

研究论文

MicroRNA-1调控人结肠癌细胞周期及其机制的研究

陈通克^{1#} 陈林华^{2#} 王 教² 王丽花^{2*}(温州医科大学实验动物中心, 温州 325000; ²温州医科大学眼视光学院, 温州 325027)

摘要 该研究通过阳离子脂质体介导的方法将microRNA-1(miR-1)转染入人结肠癌细胞HT-29和HCT 116, 使其过表达。应用MTS法、克隆形成实验、流式细胞术检测转染后细胞增殖及细胞周期的变化情况, 结果发现, miR-1能使HT-29和HCT 116细胞周期滞留在G₁期, 显著抑制细胞的增殖; 通过靶基因预测及荧光素酶分析法预测并确定*CCND1*(cyclin D1)和*CDK6*(cyclin dependent kinases 6)是miR-1作用的靶基因。采用Western blot法检测细胞内相关蛋白质表达水平, 结果发现, miR-1能下调HT-29和HCT 116中细胞周期相关蛋白CDK2、CDK4、p-Rb(retinoblastoma gene)、E2F1(E2F transcription factor 1)、p-Cdc2(cell division cycle 2)等蛋白质水平。通过人结肠癌裸鼠动物模型检测miR-1对结肠癌细胞体内成瘤能力的改变情况, 研究发现, miR-1能在体显著抑制人结肠癌细胞增殖能力。该研究表明, miR-1通过下调靶基因*cyclin D1*、*CDK6*的表达, 并影响细胞周期相关蛋白CDK2、CDK4的水平, 下调了决定细胞周期进程的关键蛋白Rb及Cdc2的磷酸化水平, 同时也降低了E2F1蛋白质水平, 使细胞周期滞留在G₁期, 从而抑制了细胞增殖。

关键词 microRNA-1; 人结肠癌; 增殖; 细胞周期

The Mechanism of MicroRNA-1 Regulating the Cell Cycle in Human Colon Cancer

Chen Tongke^{1#}, Chen Linhua^{2#}, Wang Jiao², Wang Lihua^{2*}¹Laboratory Animal Center, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China;²School of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China)

Abstract microRNA-1 was transfected into human colon cancer cell line HT-29 and HCT 116. The proliferation of HT-29 and HCT 116 cells was examined by MTS cell proliferation assay and colony formation assay. The cell cycle was analyzed by Flow Cytometry. The results showed that miR-1 could inhibit HT-29 and HCT 116 cells proliferation, colony formation, and induce G₁-phase cell cycle arrest, and suppress tumor growth in a xenograft mouse model. Furthermore, we identified *CCND1* (cyclin D1) and *CDK6* (cyclin dependent kinases 6) as the direct targets of miR-1 by dual-luciferase activity assay and Western blot. miR-1 also down-regulated the expression of CDK2, CDK4, phosphorylated-Rb (retinoblastoma gene), E2F1 (E2F transcription factor 1), phosphorylated-Cdc2 (cell division cycle 2) indirectly. Our findings suggested that miR-1 may function as a novel tumor suppressor in human colon cancer.

Keywords microRNA-1; human colon cancer; proliferation; cell cycle

收稿日期: 2016-09-26 接受日期: 2017-01-04

浙江省自然科学基金(批准号: LQ17H120009)和温州市科技计划项目(批准号: Y20130164、Y20130254)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-88067934, E-mail: wlh0369@aliyun.com

Received: September 26, 2016 Accepted: January 4, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LQ17H120009) and Wenzhou Science and Technology Planning Project (Grant No.Y20130164, Y20130254)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-577-88067934, E-mail: wlh0369@aliyun.com

网络出版时间: 2017-02-23 17:10:09 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170223.1710.006.html>

结肠癌和直肠癌常统称为肠癌。肠癌是指大肠黏膜上皮在环境或遗传等多种致癌因素作用下发生的恶性病变,预后不良,死亡率较高,因此是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,且在全球的发病率逐年递增^[1-2]。虽然近年来该肿瘤的诊断和治疗方法都有显著完善和提升,但是五年存活率仍为64.9%^[3-4]。

微RNAs(microRNAs, miRNAs)是一类长为18~25个核苷酸的非编码单链RNA,可与靶mRNA的3'UTR(3' untranslated regions)互补性结合,从而负调控靶基因的表达^[5]。通过对基因组上miRNAs的位点分析和一系列研究表明,miRNAs在个体发育、细胞增殖、分化和凋亡、血管形成、神经系统发育和肿瘤生成等过程中发挥着重要的作用^[5-12]。Calin等^[13]研究了186种可能与人类肿瘤有关的miRNAs,最终发现,这些miRNAs基因中有98种位于癌症相关的染色体区域或脆性位点上,一半以上的miRNAs基因与癌症相关区域和易感部位有关。大量的实验表明,miRNAs在肿瘤的生成、发展、预后过程中均发挥重要作用,研究其调控机制已成为热点。

Michael等^[14]发现,与正常结肠组织相比,结肠癌中的miR-143和miR-145表达明显下调。miR-143通过作用于靶基因*K-Ras*(KRAS proto-oncogene)和*IGF1R*(insulin-like growth factor 1 receptor),从而抑制结肠癌细胞的增殖,miR-145通过抑制靶基因*N-Ras*和*IRS1*(insulin receptor substrate 1)从而调控AKT(protein kinase B)/ERK(extracellular signal-regulated protein kinases)/HIF-1(hypoxia-inducible factors-1)/VEGF(vascular endothelial growth factor)信号通路,使结肠癌细胞增殖、迁移、侵袭以及血管生成能力受抑制^[15-18]。miR-18a*、miR-27b、miR-34a、miR-101和miR-126分别通过作用其各自的靶基因*K-Ras*、*VEGFC*、*SIRT1*(sirtuin 1)、*SPHK1*(sphingosine kinase 1)和*VEGFA*在结肠癌中发挥着抑癌基因的作用^[19-23]。而Gao等^[24]发现,miR-96通过抑制*P53*基因促进结肠癌细胞的增殖。越来越多的研究表明,miRNAs在结肠癌的发生发展过程中发挥重要的调控作用。因此,全面深入研究各种miRNAs的调控机制有助于开发新型有效的临床治疗结肠癌的方法和手段。

miR-1作为一种特异性表达于心肌和骨骼肌细胞中的miRNA被发现,其后研究发现,它在膀胱癌、肝癌、前列腺癌、横纹肌肉瘤、肺癌、乳腺癌以

及结肠癌等多种肿瘤中的表达量显著下调^[25-32]。在结肠癌中,Reid等^[33]发现,miR-1是通过下调靶基因*c-Met*(receptor tyrosine kinase)从而抑制细胞的增殖与迁移,而miR-1调控结肠癌细胞周期进程的分子机制目前尚未清楚。

本研究首先通过阳离子脂质体介导的方法将miR-1转染入人结肠癌细胞使其过表达,并应用MTS法、克隆形成实验、流式细胞术研究miR-1对人结肠癌细胞增殖能力及细胞周期情况的影响。通过靶基因预测及荧光素酶分析法预测并确定miR-1作用的靶基因。采用Western blot法检测转染后细胞内细胞周期相关蛋白水平的改变。通过人结肠癌裸鼠动物模型,在体研究miR-1对结肠癌细胞成瘤能力的影响,旨在阐明miR-1调节结肠癌细胞周期进程的分子机制,为结肠癌的临床诊断和治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系与动物

人结肠癌细胞系HT-29、HCT 116和HEK-293均购于美国ATCC(Manassas, VA)。6周龄雌性裸鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 实验试剂与仪器

DMEM(Dulbecco modified Eagle's medium)培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.05% Trypsin-EDTA、Lipofectamine™ RNAi MAX Reagent均购于Invitrogen公司。miR-1、随机序列RNA Oligo(阴性对照, NC)及pMIR-REPORT™ miRNA Expression Reporter Vector System均购于Ambion公司。MTS细胞增殖分析试剂和Dual-Luciferase® Reporter Assay System(TM040)购于Promega公司。流式细胞仪购于BD公司。抗体购于Cell Signaling Technology公司。硝酸纤维素膜购于GE公司。SpectraMax M5酶标仪购于Molecular Devices公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 人结肠癌细胞系HT-29和HCT 116均采用含10% FBS的DMEM培养液,置37 °C、5% CO₂培养箱中培养,细胞接近汇合时用胰蛋白酶消化传代,同时接种细胞进行实验。

1.3.2 转染 将对数生长期的HT-29和HCT 116细胞接种于多孔培养板,根据Lipofectamine™ RNAi MAX转染说明书配制转染液。将miRNA和Lipofectamine混合到无血清、无双抗的DMEM培养

液中,混匀,室温放置15 min后,每孔转染50 nmol/L的miR-1,置37 °C、含5% CO₂的培养箱中孵育。阴性对照(negative control, NC)是以相同方法将随机序列RNA转染入细胞。

1.3.3 细胞增殖实验 将对数生长期的HT-29和HCT 116细胞接种到96孔板中,每个实验组有6个复孔,24 h后按上述方法转染miR-1或随机序列RNA,转染48 h后将细胞培养液换成无血清培养液100 μL/孔,加入20 μL MTS混合液(PMS:MTS=1:20),37 °C孵育2 h后,用酶标仪在490 nm波长下读取光密度(D)值。细胞相对生长率(relative growth rate)=实验组D值/对照组D值×100%。

1.3.4 细胞平板克隆形成能力检测 将对数生长期的HT-29和HCT 116细胞接种到24孔板中,24 h后按上述方法转染miR-1或随机序列RNA,转染后24 h胰蛋白酶消化细胞,计数后接种1 000细胞于6孔板中,分布均匀,继续培养10 d。出现肉眼可见的克隆后终止培养,经4%甲醛固定后,用结晶紫染色5 min,洗净晾干,拍照记录。

1.3.5 流式细胞仪测定细胞周期 将对数生长期的HT-29和HCT 116细胞接种到6孔板中,24 h后按上述方法转染miR-1或随机序列RNA。转染后48 h后收集细胞,70%乙醇4 °C固定过夜,碘化丙啶(PI)4 °C避光染色30 min,400目滤布过滤,流式细胞术检测细胞周期分布,每样品获取30 000个细胞,Modfit软件分析细胞周期各时期的百分率。

1.3.6 靶基因预测及确定 进入TargetScanHuman^[32]靶基因预测软件: http://www.targetscan.org/vert_71/输入miR-1查询有匹配位点的靶基因,筛选并选定与周期相关的两个靶基因CCND1和CDK6。CCND1和CDK6的mRNA 3'UTR片段以及CCND1和CDK6的mRNA 3'UTR突变片段荧光报告基因载体由合元生物技术(上海)有限公司构建。将对数生长期的HEK-293细胞接种至96孔中,每个实验组设6个复孔,24 h后将构建的报告基因载体和pRL-SV40共转染细胞中,再在相应的孔中转染miR-1或随机序列RNA。48 h后进行荧光值测定,检测步骤按照Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System说明书。

1.3.7 Western blot检测细胞内相关蛋白质的水平 将对数生长期的HT-29和HCT 116细胞接种到6孔板中,24 h后细胞约30%汇合时,转染miR-1或随机序列RNA。转染48 h后,用RIPA裂解液提取各实验组细

胞的总蛋白,蛋白质溶液与上样缓冲液混合后进行10% SDS-PAGE,将电泳分离后的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,用5%脱脂奶粉-PBST封闭液室温封闭3 h,用1:800稀释的一抗混合液4 °C孵育过夜,用1:2 000稀释的HRP标记的二抗混合液室温孵育2 h,最后在暗室进行化学发光和显影。

1.3.8 裸鼠体内肿瘤生成实验 将对数生长期的HT-29和HCT 116细胞接种到75 cm²细胞培养瓶中,24 h后按上述方法转染miR-1或随机序列RNA,转染后48 h后收集细胞。将转染miR-1或随机序列RNA的样本分别注射到6周龄雌性裸鼠的背部脊柱左右两侧,每侧注射8×10⁶细胞,注射后6周,待裸鼠背部出现肿块时,分离出肿瘤块,用游标卡尺测量并计算肿瘤体积: [(长L)×(宽W)²]×0.5。

1.3.9 统计方法 所有数据均采用SPSS 10.0统计软件处理。实验数据以均值±标准误(means±S.E.M.)表示,两两比较采用t检验,P<0.05认为统计学显著差异的标准。

2 结果

2.1 转染miR-1对HT-29与HCT 116细胞增殖的影响

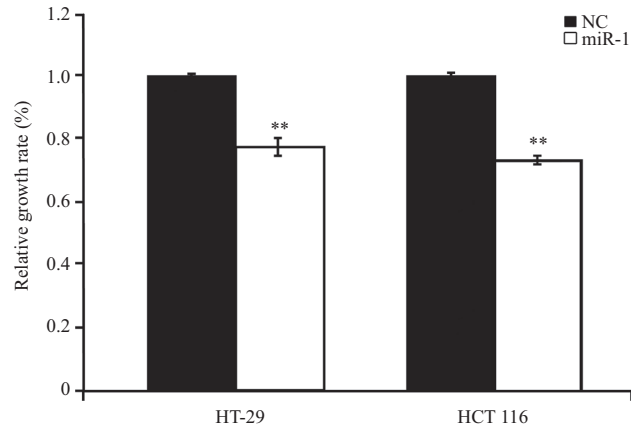
与阴性对照相比,转染miR-1后,HT-29、HCT 116细胞的增殖能力受到明显抑制(图1)。MTS法检测转染miR-1或随机序列RNA 48 h后的D值,经计算得出HT-29的抑制率为22%,HCT 116的抑制率为27%,差异具有统计学意义(P<0.01)。由此可见,miR-1能抑制HT-29、HCT 116细胞的增殖能力。

2.2 转染miR-1对细胞平板克隆形成能力的影响

与阴性对照相比,转染miR-1的HT-29和HCT 116细胞克隆数明显减少,且大小明显减小,HCT 116细胞克隆减少更明显,经定量分析结果具有统计学意义(P<0.05)。因此,miR-1能明显抑制结肠癌细胞的克隆形成能力(图2)。

2.3 转染miR-1对细胞周期的影响

转染随机序列RNA后,HT-29细胞分布在G₀/G₁期为74.38%,而转染了miR-1的HT-29细胞分布在G₀/G₁期为86.48%(图3)。转染随机序列RNA后HCT 116细胞分布在G₀/G₁期为63.78%,而转染了miR-1的HCT 116细胞分布在G₀/G₁期为82.33%。流式细胞术结果显示,转染了miR-1的HT-29和HCT 116细胞滞留在G₀/G₁的细胞数较阴性对照组明显增多,而S期

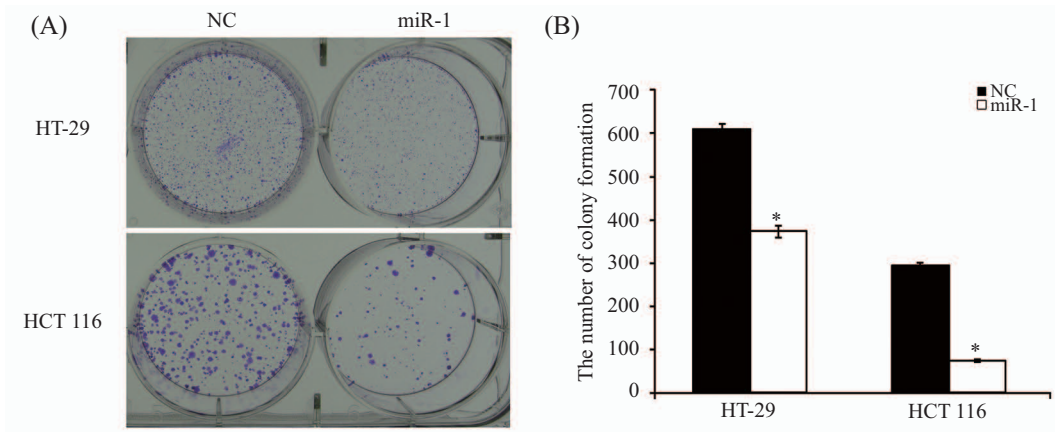


** $P < 0.01$, 与阴性对照组比较。

** $P < 0.01$ vs NC group.

图1 miR-1转染对HT-29、HCT 116细胞增殖能力的影响

Fig.1 The effect of miR-1 transfection on the proliferations of HT-29 and HCT 116 cells



* $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

* $P < 0.05$ vs NC group.

图2 miR-1转染对HT-29和HCT 116细胞克隆形成能力的影响

Fig.2 The effect of miR-1 transfection on the colony formation of HT-29 and HCT 116 cells

和G₂/M期细胞减少。以上结果表明, miR-1能使结肠癌细胞周期进程滞留在G₀/G₁期。

2.4 靶基因的预测

利用靶基因预测软件分析发现, 在人*CCND1*和*CDK6* mRNA 3'UTR区域, miR-1各有一个可能的靶位点。因此, *CCND1*和*CDK6* mRNA可能是miR-1作用的靶mRNA(图4)。

2.5 荧光素酶分析法确定预测的靶基因

结果显示, miR-1均能使*CCND1*和*CDK6* mRNA 3'UTR报告基因载体的荧光强度显著降低, 而对*CCND1*和*CDK6* mRNA 3'UTR突变报告基因载体的荧光强度没有影响, 说明miR-1能够结合到*CCND1*和*CDK6* mRNA 3'UTR区域, 抑制荧光素酶的表达。此结果表明, *CCND1*和*CDK6* mRNA是miR-1作用的

靶mRNA(图5)。

2.6 转染miR-1对HT-29、HCT 116细胞周期相关蛋白质水平的影响

miR-1能够显著抑制结肠癌细胞的增殖, 并将细胞周期阻滞在G₁期。通过靶mRNA预测及荧光素酶分析法发现, *CCND1*和*CDK6* mRNA是miR-1作用的靶mRNA。因此, 有必要检测*CCND1*和*CDK6*以及细胞周期相关蛋白的水平。将HT-29、HCT 116细胞转染miR-1或随机序列RNA后, 用Western blot检测cyclin D1、CDK6以及与细胞周期密切相关的p-Rb、E2F1、p-Cdc2、CDK2、CDK4的蛋白质水平。与阴性对照相比, 转染miR-1后, 在HT-29和HCT 116细胞中cyclin D1和CDK6的蛋白质水平明显下调, p-Rb、E2F1、p-Cdc2、CDK2、CDK4的蛋白质水

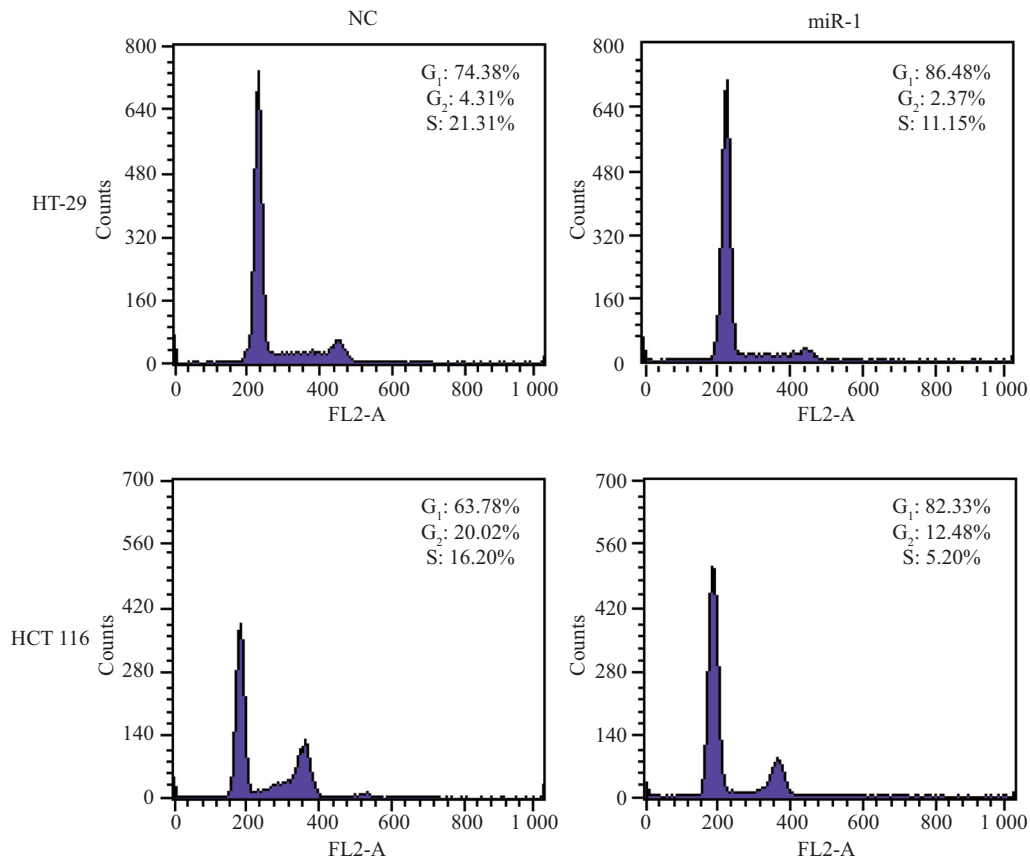
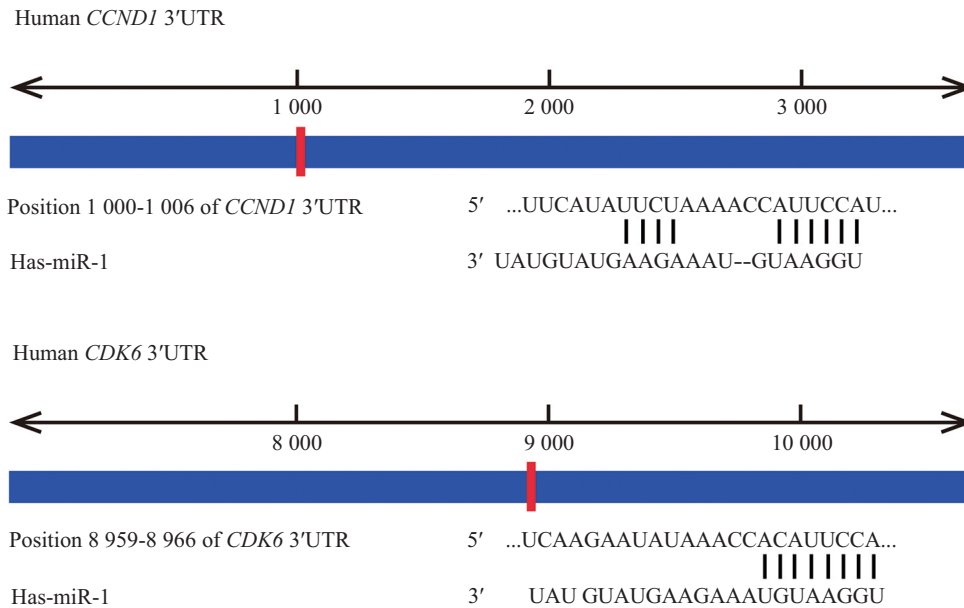


图3 转染miR-1对HT-29和HCT 116细胞周期的影响

Fig.3 The effect of miR-1 transfection on the cell cycle of HT-29 and HCT 116 cells

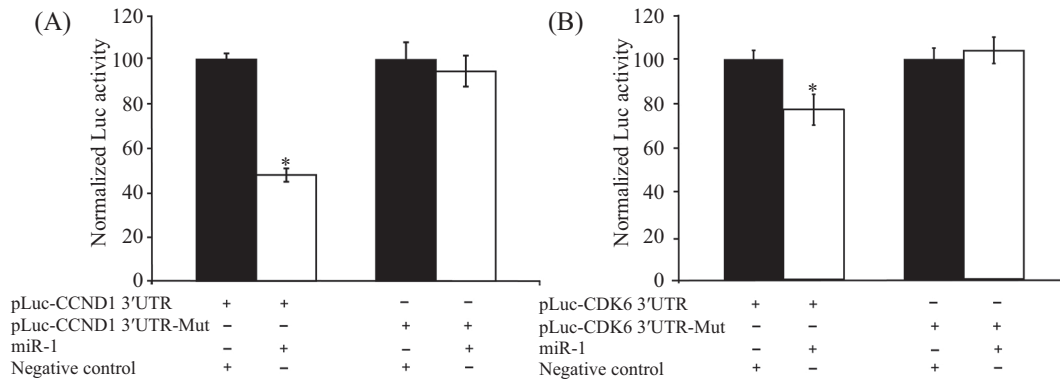


图中蓝色片段代表人*CCND1*和*CDK6* mRNA 3'UTR片段; 红色小片段代表miRNA与之匹配的大致位点。图中已列出各miRNA与human *CCND1*和*CDK6* mRNA 3'UTR匹配的具体位点和核苷酸序列。

Predicted miR-1 binding sites in *CCND1* mRNA 3'UTR and *CDK6* mRNA 3'UTR. Specific locations of the binding sites were marked with red and *CCND1* mRNA 3'UTR /*CDK6* mRNA 3'UTR with blue. Complementarity between miR-1 and the human *CCND1* mRNA 3'UTR and *CDK6* mRNA 3'UTR target site are shown.

图4 生物信息学方法预测miR-1的靶mRNA

Fig.4 Bioinformatics analysis of miR-1 target mRNA

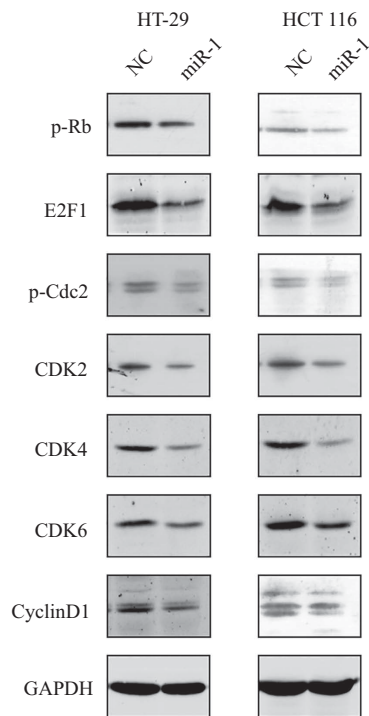


* $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

* $P < 0.05$ vs NC group.

图5 荧光报告基因载体与miR-1共转染后细胞内荧光表达强度分析

Fig.5 Dual-luciferase activity assay of the cells cotransfected with firefly luciferase reporter vector and miR-1



GAPDH为内参。

GAPDH was used as a loading control.

图6 转染miR-1对HT-29和HCT 116细胞周期相关蛋白水平的影响

Fig.6 The effect of miR-1 transfection on the expressions of proteins associated with cell cycle in HT-29 and HCT 116 cells

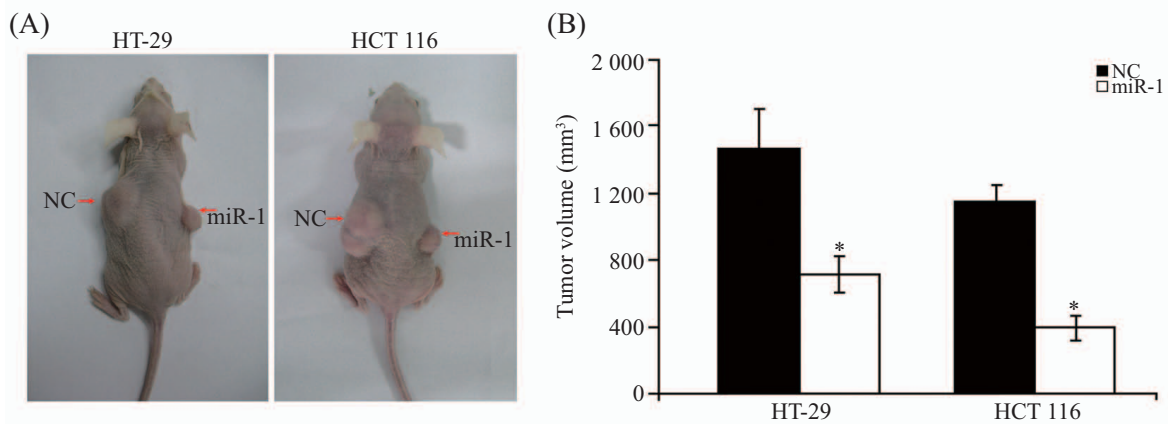
平也有不同程度降低(图6)。

2.7 转染miR-1对裸鼠体内成瘤的影响

将转染miR-1或随机序列RNA后的HT-29和HCT 116细胞接种至裸鼠体内6周后,取出肿瘤块测量体积。结果显示,转染miR-1后的HT-29和HCT 116细胞比转染随机序列RNA后的HT-29和HCT 116细胞,在裸鼠体内形成肿瘤的能力显著减弱($P < 0.05$,图7)。

3 讨论

结肠癌的男性发病率位居世界第三,女性发病率位居世界第二,它也是我国胃肠道最常见的恶性肿瘤之一,全球发病率逐年递增,患者死亡率较高^[1-2]。肿瘤细胞的异常增殖是由于抑癌基因和癌基因的表达失调导致的,大多数抑癌基因或癌基因都是从DNA转录成RNA,然后翻译成蛋白质,行使其生物学功能。随着许多研究发现,miRNAs可以调控重要的



$n=6$, $*P<0.05$, 与阴性对照组比较。

$n=6$, $*P<0.05$ vs NC group.

图7 转染miR-1对HT-29和HCT 116细胞在裸鼠体内成瘤的影响

Fig.7 The effect of miR-1 transfection on the HT-29 and HCT 116 cells growth in nude mice

肿瘤相关信号分子,如P53家族、Rb、EGFR等,从而发挥抑癌基因和癌基因的作用^[5,7]。miR-1、miR-206、miR-133b是一组在飞虫、小鼠和人类肌肉组织中高度保守的miRNAs,被称为myomiRs。研究发现,这组miRNAs的表达量在多种类型的肿瘤中发生改变^[34]。

本研究结果发现,上调HT-29与HCT 116细胞中的miR-1表达量能够显著抑制该细胞的增殖和克隆形成能力。Migliore等^[29]研究发现,在84.6%的人结肠癌组织中miR-1的表达下调,从而使组织中的*c-Met*基因显著过表达。Reid等^[33]发现,在结肠癌中miR-1通过下调靶基因*c-Met*从而抑制细胞的增殖与迁移。在本研究前期工作中通过TargetScanHuman靶基因预测软件及荧光素酶分析法证实*c-Met*是miR-1作用的靶基因之一^[32],转染miR-1后HT-29与HCT 116细胞中*c-MET*的表达量下调明显。*c-MET*是由原癌基因*c-Met*编码的一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体蛋白,是与肝细胞生长因子/离散因子(HGF/SF)高亲和性结合受体。(HGF/SF)/*c-MET*的下游信号通路众多,且在胚胎发育、组织修复和肿瘤的生长和转移等过程中都发挥重要作用。其中下游信号通路Gab1(GRB2-associated-binding protein 1)-Shp2(SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase-2)-ERK/MAPK(mitogen-activated protein kinase)调控ETS/AP1转录因子和黏附分子,从而调控细胞周期相关蛋白和细胞外基质蛋白酶[如基质金属蛋白酶2(matrix metalloprotein 2, MMP2)、还有尿激酶型纤溶酶原激活剂uPA(urokinase-type

plasminogen activator)],改变细胞骨架结构,影响细胞增殖、迁移和侵袭能力。肿瘤的发生发展是由于细胞无限增殖且不能正常死亡产生的。细胞增殖是通过细胞周期来实现的。因此,miR-1不仅通过作用其靶基因*c-Met*调控结肠癌细胞增殖,还可能在结肠癌细胞周期进程的调控机制中发挥重要功能。

细胞周期是指亲代细胞分裂结束到子代细胞分裂结束所经历的过程,由G₁、S、G₂和M期组成(G₁、S和G₂期又合称为分裂间期)^[35-36]。细胞周期时间的长短主要由G₁期决定。本研究的细胞周期检测结果表明,转染miR-1能使更多HT-29与HCT 116细胞滞留在G₁期,这可能是使HT-29与HCT 116细胞增殖受到抑制的原因之一。

众所周知,在细胞周期调节过程中,主要参与的蛋白质有细胞周期素(cyclins)、周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDKs)、周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制物CKIs(cyclin-dependent kinase inhibitors)等。在G₁期发挥重要调控作用的蛋白质主要有CDK2、CDK4、CDK6、cyclin D、cyclin E、p-Rb、E2F1等^[35-36]。CDKs的活性依赖与细胞周期蛋白结合形成复合物。如果没有细胞周期蛋白和CDKs的共同参与,细胞的绝大多数活动都将停止,细胞进入G₀期。其中,CDK(CDK4和CDK6)与cyclin D复合体在细胞进入G₁期发挥重要作用,CDK2与cyclin E复合体调节细胞从G₁期到S期的进程。Rb蛋白在细胞周期中最为关键的两个调控点G₁/S和G₂/M起到一种“闸门”的作用。在G₁期和G₂期,Rb蛋白上的多个磷酸化位点都处于非磷酸化或低磷酸化状态,与转录因子E2F

结合成复合物形式,发挥稳定的细胞周期抑制作用。在G₁和G₂末期,控制该调控点的相应细胞周期蛋白合成增加,并与相应的CDK结合,使Rb上的磷酸化位点磷酸化,这种高磷酸化状态使Rb蛋白释放E2F,游离的E2F就可以促进多种基因的转录过程。因此,Rb蛋白的功能状态最终决定着细胞周期的进程。本研究的Western blot结果也表明,转染miR-1至HT-29与HCT 116细胞能使胞内cyclin D1、CDK6、CDK2、CDK4、p-Rb、E2F1、p-Cdc2等蛋白质水平明显下调。这一结果说明,miR-1是通过下调这些在G₁期发挥重要作用的周期相关蛋白从而使细胞周期滞留在G₁期,与流式细胞术所得结果一致。裸鼠体内肿瘤形成实验结果表明,miR-1能显著抑制结肠癌细胞在动物体内的生长。

综上所述,miR-1不仅通过作用其靶基因*c-Met*调控结肠癌细胞增殖,而且通过下调靶基因*CCND1*和*CDK6*的表达水平,同时抑制周期素依赖性蛋白激酶CDK2、CDK4的表达,进而下调了决定周期进程的关键蛋白Rb及Cdc2的磷酸化水平,同时也降低了E2F1的表达量,使细胞周期滞留在G₁期,从而抑制了细胞增殖的进程。进一步阐明miR-1在结肠癌细胞周期的调控机制,有助于了解其在调节结肠癌细胞增殖过程中的作用机制,将为该疾病的临床诊断和治疗提供新的思路。

参考文献 (References)

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893-917.
- 2 Compton CC. Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003; 16(4): 376-88.
- 3 Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64(2): 104-17.
- 4 Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zaubler AG, Anderson RN, *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* 2010; 116(3): 544-73.
- 5 Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- 6 Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 2005; 579(26): 5911-22.
- 7 Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2007; 96 Suppl: R40-4.
- 8 Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res* 2005; 65(9): 3509-12.
- 9 Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: Small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009; 27(34): 5848-56.
- 10 Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(6): 321-33.
- 11 Skafnesmo KO, Prestegarden L, Micklem DR, Lorens JB. MicroRNAs in tumorigenesis. *Curr Pharm Biotechnol* 2007; 8(6): 320-5.
- 12 Winter J, Diederichs S. MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol Biol* 2011; 676: 3-22.
- 13 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(9): 2999-3004.
- 14 Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1(12): 882-91.
- 15 Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, *et al.* Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 2009; 28(10): 1385-92.
- 16 Pichler M, Winter E, Stotz M, Eberhard K, Samonigg H, Lax S, *et al.* Down-regulation of KRAS-interacting miRNA-143 predicts poor prognosis but not response to EGFR-targeted agents in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2012; 106(11): 1826-32.
- 17 Su J, Liang H, Yao W, Wang N, Zhang S, Yan X, *et al.* MiR-143 and MiR-145 regulate IGF1R to suppress cell proliferation in colorectal cancer. *PLoS One* 2014; 9(12): e114420.
- 18 Yin Y, Yan ZP, Lu NN, Xu Q, He J, Qian X, *et al.* Down regulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1829(2): 239-47.
- 19 Chen MB, Yang L, Lu PH, Fu XL, Zhang Y, Zhu YQ, *et al.* MicroRNA-101 down-regulates sphingosine kinase 1 in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 463(4): 954-60.
- 20 Stiegelbauer V, Perakis S, Deutsch A, Ling H, Gerger A, Pichler M. MicroRNAs as novel predictive biomarkers and therapeutic targets in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(33): 11727-35.
- 21 Tsang WP, Kwok TT. The miR-18a* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. *Carcinogenesis* 2009; 30(6): 953-9.
- 22 Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(36): 13421-6.
- 23 Ye J, Wu X, Wu D, Wu P, Ni C, Zhang Z, *et al.* miRNA-27b targets vascular endothelial growth factor C to inhibit tumor progression and angiogenesis in colorectal cancer. *PLoS One* 2013; 8(4): e60687.
- 24 Gao F, Wang W. MicroRNA-96 promotes the proliferation of colorectal cancer cells and targets tumor protein p53 inducible nuclear protein 1, forkhead box protein O1 (FOXO1) and FOXO3a. *Mol Med Rep* 2015; 11(2): 1200-6.
- 25 Karatas OF, Guzel E, Suer I, Ekici ID, Caskurlu T, Creighton CJ, *et al.* miR-1 and miR-133b are differentially expressed in patients with recurrent prostate cancer. *PLoS One* 2014; 9(6): e98675.
- 26 Kojima S, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nohata N, *et al.* Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer. *Br J Cancer* 2012; 106(2): 405-13.
- 27 Li J, Guan J, Long X, Wang Y, Xiang X. miR-1-mediated

- paracrine effect of cancer-associated fibroblasts on lung cancer cell proliferation and chemoresistance. *Oncol Rep* 2016; 35(6): 3523-31.
- 28 Liu R, Li J, Lai Y, Liao Y, Qiu W. Hsa-miR-1 suppresses breast cancer development by down-regulating K-ras and long non-coding RNA MALAT1. *Int J Biol Macromol* 2015; 81: 491-7.
- 29 Migliore C, Martin V, Leoni VP, Restivo A, Atzori L, Petrelli A, *et al.* MiR-1 downregulation cooperates with MACC1 in promoting MET overexpression in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18(3): 737-47.
- 30 Nasser MW, Datta J, Nuovo G, Kutay H, Motiwala T, Majumder S, *et al.* Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem* 2008; 283(48): 33394-405.
- 31 Yoshino H, Chiyomaru T, Enokida H, Kawakami K, Tatarano S, Nishiyama K, *et al.* The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(5): 808-18.
- 32 Yan D, Dong Xda E, Chen X, Wang L, Lu C, Wang J, *et al.* MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J Biol Chem* 2009; 284(43): 29596-604.
- 33 Reid JF, Sokolova V, Zoni E, Lampis A, Pizzamiglio S, Bertan C, *et al.* miRNA profiling in colorectal cancer highlights miR-1 involvement in MET-dependent proliferation. *Mol Cancer Res* 2012; 10(4): 504-15.
- 34 Mitchelson KR, Qin WY. Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease. *World J Biol Chem* 2015; 6(3): 162-208.
- 35 Schafer KA. The cell cycle: A review. *Vet Pathol* 1998; 35(6): 461-78.
- 36 Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36(3): 131-49.