DOI:10.16016/j.1000-5404.201507124

miR-378 对骨髓增生异常综合征细胞凋亡及增殖的影响

匡兴怡,魏春梅,张 涛,王 利 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血液内科)

[摘要] **目的** 研究 miR-378 对骨髓增生异常综合征 SKM-1 细胞凋亡和增殖的影响。**方法** 我们分别用 miR-378 重组慢病毒和阴性对照病毒感染 SKM-1 细胞。然后采用 CCK-8 检测 miR-378 对 SKM-1 细胞生长的影响,流式细胞仪检测各实验组细胞凋亡和周期情况,并用 Western blot 检测凋亡过程中的关键因子 cleaved-caspase-3 蛋白的表达。用生物信息学方法预测 miR-378 可能的靶基因,用 PCR 和 Western blot 进行初步验证。**结果** miR-378 慢病毒转染组的细胞增殖活性明显降低,流式细胞术检测 miR-378 组的细胞凋亡率为(12.90±3.72)%,明显高于阴性对照病毒转染组和空白对照组[(3.21±1.91)%、(2.78±1.04)%,$P<0.01$];miR-378 组的 G0/G1 期细胞增多,S 期细胞减少。同时,Western blot 结果显示 miR-378 过表达引起了 cleaved-caspase-3 的表达升高。用生物信息学方法预测抗凋亡蛋白基因 BCL2L2 为 miR-378 潜在的靶基因,并发现 miR-378 可以抑制 BCL2L2 蛋白的表达。**结论** miR-378 可以通过引起细胞凋亡和细胞周期阻滞来抑制 SKM-1 细胞的增殖,并降低 BCL2L2 蛋白的表达。

[关键词] 骨髓增生异常综合征;miR-378;细胞凋亡;BCL2L2
[中图法分类号] R394-33;R394.2;R551.302 [文献标志码] A

Effect of miR-378 on proliferation and apoptosis in myelodysplastic syndrome cells

Kuang Xingyi, Wei Chunmei, Zhang Tao, Wang Li (Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of miR-378 on apoptosis and proliferation in myelodysplastic syndrome SKM-1 cells. **Methods** SKM-1 cells were divided into 3 groups: SKM-1 cells transfected with lentiviral vector over-expressing miR-378 (miR-378 group), SKM-1 cells transfected with empty lentiviral vector (negative control group) and normal SKM-1 (blank control group). CCK-8 assay and Annexin V/7-AAD staining were conducted to detect the effect of miR-378 on the proliferation and apoptosis of SKM-1 cells. Then, Western blotting was performed to detect the expression of cleaved-capase-3 protein. Bioinformatics analysis was conducted to predict the potential target gene of miR-378, and quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and Western blotting were further confirm the target gene. **Results** After transfection with lentiviral vector over-expressing miR-378, the growth of SKM-1 cells in the miR-378 group was inhibited obviously. The apoptotic rate [(12.90 ± 3.72)%] in the miR-378 group was significantly higher than [(3.21 ± 1.91)%] in the negative control group and [(2.78 ± 1.04)%] in the blank control group ($P<0.01$). The percentage of SKM-1 cells in G0/G1 phase was increased and the percentage in S phase was decreased. Western blotting showed that overexpression of miR-378 resulted in up-regulation of cleaved-caspase-3. Moreover, BCL2L2 gene was predicted as potential target gene of miR-378, and overexpression of miR-378 reduced the expression of BCL2L2 protein. **Conclusion** miR-378 can inhibit proliferation of SKM-1 cells by inducing apoptosis and cell cycle arrest, and it also down-regulates the expression of BCL2L2 protein.

[**Key words**] myelodysplastic syndrome; miR-378; apoptosis; BCL2L2

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81250034) and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2013-2-023). Corresponding author: Wang Li, Tel: 86-23-89011532, E-mail: liwangls@yahoo.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81250034);重庆市卫生局科研项目(2013-2-023)
[通信作者] 王 利,电话:(023)89011532,E-mail:liwangls@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151203.1310.017.html(2015-12-03)

微小 RNA（miRNA）是一种单链的非编码小分子 RNA,长度通常为 19～22 个碱基。miRNA 可以通过促进靶 mRNA 的降解和/或抑制翻译过程而参与转录后的基因调控[1]。研究发现 miRNA 与肿瘤的发生、发展有着密切的联系,超过 50% 的 miRNA 基因位于肿瘤相关区域[2]。同时,miRNA 既可以发挥促癌因子的作用,也可以作为抑癌因子下调原癌基因的活性[3]。文献[4-5]报道,miR-378 在许多肿瘤组织中呈低表达并且发挥着抑癌因子的作用。Erdogan 等[6]最近发现,miR-378 在骨髓增生异常综合征（myelodysplastic syndromes, MDS）患者骨髓标本中的表达是明显降低的,这提示 miR-378 可能在 MDS 的分子发病过程中起着重要作用。本研究旨在利用 miR-378 重组慢病毒载体上调人 MDS 细胞株 SKM-1 细胞中 miR-378 的表达,观察 miR-378 对 SKM-1 细胞增殖和凋亡的影响,并初步探索 miR-378 在 SKM-1 细胞中的靶基因。

1 材料与方法

1.1 材料

人 MDS 细胞株 SKM-1 由华中科技大学附属同济医院周剑锋教授馈赠;大肠埃希菌 DH5α、293T 细胞由本实验室保存;含有 miR-378 的质粒、慢病毒载体系统（包括 pGC-GV 载体、质粒 pHelper1.0 和 pHelper2.0）由上海吉凯基因化学技术有限公司提供。胎牛血清、RPMI1640 培养基、DMEM 培养基购自美国 Gbico 公司; RNA 提取试剂 RNAiso Plus、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒均为日本 TaKaRa 公司产品;蛋白提取试剂 RIPA 裂解液、CCK-8 试剂购自上海碧云天生物研究所; cleaved-caspase-3 抗体和 BCL2L2 抗体购自美国 Immunoway 公司;T4 DNA 连接酶及限制性内切酶 *Age* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ购自 NEB 公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;质粒抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司;倒置荧光显微镜为德国 Leica 公司产品;荧光定量 PCR 仪、凝胶成像仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SKM-1 细胞和 T293 细胞分别用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基和 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO_2、相对湿度为 90% 的培养箱中培养。平均 2～3 d 传代 1 次。

1.2.2 慢病毒载体构建及包装 从含有目的基因的质粒上用限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 *Age* Ⅰ酶将 miR-378 初始转录本（pri-miR-378）的序列从载体上钓取下来。根据 pri-miR-378 的序列,设计合成 1 对引物: pri-miR-378 P1: CGGGTACCGGTACAGCTGGAGAAAGAGGCTG, pri-miR-378 P2:CGGAATTCAAAAAATTCTCTTGCGGCACCAC。利用 PCR 技术扩增目的片段后用 *Age* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切,在 DNA 连接酶介导下与同样双酶切的线性慢病毒载体 GV209 进行连接,连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α,阳性克隆进行 PCR 和测序鉴定。按 Lipofectamine 2000 说明书将重组慢病毒质粒 GV-miR-378 与慢病毒包装质粒 pHelper1.0、pHelper2.0 共转染 293T 细胞,培养 48h 后收集上清液,离心去除细胞碎片,将其浓缩过滤得到高滴度的慢病毒液,分装保存于 -80 ℃备用。取其中 1 管利用逐孔稀释法测定病毒滴度。

1.2.3 细胞转染 取对数生长期的 SKM-1 细胞,以 1×10^5 个细胞/每孔接种于 6 孔板中。24 h 后,慢病毒以 80 的感染复数（MOI 值）去感染 SKM-1 细胞,实验设置了 3 个组:miR-378 过表达慢病毒感染 SKM-1 细胞（miR-378 组）、阴性对照病毒感染 SKM-1 细胞（阴性对照组）和不加任何病毒的 SKM-1 细胞（空白对照组）。感染后 12 h 将病毒液换出,感染后第 6 天于倒置荧光显微镜下观察荧光强度,并用流式细胞仪检测感染效率。

1.2.4 实时定量逆转录多聚酶链反应（qRT-PCR）

用 RNAiso Plus 提取各组细胞的总 RNA。用特异性 miR-378 逆转录引物将 RNA 逆转录成 cDNA,反应条件如下:16 ℃ 退火 30 min,42 ℃ 反转录反应 45 min,85 ℃ 预变性 10 min。然后按说明书配制 10 μL 的 PCR 反应体系,并在 Bio-Rad CFX96 仪器上进行定量 PCR 扩增反应,每组设置 3 个复孔。miR-378 上游引物:5′-CTATTAAACGACTGGACTTGGAG-3′,下游引物:5′-TATGCTTGTTCTCGTC-TCTGTGTC-3′,扩增片段长度 76 bp;BCL2L2 上游引物:5′-GCCTTGTTCCTTCATCA-TCC-3′,下游引物:5′-TACCTAAGCCTCCACCCATC-3′,扩增片段长度为:111 bp。扩增条件为: 95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 30 s,40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组基因的相对表达量。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达 根据说明书用含有 1 μmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液提取各组细胞的总蛋白,并用 BCA 法测蛋白浓度。根据蛋白分子量大小配制相应浓度的 SDS-PAGE 凝胶,取 50 μg 蛋白进行电泳后用湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上,再用 5% 脱脂牛奶将膜封闭 2 h。按 1∶1 000 稀释一抗,在 4 ℃ 孵育 PVDF 膜过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。将 PVDF 膜与辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶7 000）孵育 1 h,接着洗膜,方法同前。用 ECL 化学发光法进行显影,最后用 Quantity one 软件分析条带灰度值。

1.2.6 Annexin V/7-AAD 双染法检测细胞凋亡

感染慢病毒后第6天,低速离心收集各组细胞,用预冷的PBS洗涤细胞2次后,加入500 μL Binding buffer重悬细胞,再加入5 μL Annexin V-PE及5 μL 7-AAD染液混匀,室温避光放置15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期 离心收集细胞后用PBS清洗2次,然后加入预冷的75%酒精4 ℃固定过夜,将固定好的细胞在含50 μg/mL RNA酶的PI染液中室温孵育30 min,用流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.2.8 CCK-8检测细胞增殖 取慢病毒感染后的SKM-1细胞,调整细胞密度至5×10^4个/mL,向每96孔中加入100 μL细胞液,实验分组同前,每组设置3个复孔。接下来连续4 d用CCK-8检测细胞增殖情况,简要地说,即向每孔加入CCK-8试剂10 μL,于37 ℃细胞培养箱内孵育2 h后,用酶标仪在450 nm波长下读取光密度值$D(450)$,并绘制出生长曲线。

1.3 统计学方法

所有数据用SPSS 20.0软件进行分析,数据结果以$\bar{x} \pm s$表示,两组间比较用t检验,多组间比较用单因素方差分析,多样本均数间两两比较用Bonferroni检验。

2 结果

2.1 成功构建重组慢病毒载体GV-miR-378

通过PCR扩增获得了大小为250 bp的目的片段,经过双酶切后用DNA连接酶将目的片段插入到GV209载体中,成功得到重组载体GV-miR-378。将重组阳性克隆进行测序,结果显示重组的慢病毒载体核苷酸链序列插入正确,无序列突变。

2.2 miR-378重组慢病毒在SKM-1细胞中转染效率的检测

GV-miR-378重组慢病毒感染SKM-1细胞6 d后检测其感染效率,在倒置荧光显微镜下可观察到明显的绿色荧光,流式细胞仪检测结果提示转染率大于70%,证明慢病毒载体GV-miR-378成功感染SKM-1细胞。

2.3 成功构建高表达miR-378的SKM-1细胞模型

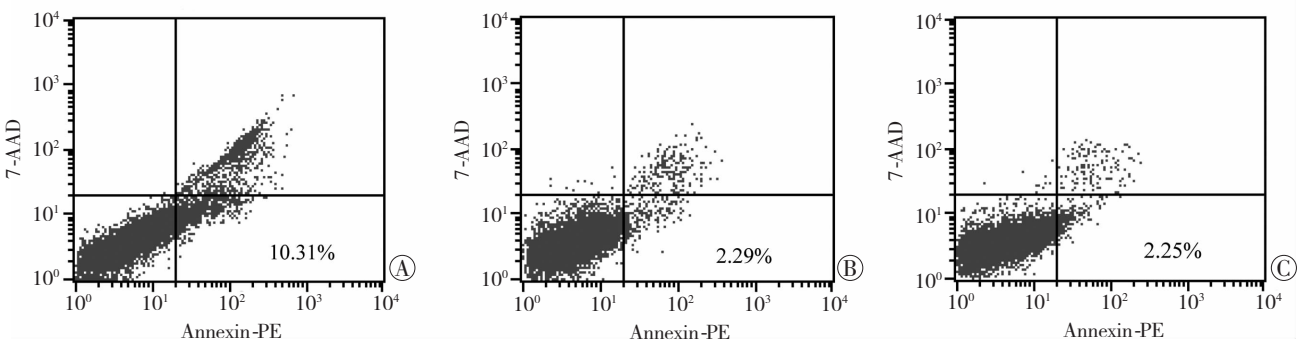
我们进一步用qRT-PCR检测各组细胞miR-378的表达,结果发现,GV-miR-378慢病毒感染组的miR-378表达量(3.10 ± 0.31)明显高于阴性对照组(1.18 ± 0.34)和空白对照组(1.00 ± 0.00),证明我们成功构建了高表达miR-378的SKM-1细胞模型,可进行下一步功能学实验。

2.4 过表达miR-378对SKM-1细胞生长的影响

用CCK-8检测各实验组细胞增殖情况,结果显示与阴性对照组和空白对照组相比,miR-378组细胞的生长速度明显减慢,miR-378组的光密度值在第3天为(0.549 ± 0.038),与阴性对照组(0.709 ± 0.026)和空白对照组(0.730 ± 0.033)相比,差异有统计学意义($P = 0.003$,$P = 0.002$);在第4天,miR-378的光密度值为(0.637 ± 0.053),明显低于阴性对照组(0.945 ± 0.044)和空白对照组(0.998 ± 0.050),以上结果说明过表达miR-378可以抑制SKM-1细胞的增殖。

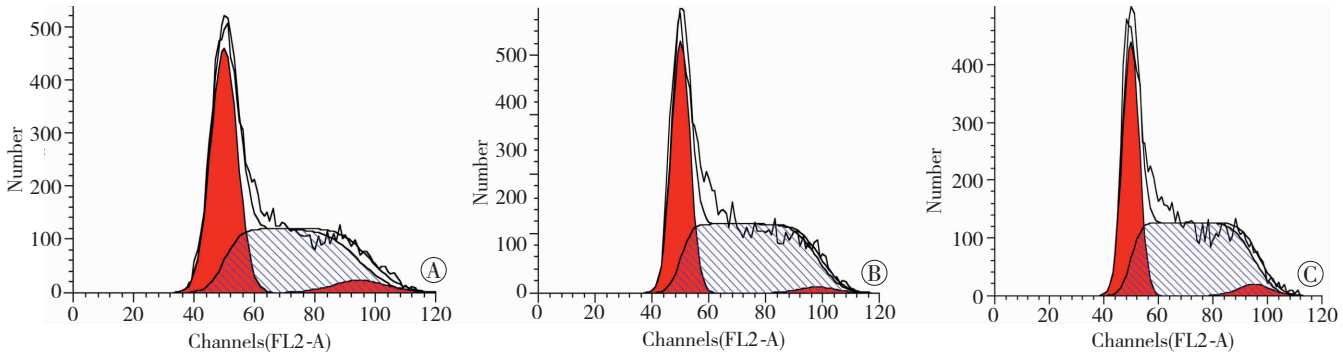
2.5 miR-378重组慢病毒对SKM-1细胞凋亡的影响

用Annexin V/7-AAD双染法检测细胞凋亡的情况,结果显示miR-378组细胞的凋亡率为(12.90 ± 3.72)%,明显高于阴性对照组和空白对照组[(3.21 ± 1.92)%和(2.78 ± 1.04)%,$P < 0.01$,图1],证明了miR-378可以促进SKM-1细胞的凋亡。



A: miR-378组;B: 阴性对照组;C: 空白对照组

图1 Annexin V/7-AAD双染法检测过表达miR-378对SKM-1细胞凋亡的影响



A：miR-378 组；B：阴性对照组；C：空白对照组

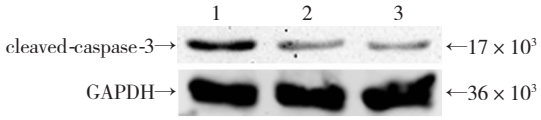
图 2 流式细胞仪检测 miR-378 对 SKM-1 细胞周期的影响

2.6 miR-378 对 SKM-1 细胞周期的影响

用流式细胞仪检测各组细胞周期分布情况，结果显示 miR-378 G0/G1 期细胞比例(48.31 ± 3.01)% 高于阴性对照组(38.09 ± 2.23)% 和空白对照组(36.91 ± 2.14)%，差异具有统计学意义(P = 0.007，P = 0.004)；而 miR-378 组 S 期细胞比例细胞比例为(49.21 ± 2.06%)，明显低于阴性对照组和空白对照组[(58.63 ± 1.80)% 和(59.44 ± 1.48)%，P < 0.01，图 2]。

2.7 Western blot 检测 cleaved-caspase-3 的表达

为进一步探索 miR-378 促进 SKM-1 细胞凋亡的机制，用 Western blot 检测各组细胞中 cleaved-caspase-3 的表达。结果显示，与阴性对照组和空白对照组相比，cleaved-caspase-3 的表达在 miR-378 组中明显升高(图 3)。

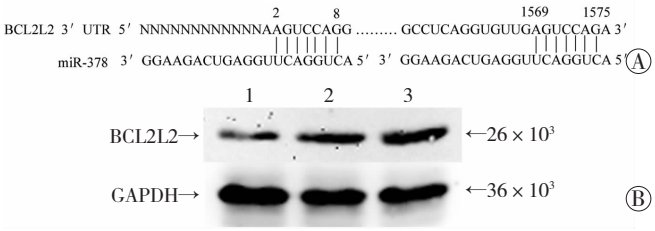


1：miR-378 组；2：阴性对照组；3：空白对照组

图 3 Western blot 检测各实验组中 cleaved-caspase-3 蛋白的表达

2.8 过表达 miR-378 对 BCL2L2 表达的影响

我们运用靶基因预测网站 Targetscan (http://www.targetscan.org/) 和 PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de/) 同时预测 miR-378 可能的靶基因，结果发现抗凋亡蛋白基因 BCL2L2 的 mRNA 3′UTR 区域与 miR-378 有两个结合位点(图 4A)。为探究 BCL2L2 在 SKM-1 细胞中是否为 miR-378 的靶基因，我们分别用 qRT-PCR 和 Western blot 检测各实验组中 BCL2L2 的表达水平。结果显示，miR-378 组 BCL2L2 mRNA 的表达量(0.95 ± 1.10)与阴性对照组(1.04 ± 0.09)和空白对照组(1.00 ± 0.00)相比，没有明显的差异(P = 0.741；P = 1.000)，而 miR-378 组中 BCL2L2 蛋白的表达是明显降低的(图 4B)。



1：miR-378 组；2：阴性对照组；3：空白对照组。A：BCL2L2 mRNA 3′UTR 区域与 miR-378 的两个结合位点；B：Western blot 检测结果

图 4 过表达 miR-378 对 BCL2L2 表达的影响

3 讨论

有文献[4,6]报道，miR-378 在肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用。但在不同类型的肿瘤中，miR-378 扮演着截然不同的角色，这说明 miR-378 的作用是复杂的。miR-378 在胃癌组织中呈低表达，它可以通过抑制 VEGF 的表达来发挥抑制癌因子的作用[4]；而在非小细胞肺癌和食管癌中，miR-378 呈高表达并且可以通过促进细胞的增殖、迁移而发挥促癌因子的作用[7-8]。Erdogan 等[6]应用基因芯片技术筛选 MDS 患者骨髓细胞中异常表达的 miRNA，结果他们发现 miR-378 的表达是最低，这提示着 miR-378 可能在 MDS 的发病中起着重要的作用。

在本项研究中，我们利用重组的慢病毒载体感染 SKM-1 细胞，并成功构建了高表达 miR-378 的 SKM-1 细胞模型。CCK-8 实验结果显示，过表达 miR-378 可以抑制 SKM-1 细胞增殖。我们进一步用流式细胞仪检测了各组细胞凋亡和周期情况，结果显示转染了 miR-378 过表达慢病毒后，SKM-1 细胞凋亡率明显增加，G0/G1 期细胞比例增加，S 期细胞比例降低。与我们的研究结果类似，Wang 等[5]的报道表明 miR-378 可以通过 CDC40 使结肠癌细胞周期阻滞在 G0/G1 期并抑制细胞的增殖。有趣的是，他们还发现 miR-378 过表达只能促进由药物介导的细胞凋亡，单独的 miR-

378 过表达对结肠癌细胞凋亡并无明显的影响。由此我们推测,miR-378 在 MDS 细胞中诱导凋亡的机制可能与结肠癌细胞中的不相同。此外,我们还检测了各组细胞中 cleaved-caspase-3 的表达。caspase-3 是细胞凋亡的主要执行者,无论是内源性凋亡通路或外源性凋亡通路最终都会激活 caspase-3 蛋白,使其剪切成为 cleaved-caspase-3,从而促使细胞凋亡的发生[9]。Western blot 结果显示 miR-378 组的 cleaved-caspase-3 表达升高,这与细胞凋亡过程中 caspase-3 的激活是一致的,从另一个侧面说明过表达 miR-378 可以促进 SKM-1 细胞凋亡的发生。以上结果证明 miR-378 在 MDS 细胞中发挥着抑癌因子的作用,与此类似,miR-378 在结肠癌和胃癌细胞中也发挥着抑癌因子的作用[4-5]。然而在一些肿瘤中,miR-378 却被证实为促癌因子[8,10],这种异质性可能是因为不同肿瘤细胞中 miR-378 的靶基因不相同所导致的。

我们用生物信息学方法去预测 miR-378 潜在的靶基因,结果提示 BCL2L2 为 miR-378 可能的靶基因之一,再利用 qRT-PCR 和 Western blot 进行验证,结果显示在 miR-378 过表达组中,BCL2L2 的表达仅在蛋白水平是降低的,这提示 miR-378 是通过抑制 BCL2L2 mRNA 的翻译而不是导致 mRNA 降解来下调 BCL2L2 蛋白的表达。BCL2L2 是 bcl-2 家族蛋白中的一员,该家族蛋白为一类凋亡过程中的重要调控因子,包含了抗凋亡蛋白(bcl-2,bcl-xl,BCL2L2,mcl-1 等)和促凋亡蛋白(bad,bak,bax,bid 等)[11]。已有研究表明,bcl-2 家族中抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白的比例在凋亡较多的 MDS 细胞中是降低的[12]。BCL2L2 在 MDS 患者中是普遍表达的[13],它可以通过与 bcl-2 家族中的促凋亡蛋白 bak 和 bad 直接结合来抑制内源性凋亡通路[14]。除此之外,BCL2L2 还可以促进肿瘤细胞的侵袭和生长,并抑制癌细胞的凋亡[15-16]。因此,BCL2L2 及其信号通路可能是 miR-378 在 SKM-1 细胞中发挥抑制作用的重要机制之一。如前所述,miR-378 可以靶向作用于 CDC40 来影响结肠癌细胞周期,至于 miR-378 在 MDS 细胞中是否也是通过 CDC40 来影响细胞周期有待进一步证明。

综上所述,我们利用 GV-miR-378 重组慢病毒载体成功构建了高表达 miR-378 的 SKM-1 细胞模型,并证明了 miR-378 可以抑制 SKM-1 细胞的生长,促进 SKM-1 细胞凋亡,并使细胞周期阻滞在 G0/G1 期。我们还证明了 BCL2L2 为 miR-378 的一个靶基因,这可能是 miR-378 在 MDS 细胞中发挥作用的重要机制之一。

参考文献:

[1] Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential [J]. Cell, 2001, 107(7): 823-826.

[2] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, *et al*. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(9): 2999-3004.

[3] Zhang B, Pan X, Cobb G P, *et al*. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12.

[4] Deng H, Guo Y, Song H, *et al*. MicroRNA-195 and microRNA-378 mediate tumor growth suppression by epigenetical regulation in gastric cancer[J]. Gene, 2013, 518(2): 351-359. DOI:10.1016/j.gene.2012.12.103

[5] Wang K Y, Ma J, Zhang F X, *et al*. MicroRNA-378 inhibits cell growth and enhances L-OHP-induced apoptosis in human colorectal cancer[J]. IUBMB life, 2014, 66(9): 645-654. DOI:10.1002/iub.1317

[6] Erdogan B, Facey C, Qualtieri J, *et al*. Diagnostic microRNAs in myelodysplastic syndrome[J]. Exp Hematol, 2011, 39(9): 915-926.e2.

[7] Lee D Y, Deng Z, Wang C H, *et al*. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(51): 20350-20355.

[8] Yu B L, Peng X H, Zhao F P, *et al*. MicroRNA-378 functions as an onco-miR in nasopharyngeal carcinoma by repressing TOB2 expression[J]. Int J Oncol, 2014, 44(4): 1215-1522. DOI:10.3892/ijo.2014.2283

[9] Lee H G, Lee J M, Shin S J, *et al*. Salinomycin inhibited cell proliferation and induced apoptosis in human uterine leiomyoma cells[J]. Obstet Gynecol Sci, 2014, 57(6): 501-506.

[10] Luo L, Ye G, Nadeem L, *et al*. MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal[J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 13): 3124-3132.

[11] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. Science, 1998, 281(5381): 1322-1326.

[12] Parker J E, Mufti G J, Rasool F, *et al*. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS[J]. Blood, 2000, 96(12): 3932-3938.

[13] Economopoulou C, Pappa V, Kontsioti F, *et al*. Analysis of apoptosis regulatory genes expression in the bone marrow (BM) of adult de novo myelodysplastic syndromes (MDS)[J]. Leuk Res, 2008, 32(1): 61-69.

[14] Yan W, Samson M, Jegou B, *et al*. Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(5): 682-699.

[15] Xu Y, Zhao F, Wang Z, *et al*. MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-w and specificity protein 1[J]. Oncogene, 2012, 31(11): 1398-1407. 10.1038/onc.2011.340

[16] Lee H W, Lee S S, Lee S J, *et al*. Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation[J]. Cancer Res, 2003, 63(5): 1093-1100.

(**收稿**:2015-07-21;**修回**:2015-09-22)

(编辑 王 红)