

miR-375 通过抑制 KLF4 促进前列腺癌细胞的迁移和侵袭

潘恩山,李煜罡,朱晓光

(南方医科大学中西医结合医院泌尿外科,广州 510315)

[摘要] **目的** 探讨 miR-375 在前列腺癌(PCa)细胞中的表达、作用及机制。**方法** 培养细胞,转染质粒,Transwell 分析 PCa 细胞的迁移和侵袭;qPCR 分析 miR-375、KLF4 mRNA 在 PCa 细胞中的表达;Western blot 分析 KLF4 蛋白在 PCa 细胞中的表达;生物信息学分析 miR-375 的靶基因,双荧光素酶实验验证。**结果** miR-375 在 PCa 中高表达,抑制 miR-375 的表达显著抑制 PCa 细胞的迁移和侵袭;通过生物信息学分析 miR-375 的潜在靶基因含有 KLF4,双荧光素酶实验验证 KLF4 为 miR-375 的靶基因;KLF4 在 PCa 细胞中表达显著降低,抑制 miR-375 的表达能够显著促进 KLF4 蛋白的表达;进一步研究表明抑制 KLF4 表达可逆转 miR-375 抑制物对 PCa 细胞的迁移侵袭的抑制作用。**结论** miR-375 抑制 KLF4 的表达促进 PCa 的迁移和侵袭,发挥癌基因的作用;其可以作为 PCa 的治疗靶点,为 PCa 的治疗提供新的方向。

[关键词] miR-375;KLF4;前列腺肿瘤;细胞运动;肿瘤浸润

[中图分类号] R737.25

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)23-3184-05

miR-375 promotes prostate cancer cell migration and invasion by targeting KLF4

Pan Enshan, Li Yugang, Zhu Xiaoguang

(Department of Urology, TCM-Integrated Cancer of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510315, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression, role and mechanism of miR-375 in prostate cancer (PCa) cells. **Methods** PCa cells were cultured and transfected with plasmid, the migration and invasion of PCa were detected by Transwell; the expression of miR-375 and KLF4 mRNA were detected by qPCR; the expression of KLF4 were detected by Western blot; the potential target genes of miR-375 were analyzed by bioinformatics and verified by dual luciferase report. **Results** The expression of miR-375 were significantly up-regulated in the PCa; Inhibited the expression of miR-375 could significantly inhibit the migration and invasion of PCa cells. KLF4 was the potential target genes of miR-375, which verified through bioinformatics analysis and dual luciferase report. The expression of KLF4 were significantly down-regulated in the PCa. Inhibited the expression of miR-375 could significantly up-regulated the expression of KLF4. Inhibited the KLF4 expression was able to reverse the suppressive effect miR-375 has on the migration and invasion of PCa cells. **Conclusion** miR-375 promotes the migration and invasion of PCa via inhibiting the expression of KLF4 and play the oncogene role. MiR-375 can be used as therapeutic targets for PCa, and provide a new direction for the treatment of PCa.

[Key words] microRNA 375; KLF4; prostatic neoplasms; cell movement; neoplasm invasiveness

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是一种严重威胁男性生命的恶性肿瘤,在美国、欧洲乃至全世界 PCa 的发病率在男性恶性肿瘤中排第 2 位,仅次于肺癌,其导致的死亡排第 5 位^[1]。PCa 在中国的发病率远低于西方国家,但是近年来也呈逐年上升的趋势。据全国 2004—2005 年第 3 次死因回顾抽样调查发现,PCa 导致的死亡排第 13 位,其病死率远低于世界平均水平,然而与 1990—1992 年死因调查结果相比病死率上升了 209.84%;2003—2007 年中国 PCa 发病率为 8.60/10 万,病死率为 3.29/10 万,分别位列第 7 位和第 12 位,比 2004—2005 进一步增加^[2]。而至 2011 年调查发现 PCa 在全部癌症发病和死亡构成进一步增加^[3]。PCa 的发病可能与生活方式、寿命延长、人口老龄化及前列腺特异性抗原(PSA)早期诊断技术的提高有关;而 PCa 的死亡则和初诊患者已局部进展或远处转移,丧失了根治性治疗的机会相关^[4]。由于 PCa 易发生远处转移,尤其是骨转移,所以寻找抑制 PCa 转移的治疗靶点具有重要的意义。

微 RNA(microRNA, miRNA)与 PCa 的发生、发展有着密切的关系。有研究表明 miR-146b、miR-320a 等在 PCa 中表达下调,过表达能够诱导 PCa 细胞的凋亡,抑制 PCa 的增殖、迁移和侵袭,在 PCa 中发挥抑癌基因的作用^[5-6]。而 miR-301a、

miR-449a 和 miR-221 等在 PCa 中表达上调,抑制其表达能够抑制 PCa 的增殖、迁移和侵袭,在 PCa 中发挥癌基因的作用^[7-9]。以上研究表明 miRNA 在 PCa 中发挥着癌基因或者抑癌基因的作用,具有很好的稳定性和特异性,可以作为潜在的新型肿瘤标志物和治疗靶点。miR-375 是 miRNA 的一种,有研究表明 miR-375 在 PCa 组织中的表达显著增加^[10],和 PCa 的发生、转移密切相关,能够作为早期诊断的标志物^[11-12]。miR-375 还能通过 miR-93/miR-106b/miR-375-CIC-CRABP1 信号通路调节 PCa 的增殖^[13],但是对 miR-375 能否调节 PCa 的迁移和侵袭及其机制仍不清楚。

本研究通过检测 miR-375 在 PCa 细胞中的表达,明确 miR-375 在 PCa 细胞迁移和侵袭中的作用,同时分析 miR-375 作用的靶基因及信号通路,探讨 miR-375 调节 PCa 的迁移和侵袭的机制,为转移的 PCa 的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂 人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 和 PCa 细胞 LNCaP、DU145、PC3 均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC);10%胎牛血清购自美国 Gibco 公司;RPMI-1640 基础培养基、TRIzol 试剂、Lipofectamine RNAi MAX 和 Lipofectamine 2000、has-miR-375 抑制物、has-miR-375 mimic 购自

美国 Invitrogen 公司; siRNA-KLF4 合成于上海吉玛制药技术有限公司; 所有引物购自上海生物工程有限公司; KLF4 野生型 3'-UTR 和突变型 3'-UTR 由苏州金唯智合成并连接到 psi-CHECK-2 载体; TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit 购自美国 ABI 公司; 抗 KLF4 抗体购自美国 Abcam 公司; 其他生化试剂购自上海生物工程有限公司及 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RWPE-1、LNCaP、DU145 和 PC3 均在含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素 G 和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中 37 °C、5% CO₂ 进行培养。当细胞融合度大约为 80% 时用胰酶消化进行传代。

1.2.2 载体构建及转染 将处于对数生长期的 PCa 细胞种植于 6 孔培养板中(每孔大约 1×10⁵ 个细胞), 第 2 天观察细胞融合度大约为 50% 时开始进行转染。采用 Lipofectamine RNAi MAX 分别转染 300 nmol/L miR-NC、miR-375 抑制物至 PCa 细胞, 或者共转染 300 nmol/L miR-375 抑制物和 10 μmol/L siRNA-KLF4 或者 si-NC 至 PCa 细胞, 转染步骤参照 Lipofectamine RNAi MAX 说明书。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 miRNA 及相应基因 miRNA 表达 收集细胞样品, 加入 1 mL Trizol 提取液提取细胞总 RNA。逆转录采用 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit; cDNA 逆转录采用 TaqMan Reverse Transcription Reagents、200 ng 总 RNA 及 Oligo dT; 操作严格按照试剂操作说明书。采用 SYBR Green 法用于 qPCR 检测。反应体系为: cDNA 5.0 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 2×SYBR Green PCR Master Mix 10 μL, ddH₂O 4.0 μL, 总反应体积为 20 μL。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 1 min 30 s, 进行 40 个循环。相对表达水平采用 2^{-ΔΔCt} 进行计算。每份样品重复测量 3 次。检测引物见表 1。

表 1 qRT-PCR 检测引物序列

名称	引物(5'-3')
miR-375	
上游引物	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
下游引物	ACGCGAGCCGAACGAACAAAUU
U6	
上游引物	CTCGCTTCGGCAGCACATA
下游引物	GTG CAGGGTCCGAGGT
KLF4	
上游引物	TTACCAAGAGCTCATGCCAC
下游引物	TGTGCCTTGAGATGGAACT
GAPDH	
上游引物	ACACCCACTCCTCCACCTTT
下游引物	TTACTCCTTGGAGGCCATGT

1.2.4 Western blot 检测 12 000 r/min 离心 10 min 收集细胞, 吸净上清后留沉淀。沉淀中直接加入细胞裂解液, 冰上充分裂解。BCA 法测定总蛋白浓度, 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白, 电泳结束后取出分离胶进行转膜, 加入转膜缓冲液, 恒定电流 0.5 A 转膜 2 h。室温下, 将聚偏氟乙烯(PVDF)膜放入 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h。然后将 PVDF 膜放入 10 mL 稀释过的抗 KLF4 抗体(1:2 000)中 4 °C 过夜。去除抗 KLF4 抗体, 30 mL 1×TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。加入 10 mL 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000), 室温孵育 2 h。30 mL 1×TBST 洗膜 3 次, 每次 5

min, 暗室进行曝光。灰度采用 Image J 分析。

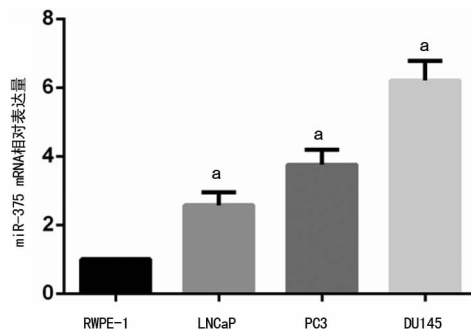
1.2.5 细胞迁移和侵袭检测 PCa 的迁移检测: 将 Transwell 侵袭小室置入 24 孔板中, 在 Transwell 小室的下室加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 收集转染后的 PCa 细胞重悬, 加入 200 μL 重悬液(共 5×10⁴ 个细胞)到 Transwell 小室的上室; 细胞培养 24 h, 取出小室, 用棉签将上室内部擦干净, 小室的下表面用 PBS 浸泡清洗。首先以 4% 多聚甲醛溶液固定细胞, 然后 0.1% 结晶紫染色液染色, 自来水冲洗 3 次, 显微镜下拍照, 并随机选取 6 个不同区域, 计算每个视野内穿过滤膜的细胞数, 取平均数为迁移细胞数。PCa 的侵袭检测: 首先在孔径为 8 μm 的 Transwell 侵袭小室微孔膜表面均匀涂抹 20 μL 0.5 g/L Matrigel 人工基质胶, 37 °C 放置 30 min 使其聚成凝胶状。其余操作步骤同迁移检测。

1.2.6 双荧光素酶实验检测靶基因 miR-375 使用预测软件 miRDB (<http://www.mirdb.org/miRDB/>) 和 Targetscan (<http://www.targetscan.org>) 进行靶基因预测, 发现 KLF4 mRNA 可能为 miR-375 的靶基因。为了确定 KLF4 mRNA 的 3'-UTR 是否为 miR-375 的直接靶蛋白, KLF4 mRNA 的野生型全长 3'-UTR 及突变型 3'-UTR 合成并连接到 psi-CHECK-2 载体, 分别命名为 KLF4-WT 和 KLF4-MUT。PCa 细胞共转染 200 nmol/L miR-NC 或 miR-375 抑制物和 100 ng 质粒(KLF4-WT 或者 KLF4-MUT), 24 孔板培养 48 h。收集细胞裂解, 海肾(Renilla)和萤火虫(firefly)荧光素酶荧光强度使用 Dual-Luciferase 双荧光报告分析系统进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行分析; 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间比较采用单因素方差分析, 多组之间两两比较采用 LSD 分析, 两组之间对比采用配对 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-375 在 PCa 细胞中的表达 采用 qPCR 检测 miR-375 在 PCa 细胞中的表达。miR-375 在正常前列腺细胞 RWPE-1 及 PCa 细胞 LNCaP、PC3 和 DU145 中的相对表达量分别为 1.000 ± 0.000、2.580 ± 0.376、3.760 ± 0.428 和 6.210 ± 0.573, 单因素方差分析结果显示差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。和 RWPE-1 相比, LNCaP、PC3 和 DU145 中 miR-375 表达显著升高, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。其中以 DU145 中 miR-375 表达量最高, 采用 DU145 作为实验细胞进行后续实验。见图 1。



^a: *P* < 0.05, 与 RWPE-1 比较。

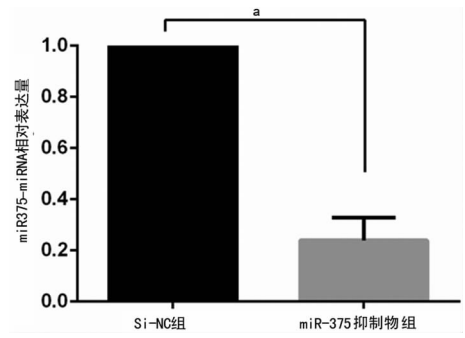
图 1 miR-375 在 RWPE-1、LNCaP、PC3 和 DU145 中的表达

2.2 miR-375 抑制物降低 miR-375 的表达 采用 qPCR 检测 miR-375 抑制物对 miR-375 在 DU145 中表达的影响, 结果图 2 所示。miR-375 在 Si-NC 组和 miR-375 抑制物组中的相对表

达量分别为 1.000 ± 0.000 和 0.240 ± 0.088 , 与 Si-NC 组比较, miR-375 抑制物组中 miR-375 表达明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-375 抑制物能够显著降低 miR-375 在 DU145 中的表达。

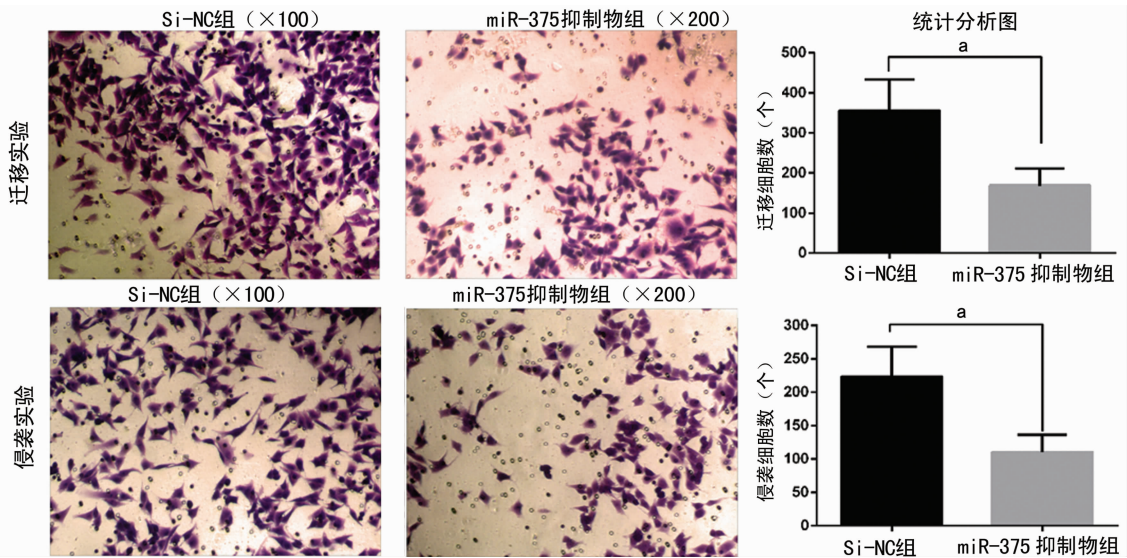
2.3 miR-375 抑制物抑制 DU145 细胞的迁移侵袭 Si-NC 和 miR-375 抑制物转染 48 h 后采用 Transwell 检测 DU145 细胞的迁移和侵袭能力, 图 3 所示。Si-NC 组和 miR-375 抑制物组的迁移细胞数分别 (355 ± 78) 个和 (168 ± 43) 个, 与 Si-NC 组比较, miR-375 抑制物组迁移细胞数明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 表明抑制 miR-375 的表达能够抑制 DU145 的迁移。进一步研究发现 Si-NC 组和 miR-375 抑制物组的侵袭细胞数分别 (223 ± 45) 个和 (110 ± 26) 个, 与 Si-NC 组比较, miR-375 抑制物组侵袭细胞数明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表明抑制 miR-375 的表达能够抑制 DU145 的侵袭。



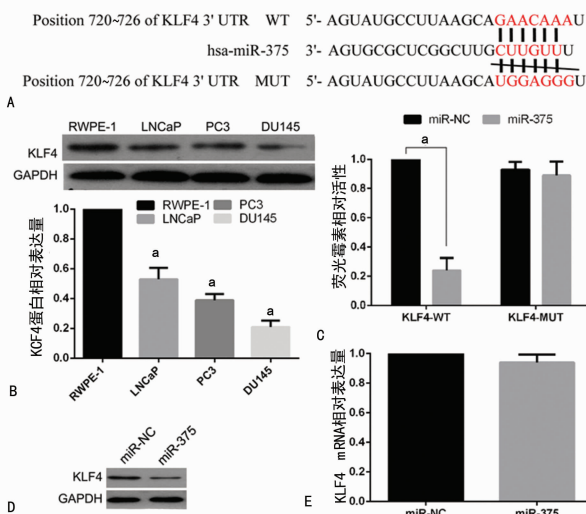
^a: $P < 0.05$

图 2 miR-375 抑制物抑制 miR-375 的表达



^a: $P < 0.05$

图 3 miR-375 抑制物抑制 DU145 细胞的迁移侵袭



A: 生物信息学分析 KLF4 mRNA 3' UTR 存在的 miR-375 结合位点; B: Western blot 检测 KLF4 在 PCa 细胞中的表达, a 表示 $P < 0.05$ (与 RWPE-1 比较); C: KLF4-WT 组和 KLF4-MUT 组的荧光素酶相对活性检测, * 表示 $P < 0.05$; D: Western blot 检测 KLF4-WT+miR-NC 和 KLF4-WT+miR-375 组 KLF4 蛋白表达; E: qPCR 检测 KLF4-WT+miR-NC 和 KLF4-WT+miR-375 组 KLF4 mRNA 表达

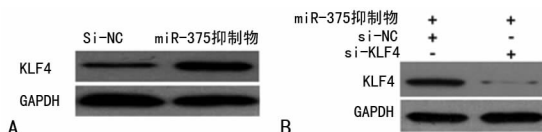
图 4 在 DU145 细胞中验证 KLF4 为 miR-375 的靶基因

2.4 miR-375 的靶基因为 KLF4 通过软件预测发现 KLF4 可能是 miR-375 的潜在靶基因, 结果如图 4A 所示。采用 Western blot 检测 KLF4 在 PCa 细胞中的表达, 结果如图 4B 所示。KLF4 在正常前列腺细胞 RWPE-1 及 PCa 细胞 LNCaP、PC3 和 DU145 中的相对表达量分别为 1.000 ± 0.000 、 0.530 ± 0.076 、 0.389 ± 0.042 和 0.210 ± 0.043 , 单因素方差分析结果显示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 RWPE-1 比较, LNCaP、PC3 和 DU145 中 KLF4 的表达显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-375 和 KLF4 的表达趋势相反, 说明 KLF4 可能被 miR-375 负调控。为了进一步证明 KLF4 是 miR-375 的靶基因, 采用双荧光素酶实验检测, 结果如图 4C 所示。KLF4-WT+miR-NC 组和 KLF4-WT+miR-375 组的荧光活性变化倍数分别为 1.000 ± 0.000 和 0.240 ± 0.085 , 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。KLF4-MUT+miR-NC 及 KLF4-MUT+miR-375 组的荧光活性变化倍数分别为 0.930 ± 0.052 和 0.890 ± 0.095 , 两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。同时采用 qPCR 检测 KLF4-WT+miR-NC 组和 KLF4-WT+miR-375 组的 KLF4 mRNA 分别为 1.000 ± 0.000 和 0.940 ± 0.054 , 两者相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果如图 4E 所示。同时采用 Western blot 检测 KLF4-WT+miR-NC 组和 KLF4-WT+miR-375 组的表达发现 KLF4 蛋白表达显著降低, 结果如图 4D 所示。以上数据说明 miR-

375 可与 KLF4 的 3'-UTR 区上的位点结合,miR-375 与 KLF4 存在直接调控关系。

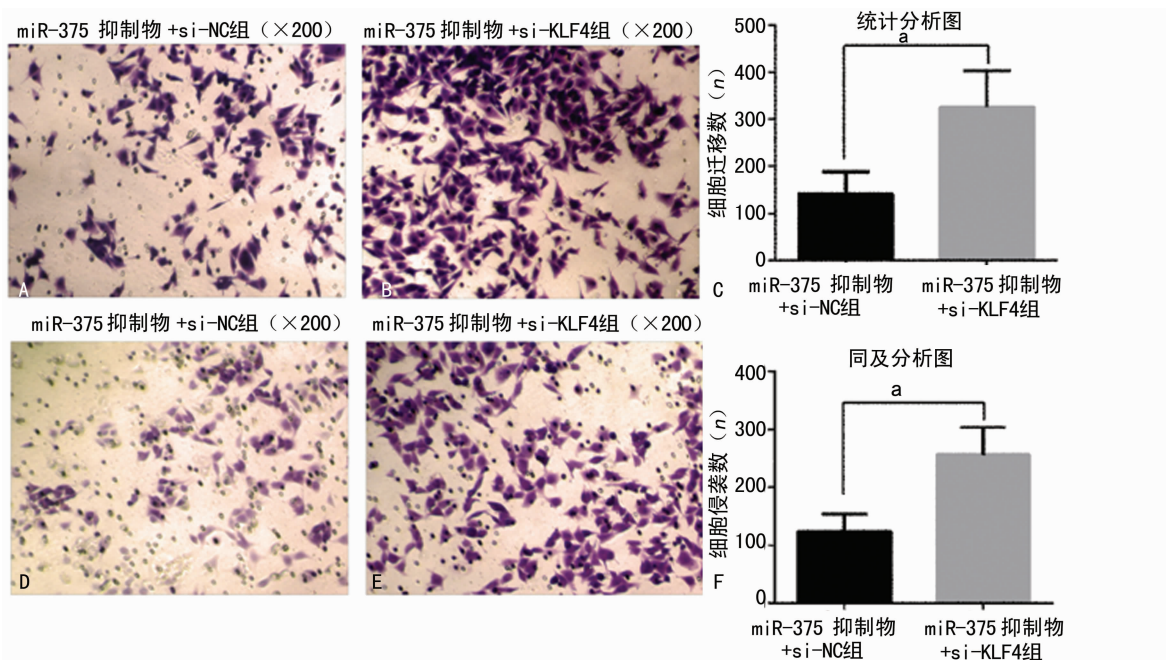
2.5 抑制 KLF4 表达能够逆转 miR-375 抑制物对 DU145 细胞的迁移侵袭的抑制作用 本研究发现 miR-375 抑制物能够促进 KLF4 的表达,结果如图 5 所示。为了进一步研究 miR-375 和 KLF4 的关系,本研究在转染 miR-375 抑制物的同时转染 si-KLF4,抑制 KLF4 的表达,分析共转染 miR-375 抑制物和 si-KLF4 对 DU145 细胞的迁移侵袭的影响。共转染 miR-375 抑制物和 si-KLF4 能够显著降低 KLF4 的表达,结果如图 5B 所示。共转染 48 h 后采用 Transwell 检测 DU145 细胞的迁移和侵袭能力。miR-375 抑制物+si-NC 组和 miR-375 抑制物+si-KLF4 组的迁移细胞数分别(141±47)个和(325±78)个,结果如图 6A~C 所示。miR-375 抑制物+si-NC 组和 miR-375 抑制物+si-KLF4 组的侵袭细胞数分别(123±31)个和

(256±48)个,结果如图 6D~F 所示。和 miR-375 抑制物+si-NC 组相比,miR-375 抑制物+si-KLF4 组迁移侵袭细胞数明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。抑制 KLF4 的表达能够逆转 miR-375 抑制物对 DU145 细胞的迁移侵袭的抑制作用。



A:Western blot 检测 miR-NC 和 miR-375 抑制物组 KLF4 的表达;B:Western blot 检测共转染 miR-375 抑制物和 si-KLF4(或 Si-NC)组 KLF4 的表达, $a: P<0.05$

图 5 不同组的 KLF4 表达



A~C:细胞迁移实验;D~F:细胞侵袭实验

图 6 抑制 KLF4 表达能够逆转 miR-375 抑制物对 DU145 细胞的迁移侵袭的抑制作用

3 讨论

本研究结果表明 miR-375 在 PCa 细胞中的表达显著升高,和以往的研究相同^[11]。同时本研究结果表明 miR-375 在 DU145 细胞中表达比其他 PCa 细胞 PC3 和 LNCaP 中的表达高,根据文献报道,这 3 种细胞的转移能力从小到大依次为 LNCaP、PC3 和 DU145 细胞,该结果说明 miR-375 的表达和 PCa 的迁移和侵袭存在关系,和 Nguyen 等^[14]研究的结果类似,其结果表明 miR-375 在高转移 PCa 组织中表达最高,其次为低转移 PCa 和未转移 PCa。

miR-375 在癌症的发生、发展过程中可能扮演癌基因或者抑癌基因的作用。Shi 等^[15]研究表明在骨肉瘤中 miR-375 能够通过抑制 PIK3CA 从而抑制 PI3K/AKT 信号通路,抑制骨肉瘤细胞的增殖,扮演抑癌基因的角色。在结肠癌中,有研究表明 miR-375 能够抑制 KLF4 的表达从而抑制结肠癌细胞的增殖^[16],而另有研究表明 miR-375 能够抑制 PHLPP1 的表达从而促进结肠癌细胞的西妥昔单抗耐药性^[17]。miR-375 在 PCa 中能够抑制 PCa 细胞的增殖^[13,18],但是对迁移和侵袭的作用还不清楚。本研究结果表明 miR-375 抑制物能够显著抑

制 miR-375 的表达,抑制 miR-375 的表达能够显著抑制 PCa 细胞的迁移和侵袭。从该结果来看,miR-375 在 PCa 中发挥癌基因的作用。

为了进一步了解 miR-375 在 PCa 中发挥癌基因的作用机制,本研究通过生物信息学分析表明 KLF4 为 miR-375 的潜在的作用靶点。为了验证该分析,本研究采用双荧光素酶分析验证,结果表明 miR-375+KLF4-WT 组的相对荧光素酶活性显著抑制而 miR-375+KLF4-MUT 组的相对荧光素酶活性无显著变化,这表明 miR-375 和 KLF4 3' UTR 之间存在相互联系;进一步分析发现 miR-375+KLF4-WT 组的 KLF4 mRNA 无显著变化,而 KLF4 的蛋白表达显著降低,说明 miR-375 不影响 KLF4 的 mRNA 水平,而是直接影响 KLF4 的翻译。该结果表明在 PCa 细胞中 KLF4 是 miR-375 作用的靶基因。有研究表明在结肠癌中 KLF4 是 miR-375 作用的靶基因,影响结肠癌的增殖^[16]。

KLF4 在生物体中有着广泛的功能,在肿瘤中发挥着癌基因或者抑癌基因的作用。在结肠癌、胃癌及肝癌等癌症中发现 KLF4 表达降低,而在原发性乳腺导管癌、口腔鳞癌中 KLF4

的表达升高。Li 等通过研究证实 KLF4 对皮肤癌细胞的增殖、迁移和黏附能力具有抑制作用，KLF4 在皮肤癌中可能是一个抑癌基因^[19]。在肝癌中，KLF4 通过结合其他转录抑制因子共同抑制 Slug 的转录，调节细胞上表皮间质化(EMT)进程，抑制肝癌细胞的迁移和侵袭能力并发挥其抑癌作用^[20]。在乳腺癌中，KLF4 高表达进而调节靶基因的表达，最终影响细胞增殖及凋亡，并促发肿瘤的形成，发挥癌基因的作用^[21]。本研究表明在 PCa 中 miR-375 能够抑制 KLF4 的表达，尤其在高转移的 PCa 细胞 DU145 中，KLF4 表达显著降低。抑制 miR-375 表达能够促进 KLF4 的表达。抑制 miR-375 表达的同时抑制 KLF4 的表达能够促进 PCa 的迁移和侵袭，表明抑制 KLF4 的表达能够促进 PCa 的迁移和侵袭。Wang 等^[22]研究表明 KLF4 能够抑制 PCa 的增殖、迁移和侵袭。另有研究表明，抑制 KLF4 的表达能够促进 PCa 细胞的迁移和侵袭^[23]，与本研究结果类似。

总之，本研究表明 miR-375 能够抑制 KLF4 的表达促进 PCa 的迁移和侵袭，发挥癌基因的作用。本研究进一步表明 miR-375 可以作为 PCa 的治疗靶点，为 PCa 转移的治疗提供新的方向。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] 韩仁强, 武鸣, 陈万青, 等. 2003~2007 年中国前列腺癌发病与死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(11): 805-811.
- [3] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Annual report on status of cancer in china, 2011[J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1): 2-12.
- [4] 杨培谦. 前列腺癌流行病学概述[J]. *中国医刊*, 2010, 18(10): 11-13.
- [5] Ding HY, Qian WQ, Xu J. MicroRNA-146b acts as a potential tumor suppressor in human prostate cancer [J]. *J Buon*, 2016, 21(2): 434-443.
- [6] Okato A, Goto Y, Kurozumi A, et al. Direct regulation of lamp1 by tumor-suppressive microRNA-320a in prostate cancer[J]. *Int J Oncol*, 2016, 16(10): 111-122.
- [7] Damodaran C, Das TP, Papu John AM, et al. Mir-301a expression: A prognostic marker for prostate cancer [J]. *Urol Oncol*, 2016, 234(6): e13-336, e20.
- [8] 常征, 张爱民, 郝俊文. miR-221 通过作用 DVL2 影响前列腺癌细胞系的侵袭功能[J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(27): 8-14.
- [9] Mao A, Zhao Q, Zhou X, et al. MicroRNA-449a enhances radiosensitivity by downregulation of c-myc in prostate cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27346.
- [10] Selth LA, Townley S, Gillis JL, et al. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(3): 652-661.
- [11] Gao Y, Guo Y, Wang Z, et al. Analysis of circulating miRNA 21 and 375 as potential biomarkers for early diagnosis of prostate cancer[J]. *Neoplasma*, 2016; 63(4): 623-628.
- [12] Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(4): 768-774.
- [13] Choi N, Park J, Lee JS, et al. Mir-93/mir-106b/mir-375-cic-crabp1: A novel regulatory axis in prostate cancer progression[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23533-23547.
- [14] Nguyen HC, Xie W, Yang M, et al. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer[J]. *Prostate*, 2013, 73(4): 346-354.
- [15] Shi ZC, Chu XR, Wu YG, et al. MicroRNA-375 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting pik3ca [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(11): 8579-8584.
- [16] Mao Q, Quan T, Luo B, et al. Mir-375 targets klf4 and impacts the proliferation of colorectal carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1): 463-471.
- [17] Mussnich P, Rosa R, Bianco R, et al. Mir-199a-5p and mir-375 affect colon cancer cell sensitivity to cetuximab by targeting phlpp1[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(8): 1017-1026.
- [18] Selth LA, Das R, Townley SL, et al. A zeb1-mir-375-yap1 pathway regulates epithelial plasticity in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 6(10): 185.
- [19] Li J, Zheng H, Yu F, et al. Deficiency of the kruppel-like factor klf4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(6): 1239-1246.
- [20] Lin ZS, Chu HC, Yen YC, et al. Kruppel-like factor 4, a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cells reverts epithelial mesenchymal transition by suppressing slug expression[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): 24.
- [21] Hu D, Zhou Z, Davidson NE, et al. Novel insight into klf4 proteolytic regulation in estrogen receptor signaling and breast carcinogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(17): 13584-13597.
- [22] Wang J, Place RF, Huang V, et al. Prognostic value and function of klf4 in prostate cancer; Rnaa and vector-mediated overexpression identify klf4 as an inhibitor of tumor cell growth and migration[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10182-10191.
- [23] Na XY, Liu ZY, Ren PP, et al. Long non-coding rna ucal contributes to the progression of prostate cancer and regulates proliferation through klf4-krt6/13 signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 12609-12616.