DOI:10.16016/j.1000-5404.201605026

miRNA-32 通过下调 PTEN 表达促进食管癌细胞的增殖

刘华松[1],徐兰兰[2],张 军[1],郭家龙[1],林称意[1],原 野[1],曾 敏[1],程栋梁[1] (442000 湖北 十堰,十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)胸心大血管外科[1];442000 湖北 十堰,湖北医药学院护理学院[2])

[摘要] **目的** 通过检测 miR-32 在食管癌组织和食管癌细胞系中的表达,探讨 miR-32 对食管癌增殖和凋亡的影响及分子机制。**方法** 使用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)检测 47 例食管癌组织和 7 种食管癌细胞系中 miR-32 表达水平;生物信息学预测 miR-32 下游靶基因磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homologue,PTEN),并通过荧光素酶报告基因法验证其结合状态;通过 miR-32 mimics 来研究其对 PTEN 的 mRNA 和蛋白表达的影响及其对食管癌细胞系 KYSE-410 增殖和凋亡的影响;通过 PTEN 回补实验进一步验证 miR-32 对其的作用。**结果** 89%(42/47)的食管癌肿瘤组织中 miR-32 表达明显上调,在低分化的食管癌细胞系 KYSE-410 中表达程度最高($P<0.05$);生物信息学预测 miR-32 可靶向作用于 PTEN,高表达 miR-32 可明显抑制 PTEN 3'UTR 荧光素酶活性($P<0.05$);高表达 miR-32 可明显促进 KYSE-410 增殖,并抑制其凋亡,抑制率 28%($P<0.05$);高表达 miR-32 对 PTEN mRNA 表达无明显影响($P>0.05$),但可明显抑制其蛋白表达,抑制率 48%($P<0.05$);相较于 miR-32 单独处理组,PTEN 补救实验可部分恢复 PTEN 蛋白的表达,同时也可逆转其对凋亡的抑制作用,此外,在 96 h 组可明显抑制食管癌细胞增殖($P<0.05$),在其他时间点与 miR-32 组无明显差异($P>0.05$)。**结论** miR-32 可通过下调 PETN 的表达促进食管癌细胞的增殖。

[关键词] 食管癌;miR-32;磷酸酶-张力蛋白基因;增殖

[中图法分类号] R394.3;R730.23;R735.1 [文献标志码] A

MicroRNA-32 promotes proliferation *via* downregulation of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in esophageal carcinoma cells

Liu Huasong[1], Xu Lanlan[2], Zhang Jun[1], Guo Jialong[1], Lin Chengyi[1], Yuan Ye[1], Zeng Min[1], Cheng Dongliang[1] ([1]Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Shiyan Taihe Hospital, the Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine;[2]School of Nursing, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, 442000)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and mechanism of microRNA-32 (miR-32) regulation on the proliferation and apoptosis of esophageal carcinoma (EC) cell line KYSE-410. **Methods** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression level of miR-32 in EC tissues of 47 patients and 7 EC cell lines. Dual-luciferase reporter assay was used to exam the binding site of 3′ UTR-PTEN to miR-32, which PTEN was theoretically predicted as downstream target of miR-32 by TargetScan database. KYSE-410 cells were either transfected with miR-32 mimics alone or co-transfected with miR-32 and constructed PTEN plasmid for PTEN rescue experiment. The regulation role of miR-32 on PTEN mRNA and protein expression, proliferation and apoptosis were assessed by Western blotting, MTT assay and Annexin V-FITC apoptosis detection kit, respectively. PTEN rescue experiment was used to validate the effect of miR-32 on PTEN expression. **Results** The expression of miR-32 was significantly increased in 89% (42/47 patients) EC tissues compared with corresponding adjacent normal tissues, and was highest in low

[通信作者] 张 军, E-mail:zhjun159@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160630.1305.003.html

differentiated KYSE-410 cells ($P<0.05$). Dual-luciferase reporter assay showed that upregulation of miR-32 decreased luciferase activity of 3′ UTR-PTEN, suggesting that PTEN was the functional downstream target of miR-32. In KYSE-410 cells, overexpression of miR-32 promoted the proliferation, inhibited the apoptosis (inhibitory rate 28%, $P<0.05$), and suppressed PTEN protein expression (inhibitory rate 48%, $P<0.05$), but had no change in mRNA level. Compared to cells transfected with miR-32 mimics alone, co-transfected cells (PTEN + miR-32 mimics) could partly reverse the inhibitory effect of miR-32 on PTEN protein expression and apoptosis. The proliferation rate was significantly decreased at 96 h, and no differences were seen at other measured time points between PTEN + miR-32 and miR-32 transfected KYSE-410 cells. **Conclusions** MiR-32 can promote the proliferation of esophageal carcinoma at least in part by suppression of PTEN expression.

[**Key words**] esophageal carcinoma; miRNA; phosphatase and tensin homologue (PTEN); proliferation

Corresponding author: Zhang Jun, E-mail: zhjun159@sina.com

食管癌是临床常见肿瘤之一,在我国发病率和病死率均较高[1-2],其形成过程中牵涉到一系列基因和表观遗传学变化,具体机制研究不清。近年来的研究在分子生物学水平上取得了很大的进展,发现了许多重要的分子事件,但仍不能有效地做到早期检测、早期诊断和特异性治疗[3]。微小RNA(microRNA,miRNA)是小的非编码RNA,通过在转录水平抑制蛋白翻译或者降解mRNA来调节基因的表达。miRNA可参与凋亡、维持细胞分化、发育以及肿瘤形成等多个过程。最近的研究表明,异常的miRNA表达在肿瘤的形成过程中具有重要作用[4-6]。miR-32已被证实在结肠癌[7]、前列腺癌[8]、非小细胞肺癌[9]等恶性肿瘤中表达上调,并具有致癌作用;但其在食管癌中的表达情况以及功能研究较少[10-11]。

磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homologue,PTEN)是常见的一种抗癌基因,并且在人类肿瘤中经常突变。在结肠癌的研究中发现PTEN的低表达和肿瘤的预后不佳有关。PETN是PI3K/AKT通路的负性调节分子,PTEN突变-PI3K/AKT激活可能是引起肿瘤形成的重要机制之一[12]。生物信息学分析显示miR-32具有和PTEN 3-′UTR结合的序列。但是,在食管癌中miR-32能否引起PTEN表达异常从而促进肿瘤发生发展尚不明确。本实验旨在研究miR-32在食管癌组织和细胞系中的表达情况,高表达miR-32对食管癌细胞增殖凋亡的影响以及从PTEN角度进行机制探讨。

1 材料与方法

1.1 食管癌组织标本、细胞系

组织标本来自我院2014年1月至2015年12月手术切除的食管癌患者47例。年龄39~70岁,中位年龄57岁;男性32例,女性15例;分化程度:高分化15例,中分化20例,低分化12例;肿瘤浸润深度:黏膜下层6例,肌层12例,外膜层29例;淋巴结转移:无转移24例,有转移23例。实验组为肿瘤组织,对照组为对应癌旁组织(距肿瘤边缘超过2 cm)。组织取材病理证实为鳞状细胞癌后立即液氮保存。本实验中患者均签署知情同意书,并经我院伦理委员会审批通过。人食管癌细胞系KYSE-30、KYSE-70、KYSE-140、KYSE-180、KYSE-220、KYSE-410、KYSE-510及正常食管上皮细胞HEEC均由本实验室保存。

1.2 主要试剂

DMEM培养基(美国Hyclone公司);胎牛血清(美国Hyclone公司);TRIzol(TaKaRa公司);反转录试剂盒(TaKaRa公司);定量PCR试剂盒(TaKaRa公司);荧光素报告基因表达质粒和荧光素报告基因检测试剂盒(美国Promega公司);PVDF膜(德国Merk Millipore公司);辣根过氧化物酶标记的二抗(美国Jackson公司);蛋白印迹相关试剂(江苏碧云天);β-actin多克隆抗体(美国Santa Cruz公司);PTEN抗体(英国Abcam公司);MTT(Emresco公司);Annexin V凋亡试剂盒(中国Beyotime公司)

1.3 细胞培养及试剂

食管癌细胞系KYSE-30、KYSE-70、KYSE-140、KYSE-180、KYSE-220、KYSE-410、KYSE-510使用DMEM培养基培养,同时辅助加入10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素,培养温度37 ℃,含5% CO_2。miR-32 mimics以及miR-32 mimics阴性对照、PTEN高表达质粒购自RiboBio(中国)。

1.4 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)

肿瘤组织 RNA 提取:液氮研磨至粉状,加入 1 mL TRIzol 混匀,室温作用 15 min;细胞 RNA 提取:培养细胞至融合 80%,弃去培养基并洗涤,加入 1 mL TRIzol,充分裂解后转入 EP 管中。

根据 TRIzol 提取 RNA 的方法依次加入氯仿、异丙醇、75% 乙醇提取 RNA,测 D 值确定 RNA 浓度,$D(260)/D(280)$ 在 1.8 ~ 2.2。RNA 反转录合成 cDNA 反应按照 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒要求先去除基因组 DNA,再反转录成 cDNA,-80 ℃保存。

设计 miR-32 引物,miR-32-上游:5′-CGGTATTGCACATTACTAAGTTGCA-3′;miR-32-下游:5′-CTCGCTTC-GGCAGCACA-3′。根据 SYBR® Premix *Ex Taq* Ⅱ法测定 miR-32 相对表达量,U6 基因作为内参对照。反应使用 ABI 7500 Fast,反应条件为 95 ℃,30 s,1 个循环预变性;然后 95 ℃,3 s,60 ℃,30 s,共 40 个循环。用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算相对表达量。所有实验重复 3 次。

1.5 细胞转染

研究 miR-32 的功能是通过用 miR-32 mimics 及其阴性对照(100 nmol/L)处理食管癌细胞 KYSE-410 来实现的,实验分为 3 组:miR-32 mimics 组(miR-32 mimics 转染)、miR-32 mimics-NC 组(阴性对照干扰)、blank control 组(未做处理)。PTEN 补救实验首先构建 PTEN 高表达质粒,用 PTEN 高表达质粒和 miR-32 mimics 共同处理 KYSE-410 细胞,实验分为三组:miR-32 组(miR-32 mimics 转染)、miR-32 + PTEN 组(miR-32mimics 和 PTEN 高表达质粒共同处理)、blank control 组(未做处理)。

1.6 荧光素酶报告基因

用 PCR 扩增获得 PTEN-3′UTR,构建报告基因质粒(RiboBio,中国)。设计引物,其中 PTEN-3′UTR-wt-上游:5′-CCGCTCGAGTTATTATTTTTCCTTTGGAATGTGAAGG-3′,PTEN-3′UTR-wt-下游:5′-GAATGCGGCCGCTGACAAGAATGAGACTTTAATCAGTTTT-3′,PTEN-3′UTR-mut-上游:5′-ATTTTGCTCCTAATTGTTCATAACGATGGCTG-3′,PTEN-3′ UTR-mut-下游:5′-TGAACAATTAGGAGCAAAATTTCTAGAACTAAACATT-3′。以上构建的载体分别命名为 PTEN-wt 和 PTEN-mut。将 KYSE-410 食管癌细胞培养在 24 孔板中,分别转染 500 ng PTEN-wt 和 PTEN-mut,并用 100 nmol/L miR-32 mimics 或者其阴性对照处理细胞。转染 48 h 后,收集细胞,根据操作说明测定荧光素酶活性。所有实验重复 3 次。

1.7 qRT-PCR 法检测 miR-32 和 PTEN mRNA 表达

转染的细胞培养 48 h 后提取 RNA 并反转录,根据之前的方法测定 miR-32 的相对表达量。对于 PTEN,计算其相对于 β-actin 的表达量。PTEN -上游:5′-GAGGGATAAAACACCATG-3′;PTEN-下游:5′-AGGGGTAGGATGTGAACCAGTA-3′;β-actin-上游:5′-CAGAGCCT-CGCCTTTGCC-3′;β-actin-下游:5′-GTCGCCCACATAGG-AATC-3′。根据 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算相对表达量。所有实验重复 3 次。

1.8 蛋白印迹法(Western blot)

转染的细胞培养 72 h 后收集,提取蛋白进行定量检测。根据蛋白提取步骤提取蛋白,并用 BCA 法测定蛋白浓度。总蛋白用 SDS-PAGE 胶得以分离,并电转至 PVDF 膜上。脱脂牛奶封闭非特异性位点,PTEN 单抗(1∶500)孵育,4 ℃过夜,对照用 β-actin 抗体(1∶2 000)孵育,4 ℃过夜;TBST 洗涤 3 遍后孵育二抗(1∶1 000),室温 1 h,TBST 洗涤 3 遍,用 ECL 发光法检测蛋白表达情况。所有实验重复 3 次。

1.9 MTT 法

通过 MTT 法检测有活性的细胞数。KYSE-410 食管癌细胞种植在 96 孔板中,分为 miR-32 mimics 组(miR-32 mimics 转染)、miR-32 mimics-NC 组(空白干扰组)、blank control 组(未做处理),分别作用 24、48、72、96 h。在不同时间点,每孔分别加入 20 μL 5 mg/mL MTT,37 ℃孵育 4 h;弃去上清,加入 200 μL DMSO 溶解蓝紫色沉淀。在 570 nm 处分别测定每孔吸光度。所有实验重复 3 次。

1.10 凋亡检测

凋亡检测使用 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒。分别用 miR-32 mimics 以及其阴性对照转染 KYSE-410,孵育 72 h 后收集细胞,根据凋亡试剂盒说明书进行操作。实验结果使用流式检测并分析,通过流式可将细胞分为活细胞、坏死细胞和凋亡细胞,分别计算每组凋亡细胞比例。实验结果重复 3 次。

1.11 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 19.0 软件进行分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式呈现。两组之间比较均通过 t 检验来实现;对于配对资料,采用配对 t 检验来计算。

2 结果

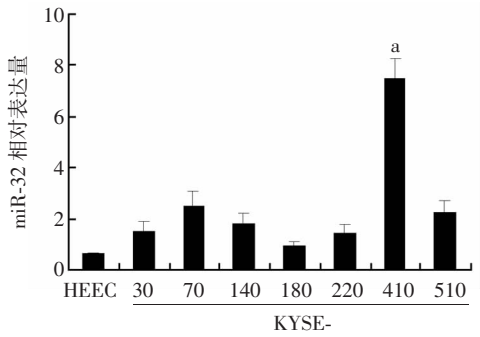
2.1 食管癌组织和食管癌各细胞系中 miR-32 的表达情况

食管癌组织 miR-32 qRT-PCR 结果显示:相较于

癌旁组织(1.63 ±0.44),肿瘤组织(4.66 ±2.07)中miR-32表达量明显上调,升高2.85倍($P<0.05$);其中89%(42/47)食管癌患者肿瘤组织中miR-32表达明显上调,差异具有统计学意义($P<0.05$),其余11%(5/47)差异无统计学意义($P>0.05$)。食管癌细胞系miR-32 qRT-PCR结果显示,与正常食管上皮细胞系HEEC(0.6 ±0.1)相比,KYSE-410中miR-32表达量最高(7.5 ±0.8),差异具有统计学意义($P<0.05$,图1)。

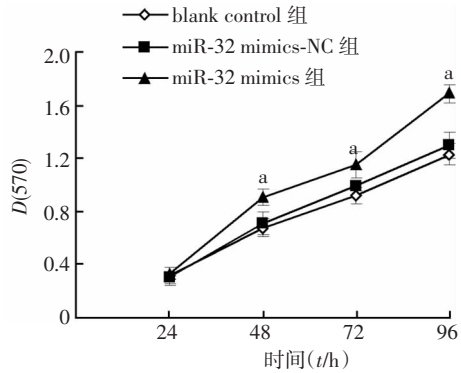
2.2　miR-32对食管癌细胞增殖和凋亡的影响

凋亡实验结果显示,miR-32 mimics可明显抑制KYSE-410的凋亡,抑制率为28%($P<0.05$)。同时,在MTT实验中,miR-32 mimics组48、72、96 h的增殖活性均明显高于相应时间点miR-32 mimics-NC组和blank control组($P<0.05$,图2)。以上数据说明,miR-32可明显促进食管癌细胞的增殖,同时抑制其凋亡。



a:$P<0.05$,与HEEC比较

图1　qRT-PCR检测7种食管癌细胞系中miR-32表达情况



a:$P<0.05$,与miR-32 mimics-NC组和blank control组比较

图2　miR-32对食管癌细胞KYSE-410增殖的影响

2.3　miR-32作用靶位点的预测以及其对PTEN 3'-UTR荧光素酶活性的影响

通过TargetScan(http://www.targetscan.org)数据库预测PTEN可以作为miR-32的靶基因。荧光素酶报告基因结果表明:miR-32 mimics可明显抑制野生型PTEN-wt的荧光素酶报告活性,与阴性对照组相比下调37%($P<0.05$);而miR-32对突变型PTEN-mut载体的荧光素酶活性无明显抑制作用($P>0.05$)。实验结果和软件预测一致,表明miR-32可与PTEN结合。

2.4　miR-32对靶基因PTEN mRNA和蛋白表达的影响

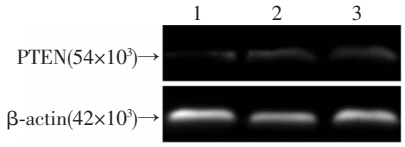
PTEN qRT-PCR结果显示,相较于miR-32 mimics-NC组和blank control组,miR-32转染后PTEN mRNA的表达无明显变化($P>0.05$,表1),说明miR-32对PTEN的转录无明显抑制。PTEN Western blot结果显示,相较于miR-32 mimics-NC组和blank control组,miR-32mimics组PETN蛋白表达明显下调48%($P<0.05$,表1、图3)。以上结果说明,miR-32主要通过转录后途径抑制PETN蛋白的表达,对其mRNA转录无明显影响。

表1　miR-32对PTEN蛋白和mRNA表达水平的影响

($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	PTEN mRNA	PTEN蛋白
miR-32 mimics组	0.99 ±0.08	0.52 ±0.02
miR-32 mimics-NC组	1.05 ±0.05	1.02 ±0.05[a]
阴性对照组	0.96 ±0.03	1.00 ±0.05[a]

a:$P<0.05$,与miR-32 mimics组比较

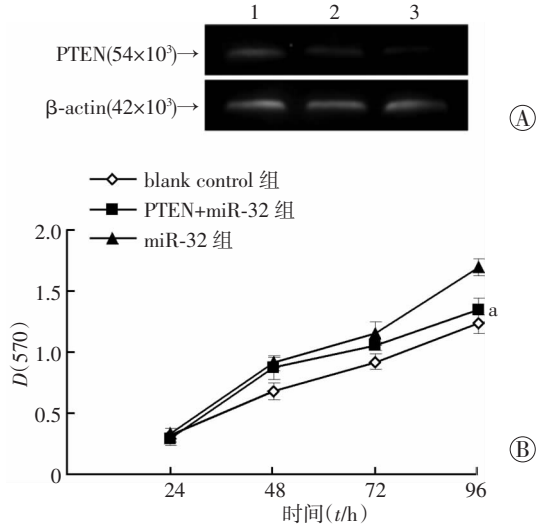


1:miR-32 mimics组;2:miR-32 mimics NC组;3:blank Control组

图3　Western blot检测miR-32对PTEN蛋白表达水平的影响

2.5　PTEN高表达对食管癌细胞增殖和凋亡的影响

为了进一步验证miR-32对PTEN的调控以及PTEN在食管癌细胞KYSE-410增殖和凋亡中的作用,我们进行了PTEN补救实验。Western blot结果显示,相较于miR-32单独处理组,PTEN + miR-32组PTEN蛋白表达水平部分恢复,但低于blank control组($P<0.05$,图4A)。凋亡结果显示,相较于miR-32单独处理组,PTEN + miR-32组凋亡率明显升高,但低于blank control组($P<0.05$)。MTT结果显示,相较于miR-32单独处理组,PTEN + miR-32组细胞增殖在24、48、72 h没有明显差异($P>0.05$),在96 h明显降低($P<0.05$,图4B)。以上结果说明,PTEN回补能部分恢复miR-32对食管癌细胞的作用。



A:Western blot 检测结果 1:miR-32 组;2:miR-32 + PTEN 组;3:blank control 组;B:MTT 检测结果 a: $P<0.05$,与 miR-32 组比较

图 4 PTEN 高表达对食管癌细胞 PTEN 蛋白和细胞增殖的影响

3 讨论

miRNAs 是一种小非编码 RNAs,主要通过转录后水平调节相应蛋白的表达。大量的研究表明,肿瘤中异常表达的 miRNAs 跟原癌基因、抑癌基因的表达以及对化疗、放疗的反应性密切相关[13]。因此,筛选出肿瘤特异性 miRNAs 及其靶基因对于理解其在肿瘤发生发展中的作用以及特异性靶向治疗具有重要意义。研究发现 miR-32 在很多恶性肿瘤中均明显上调,如肾癌、前列腺癌等。Jalava 等[14]发现 miR-32 可通过作用于具有抑制增殖的转录因子 BTG2,从而抑制肿瘤细胞的凋亡。Elzbieta 等[15]发现阻断 miR-32 可明显上调促凋亡因子 Bim 的表达,并且可增加急性髓系白血病细胞对化疗的敏感性。这些结果均说明 miR-32 是一种重要的癌基因。但目前在食管癌的研究中,miR-32 在食管癌中的表达水平以及其在食管癌发生发展的机制鲜有报道。

本实验集中研究 miR-32 在食管癌中的表达水平和功能,并探讨了其影响食管癌异常生物学功能的可能机制。首先,我们发现在 47 例食管癌患者肿瘤组织中 miR-32 表达明显增高。进一步在食管癌细胞系中验证出相似的结果,并且在低分化细胞系 KYSE-410 中 miR-32 增高最明显。以上结果提示 miR-32 和肿瘤的某些生物学功能密切相关。基于以上研究,我们选取 KYSE-410 细胞系进行 miR-32 的功能学研究。结果显示 miR-32 可促进 KYSE-410 的增殖,同时抑制其凋亡,这些结果跟 miR-32 在其他肿瘤中结果类似[7,9,14]。

为了进一步阐明 miR-32 引起相应生物学功能分子机制,我们选取了 PTEN 作为主要研究对象,主要因为生物信息学预测发现 miR-32 可靶向作用于 PTEN,并且 PTEN 是一类重要的抑癌基因。PTEN 基因位于人 10 号染色体长臂 2 区 3 带,其主要下游靶分子是磷脂酰肌醇-3,4,5,-三磷酸(PIP3)[16]。PTEN/PI3K/Akt 通路在肿瘤发生过程中起重要作用[17]。PTEN 可通过阻断 PI3K/Akt 通路来抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭转移;在这一过程中,被 PTEN 去磷酸化的 PI3K 可抑制 Akt 通路,Akt 通过调节下游蛋白来促进细胞增殖并抑制凋亡。因此,PTEN 的改变可影响细胞增殖、凋亡、侵袭转移和血管形成等多个过程。除此以外,PTEN 的表达水平可预测 EGF 受体阻断剂西妥昔单抗的抗肿瘤活性[18]。因而,PTEN 是抗肿瘤治疗的关键分子。

我们的研究表明,PTEN 是 miR-32 的下游靶分子,并且其相互作用在食管癌发生过程中具有重要作用。首先通过过表达 miR-32 我们发现其可明显促进肿瘤细胞增殖,同时抑制其凋亡。生物信息学预测 PTEN 是 miR-32 下游靶基因,荧光素酶报告基因实验显示 miR-32 可直接结合靶基因 PTEN。然后,通过过表达 miR-32 发现 PTEN mRNA 表达无明显变化,但蛋白表达明显降低;进一步通过 PTEN 补救实验发现 PTEN 回补只能部分恢复 miR-32 对食管癌细胞的作用,推测 miR-32 可能还调控其他通路影响食管癌细胞的增殖和凋亡。

我们的结果发现 miR-32 在食管癌中的表达情况,明确 miR-32 在其发生发展中的作用,并在机制角度阐明抑癌基因 PTEN 是 miR-32 下游作用靶基因之一,为明确 miRNAs 在食管癌发生发展中的作用以及特异性诊断治疗提供新思路。

参考文献:

[1] Napier K J, Scheerer M, Misra S. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities[J]. World journal of gastrointestinal oncology, 2014, 6(5): 112 - 120. DOI: 10.4251/wjgo.v6.i5.112

[2] 王道猛,钱斌,吴俊,等. 胸腹腔镜联合治疗食管癌的临床价值[J]. 中华消化外科杂志, 2015, 14(12): 1012 - 1015. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673 - 9752.2015.12.007

[3] 赫捷, 邵康. 中国食管癌流行病学现状、诊疗现状及担任中华未来对策[J]. 中国癌症杂志, 2011(7): 501 - 504. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2011.07.001

[4] Farazi T A, Hoell J I, Morozov P, *et al*. MicroRNAs in Human

Cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 774: 1 – 20. DOI: 10.1007/978-94-007-5590-1_1

[5] 韩超, 王健东. 非编码微小 RNA 在胆囊癌中的表达及功能[J]. 中华消化外科杂志, 2015, 14(10): 877 – 880. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673 – 9752.2015.10.021

[6] 邓曦, 吴敬波. 微 RNAs 与肝癌关系的研究进展[J]. 中华消化外科杂志, 2015, 14(5): 431 – 433. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673 – 9752.2015.05.018

[7] Wu W, Yang J, Xiao F, *et al*. MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells[J]. Molecular Cancer, 2013, 12(2): 186 – 195. DOI: 10.1186/1476-4598-12-30

[8] Latonen L, Scaravilli M, Zhang F, *et al*. *In vivo* role of miR-32 in prostate cancer[J]. Cancer Research, 2015, 75(15 Supplement): 3061 – 3061. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2015-3061

[9] Dan Z, Hui C, Yang X, *et al*. miR-32 functions as a tumor suppressor and directly targets SOX9 in human non-small cell lung cancer[J]. Oncotargets & Therapy, 2015, 8: 1773 – 1783. DOI: 10.2147/OTT.S72457

[10] 王光, 陆业婷, 石志来. microRNA -21 预测食管癌放疗敏感性和预后的意义[J]. 现代肿瘤医学, 2015(22): 3259 – 3261. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2015.22.015

[11] 刘涛, 张春, 杨晨晨, 等. miR-21 对食管癌移植瘤模型的作用研究[J]. 新疆医科大学学报, 2015(12): 1461 – 1465. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2015.12.001

[12] Tzenaki N, Papakonstanti E A. p110δ PI3 kinase pathway: emerging roles in cancer[J]. Frontiers in oncology, 2012, 3: 40 – 40. DOI: 10.3389/fonc.2013.00040

[13] Hummel R, Sie C, Watson D I, *et al*. MicroRNA signatures in chemotherapy resistant esophageal cancer cell lines[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(40): 14904 – 14912. DOI: 10.3748/wjg.v20.i40.14904

[14] Jalava S E, Urbanucci A, Latonen L, *et al*. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer[J]. Oncogene, 2012, 31(41): 4460 – 4471. DOI: 10.1038/onc.2011.624

[15] Elzbieta G, Xuening W, Xiuping L, *et al*. MicroRNA-32 upregulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in human myeloid leukemia cells leads to Bim targeting and inhibition of AraC-induced apoptosis[J]. Cancer Research, 2011, 71(19): 6230 – 6239. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1717

[16] Yang J M, Nguyen H N, Sesaki H, *et al*. Engineering PTEN function: Membrane association and activity[J]. Methods, 2015, 77: 119 – 124. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.10.018

[17] Carnero A, Paramio J M. The PTEN/PI3K/AKT Pathway *in vivo*, Cancer Mouse Models[J]. Frontiers in Oncology, 2014, 4: 252. DOI: 10.3389/fonc.2014.00252

[18] Razis E, Pentheroudakis G, Rigakos G, *et al*. EGFR gene gain and PTEN protein expression are favorable prognostic factors in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab[J]. Journal of cancer research and clinical oncology, 2014, 140(5): 737 – 748. DOI: 10.1007/s00432-014-1626-2

(**收稿**:2016-04-14;**修回**:2016-06-14)

(编辑 栾 嘉)