野生型和突变型荧光素酶报告质粒, 将 *SLIT1* 野生型和突变型荧光素酶报告质粒分别与 miR-640 mimic 和 NC mimic 共转染到 HEK-293T 细胞中。转染 48 h 后, 收集并裂解细胞, 使用双荧光素酶报告分析系统 (Promega, 美国) 检测荧光素酶活性。

1.2.7 Western blot 检测蛋白表达

采用 IP 细胞裂解缓冲液提取蛋白样品, BCA 法定量分析。蛋白质经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后电转移到 PVDF 膜上, 2 h 后用 5% 脱脂牛奶封闭。洗涤后将膜与采购自 Abcam 的 GAPDH、β-catenin、c-myc、Cyclin D1 和 *SLIT1* 的一抗 (1:1 000 稀释) 过夜孵育, 洗涤后与二抗 (1:5 000) 温床孵育 1.5 h。用 TBST 洗涤膜 30 min 后进行 ECL 显影, 以 GAPDH 为内参, Image J 软件分析靶向蛋白表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 版软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-640 在胶质瘤细胞中的表达

与人正常胶质细胞 HA 相比, 胶质瘤细胞 U87、U251、A172 中 miR-640 表达显著性升高 ($t=17.84, 13.05, 32.34, P$ 均 < 0.001) (Figure 1)。miR-

640 在 U87 细胞表达差异更明显, 因此选取 U87 细胞用于后续实验。

2.2 miR-640 在胶质瘤耐药细胞中高表达

细胞活力随 TMZ 浓度的增加而降低, 耐药 U87/TMZ 细胞的 IC₅₀ 值高于正常 U87 细胞 ($t=30.92, P<0.001$) (Figure 2A)。RT-qPCR 结果显示, miR-640 在 U87/TMZ 细胞中的表达显著性升高 (Figure 2B), 差异有统计学意义 ($t=9.002, P<0.001$)。

2.3 miR-640 促进 U87/TMZ 细胞侵袭力

转染 miR-640 inhibitor 至 U87/TMZ 细胞 24 h 后, RT-qPCR 检测结果显示, miR-640 inhibitor 组中 miR-640 表达量明显低于对照组 (Table 2)。与对照组比较, miR-640 inhibitor 组细胞侵袭数目显著性下降 ($P<0.05$) (Figure 3, Table 2)。

2.4 转染 miR-640 inhibitor 对 U87/TMZ 细胞增殖及 TMZ 药物敏感性的影响

与对照组相比, 下调 miR-640 组 24、48、72 h 细

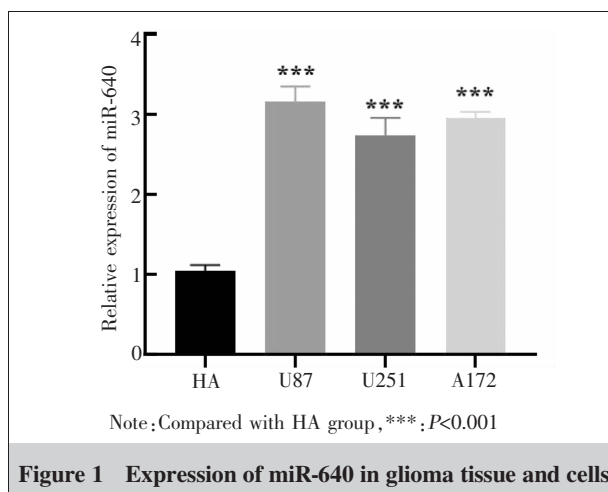


Figure 1 Expression of miR-640 in glioma tissue and cells

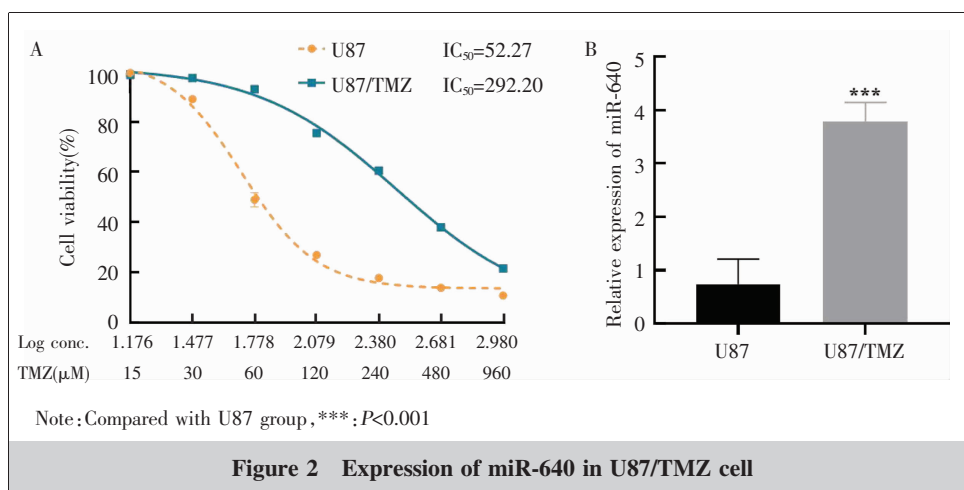


Figure 2 Expression of miR-640 in U87/TMZ cell

胞增殖率均显著性下降 ($P<0.05$) (Table 3)。

U87/TMZ 细胞转染 miR-640 inhibitor 后, NC inhibitor 和 miR-640 inhibitor 组的 IC_{50} 值分别为 293.33 ± 11.28 、 131.61 ± 8.97 , miR-640 inhibitor 组 IC_{50} 值显著性降低 ($t=19.44$, $P<0.01$) (Figure 4)。

2.5 SLIT1 在 U87/TMZ 细胞中高表达

与 U87 细胞相比, U87/TMZ 细胞中 SLIT1 的 mRNA、蛋白表达水平均显著性下调 ($t=11.07$ 、 10.55 , P 均 <0.001) (Figure 5)。

2.6 miR-640 靶向调控 SLIT1 的表达

通过 miRDB 软件预测 SLIT1 与 miR-640 的靶向结合位点示意图 (Figure 6)。与 NC mimic 与 WT-SLIT1 共转染相比, miR-640 mimic 与 WT-SLIT1 共转染后 293T 细胞的荧光活性显著性降低 ($P<0.05$); 而 miR-640 mimic 与 MUT-SLIT1 共转染、NC mimic 与 MUT-SLIT1 共转染后, 细胞荧光活性不受影响 (Table 4)。与 NC inhibitor 组相比, miR-640 inhibitor 组 SLIT1 mRNA 和蛋白表达水平均显著性上升 ($t=31.50$ 、 7.309 , P 均 <0.05) (Figure 7)。

2.7 miR-640 通过抑制 SLIT1 介导 Wnt/ β -catenin 通路促进脑胶质瘤对替莫唑胺的耐药

miR-640 inhibitor 组 U87/TMZ 细胞的 β -catenin、Cyclin D1、c-myc 表达水平低于 NC inhibitor 组 ($t=15.69$ 、 17.89 、 13.44 , P 均 <0.05)。miR-640 inhibitor+si-SLIT1 组 U87/TMZ 细胞的 β -catenin、cyclin D1、c-myc 表达水平高于 miR-640 inhibitor 组 ($t=9.712$ 、 12.70 、 11.57 , P 均 <0.05) (Figure 8)。

3 讨论

脑胶质瘤的恶性预后涉及到癌基因的扩增和过表达、抑癌基因的缺失及信号通路的异常。miRNA 通常通过与靶 mRNA 翻译区 (UTR) 结合, 抑制靶基因的表达^[9]。研究表明 miRNA 在细胞增殖^[10]、凋亡^[11]、耐药^[12-13]等生物学过程中发挥着重要作用。miR-640

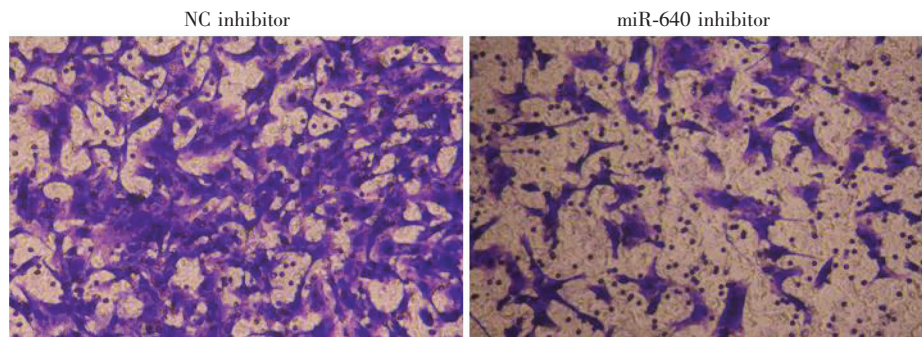


Figure 3 The effect of inhibiting the expression miR-640 on the invasion of U87/TMZ cell

Table 2 The effect of inhibiting the expression miR-640 on the invasion of U87/TMZ cell

Group	miR-640	Invasion cell number
NC inhibitor	1.02±0.05	153±31
miR-640 inhibitor	0.41±0.03	57±23
<i>t</i>	18.120	4.308
<i>P</i>	<0.001	0.0126

Table 3 Comparison of proliferation rate at different time

Group	Cell proliferation rate (%)		
	24 h	48 h	72 h
NC inhibitor	17.57±3.42	28.45±5.32	43.84±8.94
miR-640 inhibitor	10.45±2.42	15.39±3.29	18.48±4.23
<i>t</i>	2.944	3.616	5.317
<i>P</i>	0.0422	0.0224	0.006

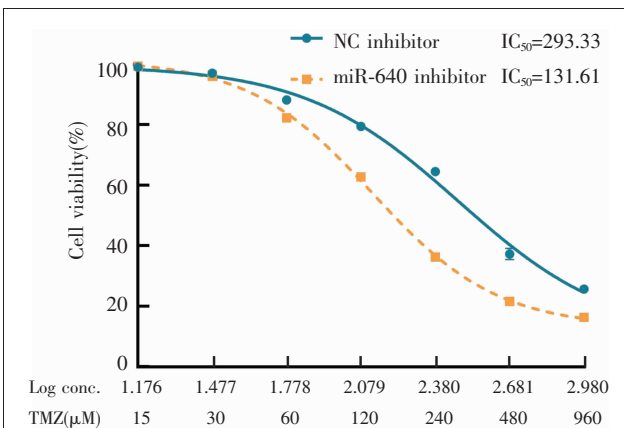


Figure 4 The effect of inhibiting the expression miR-640 on the IC_{50} value of U87/TMZ cell

在介导 H2S 促血管生成作用中发挥着关键作用^[14]。miR-640 可通过抑制 LRP1 和 Wnt 信号通路促进细胞炎症^[15]。此外, Li 等^[8]通过 miRNA 基因芯片发现 miR-640 与卵巢癌紫杉醇耐药密切相关。然而, 关于 miR-640 是否参与人脑胶质瘤细胞 TMZ 耐药机制目

前较少相关报道。本研究运用 RT-qPCR 检测 miR-640 表达,发现其在脑神经胶质瘤细胞系中高表达。为了进一步明确 miR-640 与脑神经胶质瘤 TMZ 耐药之间的相关性,通过在 U87/TMZ 细胞中检测 miR-640 表达,发现其表达水平相对于 U87 细胞显著性增高,且沉默 U87/TMZ 细胞中 miR-640 表达能抑制细胞增殖和侵袭,U87/TMZ 细胞中 TMZ 的 IC₅₀ 值显著性降低,表明 miR-640 可能抑制人脑胶质瘤细胞对 TMZ 药物敏感性。

神经轴突导向因子 SLIT1 位于染色体 10q24.1 上,由 37 个外显子组成^[16]。Shuai 等^[17]发现 SLIT1 在结直肠癌中低表达,SUV39H2 通过 SLIT1 启动子的三甲基化促进结直肠癌增殖和转移。之前的研究多集中在 SLIT1 在调节神经系统轴突发育的功能研究。近年来研究表明 SLIT1 与血管生成和癌症进展存在相关性^[18]。本研究利用生物信息学数据库发现 miR-640 靶向 SLIT1,进一步通过双荧光素酶报告实验证实两者结合,并且抑制 miR-640 可降低 U87/TMZ 细胞中 SLIT1 mRNA 与蛋白的表达水平,提示在胶质瘤中高表达 miR-640 与低表达因子 SLIT1 呈负向调控。

Wnt 信号通路广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物中,是一类在物种进化过程中高度保守的信号通路^[19],Wnt/β-catenin 信号通路在动物胚胎的早期发育、器官形成、

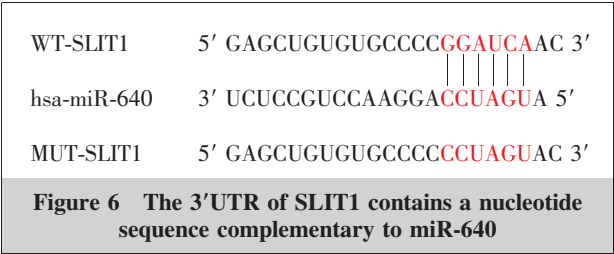
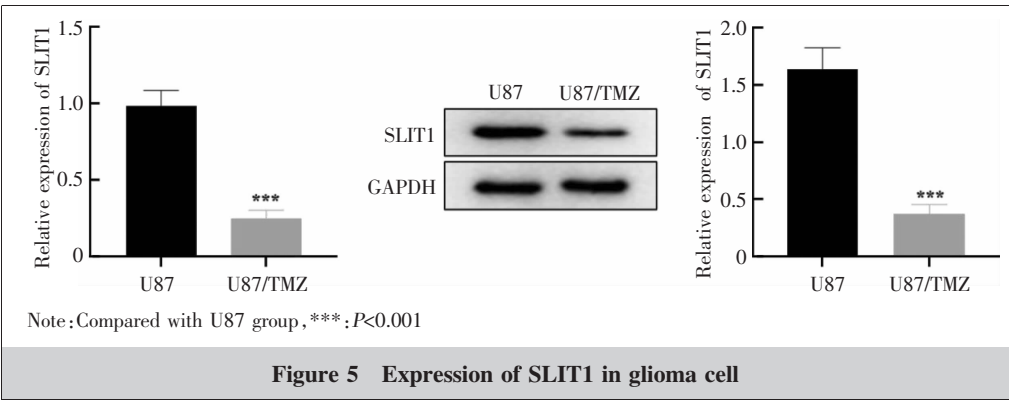
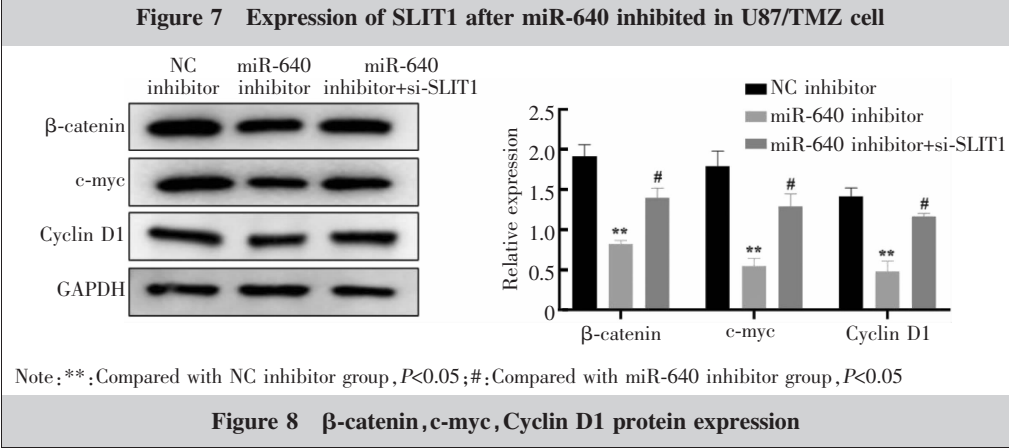
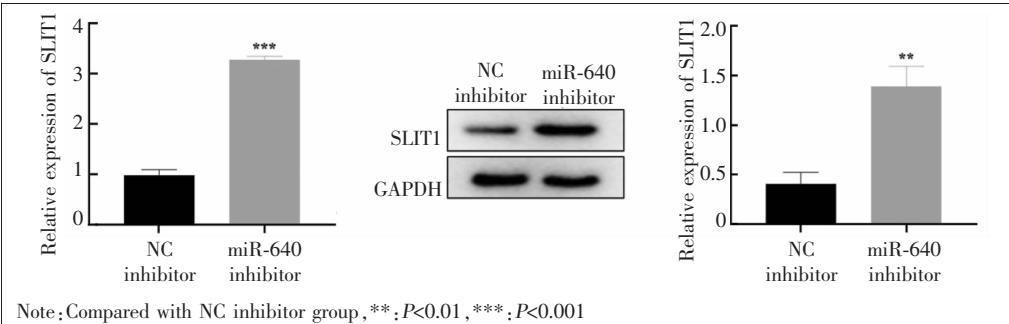


Figure 6 The 3'UTR of SLIT1 contains a nucleotide sequence complementary to miR-640

Group	WT-SLIT1	MUT-SLIT1
NC mimic	0.90±0.04	0.91±0.08
miR-640 mimic	0.52±0.10	0.90±0.03
t	6.681	0.179
P	0.0052	0.9822



组织再生和其他生理过程中具有至关重要的作用,广泛参与肿瘤转移、耐药等多种机制^[20]。干扰 Gab2 表达可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路标志蛋白 β -catenin 及下游靶基因 c-myc、Cyclin D1 蛋白表达,从而诱导细胞凋亡^[21]。对于脑胶质瘤细胞的放疗抵抗,主要机制是由 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)所介导的 DNA 修复过程影响,而 Wnt/ β -catenin 信号通路可以调控 MGMT 的表达。本研究检测干扰 miR-640 表达的 U87/TMZ 细胞中 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 蛋白的表达发现,干扰 miR-640 表达可抑制 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 蛋白的表达,揭示 miR-640 可能通过 SLIT1 介导 Wnt/ β -catenin 信号通路促进脑胶质瘤对 TMZ 的耐药。

综上所述,miR-640 可促进胶质瘤耐药细胞增殖和侵袭,并提高胶质瘤细胞对 TMZ 的耐药性,其机制可能是通过 SLIT1 介导 Wnt/ β -catenin 信号通路,为 miR-640 靶向治疗脑神经胶质瘤耐药提供参考依据。

参考文献:

- [1] Tang J, Yang L, Chen J, et al. Bortezomib inhibits growth and sensitizes glioma to temozolomide(TMZ) via down-regulating the FOXM1-Survivin axis [J]. *Cancer Commun(London)*, 2019, 39(1): 81.
- [2] Han B, Meng X, Wu P, et al. ATRX/EZH2 complex epigenetically regulates FADD/PARP1 axis, contributing to TMZ resistance in glioma[J]. *Theranostics*, 2020, 10(7): 3351-3365.
- [3] Xu X, Wang Z, Liu N, et al. Association between SOX9 and CA9 in glioma, and its effects on chemosensitivity to TMZ[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(1): 189-202.
- [4] Xu Q, Chen X, Chen B. DCUN1D1MicroRNA-3148 inhibits glioma by decreasing and inhibiting the NF- κ B pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(1): 28.
- [5] Peng G, Liu Y, Yang C, et al. MicroRNA-25 promotes cell proliferation, migration and invasion in glioma by directly targeting cell adhesion molecule 2[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(1): 16.
- [6] Li W, Liu J, Ji L, et al. MiR-674-5p suppresses the proliferation and migration of glioma cells by targeting Cul4b[J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(3): 679-691.
- [7] Tang C, Wang X, Ji C, et al. The role of mir-640: a potential suppressor in breast cancer Wnt7b/ β -catenin signaling pathway[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 645682.
- [8] Li X, Lu Y, Chen Y, et al. MicroRNA profile of paclitaxel-resistant serous ovarian carcinoma based on formalin-fixed paraffin-embedded samples[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 216.
- [9] Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(8): 460-469.
- [10] Sampath S, Venkatabalasubramanian S, Ramalingam S. Role of micrnas in the progression and metastasis of colon cancer [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2021, 21(1): 35-46.
- [11] Aggarwal T, Wadhwa R, Gupta R, et al. MicroRNAs as biomarker for breast cancer [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2020, 20(10): 1597-1610.
- [12] Weidle U, Birzele F, Brinkmann U, et al. In vivo gastric cancer: identification of microRNAs inhibiting druggable targets and mediating efficacy in preclinical models [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2021, 18(4): 497-514.
- [13] Okamura S, Yoshino H, Kuroshima K, et al. EHHADH contributes to cisplatin resistance through regulation by tumor-suppressive microRNAs in bladder cancer[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 48.
- [14] Zhou Y, Li XH, Zhang CC, et al. Hydrogen sulfide promotes angiogenesis by downregulating miR-640 via the VEGFR2/mTOR pathway[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 310(4): C305-C317.
- [15] Wang GX, Pan JY, Wang YJ, et al. MiR-640 inhibition alleviates acute liver injury via regulating WNT signaling pathway and LRP1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(17): 8988-8996.
- [16] Tong M, Jun T, Nie Y, et al. The role of the Slit/Robo signaling pathway[J]. *J Cancer*, 2019, 10(12): 2694-2705.
- [17] Shuai W, Wu J, Chen S, et al. SUV39H2 promotes colorectal cancer proliferation and metastasis via tri-methylation of the SLIT1 promoter[J]. *Cancer Lett*, 2018, 422: 56-69.
- [18] Koohini Z, Koohini Z, Teimourian S. Slit/Robo signaling pathway in cancer; a new stand point for cancer treatment [J]. *Pathol Oncol Res*, 2019, 25(4): 1285-1293.
- [19] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [20] Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36(11): 1461-1473.
- [21] 范亚峰, 崔晓燕, 虞中平, 等. Gab2 基因在肺癌细胞表达及对癌细胞凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. *肿瘤学杂志*, 2019, 25(3): 213-217.
- Fan YF, Cui XY, Yu ZP, et al. Expression of Gab2 binding protein 2 in lung cancer cells and its relation to apoptosis and Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2019, 25(3): 213-217.