

miR-181d-5p 对人结肠癌细胞凋亡的影响及机制*

柯东平¹, 朱金祥¹, 毛俊倩¹, 马佳², 李建辉², 马龙安^{1**}

(1. 陕西省肿瘤医院, 陕西 西安 710061; 2. 陕西省人民医院, 陕西 西安 710068)

[摘要] 目的: 探讨微小 RNA-181d-5p (microRNA miR-181d-5p) 对人结肠癌细胞凋亡的影响及机制。方法: 采用 miR-181d-5p 抑制物转染人结肠癌细胞系 HCT116 细胞, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, Real-time PCR 和 Western blot 技术检测细胞 miR-181d-5p、第 10 染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因 (PTEN)、黏附斑激酶 (FAK)、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、半胱天冬蛋白酶 3 (Caspase-3) mRNA 和 PTEN、FAK、p-FAK、Bcl-2、激活型 Caspase-3 (cleaved Caspase-3) 蛋白表达, Targetscan 软件在线预测及双荧光素酶实验分析 miR-181d-5p 和 PTEN 的调控关系。结果: 与阴性对照组比较, miR-181d-5p 抑制物组 miR-181d-5p mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$), 凋亡细胞明显增加 ($P < 0.01$), PTEN mRNA 表达水平明显上调 ($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 表达水平明显下调 ($P < 0.01$), PTEN、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), p-FAK、Bcl-2 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.01$), 其余各组之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); Targetscan 软件预测显示 PTEN 基因 3'UTR 含有 miR-181d-5p 的结合位点, 双荧光素酶结果显示与突变型 PTEN 3'UTR 联合 miR-181d-5p 模拟物组相比, 野生型 PTEN 3'UTR 联合 miR-181d-5p 模拟物组荧光素酶活性明显降低, 差异有高度统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: miR-181d-5p 可通过靶向调控 PTEN 抑制人结肠癌细胞凋亡, 可成为结肠癌临床分子靶向治疗的潜在靶点。

[关键词] 结肠肿瘤; 细胞凋亡; 微小 RNA-181d-5p; 黏附斑激酶

[中图分类号] R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)07-0814-07

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.07.014

Effect and Mechanism of MicroRNA-181d-5p on Apoptosis of Human Colon Cancer Cells

KE Dongping¹, ZHU Jinxiang¹, MAO Junqian¹, MA Jia², LI Jianhui², MA Longan¹

(1. Shaanxi Provincial Cancer Hospital, Xi'an 710061, Shaanxi, China; 2. Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of miR-181d-5p on apoptosis of human colon cancer cells. **Methods:** Human colon cancer cell line HCT116 was transfected with miR-181d-5p inhibitor. Apoptosis was detected by flow cytometry. Real-time PCR and Western blot were adopted to detect the protein expression of miR-181d-5p, PTEN, FAK, Bcl-2, Caspase-3 mRNA and PTEN, FAK, p-FAK, Bcl-2, cleaved Caspase-3 proteins. Targetscan analysis software online prediction and dual luciferase reporter gene system was used to analyze the regulatory relationship of miR-181d-5p and PTEN. **Results:** Compared with the negative control group, the expression of miR-181d-5p mRNA was down-regulated in the miR-181d-5p inhibitor group ($P < 0.01$), the apoptotic cells were significantly increased ($P < 0.01$), and the PTEN mRNA expression level was significantly up-regulated ($P < 0.01$); Bcl-2 mRNA expression level was significantly down-regulated ($P < 0.01$), PTEN and cleaved Caspase-3 protein expression levels were significantly increased ($P < 0.01$), p-FAK, Bcl-2 protein expression levels were significantly down-regulated ($P < 0.01$); the differences between the groups were not statistically significant ($P > 0.05$). Targetscan software predicted that the

*[基金项目] 陕西省重点科技创新项目 (2014KCT-24)

** 通信作者 E-mail: MLA317@163.com

网络出版时间: 2019-07-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190718.0040.014.html>

3'UTR of PTEN gene contained the binding site of *miR-181d-5p*, and the dual luciferase results showed that compared with the mutant PTEN 3'UTR + *miR-181d-5p* mimic group, the luciferase activity of the wild PTEN 3'UTR + *miR-181d-5p* mimic group was significantly lower, difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** *miR-181d-5p* may inhibit the apoptosis of human colon cancer cells by targeting PTEN, which could be the potential target of clinical molecular targeted therapy for treating colon cancer.

[**Key words**] colon cancer; apoptosis; *miR-181d-5p*; focal adhesion kinase

结肠癌好发于乙状结肠与直肠交界处,是最常见的胃肠恶性肿瘤之一,致死率极高^[1]。对结肠癌的治疗主要以手术、化疗和放疗综合治疗为主,尽管近年来诊治水平有了一定的提高,但结肠癌患者的总生存率依然很低,且预后较差,对患者的健康造成了严重的威胁^[2]。因此,加强结肠癌机制的研究,寻找新的治疗靶点,对结肠癌的治疗具有重要意义。微小 RNA (MicroRNA, miRNA) 是一类小分子非编码 RNA,主要通过与其靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区相对应的靶序列互补结合,促进 mRNA 降解,发挥基因表达调控作用^[3]。作为 miRNA 家族中的一员, *miR-181d-5p* 能够促进细胞生长和增殖^[4-5]。已有研究表明, *miR-181d-5p* 在结肠癌中呈高表达,提示 *miR-181d-5p* 在结肠癌的发生发展中具有重要作用,但是关于其在结肠癌中的作用机制尚不清楚^[6]。因此,本研究拟在人结肠癌细胞系 HCT116 细胞中沉默 *miR-181d-5p*,探究 *miR-181d-5p* 对结肠癌细胞凋亡的影响及相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与主要试剂 结肠癌细胞系 HCT116 细胞购自中国科学院上海细胞库,第 10 染色体同源缺失性磷酸酶 - 张力蛋白基因 (phosphatase and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN) 抗体、黏附斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 抗体、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma, Bcl-2) 抗体、激活型半胱天冬蛋白酶 3 (cleaved Caspase-3) 抗体、 β -actin 抗体、羊抗兔 IgG-HRP 抗体、细胞凋亡检测试剂盒、全蛋白提取试剂盒购自沈阳万类公司, p-FAK 抗体购自中国 CST, 荧光素酶检测试剂盒购自中国凯基公司, 胎牛血清购自以色列 BI 公司, RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司, ECL 发光液、胰酶购自中国碧云天公司, PBS 购自中国双螺旋公司, 脂质体 2 000 购自美国 Invitro-

gen 公司, 荧光染料购自中国索莱宝公司, TRIpure 总 RNA 提取试剂、反转录酶购自中国百泰克公司, 脱脂奶粉购自中国伊利公司, PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。

1.1.2 仪器 荧光定量 PCR 仪 (型号 Exicycler 96) 购自韩国 BIONEER 公司, CO₂ 培养箱 (型号 HF-90) 购自中国上海力申公司, 超速冷冻离心机 (型号 H-2050R) 购自中国湖南湘仪公司, 流式细胞仪 (型号 NovoCyte) 购自美国 Aceabio 公司, 多功能酶标仪 (型号 M200Pro) 购自瑞士 TECAN 公司, 电泳仪 (型号 DYY-7C)、转移槽 (型号 DYCZ-40D)、双垂直蛋白电泳仪 (型号 DYCZ-24DN)、凝胶成像系统 (型号 WD-9413B) 购自中国北京六一公司, 电热恒温培养箱 (型号 DH36001B) 购自中国天津泰斯特公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人结肠癌细胞系 HCT116 细胞采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱内培养。

1.2.2 细胞转染 HCT116 细胞培养至密度为 70% 左右, 采用 0.25% 胰酶消化细胞, 1 mL 完全培养基重悬细胞并计数; 将细胞分为对照组、*miR-181d-5p* 抑制物阴性对照组和 *miR-181d-5p* 抑制物组, 分别接种于 6 孔板, 每组 3 个复孔, 置于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱内培养 24 h 后, 对照组正常培养, *miR-181d-5p* 抑制物阴性对照组和 *miR-181d-5p* 抑制物组采用脂质体 2 000 以 100 pmol/L *miR-181d-5p* 抑制物阴性对照或 *miR-181d-5p* 抑制物转染细胞, 于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱内培养 6 h 后, 更换完全培养基继续培养, 48 h 后实时荧光定量 PCR 技术验证转染效率, 进行后续实验。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞转染 48 h 后, 收集各组细胞, 310 r/min 离心 5 min 后, 吸弃上清液, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤细胞, 重复上述离心过程, 残留约 50 μ L 的 PBS。每管细胞样品中加入 500 μ L 结合缓冲液

重悬细胞,继续加入 5 μL 异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V 混匀,然后加入 10 μL 碘化丙啶混匀,室温避光孵育 15 min,流式细胞仪检测凋亡细胞所占比例。

1.2.4 Real-time PCR 检测细胞 *miR-181d-5p*、*PTEN*、*FAK*、*Bcl-2*、*Caspase-3* mRNA 的表达 细胞转染 48 h 后,收集各组细胞,采用 TRIpure 总 RNA 抽提试剂提取样本总 RNA,并通过反转录 PCR 合

成 cDNA 样本。根据人相应基因序列,设计相应引物。以 cDNA 产物作为模板,采用 Real-time PCR 检测 *miR-181d-5p*、*PTEN*、*FAK*、*Bcl-2*、*Caspase-3* mRNA 的表达。反应条件:5 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行数据分析细胞 *miR-181d-5p*、*PTEN*、*FAK*、*Bcl-2*、*Caspase-3* mRNA 的表达。各基因引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Tab.1 Real-time PCR primer sequence

引物名称	序列(5'-3')	引物长度(bp)	产物长度(bp)
<i>miR-181d-5p</i>			
上游引物	AACATTCATTGTTGTCGGTGG	21	75
下游引物	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC	20	
<i>U6</i>			
上游引物	GCTTCGGCAGCACATATACT	20	134
上游引物	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC	20	
<i>PTEN</i>			
上游引物	GACCATAACCCACCACAGC	19	123
下游引物	ACCAGTTCGTCCCTTTCC	18	
<i>FAK</i>			
上游引物	TCCCTATGGTGAAGGAAGTCG	21	114
下游引物	GCTTCTGTGCCATCTCAATCT	21	
<i>Bcl-2</i>			
上游引物	CTTTGAGTTCGGTGGGGTCAT	21	156
下游引物	TACAGTTCACAAAGGCATCC	21	
<i>Caspase-3</i>			
上游引物	TGGTTCATCCAGTCGCTTTG	20	101
下游引物	AATTCTGTTGCCACCTTTCC	20	
<i>β-actin</i>			
上游引物	CACTGTGCCCATCTACGAGG	20	155
下游引物	TAATGTCACGCACGATTCC	20	

1.2.5 Western blot 检测细胞中 *PTEN*、*FAK*、*p-FAK*、*Bcl-2*、cleaved *Caspase-3* 蛋白的表达 细胞转染 48 h 后,收集各组细胞,裂解液裂解,冰上静置 5 min,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白样本,进行 SDS-PAGE 电泳,然后转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉溶液封闭,分别加入 *PTEN*、*FAK*、*p-FAK*、*Bcl-2*、cleaved *Caspase-3* 一抗 4 ℃ 孵育过夜,HRP 标记二抗 37 ℃ 孵育 45 min。ECL 发光显色,扫描胶片后采用凝胶图象处理系统分析条带光密度值,以 β -actin 为内参计算蛋白相对表达情况。

1.2.6 生物信息学预测及双荧光素酶报告基因检测 *miR-181d-5p* 和 *PTEN* 的调控关系 根据 *PTEN* 基因 3'UTR 序列信息,采用 Targetscan 分析软件在线预测 *PTEN* 基因 3'UTR 是否含有 *miR-181d-5p* 的结合位点。构建含 *PTEN* 基因 3'UTR 区荧光素酶报告载体(野生型 *PTEN*)及其突变型

载体(mut-*PTEN*),按照双荧光素酶检测试剂盒说明书进行操作。将构建完成的载体与 *miR-181d-5p* 模拟物或 *miR-181d-5p* 模拟物阴性对照共转染至 293T 细胞,即突变型 *PTEN*3'UTR 联合 *miR-181d-5p* 模拟物组、野生型 *PTEN*3'UTR 联合 *miR-181d-5p* 模拟物组、突变型 *PTEN*3'UTR 联合 *miR-181d-5p* 模拟物阴性对照组、野生型 *PTEN*3'UTR 联合 *miR-181d-5p* 模拟物阴性对照组;48 h 后,裂解细胞,检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性,以萤火虫荧光素的强度除以海肾荧光素的强度进行均一化处理,并以野生型 *PTEN*3'UTR 联合 *miR-181d-5p* 模拟物阴性对照组为基准,计算各组荧光素酶的相对活性。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检

验分析组间差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-181d-5p 沉默诱导 HCT116 细胞凋亡

与阴性对照组相比,miR-181d-5p 抑制物组 *miR-181d-5p* mRNA 表达显著下调,差异有高度统计学意义 ($P < 0.01$); 阴性对照组 *miR-181d-5p* mRNA 表达与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。流式细胞术结果显示,与阴性对照组相比,miR-181d-5p 抑制物组凋亡细胞明显增加,差异有高度统计学意义 ($P < 0.01$); 与对照组相比,阴性对照组凋亡细胞差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2、图 2。

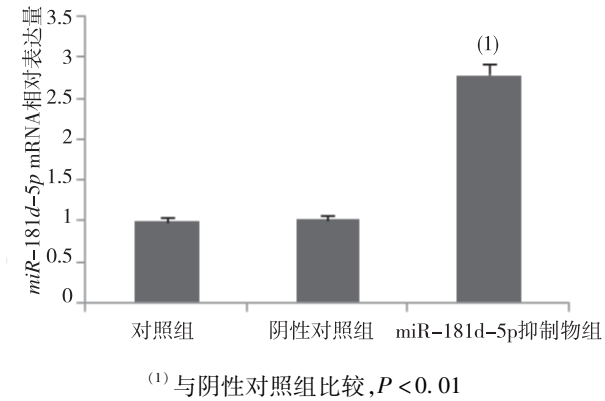
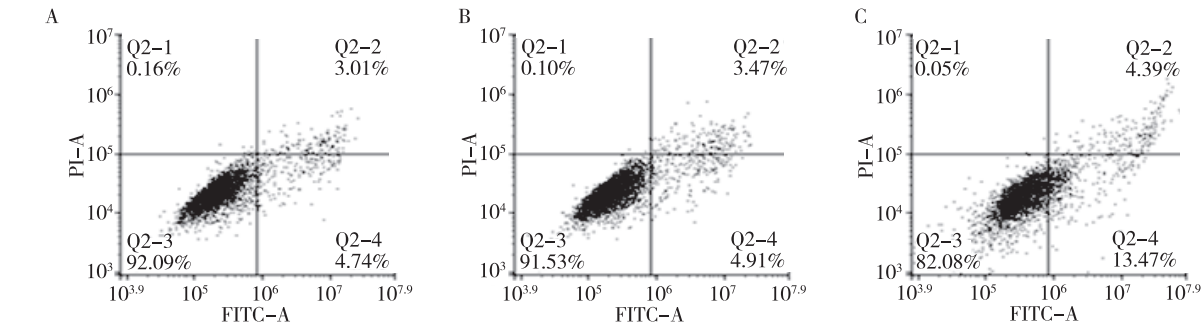


图 1 转染 miR-181d-5p 抑制物后 HCT116 细胞中 *miR-181d-5p* 的表达

Fig. 1 The expression of *miR-181d-5p* in HCT116 cells transfected with *miR-181d-5p* inhibitor



注: A 为对照组, B 为阴性对照组, C 为 miR-181d-5p 抑制物组

图 2 各组 CT116 细胞凋亡情况

Fig. 2 Cell apoptosis in each group

下调,差异均有高度统计学意义 ($P < 0.01$), 但 FAK 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

2.4 MiR-181d-5p 与 PTEN 3'UTR 特异性结合

采用 Targetscan 分析软件在线预测显示,

表 2 *MiR-181d-5p* 沉默对 HCT116 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of *miR-181d-5p* silencing on apoptosis of HCT116 cells

分组	n	HCT116 细胞凋亡率 (%)
对照组	3	8.03 ± 0.34
阴性对照组	3	8.16 ± 0.28
miR-181d-5p 抑制物组	3	18.14 ± 0.71 ⁽¹⁾

(1) 与阴性对照组比较, $P < 0.01$

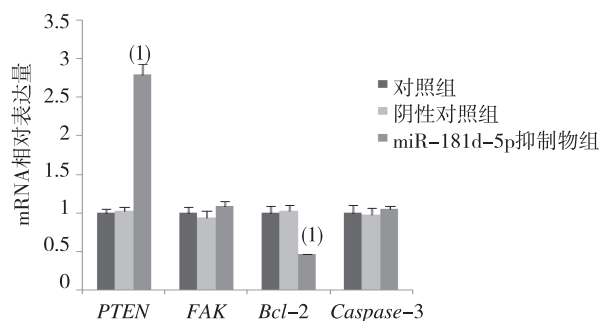
2.2 MiR-181d-5p 沉默对 PTEN、FAK、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达的影响

Real-time PCR 检测 *PTEN*、*FAK*、*Bcl-2* 和 *Caspase-3* mRNA 的表达,结果显示,与对照组相比,阴性对照组 *PTEN*、*FAK*、*Bcl-2*、*Caspase-3* mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与阴性对照组相比,miR-181d-5p 抑制物组, *PTEN* mRNA 表达水平明显上调, *Bcl-2* mRNA 表达水平明显下调,差异均有高度统计学意义 ($P < 0.01$), 但 *FAK* 和 *Caspase-3* mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

2.3 MiR-181d-5p 沉默对 PTEN、FAK、p-FAK、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

与对照组相比,阴性对照组 *PTEN*、*FAK*、p-*FAK*、*Bcl-2*、cleaved *Caspase-3* 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与阴性对照组相比,miR-181d-5p 抑制物组 *PTEN*、cleaved *Caspase-3* 蛋白表达水平明显升高, p-*FAK*、*Bcl-2* 蛋白表达水平显著

PTEN 基因 3'UTR 含有 *miR-181d-5p* 的结合位点; 双荧光素酶报告基因分析系统结果显示,与突变型 *PTEN* 3'UTR 联合 *miR-181d-5p* 模拟物组相比,野生型 *PTEN* 3'UTR 联合 *miR-181d-5p* 模拟物组荧光素酶活性显著降低,差异有高度统计学意义 (P



⁽¹⁾与阴性对照组比较, $P < 0.01$

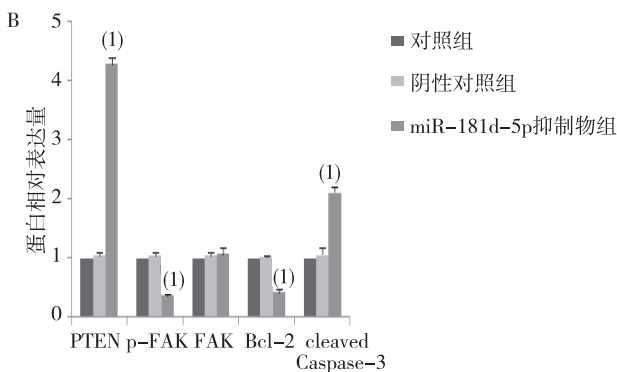
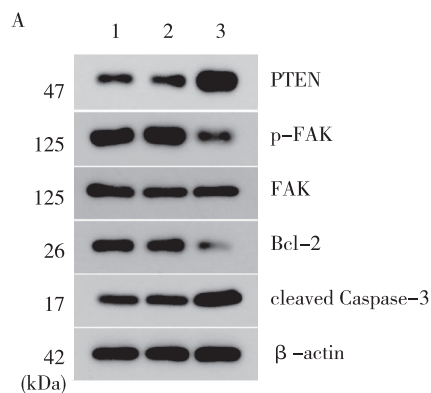
图3 *MiR-181d-5p* 沉默对 *PTEN*、*FAK*、*Bcl-2*、*Caspase-3* mRNA 表达的影响

Fig.3 Effect of *miR-181d-5p* silencing on the expression of *PTEN*, *FAK*, *Bcl-2* and *Caspase-3* mRNA

< 0.01),其余3组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图5和图6。

3 讨论

目前,国内外研究认为结肠癌主要是由环境、饮食以及生活方式与遗传因素协同作用的结果,但具体的发病机制尚不清楚^[7-8]。随着分子靶向治疗研究的深入,探讨影响结肠癌细胞凋亡的关键分子及其可能的机制将有助于后续治疗手段的开发^[9]。研究显示,miRNA作为非编码小分子RNA,在调控肿瘤的发生和发展中具有重要作用^[10],其中,miRNA-181是一个进化中极其保守的明星分子,在控制细胞生长、凋亡及分化等生理病理过程



注:A为Western blot检测PTEN、FAK、Bcl-2、cleaved Caspase-3蛋白表达,1为对照组,2为阴性对照组,3为miR-181d-5p抑制物组;B为凝胶图象处理系统分析条带光密度值,与阴性对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.01$

图4 *MiR-181d-5p* 沉默对 *PTEN*、*FAK*、*Bcl-2*、cleaved *Caspase-3* 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of *MiR-181d-5p* silencing on the expression of *PTEN*, *FAK*, *Bcl-2*, and cleaved *Caspase-3* proteins.

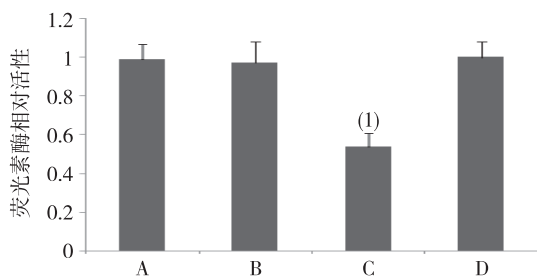


图5 *MiR-181d-5p* 在 *PTEN* 3'UTR 上结合位点预测

Fig.5 Predicted binding site of *miR-181d-5p* on *PTEN* 3'UTR

181d-5p on *PTEN* 3'UTR

中发挥重要调节作用^[11-12]。已有研究显示,miR-181a过表达能够促进骨肉瘤MG-63细胞生长、迁移和侵袭^[11];miR-181d-5p通过PI3K/AKT途径促进PC12细胞轴突生长^[4];在胰腺癌中,miR-181d-5p表达上调,敲除胰腺癌细胞中miR-181d-5p可上



注:A为,B为,C为,D为;⁽¹⁾与突变型PTEN 3'UTR + miR-181d-5p模拟物组比较, $P < 0.01$

图6 转染不同重组载体质粒荧光素酶活性

Fig.6 Transfection of different recombinant vector plasmid luciferase activity

调 *NKAIN2* 表达进而抑制细胞增殖、转移及移植瘤的生长^[5];在喉癌中,*miR-181d-5p* 表达明显升高,并通过靶向 *LCRG1* 增强 Hep2 细胞增殖、迁移和侵袭能力^[12];在结肠癌中,*miR-181d-5p* 表达上调,沉默 *miR-181d-5p* 可以在体内外抑制结肠癌细胞增殖、克隆形成和代谢,然而,其具体的作用机制尚不明确^[6]。因此,为明确 *miR-181d-5p* 对结肠癌细胞凋亡的作用,本研究采用 *miR-181d-5p* 抑制物转染结肠癌细胞 HCT116,抑制 *miR-181d-5p* 的表达,通过流式细胞术检测 *miR-181d-5p* 沉默对结肠癌细胞凋亡的影响。结果显示,*miR-181d-5p* 沉默后,结肠癌细胞的凋亡率明显提高。此外, Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡重要的调控因子,可通过抑制细胞凋亡,促进癌症的发展^[13];凋亡被定义为半胱天冬蛋白酶 (Caspase) 依赖的程序性死亡^[14],其中 Caspase-3 是 Caspase 家族中与凋亡关系最为密切的成员,正常情况下以无活性的酶原形式存在于细胞质,当细胞凋亡时才被激活为有活性的 Caspase-3,通过降解包括聚腺苷二磷酸核糖聚合酶在内的底物蛋白,不可逆地诱导细胞凋亡^[15]。本研究结果显示,沉默 *miR-181d-5p* 能够下调抗凋亡基因 *Bcl-2* mRNA 和蛋白表达,促进凋亡蛋白 Caspase-3 的活化,表明沉默 *miR-181d-5p* 能够促进结肠癌细胞凋亡。

有资料显示,miRNA 通过降解靶标基因 mRNA 或抑制其翻译,在调控个体发育、细胞凋亡、增殖、分化等生命活动中发挥重要作用^[16]。为探究 *miR-181d-5p* 影响细胞凋亡的机制,本研究首先利用生物学软件在线预测,显示 PTEN 可能是 *miR-181d-5p* 的靶基因,然后采用双荧光素酶实验检测结果显示,含有 PTEN 基因 3'UTR 区荧光素酶报告载体和 *miR-181d-5p* 模拟物共转染 293T 细胞后,荧光素酶活性显著降低,以上结果表明,*miR-181d-5p* 能够作用于 *PTEN* 的 3'UTR,*miR-181d-5p* 可能通过靶向作用 *PTEN* 3'UTR 区调控结肠癌细胞凋亡。*PTEN* 是一个具有双重特异性磷酸酶活性和酪氨酸酶活性的抑癌基因,控制与细胞增殖、周期、凋亡等一系列生理病理过程^[17]。*FAK* 是一种非受体酪氨酸激酶,定位于整合素构成的灶性粘附复合体上,具有多种功能^[18]。已有研究表明,*FAK* 为 *PTEN* 下游信号分子,*PTEN* 蛋白可通过调节 *FAK* 等信号分子的磷酸化水平影响癌细胞增殖、凋亡等情况^[19-20]。本研究结果显示,沉默 *miR-181d-5p* 能够促进 *PTEN* mRNA 和蛋白的表达,抑制 *FAK*

磷酸化,这一结果表明沉默 *miR-181d-5p* 通过 *PTEN-FAK* 途径促进了结肠癌细胞凋亡。

综上所述,本研究初步探讨了 *miR-181d-5p* 可通过靶向作用 *PTEN* 抑制结肠癌细胞凋亡,可能成为结肠癌临床分子靶向治疗的潜在靶点。

4 参考文献

- [1] 郑艺,刘杰麟,韩莹,等. 结肠癌组织中 BLM、RECQ4 的表达水平及临床意义[J]. 贵州医科大学学报, 2018, 43(10):1217-1220,1231.
- [2] WANG B, LU F Y, SHI R H, et al. MiR-26b regulates 5-FU-resistance in human colorectal cancer via down-regulation of Pgp[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(12): 2518-2527.
- [3] XU T, ZHANG K, SHI J, et al. MicroRNA-940 inhibits glioma progression by blocking mitochondrial folate metabolism through targeting of MTHFD2[J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(2):250-269.
- [4] SHEN L M, SONG Z W, HUA Y, et al. MiR-181d-5p promotes neurite outgrowth in PC12 Cells via PI3K/Akt pathway[J]. Cns Neuroscience & Therapeutics, 2017, 23(11):894.
- [5] ZHANG G, LIU D, LONG G, et al. Downregulation of microRNA-181d had suppressive effect on pancreatic cancer development through inverse regulation of KNAIN2[J]. Tumour Biology the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology & Medicine, 2017, 39(4):1-10.
- [6] GUO X, ZHU Y, HONG X, et al. MiR-181d and c-myc-mediated inhibition of CRY2 and FBXL3 reprograms metabolism in colorectal cancer[J]. Cell Death & Disease, 2017, 8(7):e2958.
- [7] BAROUDI O, BENAMMER-ELGAAIED A. Involvement of genetic factors and lifestyle on the occurrence of colorectal and gastric cancer[J]. Critical Reviews in Oncology, 2016, (107):72-81.
- [8] 宋涛,王铎,肖嘎. 卡培他滨联合奥沙利铂术前新辅助化疗对结肠癌的临床疗效[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(9):1107-1110.
- [9] 耿培亮. 纤维粘连蛋白 EDA 片段调控结肠癌 SW480 细胞增殖、凋亡和糖酵解及其机制研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2011.
- [10] ZHOU W, LI X, LIU F, et al. MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 in vitro [J]. ActaBiochimBiophys Sin (Shanghai), 2012,44(10):838-846.

- [11]臧晓方,李骏,王卫国,等. MiR-181a 靶向 RASSF1A 促进骨肉瘤细胞的生长和转移[J]. 中南大学学报(医学版), 2016, 41(8):789-795.
- [12]赵娟霞,龚勇,杨淑梅,等. MiR-181d 靶向 LCRG1 调控喉癌细胞 Hep2 增殖与迁移的机制[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(9):8-12.
- [13]SAUNDERS I T, MIR H, NEERAJ KAPUR N. et al. Emodin inhibits colon cancer by altering BCL-2 family proteins and cell survival pathways[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19(1):98.
- [14]SVERCHINSKY D V, NIKOTINA A D, KOMAROVA E Y. et al. Etoposide-induced apoptosis in cancer cells can bereinforced by an uncoupled link between Hsp70 and caspase-3[J]. Int J Mol Sci, 2018, 9(9):2519.
- [15]WU B, LIANG J. Pectolarigenin promotes functional recovery and inhibits apoptosis in rats following spinal cord injuries[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(5):3877-3882.
- [16]HUANG X, TANG F, WENG Z, et al. MiR-591 functions as tumor suppressor in breast cancer by targeting TCF4 and inhibits Hippo-YAP/TAZ signaling pathway [J]. Cancer Cell International, 2019, 19(1):108.
- [17]詹晓娟,戴益琛. 抑癌基因 PTEN 在大肠癌中的功能及机制[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(5):449-452.
- [18]LV P C, JIANG A Q, ZHANG W M, et al. FAK inhibitors in Cancer, a patent review[J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2017, 28(1):1.
- [19]WANG S, CHENG Z, YAGN X, et al. Effect of wild type PTEN gene on proliferation and invasion of multiple myeloma [J]. International Journal of Hematology, 2010, 92(1):83-94.
- [20]CAVAZZONI A, MONICAS S L, ALFIERI R, et al. Enhanced efficacy of AKT and FAK kinase combined inhibition in squamous cell lung carcinomas with stable reduction in PTEN[J]. Oncotarget, 2017, 8(32):53068-53083.

(2019-03-12 收稿,2019-06-23 修回)
中文编辑:严 征;英文编辑:赵 毅

(上接第 813 页)

- [11]邱伟芬,张昌娟,文良,等. 气相色谱-质谱联用结合 QuEChERS 法快速筛查大米中多种农药残留[J]. 食品科学, 2015,36(12):221-225.
- [12]李海飞,聂继云,徐国锋,等. QuEChERS 样品前处理方法联合在线 GPC/GC-MS 测定水果中 15 种三唑类农药残留量方法评估[J]. 分析测试学报, 2015,34(12):1331-1338.
- [13]HOU X, HAN M, DAI X, et al. A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2-3):1198-1205.
- [14]谢建军,陈捷,李菊,等. 改良 QuEChERS 法结合气相色谱串联质谱测定果蔬中 20 种杀菌剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2013,4(1):82-88.
- [15]PAREJA L, CESIO V, HEINZEN H, et al. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS[J]. Talanta, 2011, 83(5):1613-1622.
- [16]卢大胜,熊丽蓓,温忆敏,等. QuEChERS 前处理方法联合 GPC-GC/MS 在测定蔬菜水果农药残留中的应用[J]. 质谱学报, 2011,32(4):229-235.
- [17]GB/T 27404-2008. 实验室质量控制规范_食品理化检测[S]. 中华人民共和国国家标准.

(2019-03-07 收稿,2019-06-01 修回)
中文编辑:刘 平;英文编辑:冉海勇