

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.02.009

β -分泌酶抑制剂对 tau 过磷酸化大鼠 β -CTF 代谢的影响及机制研究 *

陈红媛¹ 王永闯¹ 李立¹ 王莉² 俞春江^{1△}

(1 哈尔滨医科大学附属第二临床医院神经内科 黑龙江 哈尔滨 150000;

2 哈尔滨医科大学附属第二临床医院老年病科 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要 目的:在 tau 过磷酸化大鼠中,通过检测淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)C 末端片段的表达,研究抑制 β -分泌酶(BACE1)对其代谢的影响及机制。**方法:**24 只 SD 大鼠随机分为四组,包括正常对照组、假手术组、OA 组、OA+BACE1 抑制剂组。Western blot 法检测 β -CTF、APP 及 BACE1 表达;RT-PCR 法检测 APP 及 BACE1;水迷宫检测大鼠行为学。**结果:**OA 组 β -CTF 表达显著增加 ($p<0.05$),而 OA+BACE1 抑制剂组与 OA 组相比, β -CTF 表达减少 ($p<0.05$);四组大鼠的 APP 在蛋白及 mRNA 水平表达无显著差别($p>0.05$);OA 组 BACE1 在蛋白及 mRNA 水平的表达增加,而 OA+BACE1 抑制剂组 BACE1 的蛋白表达较 OA 组减少($p<0.05$),两组大鼠 mRNA 表达水平无明显差异($p>0.05$)。OA+BACE1 抑制剂组大鼠在给予 BACE1 抑制剂后行为学有所改善($p<0.05$)。**结论:**(1)tau 过磷酸化通过促进神经元内 BACE1 表达,导致 APP 代谢途径发生转变,从而引起 β -CTF 表达增加;(2) β -CTF 表达增加可引起 tau 过磷酸化大鼠行为学改变;(3)抑制 BACE1 可改善大鼠的学习及记忆能力,支持 BACE1 作为 AD 的治疗靶点。

关键词:阿尔茨海默病;淀粉样前体蛋白 C 末端片段;BACE1;tau 过磷酸化

中图分类号:R741.02; R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)02-237-05

The Effects and Mechanisms of β -secretase Inhibitor on the Processing of β -CTF in Tau Hyperphosphorylated Rat Model*

CHEN Hong-yuan¹, WANG Yong-chuang¹, LI Li¹, WANG Li², YU Chun-jiang^{1△}

(1 Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150000, China;

2 Department of Geriatrics, The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150000, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects and mechanisms of β -secretase inhibitor on the processing of β -CTF in tau hyperphosphorylated rat model. **Methods:** Twenty-four male SD rats were randomly divided into four groups, including the control group, the sham group, the OA group and the OA+BACE1 group. For each group of rats, Western blot was used to analyze the level of amyloid precursor protein C-terminal fragment (APP-CTF), APP and BACE1. Meanwhile, RT-PCR was performed to detect the mRNA levels of APP and BACE1. With water maze test, abilities of learning and memory were detected. **Results:** It was found that β -CTF significantly increased in the OA group($p<0.05$), while decreased in the OA + BACE1 inhibitor group compared to the OA group($p<0.05$). There was no statistically significant difference in the protein and mRNA levels of APP among the four groups ($p>0.05$). The protein and mRNA levels of BACE1 significantly increased in the OA group ($p<0.05$). The protein levels of BACE1 in the OA+BACE1 inhibitor group decreased compared to the control group ($p<0.05$), and there was no difference in the mRNA levels between the two groups ($p>0.05$). With water maze test, the behavior of rats in the OA+BACE1 inhibitor group were restored($p<0.05$). **Conclusion:** (1) Hyperphosphorylated tau protein induced the increase of BACE1 expression, thus the pathway of APP processing had been shifted, and the level of β -CTF increased in neurons, (2) The increase of β -CTF impaired the behavior of rats, (3) Inhibition of BACE1 could improve the abilities of study and memory in rats, indicating that BACE1 might be a therapeutic target of AD.

Key words: Alzheimer's disease; Amyloid C-terminal fragment of amyloid precursor protein; BACE1; Tau hyperphosphorylation

Chinese Library Classification(CLC): R741.02; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)02-237-05

前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)俗称老年痴呆症,是目前最危害公共健康的疾病之一。随着社会人口老龄化逐步

加剧,AD 发病率呈上升趋势,至 2050 年将有约 1.35 亿 AD 患者,其医疗和护理给家庭和社会带来沉重的经济负担^[1]。因此,找到安全有效的 AD 预防及治疗方法是目前迫切需要的。

迄今为止,AD 发病机制尚未完全阐明,缺乏针对病因的治

* 基金项目:黑龙江省卫生计生委科研基金项目(2014-337);黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z15135)

作者简介:陈红媛(1979-),女,博士后,副主任医师,主要研究方向:神经变性疾病, E-mail: chenhongyuan1979@163.com

△通讯作者:俞春江,电话:13946021574, E-mail: yuchunjiang123@126.com

(收稿日期:2016-06-03 接受日期:2016-06-26)

疗。关于其发病机制,学者们提出了多种学说^[9]。其中,淀粉样蛋白学说一直受到人们的极大关注并处于主导地位,该学说主要认为 APP 代谢紊乱及 A β 过度沉积是 AD 发病的主要原因^[1]。亦有研究显示不仅 A β 参与 AD 的发病,APP 代谢所生成的其他片段,如 β -CTF 等亦具有神经毒性作用,亦有可能参与 AD 的发病,但具体机制尚未可知。在体外,用冈田酸(OA)处理的大鼠皮层神经元细胞 β -CTF 的表达上调,细胞发生变性、坏死^[4]。在已形成 NFT 的神经元中可检测到 β -CTF,说明在这些神经元中 APP 的代谢可能仍在继续或者 APP 及 β -CTF 在 tau 过磷酸化的状态下存在的时间有所延长。这些发现提示 tau 过磷酸化可能影响 APP 及 β -CTF 代谢,而且这可能参与 AD 发病机制。

在本研究中,我们采用侧脑室微量注射 OA 建立 tau 过磷酸化的 AD 大鼠模型,给以 BACE1 抑制剂干预,通过对 β -CTF 及其前体蛋白 APP 及代谢酶 BACE1 表达的研究,探讨 tau 过磷酸化对 β -CTF 代谢的影响及相关机制,以及 BACE1 抑制剂治疗 AD 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

冈田酸(ENZO 公司)、兔抗 APP 多克隆抗体(Invitrogen)、鼠抗 BACE1 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology)、BACE1 抑制剂 IV (Merck 公司)、SuperScriptTM II 逆转录酶试剂盒(Invitrogen 公司)、PVDF 膜、DAB 显色试剂盒、相应的二抗等。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养 雄性 SD 大鼠,清洁级,重量 250~320 g,由哈尔滨医科大学实验动物中心提供。

1.2.2 动物分组及处置 24 只 SD 大鼠随机分为四组,每组 6 只。正常对照组仅进行定向航行及空间探索试验。假手术组于第 1 天、第 3 天及第 21 天,侧脑室注射无水乙醇,每侧 1 μ L。OA 组于第 1 天及第 3 天,侧脑室注射 OA(浓度 0.4 mmol/L),每侧 1 μ L;第 21 天,每侧注射无水乙醇 1 μ L。OA+BACE1 抑制剂组于第 1 天及第 3 天注射 OA,第 21 天注射 BACE1 抑制剂 IV,每侧 1 μ L。

1.2.3 水迷宫实验 水迷宫为直径 120 cm、高 50 cm 的圆形不透明蓄水池。人为分为四个象限,第三象限置一平台。定向航行试验:为期 5 天,将大鼠置于平台上 30 s,然后将其随机放入其他三个象限,记录大鼠游上平台所用时间,即逃避潜伏期(Escape latency time),如 120 s 大鼠未能游上平台,则记录 120 s。5 天后大鼠进行第一次空间探索试验,即移除平台,大鼠从第一象限开始,记录大鼠在第三象限(原平台所在象限)内停留时间及穿过原平台所在位置的次数,限时 90 s。第一次空间探索试验结束后,注射 BACE1 抑制剂 IV 或无水乙醇,进行第二次空间探索试验。同样记录数据。第二次空间探索试验后处死大鼠并留取海马组织于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.2.4 Western blot 方法检测 β -CTF、APP 及 BACE1 蛋白表达 常规提取大鼠海马组织蛋白,测定浓度,经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转膜、封闭后,依次进行一抗及二抗的孵育,DAB 法显色后胶片拍照,利用图像处理系统分析目标条带的分子量及净光密度值。

1.2.5 实时定量 PCR(RT-PCR)法检测海马组织 APP 及 BACE1 的 mRNA 表达 提取大鼠海马组织的 RNA,估测质量及测定浓度,逆转录合成 cDNA,应用 RT-PCR 的第一链合成系统,在 PCR 仪进行扩增。制备标准曲线,测定目的基因相对拷贝数。

1.3 统计学分析

各部分结果以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 18.0 统计软件,各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 tau 过磷酸化导致神经元 β -CTF 表达增加

在神经元内,APP 主要经两种途径代谢,APP 经 β -分泌酶途径代谢生成 β -CTF(C99 及 C89),经 α -分泌酶途径代谢产生 α -CTF (C83)^[9]。我们采用 western blot 方法检测了大鼠海马中 β -CTF 表达,结果发现与正常对照组及假手术组相比,OA 组 β -CTF(C99 及 C89)表达显著增加,而 OA+BACE1 抑制剂组与 OA 组相比, β -CTF 尤其是 C99 减少($P < 0.05$)(见图 1)。结果说明在 OA 诱导的过磷酸化 tau 大鼠中 β -CTF 表达增加,而 BACE1 抑制剂可减少 β -CTF 表达。

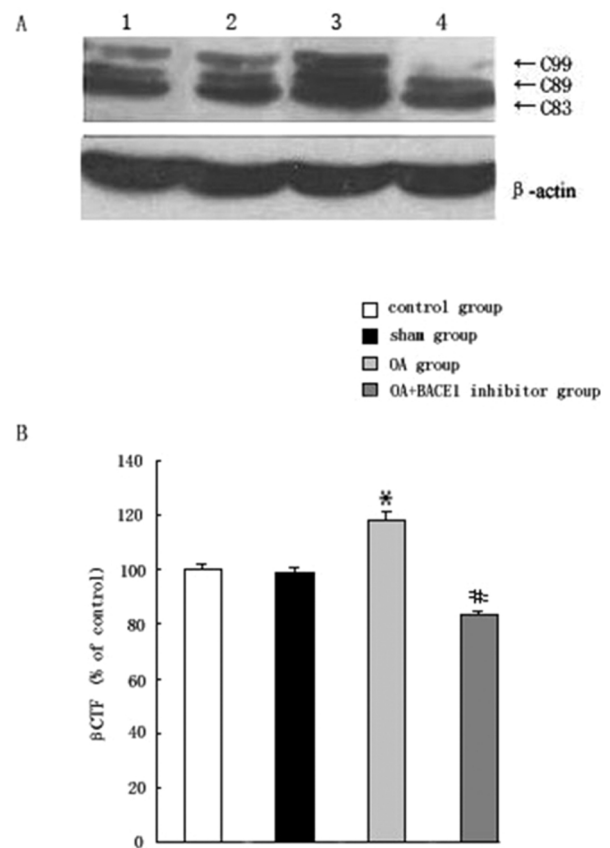


图 1 四组大鼠海马组织的 APP-CTF 的表达比较

Fig. 1 Comparison of the expression of APP-CTF in the hippocampus between four groups

Note: * $P < 0.05$ compared with the control group and # $P < 0.05$ compared with the OA group. 1. control group, 2. Sham group, 3. OA group, 4. OA+BACE1 inhibitor group.

2.2 tau 过磷酸化不影响 APP 的蛋白及 mRNA 表达

为了研究 tau 过磷酸化影响 β -CTF 表达的机制,我们利用 western blot 及 RT-PCR 法检测了 APP 及 BACE1 在蛋白及 mRNA 水平的表达。结果显示:四组大鼠 APP 的蛋白及 mRNA 表达无统计学差别($P>0.05$)(见图 2)。但 OA+BACE1 抑制剂组 APP 的蛋白水平较 OA 组相比有所增加,分析原因可能是 BACE1 抑制剂的应用抑制了 APP 经 β -分泌酶途径的代谢。以上结果说明 tau 过磷酸化对 APP 的蛋白及 mRNA 的表达无明显影响,tau 过磷酸化影响 β -CTF 代谢的机制与 APP 表达无明显关系。

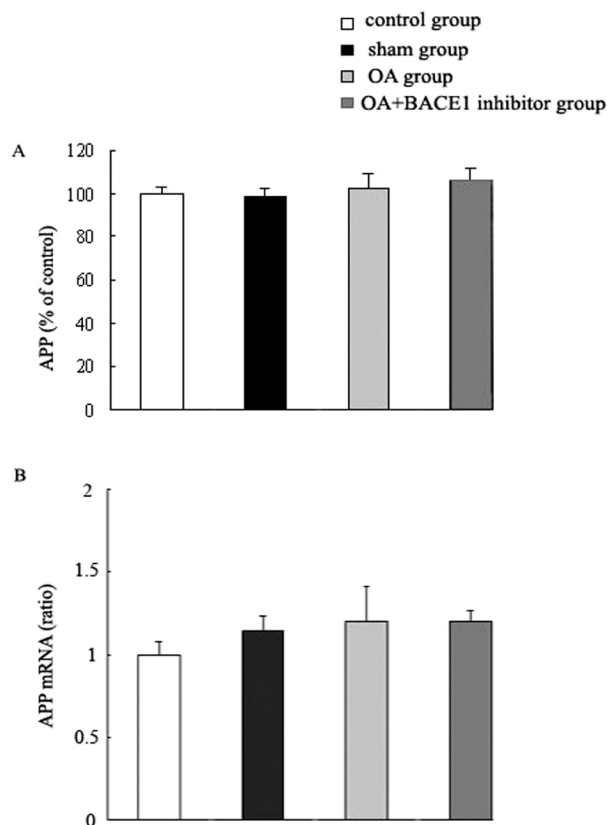


图 2 APP 在蛋白(A)及 mRNA(B)水平的表达

Fig. 2 The expression of APP in the level of protein (A) and mRNA (B) There were no significant differences in the two levels of APP in the four groups($P>0.05$)

2.3 tau 过磷酸化促进 BACE1 的表达

我们利用 western blot 及 qRT-PCR 方法分析了重要限速酶 -BACE1 的蛋白及 mRNA 水平的表达。结果显示:与对照组相比,OA 组 BACE1 的蛋白及 mRNA 水平明显增加($P<0.05$)(见图 3)。而 OA+BACE1 抑制剂组 BACE1 的蛋白水平较 OA 组减低($P<0.05$)(见图 3A);两组的 mRNA 水平表达无差别($P>0.05$)(见图 3B)。这说明 tau 过磷酸化促进 BACE1 在 mRNA 及蛋白水平的表达,而 BACE1 抑制剂 IV 对 BACE1 的抑制作用主要是发生在蛋白水平,而非 mRNA 水平。

2.4 BACE1 抑制剂可改善大鼠的行为学异常

侧脑室注射 OA 可引起大鼠的学习及记忆障碍 (见图 4. A、B、C)。给予 BACE1 抑制剂后,利用水迷宫比较四组大鼠的

行为学变化,发现 OA+BACE1 抑制剂组大鼠于第三象限中停留的时间以及穿过原平板所在位置的次数均较 OA 组增加(见图 4. D 及 E),说明 BACE1 抑制剂可改善大鼠的行为学异常。

3 讨论

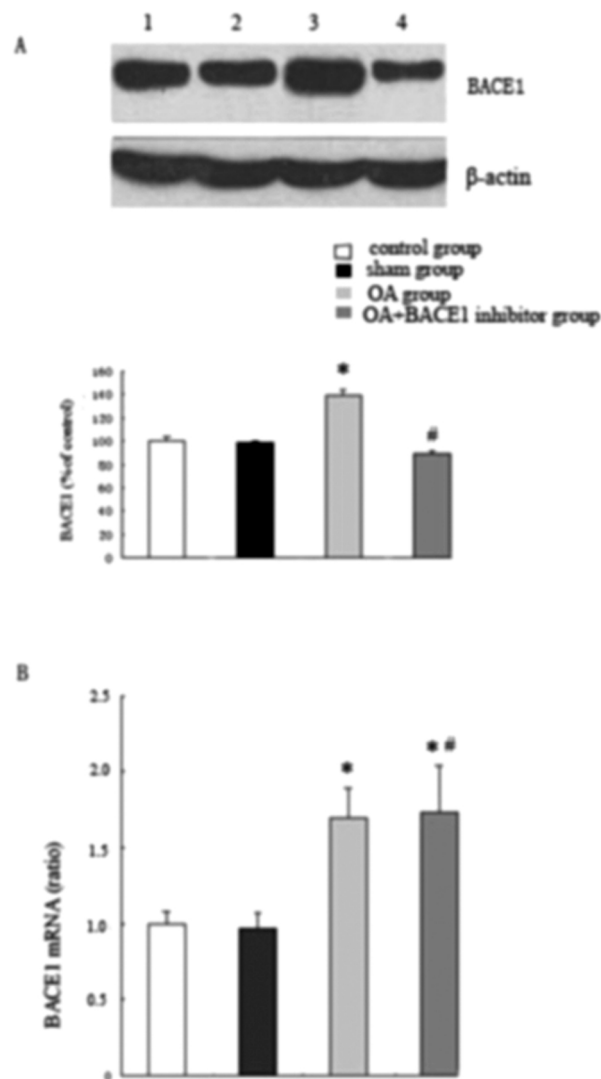


图 3 四组大鼠海马组织 BACE1 在蛋白及 mRNA 水平的表达

Fig. 3 Expression of BACE1 in the level of protein and mRNA. (A) Protein level of BACE1 in the hippocampus of the four groups of rats. * $P<0.05$ compared with the control group and # $P<0.05$ compared with the OA group. 1. control group, 2. Sham group, 3. OA group, 4. OA+BACE1 inhibitor group. (B) BACE1 mRNA level increased in the OA group and in the OA + BACE1 inhibitor group. * $P<0.05$ compared with the control group. However, there was no significant difference between the OA group and the OA + BACE1 inhibitor group (# $P>0.05$)

目前,AD 的治疗以改善症状为主,尚无法根治。许多研究者正不断寻找新的治疗靶点^[6,7]。有研究发现细胞内 β -CTF 是 AD 早期的表现,且 β -CTF 可诱导细胞功能障碍、突触丧失及细胞死亡,故提倡 AD 的治疗应针对 β -CTF^[8]。

β -CTF 是 APP 经 BACE1 代谢的重要产物。尸检发现 AD 患者脑中 β -CTF 含量增加,在体外 AD 细胞模型中亦发现 β -CTF 的表达增多^[9]。在转染人类 β -CTF cDNA 的神经元细胞系及非神经元细胞系中,细胞出现中毒表现^[10,11]。研究提示

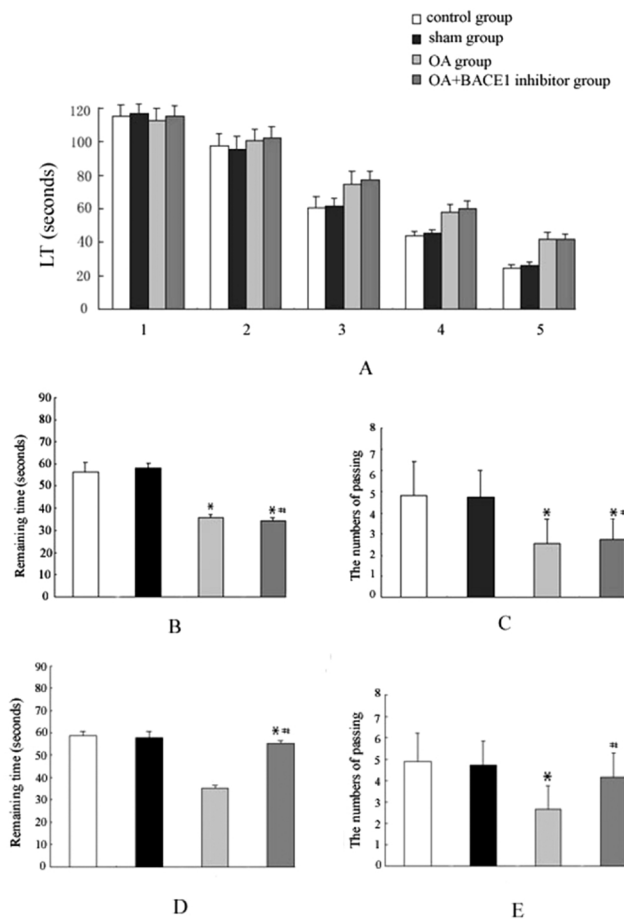


图4 水迷宫试验

Fig. 4 Behavioral test with water maze test

(A) Training trial. (B) Time remaining in the third quadrant in the first probe trial; * $P < 0.05$ compared with the control group, # $P > 0.05$ compared with the OA group. (C) Number of times crossing the platform in the first probe trial; * $P < 0.05$ compared with the control group, # $P > 0.05$ compared with the OA group. (D) Time remaining in the third quadrant in the second probe trial; * $P < 0.05$ compared with the control group, # $P < 0.05$ compared with the OA group. (E) Number of times crossing the platform in the second probe trial; * $P < 0.05$ compared with the control group, # $P < 0.05$ compared with the OA group.

β -CTF 可通过转录依赖及非转录依赖两种机制表现出神经毒性,甚至在很多方面较 $A\beta$ 具有更多的毒性作用^[12]。在 AD 早期,APP 基因突变引起的神经元凋亡更倾向于是由 β -CTF 而非 $A\beta$ 诱导的。在本研究中,我们发现注射 OA 后大鼠海马神经元的 β -CTF 表达增多,这可能与神经元死亡、大鼠表现出学习及空间记忆障碍有关,说明 β -CTF 具有神经毒性作用,推测这可能是 β -CTF 参与 AD 的主要机制之一。之前的体外研究中发现 OA 可诱导神经元中 β -CTF 的表达增加,但未进一步阐明原因。为了进一步研究 β -CTF 表达增多的原因,我们分别检测了 β -CTF 的前体蛋白 APP 及其限速酶 BACE1 在蛋白及 mRNA 水平的表达。结果发现 tau 过磷酸化促进了 BACE1 在 mRNA 及蛋白水平的增加,而 APP 的表达在 tau 蛋白过磷酸化状态下无明显改变。因此, β -CTF 的表达增加主要是由于 tau 蛋白过磷酸化促进 BACE1 的表达,导致了 APP 的代谢途径发生了转变, β -CTF 及 $A\beta$ 生成增多,从而导致神经元变性。

BACE1 是 β -CTF 生成的重要限速酶^[13]。研究表明 BACE1 的含量及活性随着年龄的增长而增加^[14]。在过表达 BACE1 的转基因鼠中 $A\beta$ 的生成及淀粉样沉积增多^[15]。在野生型及 Swedish 突变型 APP 转基因鼠,抑制 BACE1 活性可以抑制 APP 水解,降低 AD 相关脑区的 $A\beta$ 多肽以及淀粉样斑块含量,并改善受损的突触可塑性以及学习记忆能力^[16]。研究发现剔除 BACE1 基因的小鼠脑中 BACE1 酶活性消失,小鼠除了表现出髓鞘形成不良以外,其他方面均正常^[17]。以上研究说明 BACE1 参与 AD 的发病机制,抑制 BACE1 不会在体内产生毒性,这为 BACE1 作为预防和治疗 AD 的靶点提供了依据^[18]。在本研究中,我们发现给予 BACE1 抑制剂则可通过减少 β -CTF,改善大鼠的行为学异常。这一发现支持 BACE1 作为 AD 治疗靶点。

一直以来,关于 BACE1 抑制剂与 γ -分泌酶抑制剂哪种更适用于治疗 AD 的讨论从未停止过。有研究表明 BACE1 基因敲除鼠仍具有生育能力,而且几乎不出现类精神分裂样的症状^[19]。而抑制 γ -分泌酶则可能出现较严重的发育缺陷,这主要是因为 γ -分泌酶除了参与 APP 代谢以外,还参与 Notch 信号传递,而后者的主要功能是调节胚胎发育^[20]。这可能在一定程度上限制 γ -分泌酶作为 AD 治疗靶点。结合我们的研究结果,如果考虑到 β -CTF 的神经毒性作用,则 γ -分泌酶抑制剂的使用可能需要更加谨慎^[21],而调控 BACE1 用于治疗 AD 显然更有优势。

参考文献(References)

- [1] Wisniewski T, Goi F. Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease[J]. Neuron, 2015, 85(6): 1162-1176
- [2] Sun X, Jin L, Ling P. Review of drugs for Alzheimer's disease[J]. Drug Discov Ther, 2012, 6(6): 285-290
- [3] Jin M, Shepardson N, Yang T, et al. Soluble amyloid protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(14): 5819-5824
- [4] Yoon SY, Choi JE, Yoon JH, et al. BACE inhibitor reduces APP- β -C-terminal fragment accumulation in axonal swellings of okadaic acid-induced neurodegeneration [J]. Neurobiology of Disease, 2006, 22: 435-444
- [5] Richard J, O'Brien, Philip C. Wong. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease[J]. Annu Rev Neurosci, 2011, 34: 185-204
- [6] Salloway S, Sperling R, Fox NC, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild -to -moderate Alzheimer's disease[J]. N Engl J Med, 2014, 370(4): 322-333
- [7] Honig LS1, Boyd CD. Treatment of Alzheimer's Disease: Current Management and Experimental Therapeutics [J]. Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep, 2013, 2(3): 174-181
- [8] Fan LY, Chiu MJ. Comotherapy and current concepts as well as future strategies for the treatment of Alzheimer's disease [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2014, 10: 439-451
- [9] Li R, Lindholm K, Yang L B, et al. Amyloid β peptide load is correlated with increased BACE1 activity in sporadic Alzheimer's disease patients[J]. Proc Natl Acad Sci U. S. A, 2004, 101: 3632-3637

- [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