

· 医学与免疫生物技术 ·

miR-29b2c 重组腺病毒的构建及对胃癌细胞增殖和迁移的影响

骆爱玲, 杜春园, 赵雪梅, 梁继超, 陈勇

湖北大学 中药生物技术省重点实验室 生物资源绿色转化湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430062

骆爱玲, 杜春园, 赵雪梅, 等. miR-29b2c 重组腺病毒的构建及对胃癌细胞增殖和迁移的影响. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1136-1144.

Luo AL, Du CY, Zhao XM, et al. Effects of recombinant adenovirus Ad-miR-29b2c on HGC-27 cell proliferation and migration. Chin J Biotech, 2017, 33(7): 1136-1144.

摘要: 构建了 miR-29b2c 重组腺病毒 Ad-miR-29b2c, 考察了其对 HGC-27、MGC-803 胃癌细胞增殖及迁移的抑制作用。采用 PCR 从基因组扩增 miR-29b2c 片段, 并克隆至腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 中, 构建穿梭质粒 pAdT-29b2c, 经酶切及测序鉴定。穿梭质粒经 *Pme* I 线性化后与腺病毒骨架载体共转化 BJ5183 感受态, 产生重组腺病毒质粒 Ad-miR-29b2c, 再经 *Pac* I 线性化后转染 293A 细胞进行包装。重组腺病毒扩增后感染 HGC-27 细胞, 通过 MTT 及细胞迁移实验观察 Ad-miR-29b2c 对 HGC-27、MGC-803 细胞增殖及迁移的影响。采用 Western blotting 检测 Ad-miR-29b2c 对 HGC-27、MGC-803 细胞 δ -catenin 蛋白表达的影响。酶切、测序及荧光定量 PCR 结果表明重组腺病毒构建成功, miR-29b 及 miR-29c 在 HGC-27 细胞过表达。MTT 实验表明 Ad-miR-29b2c 能显著抑制 HGC-27、MGC-803 细胞增殖。细胞迁移实验表明 Ad-miR-29b2c 能显著抑制 HGC-27、MGC-803 细胞迁移。此外, Ad-miR-29b2c 能显著降低 HGC-27、MGC-803 细胞 δ -catenin 蛋白表达水平。综上所述, 构建了 miR-29b2c 的重组腺病毒, 并发现其可以抑制胃癌细胞 HGC-27 和 MGC-803 的增殖及迁移, 该作用可能与 miR-29 抑制 HGC-27、MGC-803 细胞 δ -catenin 蛋白表达有关。

关键词: miR-29, 胃癌, 重组腺病毒, 基因治疗

Received: January 4, 2017; **Accepted:** April 6, 2017

Supported by: Young Talent Project of the Education Department of Hubei Province (No. Q20141002).

Corresponding authors: Jichao Liang. Tel/Fax: +86-27-88663590; E-mail: liang529114@163.com

Yong Chen. Tel/Fax: +86-27-88663882; E-mail: cy101610@qq.com

湖北省教育厅科学技术研究计划青年人才项目 (No. Q20141002) 资助。

网络出版时间: 2017-04-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170418.1109.001.html>

Effects of recombinant adenovirus Ad-miR-29b2c on HGC-27 cell proliferation and migration

Ailing Luo, Chunyuan Du, Xuemei Zhao, Jichao Liang, and Yong Chen

Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

Abstract: We constructed recombinant adenoviruses expressing miR-29b2c (Ad-miR29b2c), and analyzed their effects on the proliferation and migration of HGC-27 and MGC-803 cells. miR-29b2c gene was amplified by PCR from genomic DNA and cloned into the pAdTrack-CMV vector to create the shuttle plasmid pAdT-29b2c. The recombinant plasmid was verified by restriction enzyme digestion and sequencing. The linearized shuttle vector was mixed with an adenoviral backbone plasmid (pAdEasy-1), followed by cotransformation into competent BJ5183 cells to generate the recombinant plasmid pAd-miR-29b2c. Finally, recombinant adenoviral vectors were generated by transfecting the recombinant plasmid into 293A packaging cell line. HGC-27 and MGC-803 cells were infected with the recombinant adenoviruses expressing pAd-miR-29b2c, then MTT and wound-healing assay were used to analyze the effects of pAd-miR-29b2c on the proliferation and migration of HGC-27 and MGC-803 cells. The miR-29b and miR-29c levels were significantly increased in HGC-27 cells after infected with pAd-miR-29b2c. MTT and wound-healing analysis also revealed a significant decrease in proliferation and migration of HGC-27 and MGC-803 cells compared to the control Ad-GFP-infected cells. Furthermore, western blotting results demonstrated that the protein expression level of δ -catenin was reduced in pAd-miR-29b2c transfected HGC-27 and MGC-803 cells. Taken together, the recombinant adenoviral vector was generated, and it can significantly inhibit the proliferation and migration of HGC-27 and MGC-803 cells.

Keywords: miR-29, gastric cancer, recombinant adenovirus, gene therapy

胃癌是一种发病率及死亡率极高的恶性肿瘤，每年约 90 万人被诊断为胃癌，约 70 万人死于胃癌^[1]。目前对于胃癌的治疗以手术为主，但无论是早期还是中晚期胃癌均存在术后复发的情况，寻找有效的早期诊断指标及治疗靶靶是胃癌处理中的一个难题。

miRNA 是一类长 18–25 个核苷酸组成的内源性非蛋白编码 RNA，在体内分布广泛，物种间高度保守。在病理及生理条件下，miRNA 调节大量蛋白编码基因的表达，并形成复杂的调控网络，在发育、分化、增殖及凋亡等过程中起着非常重要的调节作用。miRNA 是最大的一类基因表达转录后调控因子，自 2002 年发现 miRNA 表达异常

与肿瘤相关以来，越来越多的研究表明多种 miRNA 均参与肿瘤的发生与发展^[2-3]。

研究表明，miR-29 家族与肿瘤密切相关。研究人员陆续报道了恶性胆管癌、鼻咽癌、肺癌、成神经细胞瘤、横纹肌肉瘤等多种肿瘤细胞中存在 miR-29 基因簇或单个基因表达异常^[4-10]。miRNA-29 家族是一类抑癌基因，对胃癌细胞的增殖和转移发挥负调控作用^[11]。最近有研究显示，miR-29 表达水平与胃癌患者生存率有密切关系，miR-29 高表达胃癌患者与 miR-29 低表达胃癌患者相比，术后 5 年生存率更高，提示 miR-29 家族与胃癌的发生发展可能密切相关^[12]。

miR-29 家族包括 miR-29a、miR-29b 和

miR-29c 等 3 个成员,且分为 miR-29b1a、miR-29b2c 两个基因簇位于不同的染色体上。本研究克隆了 miR-29b2c 基因片段,并构建了重组腺病毒,发现 Ad-miR-29b2c 能显著抑制胃癌细胞 HGC-27 和 MGC-803 的增殖和迁移。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

pAdTrack-CMV 穿梭质粒、pAdEasy-1 腺病毒骨架质粒、HGC-27 细胞、293A 细胞、BJ5183 感受态(实验室保存)。限制性内切酶 *Bgl* II、*Xba* I (Promega 公司); *Pme* I、*Pac* I (NEB 公司); DL2000、 λ DNA/*Hind* III 核酸分子量标准 (TaKaRa 公司);胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司);质粒提取试剂盒 (QIAGEN 公司);Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司);*Taqman* 荧光定量 PCR 试剂盒 (Applied Biosystems 公司);DMEM 细胞培养基、胎牛血清 (GIBCO 公司)。miRNA 提取试剂盒 (Ambion 公司);miRNA 反转录及荧光定量检测试剂盒 (Applied Biosystems 公司)。PVDF 膜 (Millipore 公司),Anti-GAPDH、Anti-Catenin (BOSTER 公司),鼠二抗、兔二抗 (KPL 公司)。BCA 试剂盒 (Thermo 公司),超敏 ECL 化学发光试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF、蛋白上样缓冲溶液 (碧云天公司),蛋白酶抑制剂 Cocktail (Roche 公司)。

引物设计与合成:用于 PCR 扩增 miR-29b2c 片段的引物如下,下划线为引入的酶切位点。

29F: TTGCTCAGATCTGCCTACAGGGTCA TGGGAT; 29R: CCTTCTTCTAGACCAGGGAC CACTTCTCATT。

插入载体的是前体序列,分别为 miR-29b (GenBank Accession No. NR_029518.1) 和 miR-29c

(GenBank Accession No. NR_029832.1)。

1.2 穿梭表达载体 pAdT-29b2c 的构建

PCR 扩增出的 miR-29b2c 片段经 *Bgl* II/*Xba* I 双酶切后亚克隆到 pAdTrack-CMV 载体,构建出重组穿梭质粒 pAdT-29b2c。重组质粒经测序鉴定,序列完全正确。

1.3 重组腺病毒 Ad-miR-29b2c 的构建

pAdT-29b2c 质粒经 *Pme* I 线性化后,与 pAdEasy-1 腺病毒骨架质粒共转化 BJ5183 感受态细胞,在胞内进行同源重组,涂卡那霉素平板后培养 18-24 h,挑取较小单克隆,提取质粒后经 *Pac* I 酶切鉴定。得到重组腺病毒质粒 pAd-miR-29b2c。

1.4 重组腺病毒 pAd-miR-29b2c 的包装和扩增

取 4 μ g 重组腺病毒质粒 pAd-miR-29b2c,经 *Pac* I 酶切线性化,用乙醇进行沉淀回收,按照 Lipofectamine 2000 转染试剂要求,转染至 70%汇合度的 293A 细胞中,1-2 周后可以观察到扩增斑。50%的细胞变圆并漂起后收集细胞,4 次液氮/37 $^{\circ}$ C 反复冻融后离心得到第 1 代重组腺病毒。

1.5 细胞增殖实验

取对数生长期的 HGC-27 和 MGC-803 细胞,胰酶消化后接种于 96 孔板。实验分为 5 组,对照组给予含 pAd-GFP 的完全培养基,实验组用完全培养基配置不同滴度的上述收集的重组腺病毒 pAd-miR-29b2c,用 pAd-GFP 调整实验组病毒总量,保证每组细胞感染了相同总量的重组腺病毒以降低实验误差;每组设置 5 个平行复孔,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下置于培养箱中培养 24 h。然后,每孔加入 20 μ L 5 g/L MTT

溶液,于培养箱中继续培养 4 h 后,弃掉培养液,每孔加入 150 μ L DMSO,室温振荡混匀,用酶标仪测定在 570 nm 处的吸光度,根据吸光值比较各组细胞增殖情况。

1.6 细胞迁移实验

取对数生长期的 HGC-27 和 MGC-803 细胞,胰酶消化后接种于 6 孔板(过夜铺满)。翌日用干净的蓝枪头均匀划痕,将不同浓度的重组腺病毒 pAd-miR-29b2c 及空白对照置于含 pAd-GFP 的无血清培养基中继续培养,观察 24 h 和 48 h 后迁移到划痕区细胞的情况,每组设 3 个重复孔。

1.7 实时定量 PCR

采用 miRNA 分离提取试剂盒提取总 miRNA,miRNA 经 Applied Biosystems miRNA 反转录试剂盒反转录后采用 Taqman 探针法定量分析 miR-29b 及 miR-29c 水平。

1.8 蛋白印迹实验

取对数生长期的胃癌细胞,胰酶消化后接种于 6 孔板。翌日,分别转染 Ad-GFP 和 Ad-miR-29b2c。细胞融合至 90%左右,取出 6 孔板,预冷 PBS 清洗 2-3 次,再加入预先配好的细胞裂解液,充分裂解后,经 BCA 蛋白测定试剂盒测得总蛋白浓度。裂解液中加入蛋白上样缓冲溶液,沸水浴 10 min 变性,进行 10% SDS-PAGE。电泳结束后,用湿转法将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,电转结束后用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h,将 PVDF 膜移至配好的 GAPDH 和 Catenin 一抗 (1:1 000) 中,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 溶液洗膜 6 次,8 min/次,分别加入鼠二抗、兔二抗 (1:5 000) 于 28 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 溶液洗膜 6 次,8 min/次,加入

超敏 ECL 化学发光液后置于暗室曝光。

2 结果与分析

2.1 pAdT-29b2c 穿梭质粒的构建与鉴定

PCR 扩增出 miR-29b2c 片段,凝胶电泳检测,如图 1 所示,片段大小与设计一致。目标片段及 pAd-Track-CMV 空载体经 *Bgl* II/*Xba* I 双酶切后用 T4 DNA 连接酶进行连接,转化大肠杆菌后挑取单克隆,少量提取质粒,并用 *Bgl* II/*Xba* I 双酶切进行初步鉴定。如图 2 所示,质粒经 *Bgl* II/*Xba* I 双酶切后,出现了一条约 1.3 kb 的小片段。取阳性克隆送公司测序,结果证明插入序列与设计完全一致,没有突变,插入方向正确。结果表明重组穿梭质粒 pAdT-29b2c 构建成功。

2.2 重组腺病毒载体的构建及鉴定

重组穿梭质粒 pAdT-29b2c 经 *Pme* I 酶切线性化后凝胶电泳回收。回收片段与 100 ng 腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 混合后,电转化 BJ5183 感受态细胞,挑菌、提取重组质粒,重组质粒经 *Pac* I 酶切,电泳。如图 3 所示,根据重组腺病毒包装系统说明书,酶切产生 4.5 kb 的片段,说明腺病毒重组成功^[13],命名为 pAd-miR-29b2c。

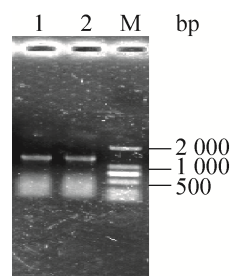


图 1 miR-29b2c 基因序列的扩增

Fig. 1 PCR amplification of miR-29b2c gene sequence. M: DL2000 marker; 1, 2: miR-29b2c fragments.

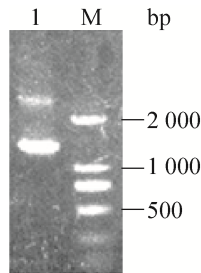


图2 重组穿梭质粒 pAdT-29b2c 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of recombinant shuttle plasmid pAdT-29b2c.

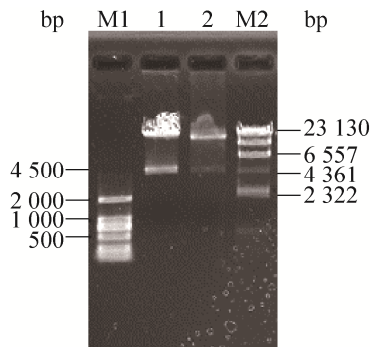


图3 *Pac* I 酶切重组质粒 pAd-miR-29b2c

Fig. 3 *Pac* I digestion of recombinant plasmid pAd-miR-29b2c. M1: DL2000 marker; M2: λ -*Hind* III digest DNA marker.

2.3 重组腺病毒的包装及扩增

腺病毒重组质粒经 *Pac* I 酶切线性化后, 转染 293A 细胞进行包装, 48 h 后荧光显微镜下可

见少量 GFP (绿色荧光蛋白) 的表达, 1 周后细胞基本都变绿, 如图 4 所示。50% 的细胞漂起后收集细胞, 反复冻融释放病毒 (Ad-miR-29b2c), 重新感染新鲜的 293A 细胞进行病毒扩增。

2.4 重组腺病毒在 HGC-27 细胞中的表达

培养 HGC-27 细胞, 在对数生长期分别感染 Ad-GFP 及重组腺病毒 Ad-miR-29b2c。24 及 48 h 后收集细胞, 提取总 miRNA, 采用 *Taqman* 探针法对 miR-29b 及 miR-29c 进行定量分析。如图 5 所示, 与感染 Ad-GFP 组相比, 感染 Ad-miR-29b2c 组 miR-29b 及 miR-29c 表达水平明显升高。

2.5 重组腺病毒对 HGC-27 和 MGC-803 细胞增殖的影响

HGC-27 细胞分别感染 Ad-GFP 及 Ad-miR-29b2c, 24、48 及 72 h 后 MTT 法检测抑制效果。如图 6 所示, 与感染 Ad-GFP 组相比, 感染 Ad-miR-29b2c 组对 HGC-27 和 MGC-803 细胞有明显的抑制作用, 48 h 及 72 h 比 24 h 抑制作用更强。

2.6 重组腺病毒对 HGC-27 和 MGC-803 细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示 (图 7), 与感染 Ad-GFP 组相比, 感染 Ad-miR-29b2c 组 HGC-27 和 MGC-803 细胞迁移明显受到了抑制。

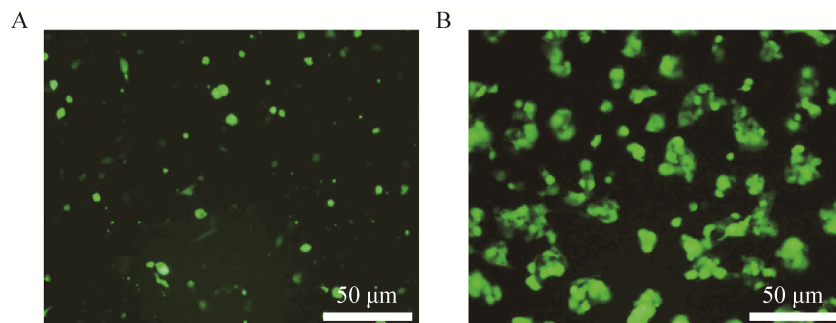


图4 线性化重组质粒 pAd-miR-29b2c 转染 293A 细胞 3 d (A) 和 5 d (B) 后的绿色荧光蛋白表达

Fig. 4 Green fluorescent protein expression in 293A cells 3 d (A) and 5 d (B) after transfected by linearized recombinant plasmid pAd-miR-29b2c.

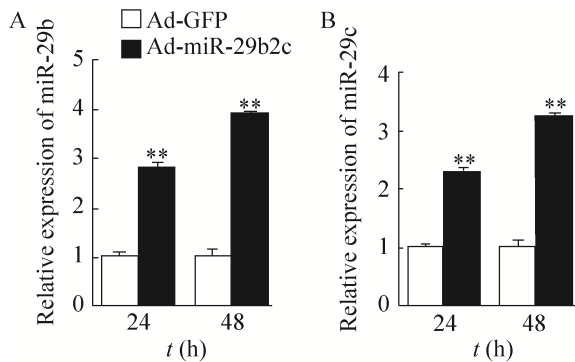


图 5 Real-time PCR 分析经重组腺病毒感染后的 HGC-27 细胞中 miR-29b 和 miR-29c 表达水平
Fig. 5 Real-time PCR analysis of miR-29b and miR-29c expression levels in HGC-27 cells after infected by indicated adenovirus (** $P<0.01$).

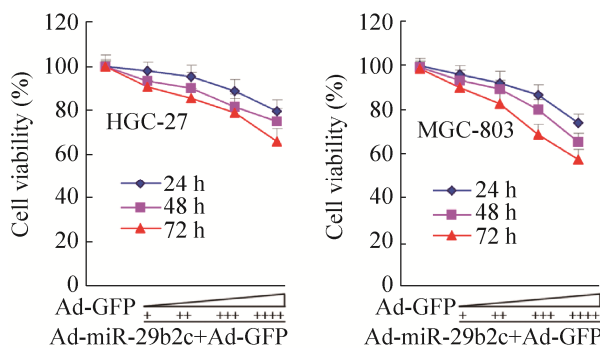


图 6 HGC-27 和 MGC-803 细胞感染重组腺病毒后 MTT 分析细胞活力
Fig. 6 Cell viability analysis of HGC-27 and MGC-803 cells treated with indicated adenovirus was measured using an MTT assay. The Ad-GFP in experimental group was used to normalize the total amount of adenoviruses.

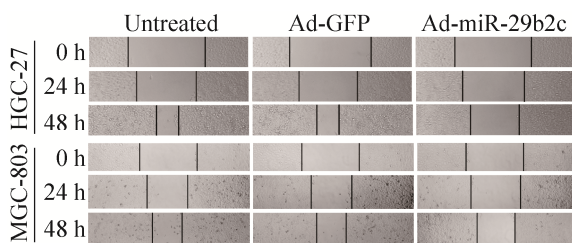


图 7 HGC-27 和 MGC-803 细胞中细胞迁移分析
Fig. 7 Cell migration assay was conducted in HGC-27 and MGC-803 cells.

2.7 重组腺病毒对 HGC-27 和 MGC-803 细胞 Catenin 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示,与感染 Ad-GFP 组相比,感染 Ad-miR-29b2c 组 Catenin 蛋白表达水平明显降低,如图 8 所示。

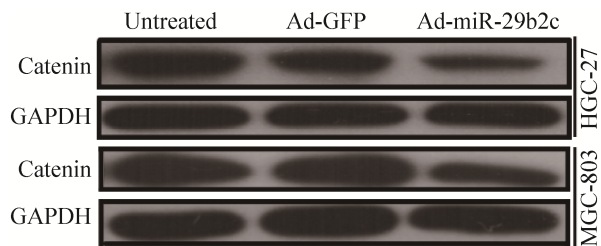


图 8 蛋白印迹分析 δ -catenin 在 HGC-27 和 MGC-803 细胞中的表达
Fig. 8 Western blotting analysis of δ -catenin protein expression in HGC-27 and MGC-803 cells.

3 讨论

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一^[14],全球范围内发病率高,仅次于肺癌、乳腺癌及结直肠癌^[15]。胃癌死亡率更是位居恶性肿瘤第二^[16]。我国每年新发病例大约 40 万,约占世界总发病例数的 42%^[17]。胃癌已经严重威胁我国居民的生活健康。

miRNA 的发现及其调控机制的阐明为深入理解很多生理病理过程提供了新的重要线索及视野^[3,18-20]。近年来,研究发现,多种 miRNA 的异常表达与胃癌的发生发展密切相关 (miR-448^[21]、miR-let-7a^[22]、miR-133^[23]、miR-206^[24])。

miR-29 家族包含 miR-29a、miR-29b 及 miR-29c 等 3 个成员。研究表明,miR-29 家族通常扮演抑癌基因的角色,抑制多种肿瘤细胞的生长^[25]。

目前,虽然 miR-29c 已被发现与胃癌细胞增

殖相关,但 miR-29 家族在体内分布在不同的染色体上,miR-29b 与 miR-29a 及 miR-29c 分别形成两个 miRNA 簇,即 miR-29b1a 及 miR-29b2c。miRNA 通常在物种之间非常保守,主要通过其种子序列靶向结合于靶 mRNA 3'非翻译区,抑制靶基因的翻译。miR-29a、miR-29b 及 miR-29c 种子序列完全一致,即 5'-UAGCACCAU-3'。研究表明,miR-29 家族成员在多种细胞内可以同时靶向同一个靶 mRNA,该调控模式的意义还有待研究。miR-29b1a 和 miR-29b2c 存在于不同的基因簇,加工后分别表达 miR-29b、miR-29a 及 miR-29b、miR-29c。为了研究 miR-29b2c 与胃癌之间的关系,本研究克隆了其片段,并包装成重组腺病毒,模拟体内 miR-29b 与 miR-29c 共表达的现象,通过细胞增殖及迁移实验,发现 miR-29b 与 miR-29c 能显著抑制胃癌细胞增殖及迁移,为实现腺病毒基因治疗胃癌提供线索。miR-29b1a 是否具有相同或类似的影响胃癌细胞增殖及迁移的活性,需要单独包装其腺病毒,作进一步的研究。

研究表明,胃癌细胞的增殖、迁移受到多个信号通路的影响,如 PI3K/Akt 信号途径。在胃癌、乳腺癌、肺癌等多种恶性肿瘤中均能检测到 PI3K/Akt 途径的活化^[26-28],并通过其下游效应分子调节肿瘤细胞的分化、侵袭转移等,与临床肿瘤预后密切相关。此外,HIF-1 α /VEGF 途径在胃癌的发生、发展及侵袭转移方面也发挥了重要作用。胃癌组织的低氧状态诱导 HIF-1 α 的活化,从而调节包括葡萄糖转运蛋白、血管内皮生长因子等多种基因的表达水平,导致胃癌恶化、转移^[29]。

δ -catenin 最初作为 1 个神经特异性表达蛋白被发现。研究表明, δ -catenin 可以与经典的

钙粘素、钙调节的细胞-细胞连接蛋白等相互作用,参与多种人类疾病的发生发展过程,如 δ -catenin 的表达异常与近视、阿尔兹海默病及精神分裂症相关^[30]。最新的研究表明, δ -catenin 影响 Wnt 信号通路及参与 Rho GTP 酶的调节,其突变及表达紊乱与包括胃癌在内的多种肿瘤的增殖及转移密切相关^[31]。鉴于 δ -catenin 在胃癌发生发展中的重要性,以及其被预测为 miR-29 家族的潜在靶基因,我们在胃癌细胞中检测了其表达水平是否受到 miR-29 家族的调控。

综上所述,腺病毒介导的过表达 miR-29b2c 抑制 HGC-27 及 MGC-803 胃癌细胞增殖和迁移,该活性可能与 δ -catenin 蛋白表达水平有关。

REFERENCES

- [1] Herrero R, Parsonnet J, Greenberg ER. Prevention of gastric cancer. *JAMA*, 2014, 312(12): 1197-1198.
- [2] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 597-610.
- [3] David CJ, Manley JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev*, 2010, 24(21): 2343-2364.
- [4] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*, 2007, 26(42): 6133-6140.
- [5] Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5874-5878.
- [6] Garzon R, Liu SJ, Fabbri M, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly *DNMT3A* and *3B* and indirectly *DNMT1*. *Blood*, 2009, 113(25): 6411-6418.

- [7] Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, et al. Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by *miR-29* and *miR-181*. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11590–11593.
- [8] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(40): 15805–15810.
- [9] Xu H, Cheung IY, Guo HF, et al. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors. *Cancer Res*, 2009, 69(15): 6275–6281.
- [10] Wang HT, Garzon R, Sun H, et al. NF- κ B-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*, 2008, 14(5): 369–381.
- [11] Gong JN, Li JX, Wang Y, et al. Characterization of microRNA-29 family expression and investigation of their mechanistic roles in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 2014, 35(2): 497–506.
- [12] Chen L, Chen XH, Li XC, et al. Expression of miR-29 in serum of gastric cancer patients and its effect on prognosis. *J Mol Diagn Ther*, 2011, 3(2): 90–92 (in Chinese).
陈陵, 陈先华, 李学成, 等. miR-29 在胃癌患者血清中的表达及其对预后的影响. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(2): 90–92.
- [13] Liang JC, Liu CZ, Qiao AJ, et al. MicroRNA-29a-c decrease fasting blood glucose levels by negatively regulating hepatic gluconeogenesis. *J Hepatol*, 2013, 58(3): 535–542.
- [14] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [15] Dong ZW, Qiao YL, Li LD, et al. Report of Chinese cancer control strategy. *Bull Chin Cancer*, 2002, 11(5): 250–260 (in Chinese).
董志伟, 乔友林, 李连弟, 等. 中国癌症控制策略研究报告. *中国肿瘤*, 2002, 11(5): 250–260.
- [16] Wu WKK, Lee CW, Cho CH, et al. MicroRNA dysregulation in gastric cancer: a new player enters the game. *Oncogene*, 2010, 29(43): 5761–5771.
- [17] Zou WB, Li ZS. Progress in the incidence and mortality of gastric cancer in China. *Chin J Prac Intern Med*, 2014, 34(4): 408–415 (in Chinese).
邹文斌, 李兆申. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展. *中国实用内科杂志*, 2014, 34(4): 408–415.
- [18] Link A, Kupcinskis J, Wex T, et al. Macro-role of microRNA in gastric cancer. *Dig Dis*, 2012, 30(3): 255–267.
- [19] Xie Y, Todd NW, Liu ZQ, et al. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2010, 67(2): 170–176.
- [20] Chen YC, Zhu XD, Zhang XJ, et al. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Mol Ther*, 2010, 18(9): 1650–1656.
- [21] Wu XS, Tang HR, Liu GB, et al. miR-448 suppressed gastric cancer proliferation and invasion by regulating ADAM10. *Tumor Biol*, 2016, 37(8): 10545–10551.
- [22] Tang R, Yang C, Ma X, et al. MiR-let-7a inhibits cell proliferation, migration, and invasion by down-regulating PKM2 in gastric cancer. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5972–5984.
- [23] Liu YF, Zhang X, Zhang YJ, et al. Identification of miRNomes in human stomach and gastric carcinoma reveals miR-133b/a-3p as therapeutic target for gastric cancer. *Cancer Lett*, 2015, 369(1): 58–66.
- [24] Zheng ZQ, Yan DS, Chen XY, et al. MicroRNA-206: effective inhibition of gastric cancer progression through the c-met pathway. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): e0128751.
- [25] Zhao JJ, Lin JH, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood*, 2010, 115(13): 2630–2639.
- [26] Han ZW, Rong RZ, Kong PZ, et al. Expression of MUC15 and PI3K/Akt in gastric carcinoma and its association with clinical-pathological characteristics

- and prognosis. *Chin J Clin Oncol*, 2016, 43(2): 56–61 (in Chinese).
- 韩志伟, 戎瑞洲, 孔鹏洲, 等. MUC15 和 PI3K/Akt 表达与胃癌临床病理特征及预后的相关性研究. *中国肿瘤临床*, 2016, 43(2): 56–61.
- [27] Lin XD, Hu D, Chen G, et al. Association of SNP in the PI3K-PTEN-AKT-mTOR pathway with genetic susceptibility of gastric cancer. *J Clin Exp Pathol*, 2016, 32(4): 361–365, 369 (in Chinese).
- 林贤东, 胡丹, 陈刚, 等. PI3K-AKT-mTOR 信号通路基因多态性与胃癌遗传易感相关性. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(4): 361–365, 369.
- [28] Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, et al. Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy. *Gastric Cancer*, 2007, 10(1): 45–51.
- [29] Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer*, 2006, 9(1): 44–49.
- [30] Lu Q, Aguilar BJ, Li MC, et al. Genetic alterations of δ -catenin/NPRAP/Neurojungin (*CTNND2*): functional implications in complex human diseases. *Hum Genet*, 2016, 135(10): 1107–1116.
- [31] Reynolds AB, Rocznik-Ferguson A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*, 2004, 23(48): 7947–7956.

(本文责编 陈宏宇)