

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.02.001

• 基础研究 •

MiR-147a 通过抑制细胞自噬促进 HIF-1 α 蛋白的积累 *王 凡^{1,2,3} 卢锦华⁴ 何 杰⁵ 张浩翔^{1,2} 张雅鸥^{2Δ}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084; 2 清华大学深圳研究生院 广东 深圳 518033;

3 深圳市坪山高级中学 广东 深圳 518118; 4 深圳南粤药业有限公司 广东 深圳 518033;

5 广州市第一人民医院消化内科 广东 广州 510180)

摘要 目的: HIF-1 α 是由低氧诱导表达的一个重要的调节肿瘤生长、代谢的转录因子, 它的降解除了通过泛素-蛋白酶体途径降解之外还与可以通过细胞自噬途径降解。通过研究 miR-147a 对细胞自噬的影响从而进一步研究 miR-147a 对 HIF-1 α 降解的影响。**方法:** 在 HeLa 细胞中过表达 miR-147a, 用 Western blot 和 Q-PCR 检测细胞自噬相关的标志物 LC3B、P62、LAMP-2A 的变化。再通过溶酶体-自噬泡共定位实验共聚焦显微镜观察自噬泡的数量以及共定位情况。最后通过加入自噬诱导剂(EBSS)和自噬抑制剂(Bafilomycin A1), 用 Western blot 检测转染 NC 与 miR-147a 后 HIF-1 α 蛋白的表达情况。**结果:** 过表达 miR-147a 后自噬相关的标志物 LC3B、P62 表达量上升, LAMP-2A 表达量下降, 且溶酶体与自噬泡的共定位增多; 加入自噬诱导剂和自噬抑制剂后 HIF-1 α 蛋白的表达量增加。结果表明 miR-147a 可以抑制细胞自噬的巨自噬途径以及分子伴侣介导的自噬途径, 积累 HIF-1 α 蛋白。**结论:** miR-147a 通过抑制细胞自噬从而减少 HIF-1 α 蛋白的降解, 但是 miR-147a 作用靶点的分子机制需要进一步研究。

关键词: 细胞自噬; miR-147a; HIF-1 α **中图分类号:** R-33; Q593 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)02-201-04MiR-147a Increases the Accumulation of HIF-1 α Protein through Inhibiting Autophagy*WANG Fan^{1,2,3}, LU Jin-hua⁴, HE Jie⁵, ZHANG Hao-xiang^{1,2}, ZHANG Ya-ou^{2Δ}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China; 2 Key Lab in Healthy Science and Technology, Division of Life Science, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518033, China; 3 Shenzhen Ping Shan senior high school, Shenzhen Guangdong, 518118, China; 4 Shenzhen South China Pharmaceutical Company Shenzhen, Guangdong, 518033, China; 5 Digestive Disease Center of Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou, Guangdong, 510180, China)

ABSTRACT Objective: HIF-1 α is an important hypoxia-induced factor which regulates tumor growth and metabolism. And its degradation is associated with autophagy. To further study the impact of miR-147a on HIF-1 α 's degradation, we study the relationship between miR-147a and autophagy. **Methods:** MiR-147a was over-expressed in HeLa cells. Autophagy related markers, such as LC3B, P62 and LAMP-2A were detected by Western blot and Q-PCR. Next, we used confocal microscope to observe the numbers of autophagic vacuoles and its co-localization with lysosome. Finally, we performed Western blot to detect the protein level of HIF-1 α when HeLa cells were transfected with miR-147a and treated with autophagy inducer or autophagy inhibitor. **Results:** Autophagy related markers, such as LC3B, P62 and LAMP-2A were increased and the numbers of autophagic vacuoles and its co-localization with lysosome were raised. The protein level of HIF-1 α were increased when treated with autophagy inducer or autophagy inhibitor. All these experiments revealed that miR-147a could inhibit both macroautophagy and chaperone-mediated autophagy, thus reduced the degradation of HIF-1 α . **Conclusion:** In this paper, we found that miR-147a could inhibit autophagy and accelerated the accumulation of HIF-1 α through hindering the autophagy pathway of HIF-1 α degradation. But the targets of miR-147a needed further research.

Key words: Autophagy; miR-147a; HIF-1 α **Chinese Library Classification(CLC):** R-33; Q593 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2017)02-201-04

前言

细胞自噬是一种基本的分解代谢途径, 细胞通过溶酶体将多余的、有害的、损伤的细胞器或蛋白降解。细胞自噬具有三

* 基金项目: 深圳市科技计划项目(GJHZ20140416153718941)

作者简介: 王凡(1990-), 女, 硕士, 主要研究方向: 分子生物学, E-mail: wang-fl3@mails.tsinghua.edu.cn

Δ 通讯作者: 张雅鸥, 女, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 分子生物学, Email: zhangyo@sz.tsinghua.edu.cn

(收稿日期: 2016-04-27 接受日期: 2016-05-20)

种形式:微自噬(microautophagy)、巨自噬(macroautophagy)、分子伴侣介导的自噬(Chaperone-mediated autophagy)^[1]。微自噬是溶酶体直接降解细胞质中的组分过程^[2]。巨自噬是过程比较复杂,分为多个阶段^[3]。细胞自噬起始阶段需要在多个复合物的作用下使细胞内的双层膜结构形成双层膜的吞噬泡,然后延伸包裹需要降解的物质,形成一个球形的自噬泡。延伸阶段主要在LC3的参与下,因此LC3是自噬泡形成的一个标志物^[4]。当自噬泡与溶酶体融合形成自噬小体就是自噬泡的成熟阶段,成熟阶段的自噬小体可以降解被包裹的物质。p62/SQSTM1是自噬小体中普遍存在的一种底物,因此可以作为自噬流中的一个标志物^[5]。分子伴侣介导的自噬是一种选择性降解蛋白的途径,HSP70识别含有KFERQ序列的蛋白,然后与溶酶体膜上的LAMP-2A识别进入溶酶体中降解^[6]。细胞自噬参与多种生理功能,自噬调控包括发育与分化、免疫反应、衰老、癌症以及其他相关疾病^[7]。

MicroRNA是一类广泛存在于真核生物中的长度约20-23个小核苷酸的非编码RNA。通过转录后调控编码基因从而调控细胞的生长、胚胎的发育、心血管疾病的生成和癌症等^[8]。低氧是实体瘤发生的一个重要的微环境,低氧下诱导产生一个非常重要的低氧诱导因子-HIF-1 α ,它是受氧气调控的具有基础的-螺旋-环-螺旋-PAS结构域的异源二聚体^[9]。HIF-1 α 的降解主要有两条途径降解,一条是受氧气调控的蛋白酶体途径;一条为不受氧气调控的细胞自噬途径^[10]。在常氧的情况下,PHD羟基化酶具有活性羟基化HIF-1 α 并通过泛素-蛋白酶体途径降解;在低氧的情况下,HIF-1 α 与HIF-1 β 结合形成具有转录活性的二聚体^[11]。不受氧气调控的自噬途径,分子伴侣介导的自噬可以选择性的靶向HIF-1 α 并通过溶酶体降解^[12]。HIF-1 α 作为一个转录因子通过调节大量的下游基因的转录,从而调控一系列生理过程使得肿瘤细胞可以适应低氧环境生存,包括代谢减慢、抑制 β -脂肪酸的氧化、改变肿瘤表达基因等^[13]。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

HeLa(human cervical cancer, ATCC, CCL-2)细胞在温度为37℃,含有5%CO₂的细胞培养箱中培养。培养基为含有10%的胎牛血清(FBS, PAA, A15-101)的DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)。

1.2 miRNA的转染

HeLa细胞转染miRNA使用Lipofectamine 2000(Invitrogen, 11668-019)进行瞬时转染。操作时将终浓度为20nM的miRNA用Opti-MEM(Invitrogen)稀释后与等体积稀释的Lipofectamine 2000混合。在室温孵育15min后,将混合的miRNA、转染试剂混合物加入含有细胞的每孔细胞培养皿中。细胞置于37℃,5%CO₂的细胞培养箱中培养6h,待细胞贴壁,换新鲜的含有10%血清的DMEM培养基。

1.3 RNA的提取,反转录与实时定量PCR

去掉6孔板中的培养基,用1×PBS清洗一遍后每孔加入1mL的RNAiso plus(Takara, D9108B),按照说明书上的操作提取RNA。将提取的mRNA在NANODROP 2000上测量核酸

浓度,取出2 μ g mRNA,加入2 μ L的Random Primer按照逆转录试剂盒(Takara, D6130)操作进行逆转录反应得到cDNA。实时定量PCR反应使用绿色实时定量PCR混合物SYBR(Toyobo, QPK-201),按照说明书进行操作。

1.4 蛋白质印记

将需要实验用的六孔板中的细胞去掉培养基,用PBS缓冲液清洗两边后倒掉缓冲液,加入约适量的细胞裂解液使细胞完全裂解。利用考马斯亮蓝法检测蛋白浓度,通过定量使所有的样品的蛋白浓度保持一致。加入4×SDS-PAGE Loading Buffer,置于100℃的加热器上煮10min使蛋白完全变性后置于冰上预冷,然后离心使壁上水蒸气置于下部。配置10%SDS-PAGE电泳分离胶与5%浓缩胶,室温下100V进行电泳,80V电压湿转法转膜1.5h-2.0h,封闭后孵育一抗、二抗。所使用的一抗为HIF-1 α (BD 610958),P62(MBL PM045),Lamp-2A(ab125068),LC3B(Sigma L7543),ACTB(CST 3700)。二抗为羊抗鼠(KPL 074-1806或者羊抗兔(KPL 474-1506),显影定影底物购自KPL公司。定影后得到相应的条带扫描后使用ImageJ软件对扫描的图片灰度值分析。

1.5 共聚焦显微镜观察自噬泡

实验室构建的稳定表达GFP-LC3的HeLa细胞系按照每孔30万细胞的密度种于六孔板细胞培养皿中,并在每孔底部放置一个盖玻片使细胞可以附着生长。转染miRNA,36h后加终浓度为50nM的lysotracker Red在细胞培养箱中继续培养20min后,取出盖玻片用封片剂封片后置于共聚焦显微镜下观察。观察到的绿色荧光蛋白的发光现象为自噬泡,红色现象为溶酶体。

1.6 统计学分析

所得的所有数据都是至少重复三次的结果,使用Graph-Pad Prism 5分析,均值采用 $\pm$ SD(标准差)表示。两个样本的比较采用独立样本t检验,*p<0.05具有统计学意义上的差异;**p<0.001具有显著性差异。

2 结果

2.1 miR-147a对巨自噬的影响

为了研究miR-147a与巨自噬的关系,我们将miR-147a转染到HeLa细胞中,首先通过Western blot检测巨自噬发生过程中的两个重要的标志物LC3B和P62。结果发现转染了miR-147a后LC3B、P62的表达量与对照NC相比都有所增加;通过转染Ant-miR-147a抑制内源性的miR-137a后,LC3B、P62的表达量与对照NC相比都有所减少。(见图1A)。

由于LC3B的增加表明自噬泡的增多;P62作为巨自噬特异性降解底物,P62表达量的增加说明巨自噬途径可能受到阻碍。因此可以初步证明miR-147a可以抑制巨自噬。

为了进一步验证miR-147a抑制巨自噬过程,我们将miR-147a转染至稳定表达绿色荧光蛋白标记的LC3B的HeLa细胞株中,并利用溶酶体特异性荧光染料LysoTracker标记细胞中的溶酶体,E-64d是Cathepsin抑制剂作为阳性对照^[14]。结果显示在miR-147a过表达的细胞中,GFP-LC3(绿色亮点)增多,并且GFP-LC3与溶酶体(红色亮点)的共定位(橘黄色)与NC相比增多,但是没有E-64d处理的多(见图1B)。说明了

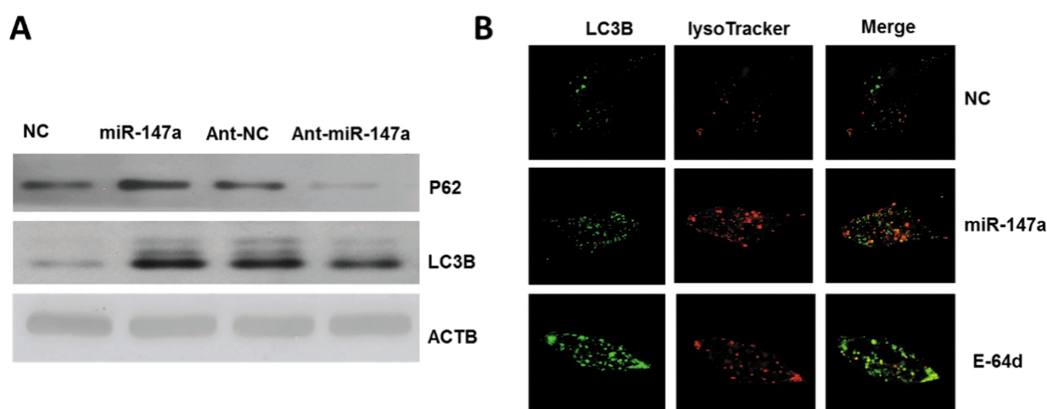


图 1 miR-147a 抑制巨自噬

Fig.1 miR-147a inhibits macroautophagy

Note: A: The protein levels of P62, LC3B and ACTB by Western blot. B: The co-localization with lysosome and autophagic vacuoles by confocal microscope.

miR-147a 抑制巨自噬途径是通过抑制自噬泡与溶酶体的融合造成的。

2.2 miR-147a 对分子伴侣介导的自噬的影响

为了进一步研究 miR-147a 是否对分子伴侣介导的细胞自噬也有影响,我们首先将 miR-147a 转染 HeLa 细胞,检测分子伴侣介导的自噬发生过程中的重要的一个蛋白受体 LAMP-2A

的表达情况。Q-PCR 检测发现 LAMP-2A 的 mRNA 的表达量下降 (见图 2A); Western blot 检测 LAMP-2A 的蛋白表达量也下降, Image J 软件对三次结果灰度值分析统计发现 LAMP-2A 的蛋白表达量是具有显著性下降的 (见图 2B、图 2C)。由于分子伴侣中介导底物降解的蛋白受体 LAMP-2A 表达降低,因此分子伴侣介导的自噬途径受阻。

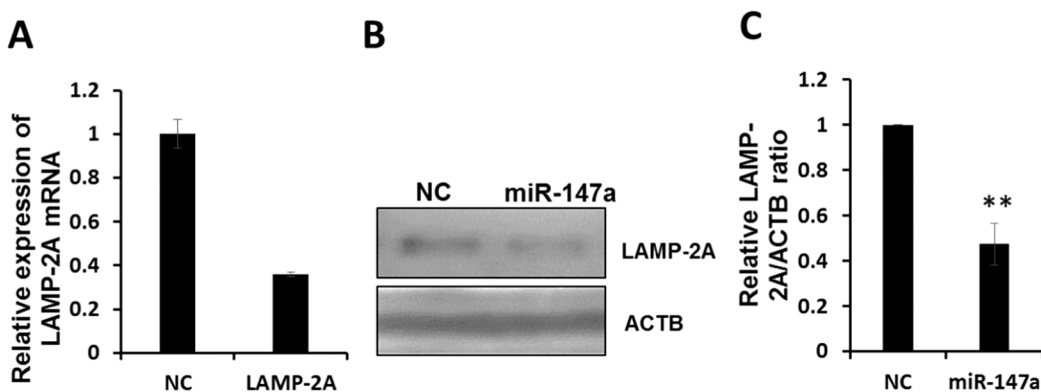


图 2 miR-147a 抑制分子伴侣介导的自噬

Fig.2 miR-147a inhibits Chaperone-mediated autophagy

Note: A: The relative expression levels of LAMP-2A by Q-PCR. B: The protein levels of LAMP-2A by Western blot. C: Relative LAMP-2A/ACTB ratios were determined by Image J densitometric analysis. **P<0.001.

2.3 miR-147a 通过抑制细胞自噬降低对 HIF-1 α 蛋白的降解

由于 HIF-1 α 在常氧下会通过细胞自噬途径被降解, miR-147a 在上述实验中已经证明可以抑制细胞自噬途径,因此我们推测 miR-147a 是不是通过抑制自噬途径从而降低对 HIF-1 α 的降解,造成 HIF-1 α 的积累。为了验证这一猜想,我们在转染了 miR-147a 的后 46 h 收样前加入终浓度为 10 nM 的 Bafilomycin A1 两小时收样。Bafilomycin A1 是一个自噬抑制剂,可以改变泡体的 H⁺ ATPase 活性,通过抑制自噬泡与溶酶体的融合从而抑制自噬过程^[5]。分子伴侣介导的自噬在营养缺乏 (约 30 min) 被激活,因此我们在顺转 miR-147a 后 48h 收样前加入 EBSS (饥饿诱导剂) 30 min 后收样。Western blot 检测 HIF-1 α 与 ACTB 的蛋白量,结果如图 3A。加入自噬抑制剂后与不加药相比 HIF-1 α 的蛋白量有所增加,加入自噬诱导剂后

与不加药相比 HIF-1 α 蛋白变化不明显。但是无论加入自噬诱导剂还是自噬抑制剂,转染了 miR-147a 处理后 HIF-1 α 的蛋白量都比 NC 有显著性增加,并且同时转染了 miR-147a 后加入自噬抑制剂比不加入任何药品或加入自噬诱导剂的 HIF-1 α 的蛋白量要高 (见图 3B)。结果表明 miR-147a 是通过抑制自噬途径从而降低对 HIF-1 α 的降解,造成 HIF-1 α 的积累。

3 讨论

HIF-1 α 目前已经被报道调节许多包括血管生成、红细胞生成、代谢、自噬以及肿瘤的形成等多种基因的表达^[6],并且 HIF-1 α 的降解与细胞自噬途径相关^[10,12]。MiRNA 可以通过影响细胞自噬从而影响多种生理活动,比如 miR-15a 和 miR-16a 可以通过诱导自噬增强喜树碱的化学敏感性^[17]。MiR-155 通过

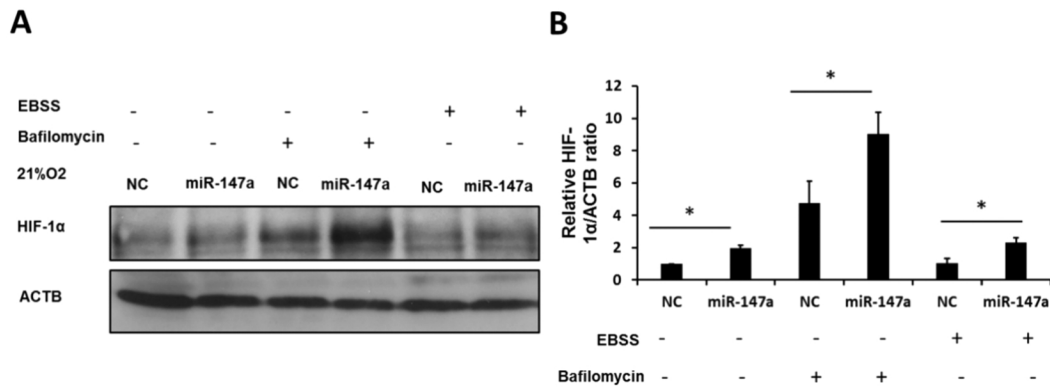


图3 miR-147a 抑制细胞自噬降低对 HIF-1 α 蛋白的降解

Fig.3 miR-147a reduces the degradation of HIF-1 α by inhibiting autophagy

Note: A: The protein levels of HIF-1 α by Western blot. B: Relative HIF-1 α /ACTB ratios were determined by Image J densitometric analysis. *P<0.05.

靶向 MTOR 通路的多个因子诱导自噬从而影响细胞增殖^[18]。MiR-155 可以通过靶向 HIF-1 α ，促进 HIF-1 α 的降解；过表达 miR-494 可以通过 PI3K/AKT 途径上调 HIF-1 α ^[19, 20]。关于 miR-147a 报道的是其对细胞生长的影响，miR-147a 与 miR-147a 一样可以通过抑制 pRB、CDK4、HSP60 的蛋白表达从而抑制细胞生长^[21, 22]。MiR-147a 也可以诱导间充质向上皮细胞转化并且转化 EGFR 抑制剂的耐药性^[23]。但是目前并没有关于 miR-147a 通过细胞自噬途径对 HIF-1 α 的稳定性的影响，因此通过研究研究 miRNA 对细胞自噬的影响来研究 HIF-1 α 的稳定性对于研究肿瘤的生理机理具有重要意义。

在本研究中首先通过瞬时转染 miR-147a 检测巨自噬形成过程的标志物 LC3B 和 P62，初步判断 miR-147a 对于巨自噬的影响。再通过共聚焦显微镜观察荧光标记的自噬泡与溶酶体的数量，同时通过共定位观察发现 miR-147a 抑制自噬溶酶体的形成。由于细胞自噬具有多种形式，因此我们检测了瞬时转染 miR-147a 后分子伴侣介导的自噬标志物 LAMP-2A 的变化，结果表明 miR-147a 抑制分子伴侣介导的自噬的形成。由于自噬途径主要通过溶酶体降解蛋白或细胞器从而调节生长、发育、肿瘤等，因此我们检测了在肿瘤发生中的一个重要的因子-HIF-1 α 表达情况与细胞自噬以及 miR-147a 的关系。通过抑制自噬或促进自噬，miR-147a 都可以促进 HIF-1 α 蛋白的积累，减少通过细胞自噬途径的降解。

在本研究中我们发现了 miR-147a 通过抑制细胞自噬这一机制从而降低对 HIF-1 α 的降解，促进 HIF-1 α 的积累。但是由于 miRNA 的作用方式为与靶基因的 3'UTR 端结合，从而降解靶基因 mRNA 或者抑制靶基因蛋白的翻译^[24]。在本研究中发现 miR-147a 抑制细胞自噬，但是并没有找到 miR-147a 直接作用的靶点，因此 miR-147a 调控细胞自噬的分子机理需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Jia G, Sowers JR. Autophagy: a housekeeper in cardiorenal metabolic health and disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2): 219-224
- [2] Yang W, Cai J, Zhou Z, et al. Microautophagy involves programmed cell semi-death of sieve elements in developing caryopsis of *Triticum aestivum* L[J]. *Cell Biology International*, 2015, 39(12): 1364-1375
- [3] Klionsky DJ. Coming soon to a journal near you-The updated

guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. *Autophagy*, 2014, 10(10): 1691-1691

- [4] Gomez-Sanchez, Yakhine-Diop SM, Rodríguez-Arribas M R., et al. mRNA and protein dataset of autophagy markers (LC3 and p62) in several cell lines[J]. *Data Brief*, 2016, 7: 641-647
- [5] Komatsu M, Y Ichimura. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy [J]. *Febs Letters*, 2010, 584 (7): 1374-1378
- [6] Li W, Yang Q, Mao Z. Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(5): 749-763
- [7] Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, et al. Autophagy: for better or for worse[J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 43-61
- [8] Ke XS, Liu CM, Liu DP, et al. MicroRNAs: key participants in gene regulatory networks [J]. *Commentary. Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7(4): 516-523
- [9] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(12): 5510-5514
- [10] Fujita N, Chiba K, Shapiro IM, et al. HIF-1 α and HIF-2 α degradation is differentially regulated in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(2): 401-412
- [11] Kaelin WG, PJ Ratcliffe. Oxygen sensing by metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway[J]. *Molecular Cell*, 2008, 30(4): 393-402
- [12] Hubbi ME, Hu H, Kshitiz, et al. Chaperone-mediated Autophagy Targets Hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF-1 α) for Lysosomal Degradation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(15): 10703-10714
- [13] Ajdukovic J. HIF-1 - a big chapter in the cancer tale [J]. *Exp Oncol*, 2016, 38(1): 9-12
- [14] Oliveira CS, Pereira H, Alves S, et al. Cathepsin D protects colorectal cancer cells from acetate-induced apoptosis through autophagy-independent degradation of damaged mitochondria[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1788

(下转第 241 页)

- [10] Ana-Marí a Simó n, Lucio Schiapparelli, Pablo Salazar-Colocho, et al. Overexpression of wild-type human APP in mice causes cognitive deficits and pathological features unrelated to A β levels[J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 33(3): 369-378
- [11] Klaver DW, Wilce MC, Cui H, et al. Is BACE1 a suitable therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease? Current strategies and future directions Ana-Marí a Simó n. *Biol Chem*, 2010, 391(8): 849-859
- [12] Keun-A Chang, Yoo-Hun Suh. Pathophysiological Roles of Amyloidogenic Carboxy-Terminal Fragments of the β -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's disease [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 97: 461-471
- [13] Cole SL, Vassar R. BACE1 structure and fuction in health and Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2008, 5(2): 100-120
- [14] Vassar R, Kovacs DM, Yan R, et al. The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential[J]. *J Neurosci*, 2009, 29: 12787-12794
- [15] Li Y, Zhou W, Tong Y, et al. Control of APP processing and A generation level by BACE1 enzymatic activity and transcription[J]. *The FASEB Journal*, 2006; 6: 285-292
- [16] Kimura R, Devi L, Ohno M. Partial reduction of BACE1 improves synaptic plasticity, recent and remote memories in Alzheimer's disease transgenic mice[J]. *J Neurochem*, 2010, 113(1): 248-261
- [17] Kandalepas PC, Vassar R. Identification and biology of beta-secretase [J]. *J Neurochem*, 2012, 120 (Suppl 1): 55-61
- [18] Butini S, Brogi S, Novellino E, et al. The structural evolution of BACE1 inhibitors: a focus on the development of small-molecule inhibitors[J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(15): 1787-1807
- [19] Tamayev R, D'Adamio L. Inhibition of gamma-secretase worsens memory deficits in genetically congruous mouse model of danish dementia[J]. *Mol Neurodegener*, 2012, V7N: 19-25
- [20] Bonini SA, Ferrari-Toninelli G, Montinaro M, et al. Notch signalling in adult neurons: a potential target for microtubule stabilization [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2013, 6(6):375-85
- [21] Jiang Y, Mullaney KA, Peterhoff CM, et al. Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is A β -independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(4): 1630-1635

(上接第 204 页)

- [15] Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, et al. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells[J]. *Cell Struct Funct*, 1998, 23(1): 33-42
- [16] Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2009, 24: 97-106
- [17] Huang N, Wu J, Qiu W, et al. MiR-15a and miR-16 induce autophagy and enhance chemosensitivity of Camptothecin[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(6): 941-948
- [18] Wan G, Xie W, Liu Z, et al. Hypoxia-induced MIR155 is a potent autophagy inducer by targeting multiple players in the MTOR pathway[J]. *Autophagy*, 2014, 10(1): 70-79
- [19] Sun G, Zhou Y, Li H, et al. Over-expression of microRNA-494 up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α expression via PI3K/Akt pathway and protects against hypoxia-induced apoptosis[J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20: 100-100
- [20] Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, et al. MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1 α activity during prolonged hypoxia[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(19): 4087-4096
- [21] Bertero T, Grosso S, Robbe-Sermesant K, et al. "Seed-Milarity" confers to hsa-miR-210 and hsa-miR-147b similar functional activity [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44919
- [22] Uhlmann S, Mannsperger H, Zhang JD, et al. Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer [J]. *Mol Syst Biol*, 2012, 8: 570
- [23] Lee CG, McCarthy, Gruidl M, et al. MicroRNA-147 induces a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and reverses EGFR inhibitor resistance[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84597
- [24] Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, et al. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy[J]. *Perspect Clin Res*, 2016, 7(2): 68-74