

. 实验研究 .

miR-103a-3p 过表达靶向负调控 PDK4 抑制胶质瘤生长及侵袭

郭 放 万学锋 刘献志 杨 强 李太平

【摘要】目的 探讨 miR-103a-3p 过表达对胶质瘤 C6 细胞恶性生物学行为的影响及对裸鼠移植瘤生长的影响。**方法** 体外培养鼠源性 C6 胶质瘤细胞,转染 miR-103a-3p mimics 质粒过表达 miR-103a-3p,转染 miR-103a-3p mimics+pcDNA-PDK4 质粒分析 PDK4 过表达对 miR-103a-3p 过表达的影响;EDU 法检测细胞增殖活性;qRT-PCR 检测 miR-103a-3p、PDK4 mRNA 表达水平;流式细胞仪检测细胞凋亡率;Transwell 实验检测细胞侵袭能力;免疫印迹法检测 E-cadherin、N-cadherin、vimentin 蛋白表达水平。取 40 只裸鼠,其中 20 只皮下注射未转染质粒的 C6 细胞、20 只皮下注射转染 miR-103a-3p mimics 质粒的 C6 细胞构建移植瘤模型,分析 miR-103a-3p mimics 过表达对移植瘤生长的影响。**结果** 生物信息学及双荧光素酶试验证实 PDK4 是 miR-103a-3p 的靶点。过表达 miR-103a-3p 明显降低 C6 细胞 PDK4、Ki67、PCNA、N-cadherin、vimentin 表达水平($P<0.05$),明显抑制 C6 细胞增殖活性、侵袭能力($P<0.05$),明显增加 C6 细胞 E-cadherin 表达水平、细胞凋亡率($P<0.05$)。过表达 PDK4 明显抑制过表达 miR-103a-3p 对 C6 胶质瘤细胞的作用($P<0.05$)。过表达 miR-103a-3p 明显抑制裸鼠移植瘤生长($P<0.05$),抑制肿瘤组织 PDK4、Ki67、vimentin 表达($P<0.05$)。**结论** 过表达 miR-103a-3p 通过靶向抑制 PDK4 表达,一方面抑制胶质瘤细胞增殖、促进胶质瘤细胞凋亡,从而抑制胶质瘤生长;另一方抑制胶质瘤上皮-间质转化过程,从而抑制胶质瘤细胞侵袭。

【关键词】 胶质瘤;微小核糖核酸(miRNA);miR-103a-3p;丙酮酸脱氢酶激酶 4;细胞增殖;上皮-间质转化

【文章编号】 1009-153X(2021)06-0442-07 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Overexpression of miR-103a-3p inhibits glioma growth and invasion by targeted negative regulation of PDK4

GUO Fang¹, WAN Xue-feng², LIU Xian-zhi³, YANG Qiang¹, LI Tai-ping¹. 1. Department of Neurosurgery, Zhengzhou Yihe Hospital, Zhengzhou 450003, China; 2. Department of Neurosurgery, Zhumadian Central Hospital Affiliated to Huanghuai University, Zhumadian 463000, China; 3. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of miR-103a-3p overexpression on the malignant biological behavior of glioma C6 cells and the growth of transplanted glioma in nude mice. **Methods** Murine C6 glioma cells were cultured in vitro, miR-103a-3p mimics plasmid was transfected into the C6 cells to overexpress the miR-103a-3p, miR-103a-3p mimics + pcDNA-PDK4 plasmid was transfected into the C6 cells to analyze the effect of PDK4 overexpression on miR-103a-3p overexpression. C6 glioma cells were subcutaneously injected into 40 nude mice to construct a transplanted tumor model, of which 20 received subcutaneous injection of C6 cells without plasmid transfection and 20 transfected miR-103a-3p mimics plasmid C6 cells. EDU method was used to detect the cell proliferation activity. qRT-PCR was used to detect the miR-103a-3p and PDK4 mRNA expression levels. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate. Transwell experiment was used to detect cell invasion ability. Western blotting was used to detect the protein expression levels of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin. **Results** Bioinformatic analysis and dual luciferase test confirmed that PDK4 was the direct target of miR-103a-3p. Overexpression of miR-103a-3p significantly reduced the expression levels of PDK4, Ki67, PCNA, N-cadherin, and vimentin in C6 cells ($P<0.05$), significantly inhibited C6 cell proliferation activity and invasion ability ($P<0.05$), and significantly increased C6 cell E-cadherin expression level ($P<0.05$), significantly increased the apoptosis rate of C6 cells ($P<0.05$). Overexpression of PDK4 significantly inhibited the effect of overexpression of miR-103a-3p on C6 glioma cells ($P<0.05$). Overexpression of miR-103a-3p significantly inhibited the growth of transplanted tumors in nude mice ($P<0.05$), and inhibited the expression of PDK4, Ki67, and vimentin in tumor tissues ($P<0.05$). **Conclusions** Overexpression of miR-103a-3p can inhibit glioma cell proliferation and promote glioma cell apoptosis through targeted inhibition of PDK4 expression, thereby inhibiting glioma growth; on the other hand, it inhibits glioma epithelial-mesenchymal transition process, thereby inhibiting the invasion of glioma cells.

【Key words】 Glioma; MicroRNA; miR-103a-3p; Pyruvate dehydrogenase kinase 4; Cell proliferation; Epithelial-mesenchymal transition

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.06.012

基金项目:2016 年河南省攻关计划项目(201604213)

作者单位:450003 郑州,郑州颐和医院神经外科(郭放、杨强、李太平);463000 河南驻马店,黄淮学院附属驻马店市中心医院神经外科(万学锋);450000 郑州,郑州大学第一附属医院神经外科(刘献志)

胶质瘤是神经系统最常见的原发性肿瘤,具有高复发性、高致残性、高病死率的特点,严重危害人类健康^[1]。目前,脑胶质瘤的发病机制尚未完全阐明,但遗传易感、环境污染与其发病关系密切^[2]。miR-103a-3p 参与卵巢癌的迁移和侵袭过程^[3]。丙酮酸脱氢酶激酶 4(pyruvate dehydrogenase kinase 4, PDK4)是线粒体呼吸作用向细胞质糖酵解代谢转换的关键酶,其过表达促进乳腺癌细胞增殖、侵袭及耐药性^[4]。利用 miRNA 靶基因预测数据库对 miR-103a-3p 的靶基因进行预测发现,PDK4 可能是其潜在的靶基因。本文探讨过表达 miR-103a-3p 对胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养、转染及分组 将鼠源性 C6 胶质瘤细胞(美国模式培养物集存库)培养于含 10%胎牛血清的完全 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司)至对数生长期,0.25%胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司)消化制成单细胞悬液。参照试剂盒操作说明采用 Lipofectamine®2000(美国 Thermo Fisher 公司)将质粒 miR-103a-3p mimics(上海吉凯基因技术有限公司)、mimics-NC(上海吉凯基因技术有限公司)、pcDNA-NC(美国 Invitrogen 公司)、pcDNA-PDK4(美国 Invitrogen 公司)分别转染鼠源性 C6 胶质瘤细胞,继续培养 48 h 后,荧光显微镜下观察。若发出绿色荧光信号,则视为转染阳性,测序验证稳定表达后收集细胞用于后续实验。根据转染质粒分为 miR-NC 组、mimics 组、pcDNA 组、PDK4 组、mimics+PDK4 组、control 组(未转染质粒)。

1.2 RT-PCR 检测 miR-103a-3p 及 PDK4、Ki-67、PCNA mRNA 表达 采用 TRIzol 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)提取总 RNA,紫外分光光度计测定浓度,并用凝胶电泳检测 RNA 完整性。按照反转录试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)说明书合成 cDNA,反转录体系(20 μl):2×miRNA 反应混合液 10 μl,0.1% BSA 2 μl,miRNA PrimeScript®RT 酶混合物 2 μl,总 RNA 1 μl,RNase Free ddH₂O 补充至 20 μl。反应条件:37 ℃、15 min,85 ℃、5 s,4 ℃、30 min。根据荧光定量 PCR 试剂盒(美国 TAKALA 公司)说明书操作,PCR 体系 20 μl:SYBR®Prmix Ex Tap II (2×)10 μl,上游引物 0.4 μl,下游引物 0.4 μl,ROX Reference Dye II (50×)0.4 μl,cDNA 2 μl,ddH₂O 6.8 μl。PCR 反应参数:50 ℃激活聚合酶 5 min,95 ℃预变性 2 min,95 ℃变性 30 s,60 ℃退火 35 s,70 ℃延伸 5 s,反

应进行 40 个循环。溶解曲线绘制:95 ℃、15 s,60 ℃、60 s,85 ℃、15 s,60 ℃、15 s。miR-103a-3p 以 U6 为内参基因,PDK4、Ki-67、PCNA 以 β-actin 作为内参基因,引物序列见表 1。每个样孔设置 3 个复孔。用 2^{-ΔΔCt}法计算相关基因表达量。

1.3 免疫印迹法检测 PDK4 蛋白表达水平 按试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)说明书提取细胞总蛋白,BCA 法(上海碧云天生物技术公司)测定蛋白浓度后,SDS-PAGE 凝胶电泳、电转膜至 PVDF 膜(美国 Thermofisher 公司),5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入兔抗大鼠 PDK4、ACTIN 一抗(1:500;美国 Abcam 公司)4 ℃孵育过夜,TBS 缓冲液(美国 Thermofisher 公司)漂洗 40 min 后,加入 HRP 标记的二抗(1:500;美国 Abcam 公司)常温孵育 1 h,TBST 缓冲液冲洗 40 min,ECL 显影并拍照。

1.4 双荧光素酶报告试验验证 miR-103a-3p 与 PDK4 的靶向关系 将含有 PDK4 结合位点的 miR-103a-3p 3'-UTR 片段及其突变体插入到 pLV-EGFP (2A)Puro 载体荧光素酶报告基因的下游,分别命名为 PDK4 wt 和 PDK4 mut。对构建好的质粒进行测序,将测序结果符合要求的质粒分别和 miR-103a-3p mimics 及 mimics-NC 共转染 C6 细胞。转染完成后 24 h 后裂解细胞,进行荧光素酶活性检测。

1.5 细胞增殖能力的检测 将对数生长期 C6 细胞以 1×10⁵个/ml 密度接种到 96 孔板中,参考文献[5]报道方法应用 Cell-Light™ EdU 细胞增殖检测试剂盒(广州锐博生物技术有限公司)检测细胞增殖能力。KR 刺激 24 h 后,每孔滴加现配的含 EDU (50 μmol/L)的培养基孵育 2 h,加入含 4%多聚甲醛的 PBS 细

表 1 引物序列

基因		引物序列
miR-103a-3p	上游	5'-ACACTCCAGCTGGGAGCAGCATTG-TACAGGG-3'
	下游	5'-TGGTGTCGCGTGGAGTCG-3'
U6	上游	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	下游	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
PDK4	上游	5'-CCCAGTTGGCTAAGATGCTATG-3'
	下游	5'-AGTGCCACTCTTTTCCCAGG-3'
Ki67	上游	5'-CCACACTGTGTGTCGTCGTTTG-3'
	下游	5'-CCGTGCGCTCATCCATTCA-3'
PCNA	上游	5'-ATGTTTGAGGGCAGCGCTGATCCAG-3'
	下游	5'-CTAAGATGCTTCCTCACTTCAATC-3'
β-actin	上游	5'-GCCTTCACCGTTCCAGTTT-3'
	下游	5'-CTGAGCTGCGTTTACACCC-3'

胞固定液室温孵育 30 min, 然后滴加甘氨酸(2 g/L)孵育 5 min, 再加入 PBS 清洗 5 min。之后, 加入 1× Apollo 染色反应液室温避光孵育 30 min, 用含 0.5% TritonX-100 的 PBS 溶液清洗 3 次(10 min/次), 再用甲醇清洗 2 次(5 min/次)、PBS 清洗 1 次(5 min)。加入 DAPI 反应液室温避光孵育 30 min 后, PBS 清洗 3 次。荧光显微镜观察, 随机选择 5 个视野, 计算 EDU 染色阳性细胞比例。

1.6 细胞凋亡水平的检测 取 C6 细胞进行计数, 调整细胞密度为 1×10^6 个/ml, 1 000 转/min 离心 5 min, PBS 重悬沉淀, 加入 Annexin V-FITC 缓冲液混匀, 再加入 Annexin V/FITC+PI 混合, 室温避光孵育 15 min。流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.7 细胞侵袭能力的检测 收集对数生长期 C6 细胞, PBS 缓冲液冲洗后, 用无胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 24 h, 制成 1×10^5 个/ml 细胞悬液。取 200 μ l 细胞悬液放置在铺好 Matrigel 胶(美国 Corning 公司)的 Transwell 小室内, 再将小室放置到含 100 ml/L 胎牛血清培养液的 24 孔板中继续培养 24 h。取出小室, 用 PBS 淋洗, 并利用棉签轻柔的擦去上层未穿膜的细胞和基质胶, 用冰甲醛对滤膜进行固定后, 结晶紫染色 30 min, 倒置显微镜观察、拍照。

1.8 裸鼠移植瘤试验 将 40 只裸鼠[5 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠, 体重 (16.37 ± 1.07) g, 购自北京阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0009]]随机等分为 Control 与 mimics 组, 每组 20 只。参考文献[6]报道方法建立移植瘤模型。收集对数生长期 C6 细胞和转染 miR-103a-3p mimics 质粒的 C6 细胞, 注射于裸鼠右腋下皮下。每 5 d 随机处死 3 只裸鼠, 30 d 时处死所有裸鼠, 分离肿瘤并测定肿瘤质量及体积, 并取肿瘤组织进行免疫组化染色观察 Ki-67、Vimentin 表达, RT-PCR 检测 miR-103a-3p、PDK4 mRNA 水平。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件分析; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 q 检验; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-103a-3p 过表达靶向负调控 C6 细胞 PDK4 表达 mimics 组 C6 细胞 PDK4 mRNA 及蛋白表达水平显著低于 control 组 ($P < 0.05$), mimics+PDK4 组细胞 PDK4 mRNA 及蛋白表达水平显著高于 mimics 组 ($P < 0.05$)。共转染 miR-103a-3p mimics 和 PDK4 wt 细胞荧光素酶活性显著低于共转染 mimics-NC 和

PDK4 wt 细胞 ($P < 0.05$), 而共转染 miR-103a-3p mimics 和 PDK4 mut 细胞荧光素酶活性和共转染 mimic NC 和 PDK4 mut 细胞无统计学差异 ($P > 0.05$)。见图 1。

2.2 miR-103a-3p 过表达靶向负调控 PDK4 表达抑制 C6 细胞增殖 mimics 组 C6 细胞增殖活性、Ki-67 和 PCNA mRNA 水平均明显低于 control 组 ($P < 0.05$), PDK4 组 C6 细胞增殖活性、Ki-67 和 PCNA mRNA 水平均明显高于 control 组 ($P < 0.05$), mimics+PDK4 组 C6 细胞增殖活性、Ki-67 和 PCNA mRNA 水平均明显低于 mimics 组 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 miR-103a-3p 过表达靶向负调控 PDK4 表达促进 C6 细胞凋亡 mimics 组 C6 细胞凋亡率显著高于 control 组 ($P < 0.05$), PDK4 组 C6 细胞凋亡率明显低于 control 组 ($P < 0.05$), mimics+PDK4 组 C6 细胞凋亡率显著低于 mimics 组 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 miR-103a-3p 过表达靶向负调控 PDK4 表达抑制 C6 细胞侵袭 mimics 组 C6 细胞侵袭能力、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平均明显低于 control 组 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平明显高于 control 组 ($P < 0.05$); PDK4 组 C6 细胞侵袭能力、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平均明显高于 control 组 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平明显低于 control 组 ($P < 0.05$); mimics+PDK4 组 C6 细胞侵袭能力、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平均明显高于 mimics 组 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平明显低于 mimics 组 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 miR-103a-3p 过表达靶向负调控 PDK4 表达抑制 C6 细胞裸鼠体内移植瘤生长 mimics 组移植瘤重量、体积、PDK4 mRNA 水平、Ki-67 和 Vimentin 表达阳性率均明显低于 control 组 ($P < 0.05$), miR-103a-3p 水平显著高于 control 组 ($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

miR-103a-3p 属于 miR-103a 前体 3' 端产物, 在神经胶质瘤及神经胶质瘤干细胞中呈低表达, 可下调胚胎前脑锌指蛋白 1/细胞分裂周期磷酸酶 24A 途径, 抑制神经胶质瘤干细胞恶性生物学行为, 并促进其凋亡^[7]。本研究发现, 鼠源性胶质瘤 C6 细胞过表达 miR-103a-3p 后, 细胞 PDK4 mRNA 表达水平及蛋白表达水平均显著降低, 进一步双荧光素酶报告实验证实 miR-103a-3p 与 PDK4 的靶向负调控关系。

本研究结果还显示, 过表达 miR-103a-3p 后, C6 细胞增殖活性显著降低, C6 细胞 Ki67、PCNA 的

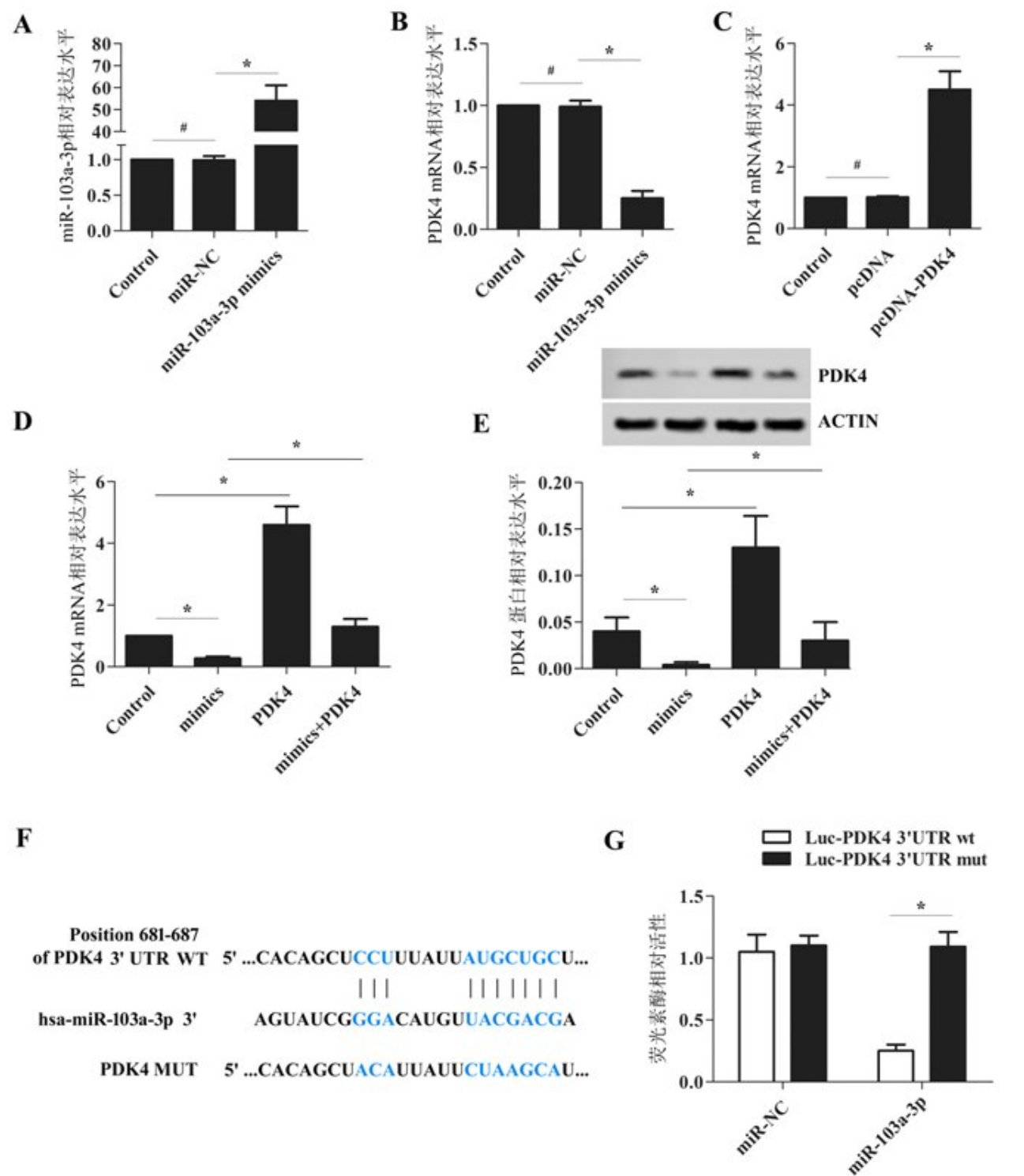


图 1 过表达 miR-103a-3p 靶向负调控体外培养 C6 胶质瘤细胞 PDK4 表达

A. 转染 miR-103a-3p mimics 后 C6 细胞 miR-103a-3p 相对表达水平变化; B. 转染 miR-103a-3p mimics 后 C6 细胞 PDK4 相对表达水平变化; C. 转染 pcDNA-PDK4 后 C6 细胞 PDK4 相对表达水平变化; D. 共同转染 miR-103a-3p mimics、pcDNA-PDK4 后 PDK4 相对表达水平变化; E. 共同转染 miR-103a-3p mimics、pcDNA-PDK4 后 PDK4 蛋白表达水平变化; F. 靶向基因序列; G. 双荧光素酶活性; * $P<0.05$, # $P>0.05$

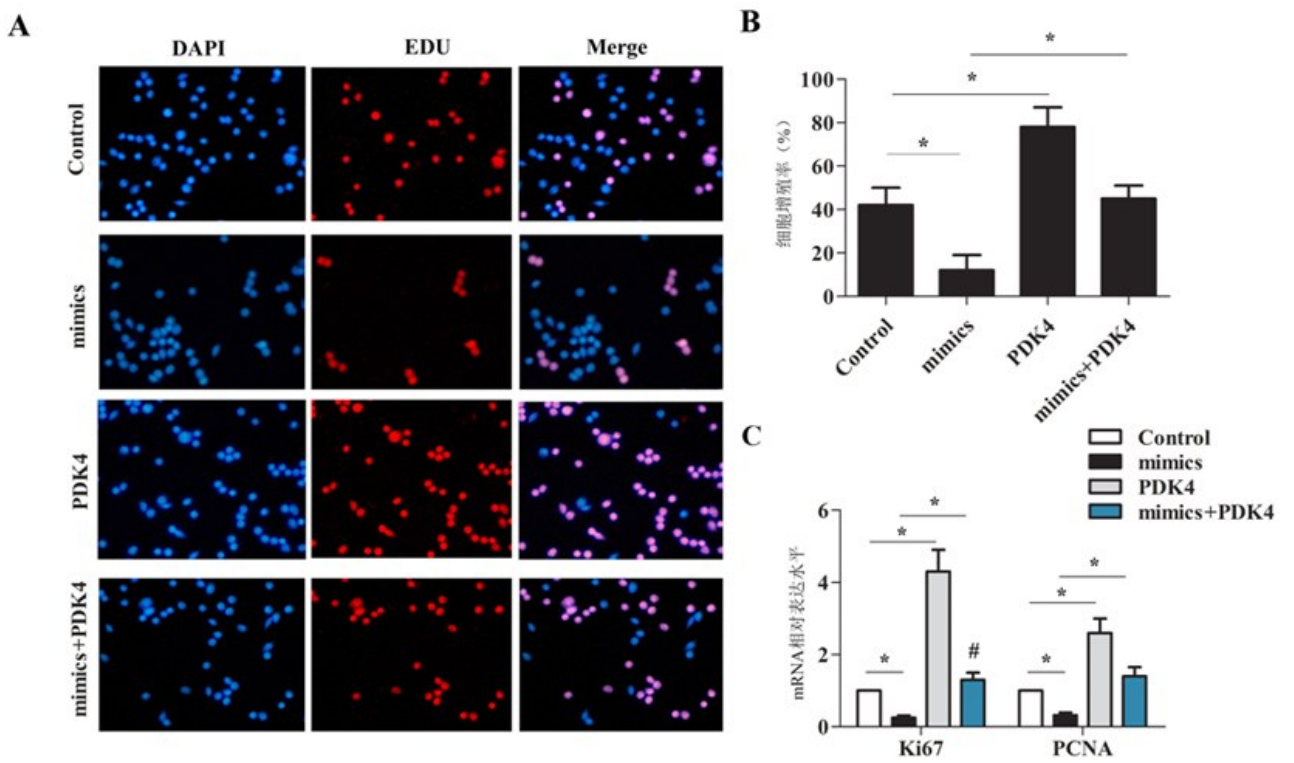


图2 过表达 miR-103a-3p 靶向负调控 PDK4 抑制 C6 胶质瘤细胞的增殖活性
A. C6 细胞 EDU 染色结果; B. C6 细胞增殖活性; C. 细胞 C6 细胞 Ki67、PCNA mRNA 表达水平; * $P < 0.05$

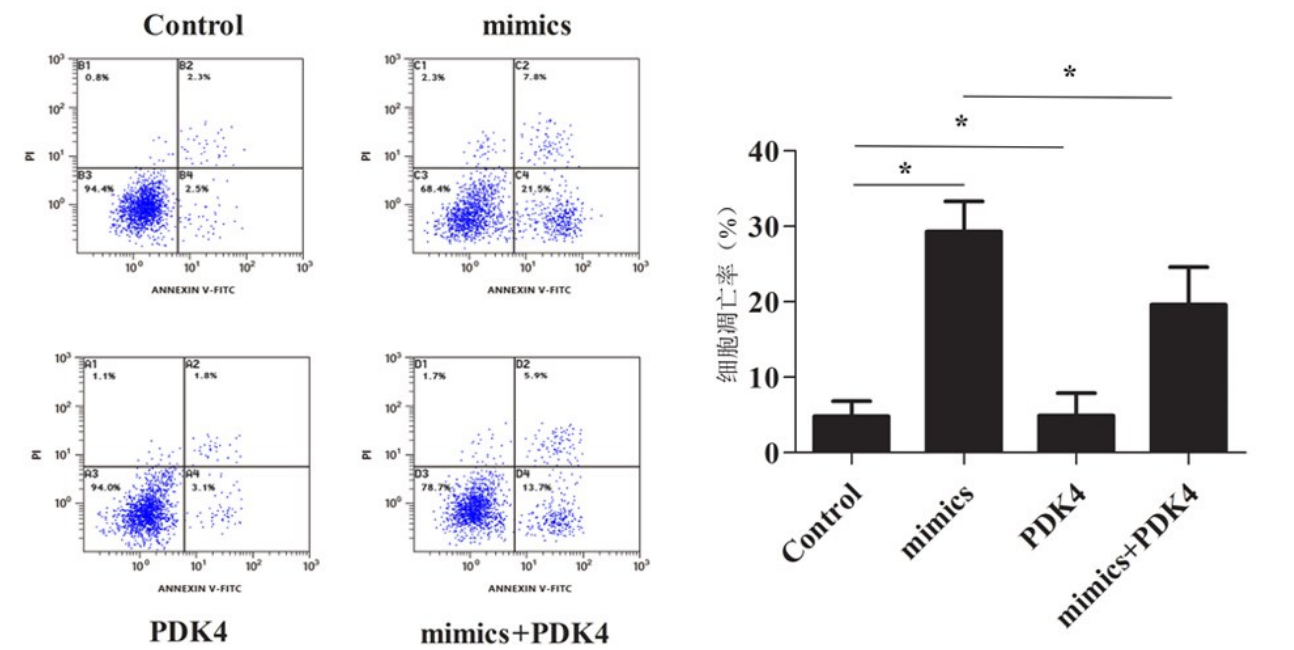


图3 过表达 miR-103a-3p 靶向负调控 PDK4 促进 C6 胶质瘤细胞凋亡
* $P < 0.05$

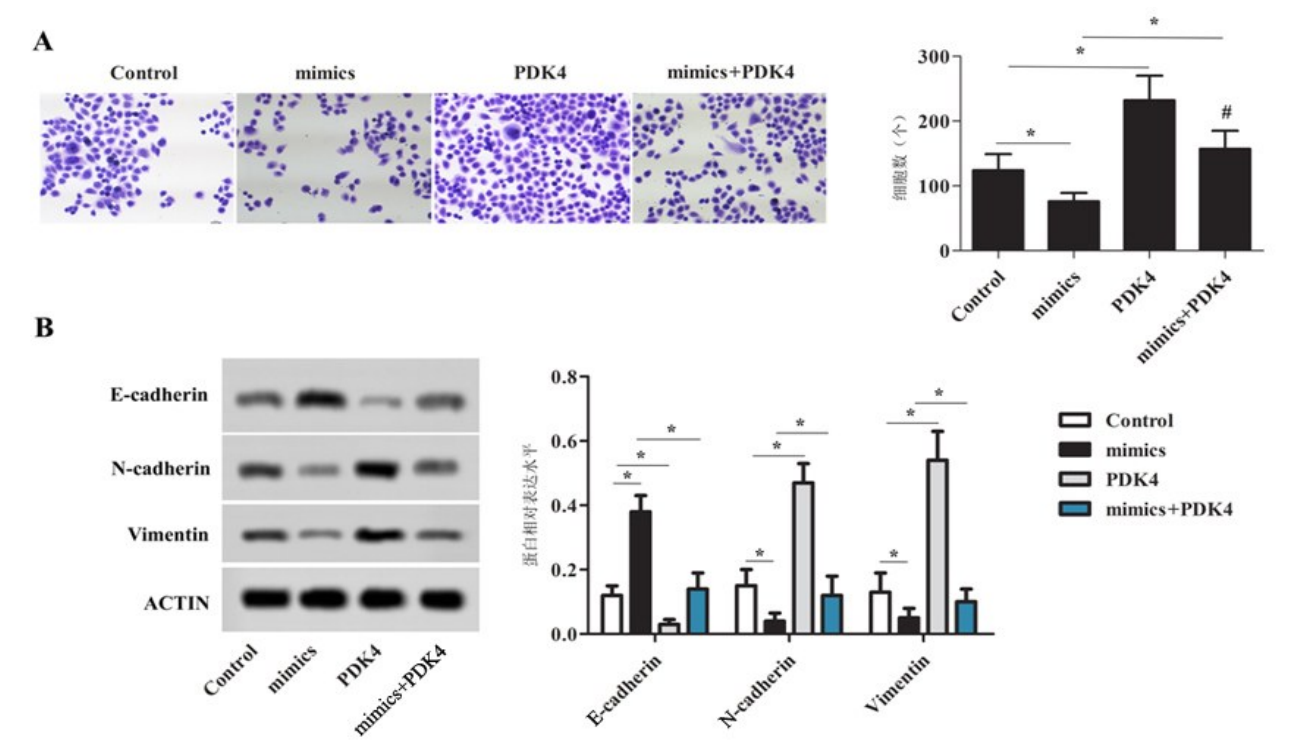


图4 过表达 miR-103a-3p 靶向负调控 PDK4 抑制 C6 细胞侵袭及上皮-间质转化标志蛋白的表达
* $P<0.05$

mRNA 相对表达水平均显著降低;而共同过表达 miR-103a-3p 和 PDK4 后,C6 细胞 Ki67、PCNA 的 mRNA 相对表达水平明显升高;另外,过表达 miR-103a-3p 后,C6 细胞凋亡细胞数明显升高,而共同过表达 miR-103a-3p 和 PDK4 后,C6 细胞凋亡数量明显减少。这可能与 Warburg 效应有关。在氧气足够的情况下,肿瘤细胞依旧通过糖酵解来获取能量,这种代谢的重新编程被称为 Warburg 效应^[8]。PDK4 为细胞糖酵解过程的关键激酶^[9],抑制其活性,可抑制肿瘤细胞糖酵解过程,导致肿瘤细胞能量供应障碍,从而抑制 C6 细胞增殖,促进其凋亡。

胶质瘤具有高侵袭性的特点。EMT 与恶性肿瘤细胞侵袭、转移具有密切关系^[10],因此通过分析 EMT 过程来了解 miR-103a-3p 的调控机制有积极意义。本研究结果显示,过表达 miR-103a-3p 后,C6 细胞侵袭能力及 EMT 指标蛋白表达水平显著升高,表明 miR-103a-3p 负调控 PDK4 抑制 C6 细胞的 EMT 进程,从而降低其侵袭能力。线粒体呼吸对肿瘤细胞的迁移及侵袭起着决定性的作用,虽然肿瘤细胞在 Warburg 效应下偏向于糖酵解获取能量,但当 PDK4 这一糖酵解关键激酶下调后,会改变丙酮酸进入三羧酸循环的过程,而这一过程是 EMT 的关键步骤^[11]。因此,我们推测 miR-103a-3p 负调控 PDK4 后,

使线粒体呼吸代谢过程发生改变,调控 EMT 进程关键蛋白表达,进而抑制 C6 细胞的侵袭能力。

本研究进行了裸鼠异体移植瘤实验,发现过表达 miR-103a-3p 后,移植瘤的体积及质量均明显低于对照组,Ki67、Vimentin 阳性表达率也显著降低,与体外实验一致,表明过表达 miR-103a-3p 能够一直移植瘤生长。这与 Chen 等^[12]研究一致。

综上所述,过表达 miR-103a-3p 通过靶向抑制 PDK4 表达,一方面抑制胶质瘤细胞增殖、促进胶质瘤细胞凋亡,从而抑制胶质瘤生长;另一方抑制胶质瘤 EMT 过程,从而抑制胶质瘤细胞侵袭。

【参考文献】

[1] Strojnik T, Duh D, Lah TT. Prevalence of neurotropic viruses in malignant glioma and their onco- modulatory potential [J]. *Vivo*, 2017, 31(2): 221-230.

[2] Foreman PM, Friedman GK, Cassady KA, *et al.* Oncolytic virotherapy for the treatment of malignant glioma [J]. *Neurotherapeutics*, 2017, 14(2): 333-344.

[3] Bignotti E, Calza S, Tassi RA, *et al.* Identification of stably expressed reference small non-coding RNAs for microRNA quantification in high- grade serous ovarian carcinoma

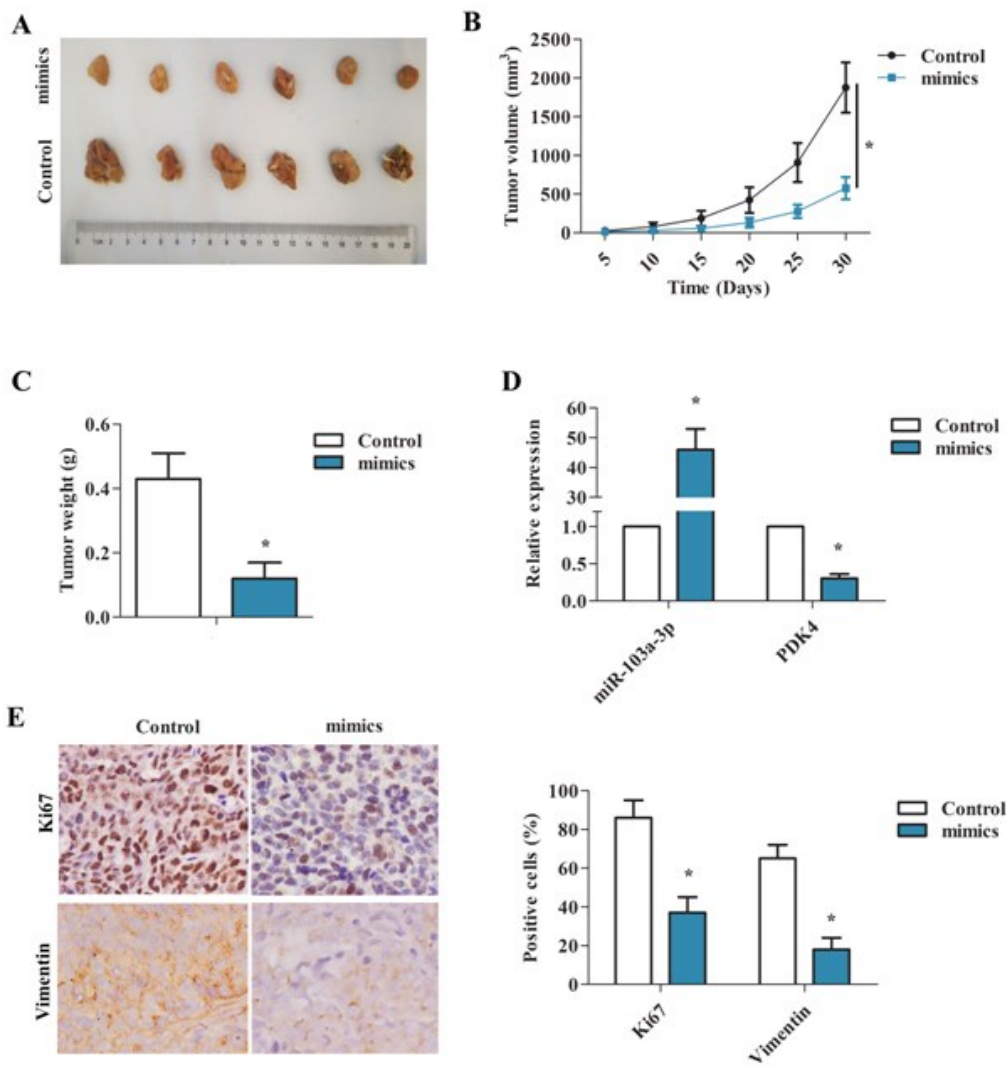


图 5 过表达 miR-103a-3p 抑制裸鼠体内移植瘤生长
A. 移植瘤肉眼观; B. 移植瘤体积的变化; C. 裸鼠注射 C6 细胞 30 d 移植瘤重量; D. 移植瘤组织 miR-103a-3p、PDK4 mRNA 相对表达水平; E. 移植瘤组织 Ki67、Vimentin 免疫组化染色及量化分析结果; * $P < 0.05$

tissues [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(12): 2341-2348.

[4] Wang J, Qian Y, Gao M. Overexpression of PDK4 is associated with cell proliferation, drug resistance and poor prognosis in ovarian cancer [J]. Cancer Manag Res, 2018, 11: 251-262.

[5] 赵鸣雷,甄栋钦,黄健发,等. EdU 标记兔外周血单个核细胞的体外增殖[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(9): 1432-1438.

[6] 张红波,谈胤求,张世忠,等. 白藜芦醇对人恶性脑胶质瘤模型裸鼠体内肿瘤生长的影响及其机制[J]. 中华解剖与临床杂志, 2019, 24(1): 71-75.

[7] Yu M, Xue Y, Zheng J, *et al.* Linc00152 promotes malignant progression of glioma stem cells by regulating miR-103a-3p/FEZF1/CDC25A pathway [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 110.

[8] Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt A): 156-164.

[9] Woolbright BL, Choudhary D, Mikhalyuk A, *et al.* The role of pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK4) in bladder cancer and chemoresistance [J]. Mol Cancer Ther, 2018, 17(9): 2004-2012.

[10] Bozhkova DM, Poryazova- Markova EG. The epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin and tumor progression in ovarian serous tumors [J]. Folia Med (Plovdiv), 2019, 61(2): 296-302.

[11] Sun S, Liu J, Zhao M, *et al.* Loss of the novel mitochondrial protein FAM210B promotes metastasis via PDK4-dependent metabolic reprogramming [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(6): e2870.

[12] Chen LP, Zhang NN, Ren XQ, *et al.* miR-103/miR-195/miR-15b regulate SALL4 and inhibit proliferation and migration in glioma [J]. Molecules, 2018, 23(11): 2938.

(2020-09-12 收稿, 2021-05-14 修回)