

TRBP2基因过表达对肺腺癌A549细胞增殖、迁移及侵袭的影响及可能机制

夏红军 葛明建*

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

摘要 该文探讨了TAR RNA结合蛋白2(TAR RNA binding protein 2, *TRBP2*)基因对肺腺癌A549细胞增殖、迁移及侵袭的影响及可能机制。构建*TRBP2*慢病毒过表达载体,以不同感染复数(MOI)感染A549细胞,根据绿色荧光强度选择最适MOI值。荧光定量PCR(FQ-PCR)检测*TRBP2*、*MMP-2*(matrix metalloproteinase-2)、*PKR*(double-stranded RNA-dependent protein kinase) mRNA的表达量。免疫蛋白印记(Western blot)法检测*TRBP2*、*MMP-2*、*PKR*、p-*PKR*的表达。采用MTT法、平板克隆实验检测*TRBP2*基因对A549细胞增殖的影响,Transwell迁移及侵袭实验检测细胞迁移和侵袭能力,黏附实验检测同种细胞和异种细胞间黏附情况。结果发现,成功构建了*TRBP2*基因过表达的A549细胞株,与空载体组和对照组比较,*TRBP2*基因过表达组细胞侵袭、迁移能力明显增强($P<0.05$),同种细胞间黏附力减弱($P<0.05$)而异种细胞间黏附力增强($P<0.05$),增殖速度加快($P<0.05$)及克隆形成率增加($P<0.05$)。此外,*MMP-2*、*TRBP2*蛋白及mRNA表达量明显升高($P<0.05$); p-*PKR*蛋白表达量降低($P<0.05$); *PKR*蛋白及mRNA表达量无差异。对照组与空载体组之间比较,以上各项指标均没有明显差异($P>0.05$)。该研究表明,过表达*TRBP2*基因可能通过促进*MMP-2*的表达同时抑制*PKR*磷酸化来促进肺腺癌A549细胞增殖、迁移及侵袭。

关键词 肺腺癌; *TRBP2*; 增殖; 迁移; 侵袭

Effect of *TRBP2* Gene Over-expression on Proliferation, Migration and Invasion of Lung Adenocarcinoma Cell A549 and Its Mechanism

Xia Hongjun, Ge Mingjian*

(Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract In this study, we investigated the effect of *TRBP2* (TAR RNA binding protein 2) gene over-expression on the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* and explored the possible mechanism. The human lung adenocarcinoma A549 cells were infected with the lentivirus which recombined the human *TRBP2* gene in a proper MOI and cells stably over-expressing *TRBP2* were constructed by observing fluorescence intensity. Then, the mRNA expression of *TRBP2*, *MMP-2* and *PKR* were detected by fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and the protein expression of *TRBP2*, *MMP-2*, *PKR* and p-*PKR* were detected by Western blot. MTT and colony formation assay were used to assess proliferation of A549 cells influenced by *TRBP2* gene over-expression. Furthermore, Transwell chambers assay and adhesion experiments were used to detect the invasion, migration, homogeneous and heterogeneous cells intercellular adhesion among three groups. The results showed that A549 cells with the *TRBP2* gene

收稿日期: 2015-03-02 接受日期: 2015-04-07

国家自然科学基金(批准号: 30972961)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89011131, E-mail: mingjian_ge@hotmail.com

Received: March 2, 2015 Accepted: April 7, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30972961)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011131, E-mail: mingjian_ge@hotmail.com

网络出版时间: 2015-06-01 17:29

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150601.1729.013.html>

over-expressed were successfully built. Compared with the control and empty vector group, the over-expression *TRBP2* gene cells' invasion, migration ability and heterogeneous cells intercellular adhesion were enhanced ($P < 0.05$), while homogeneous cells intercellular adhesion were decreased ($P < 0.05$). Abilities of proliferation and colony formation rate were enhanced ($P < 0.05$). What's more, the mRNA and protein expression of *TRBP2* were significantly raised, so was the *MMP-2* ($P < 0.05$). The expression of p-PKR protein was significantly decreased, although the expression of PKR showed no difference. There was no any difference between the control group and empty vector group ($P > 0.05$). In conclusion, by promoting the expression of *MMP-2* and inhibiting the phosphorylation of PKR, over-expression of *TRBP2* could promote the proliferation, invasion and migration of lung adenocarcinoma A549 cells.

Keywords lung adenocarcinoma; *TRBP2*; proliferation; migration; invasion

肺癌是当今世界发病率及死亡率最高的恶性肿瘤, 肺癌的治疗方法主要以手术切除、化疗及放疗为主, 但化疗药物的严重毒副作用和耐药性已成为肺癌治疗的难点。*TRBP2*属于双链RNA(dsRNA)结合蛋白家族成员, 其在人体细胞质及细胞核中广泛表达, 该基因与多种恶性肿瘤细胞的增殖、分化、迁移及侵袭有关。Monsef等^[3]发现, *TRBP2*具有癌基因潜质, 其功能的发挥可能通过调节PKR磷酸化来实现。然而, Sonia等^[4]发现, 依诺沙星可通过增强*TRBP2*的表达来抑制多种癌细胞的增殖及转移。目前该基因对肺腺癌生物学行为的影响还未见报道, 本研究以携带人过表达*TRBP2*基因的重组慢病毒感染肺腺癌A549细胞, 用嘌呤霉素筛选并获得稳定细胞株, 观察*TRBP2*基因对肺腺癌A549细胞体外增殖、侵袭及迁移的影响并探讨其可能机理, 以期对肺癌的生物治疗寻找新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料和细胞株

人肺腺癌细胞株A549来自重庆医科大学肿瘤研究中心; 携带人*TRBP2*基因的重组慢病毒和空载体慢病毒均由上海吉凯基因化学技术有限公司提供(货号: GOSL42965); 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)由重庆医科大学肿瘤研究中心提供。兔抗人*TRBP2*多克隆抗体、兔抗人P-PKR抗体、兔抗人PKR抗体、Transwell小室、基质胶均购自BD公司; 兔抗人*MMP-2*多克隆抗体购自Abcam公司; 兔抗 β -actin多克隆抗体、山羊抗兔二抗购自博士德公司; *TRBP2*、*MMP-2*、*PKR*引物设计及合成由TaKaRa公司完成; 反转录试剂盒及实时荧光定量试剂盒购自TaKaRa公司。荧光显微镜购自日本Olympus公司; 凝胶成像仪购自法国

Vilber Lourmat公司; 酶标仪购自美国Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基培养细胞, 置于37℃、5% CO₂培养箱中培养, 常规换液、传代。

1.2.2 感染并筛选稳定株 调整A549细胞密度为 1×10^6 /mL, 铺6孔板(每组设1个复孔), 当细胞融合率达到60%时, 分别以MOI值0, 10, 20, 30, 40, 50, 60加入空载体慢病毒(吉凯基因建议A549细胞MOI为20), 12 h后换液, 4 d后在荧光显微镜下观察细胞绿色荧光强度及范围, 取MOI值最小而荧光表达量强的作为转染用MOI值。参照此MOI值加入携带目的基因和空载体基因的慢病毒颗粒, 然后每孔加8 μ L聚凝胺(1~10 μ g/mL), 总容量保持在1 mL, 48 h后每孔加1.5 μ g/mL的嘌呤霉素以筛选稳定株, 并设不感染对照(未经病毒感染的A549细胞)组, 各组分别加入等量等浓度的嘌呤霉素, 每2~3 d换含嘌呤霉素的完全培养液1次, 完全清除未感染嘌呤霉素抗性基因的细胞, 最终获得稳定转染细胞株。

1.2.3 实验分组 本实验细胞株共分为三组: 实验组(携带过表达*TRBP2*基因的A549细胞组)、空载体组(携带空载体基因的A549细胞组)及对照组(A549细胞组)。

1.2.4 FQ-PCR法检测*TRBP2*、*PKR*、*MMP-2* mRNA表达 Trizol法抽提各组RNA, 逆转录获取cDNA, 95℃预变性1 min, 95℃变性15 s, 60℃退火15 s, 72℃延伸45 s, 总共40个循环。

1.2.5 MTT法检测细胞增殖 取对数生长期3组细胞, 消化并计数, 制成 1×10^4 /mL细胞悬液, 每孔接种200 μ L至96孔板内, 设6个平行孔。分别于0, 24, 48, 72 h加入MTT(5 mg/mL, 20 μ L/孔), 4 h后去上清液, 加150 μ L/孔DMSO, 在全波长自动酶标仪570 nm处比色测吸光度(D)值。

1.2.6 平板克隆形成实验 用胰酶消化细胞,计数并接种于6孔板,每孔100个细胞于37 °C、5% CO₂培养箱中培养2周。出现肉眼可见的细胞克隆时,终止培养,PBS漂洗,空气干燥;甲醇固定15 min后空气干燥;用4%结晶紫稀液染色15 min,流水缓慢洗去染液,空气干燥;在显微镜下对形成的克隆计数(≥ 50 个细胞为一个克隆),平板克隆形成率=形成克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.7 Transwell小室检测细胞侵袭及迁移力 侵袭实验:将Matrigel胶用无血清1640培养基(1:6)于冰上稀释后,取80 μL 铺于上室,紫外线照射过夜,实验前水化基底膜。取3组细胞,按 $2 \times 10^5/400 \mu\text{L}$ 加入上室,下室加10%胎牛血清培养液600 μL ,常规培养24 h,棉签擦去上室内细胞,4%多聚甲醛固定,瑞氏染色、切膜、封片、摄像,计数5个视野平均穿膜细胞数。迁移实验:上室内不铺胶,18 h后终止实验,余操作同侵袭实验。

1.2.8 黏附实验 取对数生长期A549、HUVEC细胞,消化、计数,制成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液。取A549细胞(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$)接种于96孔板内,每组设4个平行孔,取同量HUVEC接种于96孔板,培养过夜;次日调整空载体组、实验组细胞浓度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 并加入96孔板(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$),每隔30 min依次吸出各孔上清,PBS清洗2次,加入无血清培养基(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$),120 min后离心,吸出上清后加入无血清培养基(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$)。加入MTT(10 $\mu\text{L}/\text{孔}$),4 h后去上清液加DMSO(150 $\mu\text{L}/\text{孔}$),用酶标仪在570 nm波长处比色;计算同(异)种黏附率=(实验孔 D 值均数-下层细胞 D 值均数)/上层所种细胞 D 值均数,在荧光显微镜下各取5个视野观察细胞黏附水平并照相。

1.2.9 Western blot检测TRBP2、MMP-2、PKR、p-PKR蛋白表达 分别收集三组对数生长期的细胞,提取蛋白,用BCA法测定蛋白浓度,取相同含量的总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,然后电转、封闭,4 °C过

夜,一抗(兔抗人TRBP2多克隆抗体、兔抗人MMP-2多克隆抗体、兔抗人PKR多克隆抗体、兔抗人p-PKR多克隆抗体和兔抗 β -actin多克隆抗体,工作浓度分别为1:200、1:200、1:200、1:200和1:2 000),山羊抗兔二抗(工作浓度均为1:2 500),洗膜、孵育、显影,检测灰度值后,做定量分析。

1.2.10 统计学分析 应用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析。所有实验重复3次,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 构建重组慢病毒感染A549细胞株

用携带目的基因及空载体基因的重组慢病毒颗粒感染A549细胞株,所获得的两组细胞株均经过puromycin法筛选后转染效率达到90%以上(图1)。

2.2 采用FQ-PCR检测TRBP2、PKR及MMP-2 mRNA的表达量

实验组细胞TRBP2和MMP-2 mRNA相对表达量均高于空白对照组及空载体组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),实验组细胞PKR mRNA相对表达量与空白对照组及空载体组无差异,空载体组与空白对照组表达无差异($P > 0.05$,图2)。

2.3 MTT法检测细胞增殖

结果显示,实验组细胞生长速度明显快于对照组和空载体组($P < 0.05$),后两者之间生长速度无明显差异($P > 0.05$,表1)。

2.4 平板克隆形成实验

实验组细胞形成的克隆小体数明显多于空载体组及空白对照组,结果有显著差异($P < 0.05$),空载体组与空白对照组之间无统计学差异($P > 0.05$,图3)。

2.5 Transwell小室检测细胞侵袭、迁移力

侵袭、迁移实验结果显示,实验组穿膜细胞数明显多于对照组和空载体组($P < 0.05$),而对照组与

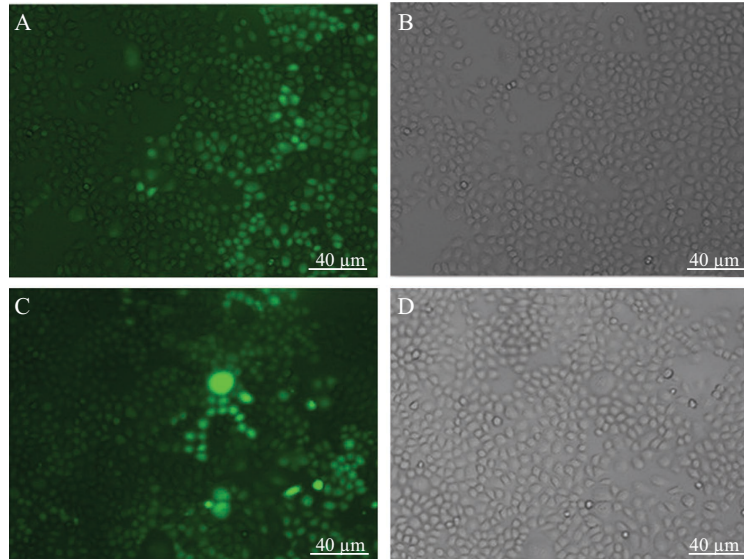
表1 三组细胞不同时间点吸光值测定($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The absorbance value of three groups at different time points ($n=3, \bar{x} \pm s$)

时间(h)	对照组	空载体组	实验组
Time (h)	Control group	Empty vector group	Experimental group
0	0.442 \pm 0.012	0.451 \pm 0.008	0.422 \pm 0.013
24	1.252 \pm 0.051	1.210 \pm 0.040	1.142 \pm 0.061
48	1.482 \pm 0.121	1.512 \pm 0.015	1.911 \pm 0.058* [#]
72	1.640 \pm 0.148	1.728 \pm 0.021	2.318 \pm 0.062* [#]

* $P < 0.05$, 与对照组比较; [#] $P < 0.05$, 与空载体组比较。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs empty vector group.

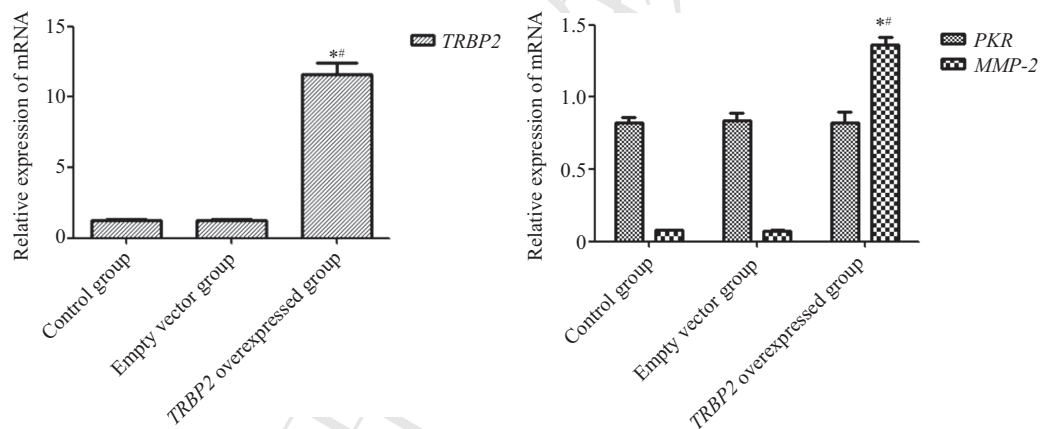


A: 荧光下转染TRBP2的细胞; B: 白光下转染TRBP2的细胞; C: 荧光下转染空载体的细胞; D: 白光下转染空载体的细胞。

A: *TRBP2* transfected cells in fluorescence; B: *TRBP2* transfected cells in white light; C: empty vector transfected cells in fluorescence; D: empty vector transfected cells in white light.

图1 重组慢病毒感染A549时TRBP2基因的表达

Fig.1 Expression of *TRBP2* in A549 infected by recombinant lentiviral vector

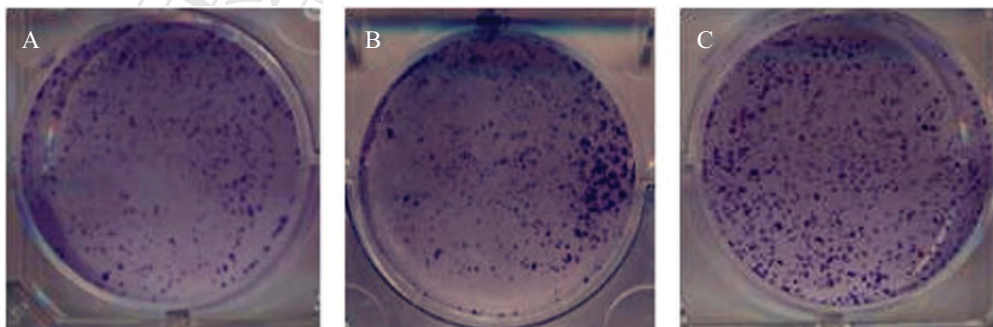


* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与空载体组比较。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs empty vector group.

图2 三组细胞TRBP2、PKR、MMP-2 mRNA表达水平

Fig.2 The mRNA expressions of *TRBP2*, *PKR*, *MMP-2* in three groups

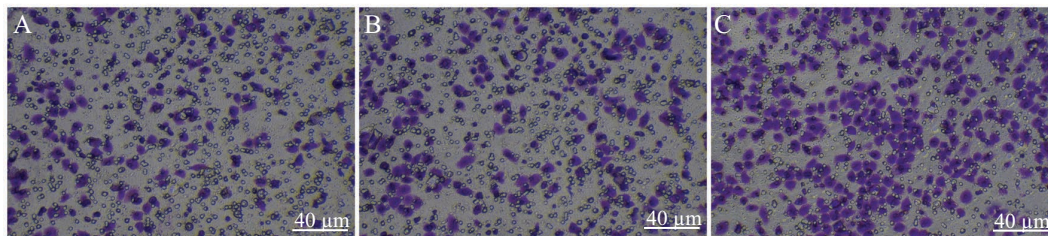


A: 对照组; B: 空载体组; C: 实验组。

A: control group; B: empty vector group; C: experimental group.

图3 平板克隆实验检测三组细胞生长

Fig.3 The growth of three groups cells detected by colony formation test

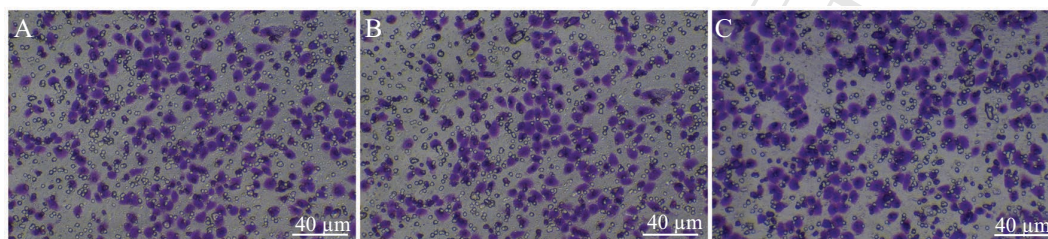


A: 对照组; B: 空载体组; C: 实验组。

A: the control group; B: the empty vector group; C: the experimental group.

图4 三组细胞迁移力比较

Fig.4 Comparison of the migration force in the three groups of cells

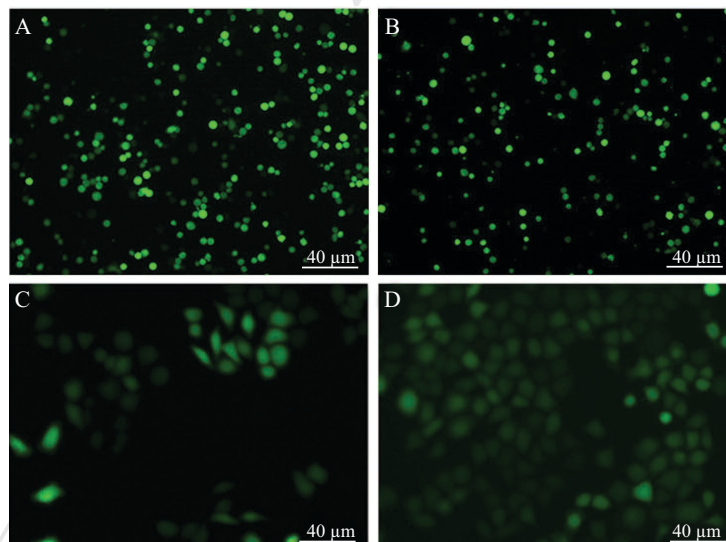


A: 对照组; B: 空载体组; C: 实验组。

A: the control group; B: the empty vector group; C: the experimental group.

图5 三组细胞侵袭力比较

Fig.5 Comparison of the invasion force in the three groups of cells



A: 异种细胞实验组; B: 异种细胞对照组; C: 同种细胞实验组; D: 同种细胞对照组。

A: the experimental group of heterogeneous cells; B: the control group of heterogeneous cells; C: the experimental group of homogeneous cells; D: the control group of homogeneous cells.

图6 *TRBP2*基因对同种及异种细胞间黏附力的影响

Fig.6 The effect of *TRBP2* gene on the homogeneous and heterogeneous cells intercellular adhesion

空载体组间无统计学差异($P>0.05$)(表2、图4和图5)。

2.6 黏附实验

在同种细胞黏附实验中, 荧光显微镜下显示带荧光细胞数: 实验组为(60.14±1.19)、空载体组为(168.15±1.28); 而异种细胞间: 实验组为(92.30±1.23)、空载体组为(59.20±1.38)。并且发现

各时段细胞间黏附率与空载体组相比, 实验组细胞同种细胞间黏附率减弱($P<0.05$), 异种间黏附率增强($P<0.05$, 表3和图6)。

2.7 Western blot检测*TRBP2*、*MMP-2*、*PKR*及p-*PKR*蛋白表达

结果显示, 实验组*TRBP2*、*MMP-2*蛋白表达量

表2 三组细胞侵袭、迁移力测定($\bar{x}\pm s$)Table 2 Cell invasion and migration determination in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	侵袭实验 Invasion test	迁移实验 Migration group
The control group	150.21±12.10	161.51±17.21
The empty vector group	142.40±13.39	172.32±20.18
The experimental group	234.10±14.37* [#]	314.12±11.42* [#]

* $P<0.05$, 与对照组比较; [#] $P<0.05$, 与空载体组比较。* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs empty vector group.表3 同种及异种细胞间黏附率的比较($\bar{x}\pm s$)Table 3 Comparison of the homogeneous and heterogeneous cells intercellular adhesion ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups		黏附率 Adhesion rate			
		30 min	60 min	90 min	120 min
Homogeneous	Empty vector group	0.058±0.021	0.098±0.035	0.154±0.064	0.165±0.075
	Experimental group	0.024±0.016*	0.056±0.028*	0.084±0.031*	0.135±0.084*
Heterogeneous	Empty vector group	0.315±0.082	0.413±0.141	0.448±0.281	0.453±0.341
	Experimental group	0.387±0.147*	0.563±0.117*	0.818±0.017*	0.893±0.029*

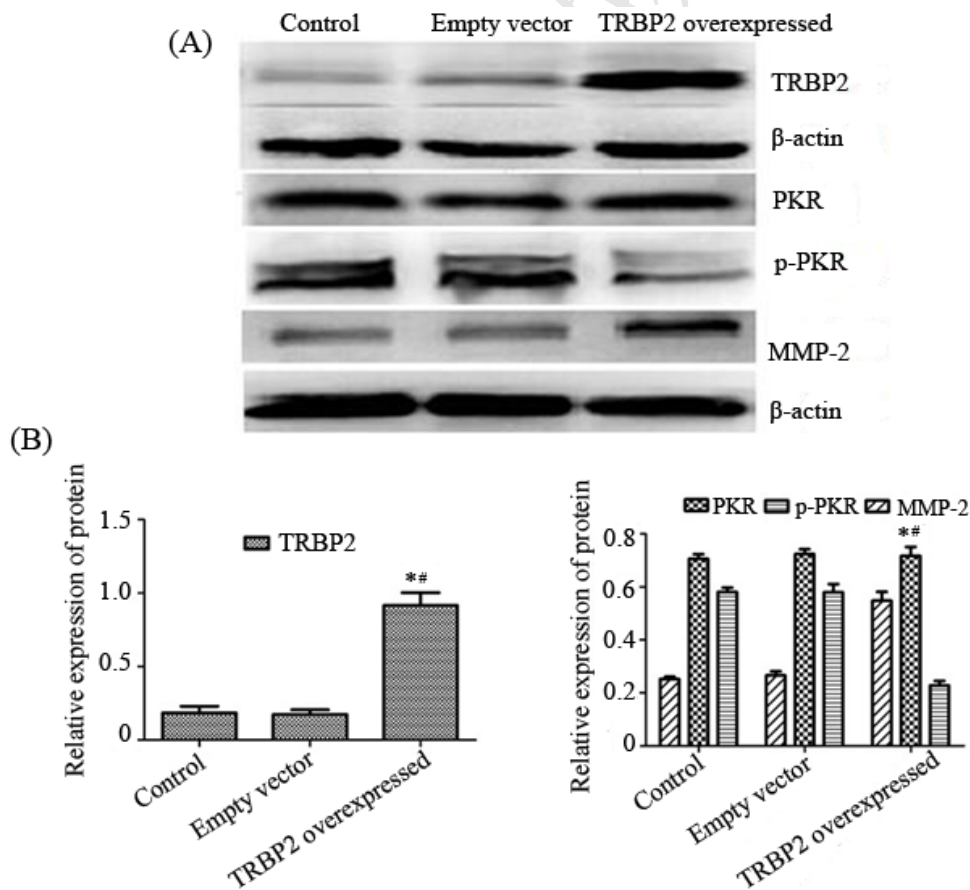
* $P<0.05$, 与空载体组比较。* $P<0.05$ vs empty vector group.A: Western blot检测四种蛋白的表达情况; B: Western blot结果的统计分析。* $P<0.05$, 与对照组比较; [#] $P<0.05$, 与空载体组比较。A: the expressions of the four proteins detected by Western blot; B: the statistical analysis of the result of Western blot. * $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs empty vector group.

图7 Western blot检测四种蛋白在各组细胞中的表达

Fig.7 The expression of proteins among each group by Western blot

高于对照组和空载体组($P < 0.05$), p-PKR蛋白表达量低于对照组和空载体($P < 0.05$), PKR蛋白在三组细胞间表达量无明显差异, 对照组与空载体组之间比较以上各项指标无差异(图7)。

3 讨论

TRBP2是双链RNA结合蛋白家族成员^[1], *TRBP2*基因具有多种生物学功能, 包括调控精子生成与发育、抑制PKR激活、调节HIV蛋白表达、参与RNA干扰(RNAi)等。目前研究表明, *TRBP2*还参与RISC复合体(RNA induced silencing complex)的形成和miRNA(microRNA)的转录后修饰, 其中miRNA已被证实与人体多种肿瘤的形成及转移有关, 提示这类小的核酸分子发挥着类似癌基因或抑癌基因的作用。本课题组此前在肺腺癌患者淋巴转移的分子指纹鉴定中发现, 与伴有区域淋巴结转移的肺腺癌相比, *TRBP2*基因在不伴区域淋巴结转移的肺腺癌细胞中表达明显升高, 提示肺腺癌中*TRBP2*基因的表达异常可能与肺腺癌发生发展存在密切关系^[5]。

既往研究证实, *TRBP2*基因与恶性肿瘤(肾上腺皮质癌、尤文肉瘤、恶性黑色素瘤、消化道肿瘤等)^[2,6-9]的增殖、凋亡等生物学行为存在密切联系, 关于该基因对肺腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响还未见报道。Claudio等^[6]发现, *TRBP2*基因通过调节miRNA-143及miRNA-145的表达来抑制尤文肉瘤细胞的增殖; Stefano等^[9]发现, 该基因在肾上腺癌中的阳性表达率显著高于肾上腺良性病变, 并进一步证实*TRBP2*基因可作为区分肾上腺良恶性病变的分子指标。我国学者Lin等^[10]发现, *TRBP2*基因在乳腺癌细胞质中的表达量显著高于其在癌旁细胞质中的表达, 并且该基因的表达量与乳腺癌患者的长期生存率及预后成负相关。以上研究提示, *TRBP2*基因对癌细胞生物学行为的影响可能存在组织特异性, 本实验在前期研究的基础上研究*TRBP2*基因过表达对人肺腺癌细胞A549增殖、迁移及侵袭的影响, 并初步探讨了其可能机制。

双链RNA依赖的蛋白激酶(PKR)是一种在全身广泛表达的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 活化的PKR可抑制肿瘤细胞的生长, 是宿主防御机制中发动细胞死亡来对抗肿瘤形成的关键点。*TRBP2*基因是PKR的强抑制物, 可通过竞争性结合dsRNA来抑制PKR的磷酸化, 进而促进病毒增殖及调节肿瘤细胞的

蛋白质合成。翻译起始因子-2(eukaryotic initiation factor-2, eIF-2)在 α 亚基的磷酸化对*p53*基因功能的发挥起重要作用^[11], 而eIF-2 α 的磷酸化是由eIF-2 α 激酶家族调控的, p-PKR就是eIF-2 α 激酶家族中的一员。目前, 临床上可通过激活PKR的方式来控制肿瘤细胞的转移。

基质金属蛋白酶-2(MMP-2)是一种可降解IV型胶原的酶, 其在肿瘤的血管形成、细胞的浸润和转移过程中都起到重要作用。既往研究表明, *MMP-2*基因的表达与肺癌组织低分化及远处转移密切相关, 随着肺癌侵袭力的增强*MMP-2*表达量增加^[12-13]。Bian等^[14]认为, *MMP-2*基因的启动子上有11个*p53*结合位点, *MMP-2*基因是*p53*的靶基因, 其表达受*p53*基因的调节, *p53*基因可通过*MMP-2*的表达来调节血管生成及肿瘤细胞入侵。本实验通过Western blot检测发现, p-PKR蛋白的表达与*MMP-2*表达成显著负相关。我们推测, *TRBP2*可竞争性抑制PKR磷酸化来促进A549细胞增殖, 并通过提高*MMP-2*表达来促进A549细胞侵袭及迁移, 但*MMP-2*升高是否与p-PKR对*p53*基因的调节有关尚缺乏明确依据, 还需进一步研究。

本研究以携带*TRBP2*基因的重组慢病毒感染人肺腺癌A549细胞, 用Puromycin筛选法建立稳定细胞株, 通过MTT法、平板克隆实验、Transwell小室及黏附实验检测*TRBP2*基因对A549细胞增殖、迁移及侵袭的影响。结果提示, 实验组细胞增殖指数增加, 倍增时间缩短, 生长速度加快, 侵袭及迁移能力明显增强, 提示该基因能增加人肺腺癌A549细胞的体外增殖、迁移及侵袭能力。此结论与*TRBP2*基因对黑色素瘤、骨肉瘤、乳腺癌等肿瘤细胞的增殖起正向调控作用的研究结果^[2,10]相符, 而与Claudio等^[6]发现的*TRBP2*可抑制尤文肉瘤细胞的增殖结果不符, 提示该基因对肿瘤生物学行为的影响存在组织特异性, 可能存在多种分子机制, 具体机制还需进一步探讨。

综上所述, *TRBP2*基因过表达引起PKR磷酸化水平降低及*MMP-2*表达量增加可能是人肺腺癌A549细胞增殖、迁移及侵袭的重要机制, 本实验仅从细胞层面做相关研究, 但该研究结果可为组织及动物实验打下基础, 并为临床推广提供理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Sanghvi VR, Steel LF. The cellular TAR RNA binding protein,

- TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of double-stranded RNA-dependent kinase PKR. *J Virol* 2011; 85(23): 12614-21.
- 2 Sand M, Skrygan M, Georgas D, Arenz C, Gambichler T, Sand D, *et al.* Expression Levels of the microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 and the RNA-induced silencing complex (RISC) components argonaute-1, argonaute-2, PACT, TARBP1, and TARBP2 in epithelial skin cancer. *Mol Carcinog* 2012; 51(11): 916-22.
- 3 Benkirane M, Neuveut C, Chun RF, Smith SM, Samuel CE, Gatignol A, *et al.* Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J* 1997; 16(3): 611-24.
- 4 Melo SA, Ropero S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA, *et al.* A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet* 2009; 41(3): 365-70.
- 5 葛明建, 王梅, 吴庆琛, 秦治明, 陈力, 李良彬. 肺腺癌患者淋巴转移的分子指纹鉴定. *癌症(Ge Mingjian, Wang Mei, Wu Qingchen, Qin Zhiming, Chen Li, Li Liangbin. Gene expression signature for lymphatic metastasis of human lung adenocarcinoma. Chinese Journal of Cancer) 2009; 28(3): 262-7.*
- 6 de Vito C, Riggi N, Cornaz S, Suvà ML, Baumer K, Provero P, *et al.* A TARBP2-dependent miRNA expression profile underlies cancer stem cell properties and provides candidate therapeutic reagents in ewing sarcoma. *Cancer Cell* 2012; 21(6): 807-21.
- 7 Caramuta S, Lee L, Ozata DM, Akçakaya P, Georgii-Hemming P, Xie H, *et al.* Role of microRNAs and microRNA machinery in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J* 2013; 11(3): e152.
- 8 Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Kunimoto H, Noshio K, Suzuki H, *et al.* Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18(22): 2745-55.
- 9 Caramuta S, Lee L, Ozata DM, Akçakaya P, Xie H, Höög A, *et al.* Clinical and functional impact of TARBP2 over-expression in adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20(4): 551-64.
- 10 Lin X, Wu M, Liu P, Wei F, Li L, Tang H, *et al.* Up-regulation and worse prognostic marker of cytoplasmic TARBP2 expression in obstinate breast cancer. *Med Oncol* 2014; 31(4): 868.
- 11 He Y, Correa AM, Raso MG, Hofstetter WL, Fang B, Behrens C, *et al.* The role of PKR/eIF2a signaling pathway in prognosis of non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2011; 6(11): e24855.
- 12 Kuo HY, Huang YS, Tseng CH, Chen YC, Chang YW, Shih HM, *et al.* PML represses lung cancer metastasis by suppressing the nuclear EGFR-mediated transcriptional activation of MMP2. *Cell Cycle* 2014; 13(19): 3132-42.
- 13 Karahan N, Güney M, Baspinar S, Oral B, Kapucuoglu N, Mungan T. Expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 28(3): 184-8.
- 14 Bian J, Sun Y. Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Mol Cell Biol* 1997; 17(11): 6330-8.