

过表达 miR-18a 靶向 ATM 对结肠癌细胞增殖和迁移的影响

刘明佳, 陈利弘, 胡开锋, 杨晓龙, 董婧颖, 刘 戟[△]

四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 研究 miR-18a 通过靶基因共济失调-毛细血管扩张突变基因 (ataxia telangiectasia mutated gene, ATM) 调控结肠癌细胞的生物学特性。**方法** 通过软件预测 miR-18a 其中一个靶基因。设计合成 miR-18a 的模拟剂(mimics)和抑制剂(inhibitor), 通过转染不同组分上调或下调内源性 miR-18a 在结肠癌细胞株 HCT116 中的表达。采用实时荧光定量(qRT)-PCR、Western blot、MTT 法、克隆形成实验、Transwell 等方法, 检测过表达 miR-18a 调控 ATM 基因的表达对体外结肠癌细胞增殖及迁移能力的影响。**结果** 软件预测发现 miR-18a 的其中一个靶基因是 ATM。通过瞬时转染, 过表达内源性 miR-18a, 可降低 HCT116 细胞内靶基因 ATM 蛋白的表达水平。转染 miR-18a mimics 后能够下调 HCT116 细胞的增殖活力, 同时显著降低 HCT116 细胞的克隆形成能力、横向迁移能力及纵向侵袭能力, 以上各项改变均与 miR-18a 过表达有关。**结论** 证实了 miR-18a 通过负向调控 ATM 的表达, 抑制结肠癌细胞 HCT116 的增殖和迁移能力。

【关键词】 miR-18a ATM 增殖 迁移 结肠癌细胞 HCT116

Study on the Effect of Overexpression of miR-18a on Cellular Proliferation and Migration by Targeting ATM in Human Colorectal Cancer Cells LIU Ming-jia, CHEN Li-hong, HU Kai-feng, YANG Xiao-long, DONG Jing-ying, LIU Ji[△]. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: liuji6103@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the regulation to colon cancer cellular biological properties through miR-18a targeting ataxia-telangiectasia mutated gene (ATM). **Methods** A target of miR-18a was predicted by using bioinformatics tools. The miR-18a mimics and inhibitors were designed and synthesized. The expression of endogenous miR-18a in colon cancer cell line HCT116 was up-regulated or down-regulated by transfection. The effect of overexpression of miR-18a on cellular proliferation, invasion and migration via regulation of ATM gene expression was confirmed *in vitro* by using qRT-PCR, Western blot, MTT assay, clone forming assay and Transwell method, respectively. **Results** ATM was identified as a potential target gene of miR-18a in the bioinformatics analysis. In addition, through transient transfection leading to the overexpression of miR-18a in HCT116 cell, the expression level of ATM was decreased. Down-regulation of HCT116 cell proliferation activity while significantly reducing HCT116 cell clone forming ability, lateral migration ability and longitudinal invasion ability were observed after transfected with miR-18a mimics. All of the changes were related to the overexpression of miR-18a. **Conclusion** miR-18a inhibited the proliferation and migration of colon cancer cell HCT116 through negative regulation of ATM expression.

【Key words】 miR18a ATM Proliferation Migration Colorectal cancer cells HCT116

近年的研究表明,微小 RNA (microRNA 或 miRNA) 与包括结肠癌^[1]在内的多种癌症的发生发展密切相关,而且多种 miRNA 定位于与癌症相关的基因组上的结合位点^[2],说明其在癌症的发生过程中可能起着至关重要的作用。在之前的诸多报道中,miR-18a 可作为一个抑癌基因的角色^[3]在多种

癌症组织中呈低表达并且通过调控不同的靶基因对多种癌细胞的生物学特性产生不同的影响^[4]。根据 TargetScan、picTar、RNA22、PITA、miRanda 等相关软件预测,miR-18a 的靶基因是共济失调-毛细血管扩张突变基因 (ataxia telangiectasia mutated gene, ATM)。ATM 蛋白是一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于磷脂酰肌醇 3-激酶相关蛋白激酶 (PIKK) 家族成员。ATM 通过一系列的调控会诱

[△] 通信作者, E-mail: liuji6103@scu.edu.cn

导细胞周期阻滞、凋亡和 DNA 修复等,维持基因组的稳定^[5]。很多体外实验发现,在肿瘤的发生和发展中涉及到 ATM 蛋白的表达异常,表明 ATM 基因可作为治疗肿瘤的一个潜在靶点^[6]。miR-18a 靶向 ATM 在结肠癌中针对细胞增殖侵袭和迁移的研究迄今未见报到。本研究的意义在于通过探讨 miR-18a 的调控功能,为今后临床治疗中作为结肠癌检测的新的肿瘤标志物提供理论依据。期待为结肠癌的发病机制研究及防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要材料

由吉玛基因-RNAi 专业公司负责设计人工合成 miR-18a 序列,根据 miR-18a 的前体序列设计并合成对应的模拟剂(mimics)和抑制剂(inhibitor)以及相应的阴性对照(negative control, NC)。其序列见表 1。

表 1 microRNA 寡核苷酸序列

Table 1 microRNA oligo nucleotide sequences

Name	5'-3'
NC	F:UUCUCCGAACGUGUCG GUTT R:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
MiR-18a mimics	F:UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG R:AUCUGCACUAGALGCACCUUAU
MiR-18a inhibitor	F:CUAUCUGCACUAGAUGCACCUUA

FAM-miRNA 购自上海吉玛基因-RNAi 专业公司;结肠癌肿瘤细胞株 HCT116 由四川大学生命科学院肖志雄教研室提供;TRE-Trizol 试剂盒(Invitrogen, USA);逆转录试剂盒(Thermo, USA);逆转录引物(广州锐博);Hairpin-it miRNAs 定量和 U6 校准实时荧光定量(qRT)-PCR 试剂盒(Genepharma);胎牛血清(Gibco, FBS);RPMI-1640 液体培养基、胰蛋白酶(HyClone);DMSO(Beyotime);Lipofectamine™ 2000(Invitrogen, USA);RIPA 细胞裂解液;Tris Base(Dom, USA);兔抗人的 ATM 一抗(Abcam);鼠抗人的 β -actin 一抗、山羊抗兔、抗鼠二抗;MTT 试剂(BD);SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(碧云天);Transwell 小室(Corning)等,其他试剂省略。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析 应用生物信息学软件 targetscan 5.1、picTar、RNA22、PITA、miRanda 等软件分析,预测可能与 miR-18a 结合的下游靶基因,找出 miR-18a 与 ATM-3'UTR 之间的关系。

1.2.2 细胞培养与转染 HCT116 细胞贴壁生长

于含 20%FBS 的 RPMI-1640 培养基中。在 37℃、体积分数 5%CO₂ 的条件下培养,当细胞生长到 70%~90%时进行传代。转染前一天,将处于对数生长期的 HCT116 细胞传代接种于 6 孔板中,用无抗生素的 RPMI-1640 培养基培养 24 h。当细胞汇合达到 60%以上时,利用脂质体 lipofecatmine2000 将 miRNA 合成物转进相应 HCT116 细胞中,形成转染试剂-培养基混合液,置于培养箱 37℃恒温温育 6 h,换掉原液继续培养。

1.2.3 转染效率的检测 正式转染目的 miRNA 前,用一个带荧光标记的阴性对照 FAM-miRNA 分别在终浓度为 40、60、80、100 nmol/L 条件下转染 HCT116 细胞,转染细胞 6 h 后,放在荧光显微镜下观察效果。流式细胞仪测定不同浓度下的 FAM-miRNA 其荧光信号强度,计算转染效率,以选定最佳浓度(对应的转染效率最高)为后续实验作参照。

1.2.4 qRT-PCR 检测 miR-18a mRNA 的表达 分为 4 个组,每个组设 3 个平行实验。分别是 miR-18a mimics 组、miR-18a inhibitor 组、NC 组、空白组(该组不含任何外源 miRNA,检测该组可反映内源性 miR-18a 的表达量)。取终浓度为 100 nmol/L 的 miRNA 合成物转染细胞 48 h 后用 qRT-PCR 测定用不同组分处理后细胞内 miR-18a mRNA 水平的表达情况。采用特异性 miR-18a 的反转录引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGACGCCAAT-3';内参 U6 引物序列:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTTCGCACTGGATACGACAAAAATATG -3',以反转录产物 cDNA 为模板,进行 RT-PCR,其中 miR-18a 上游引物为:5'-GATAGCAGCACAGA AATATTGGC-3';U6 上游引物为:5'-GCGCGTC GTGAAGCGTTC-3';通用下游引物为:5'-GTGC AGGGTCCGAGG-3'。总反应体系 20 μ L,其中 cDNA 1 μ L,上、下游引物各 1 μ L,SYBR 荧光染料 10 μ L,ddH₂O 7 μ L,反应程序设定为 95℃预变性 20 s;95℃ 10 s,60℃ 20 s;70℃ 25 s;40 个循环。用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算基因相对表达量。

1.2.5 Western blot 检测 ATM 蛋白表达 设置 miR-18a mimics 组、NC 组和 miR-18a inhibitor 组,每组各设 3 个复孔。将转染后的各组结肠癌 HCT116 细胞于 6 孔板上铺板,待细胞生长融汇到 70%~90%后冰上用 RIPA 裂解液提取总蛋白。进行常规 Western blot,其中兔抗人 ATM 多克隆抗体 1:500,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗

1 : 1 000。以 β -actin 为参照。凝胶成像仪下曝光拍照,扫描灰度值,以各条带与 β -actin 条带灰度值比值为蛋白相对表达量。

1.2.6 MTT 法检测细胞增殖活性 将 HCT116 细胞以 $2.5 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ 细胞浓度接种到 96 孔板,每孔加入 200 μL (将细胞分为 miR-18a mimics 转染组、miR-18a inhibitor 转染组、NC 组,每组各设 3 个复孔,转染方法同 1.2.2), 37°C 、体积分数 5% CO_2 的条件下分开培养 12 h、24 h、36 h。细胞长满后每孔加含 20 μL MTT (5 mg/mL) 的培养液,体积共 200 μL ,连续培养 4 h,终止时小心吸走孔内培养上清。加 150 μL DMSO,摇床振荡 10~20 min 后,在酶标仪于 490 nm 波长处测定光密度(OD)值。

1.2.7 平板克隆(菌落)形成实验 实验设 miR-18a mimics 组、miR-18a inhibitor 组、NC 组、空白组 4 组。HCT116 细胞于 24 孔板接种,控制每孔细胞数在 3.5×10^3 左右,培养 24 h 后进行细胞转染,转染方法请参照 1.2.2;消化细胞并收集细胞沉淀;用 1 mL 完全培养基使其均匀分散,并用细胞计数板进行细胞计数;接种细胞至 6 孔板中(每组各设 3 个复孔),每孔约 900 个细胞使其均匀分布;在相同条件下连续培养 1 周左右,实时观察培养过程中平板集落形成的情况,直到细胞单独的集落形成时终止培养。再进行固定、染色并晾干拍照^[7]。菌落形成率(%)=(菌落数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.8 划痕实验检测细胞横向迁移能力 以每孔 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 浓度接种细胞至 6 孔板中,设置 miR-18a mimics 组、NC 组、miR-18a inhibitor 组,每组各设 3 个复孔。分别转染不同处理组 24 h 后,待细胞融合再进行划痕处理。用小量程的枪头顶端轻轻在 6 孔板底部轻微划过,PBS 漂洗 3 次,换好无血清培养基再于低倍镜下(10 $\times$)拍照,再在 37°C 、体积分数 5% CO_2 的条件下温育 48 h 后,观察枪头划线处的生长情况。使用倒置相差显微镜分别在划痕 0 h、24 h 和 48 h 拍照,观察各组间细胞迁移速度。

1.2.9 Transwell 检测细胞侵袭力 设 miR-18a mimics 组、miR-18a inhibitor 组、NC 组、空白组 4 组。实验前细胞饥饿培养 12 h,规避血清影响,贴壁细胞用胰酶消化后用无血清培养基(含 0.05%~0.2% BSA)重悬,细胞悬液密度调整为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种细胞;用无菌小镊子将小室放入 24 孔板内,于 Transwell 小室上室内加入 200 μL 细胞悬液,下室中加入 700 μL 含有 20% FBS 的 RPMI-1640 细胞培养基培养。分别用不同组分进行细胞

转染,温育 24 h;进行固定、染色和干燥,取出小室,加入体积分数为 10% 的甲醇(每孔 200 μL)固定下室细胞 30 s,吸去甲醇,加入 500 μL 0.1% 结晶紫室温摇床上振荡染色 20 min;用 PBS 洗去染液,倒置于载玻片上, 37°C 烘干;镜检:染色后的 Transwell 小室放于正置普通光学显微镜(20 $\times$)下随机选取 5 个视野进行观察、拍照和细胞计数。

1.3 统计学方法

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较用独立样本 t 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 生物信息学软件预测

查阅文献及利用 targetscan5.1、miRanda 等生物信息学软件,确定 miR-18a 与 ATM 基因 3'UTR 间存在互补序列。揭示 miR-18a 与 ATM 基因 3'-UTR 间互补序列约为 8 对碱基。如图 1 显示 GCACCUUA 与 CGUGGAAU 配对。

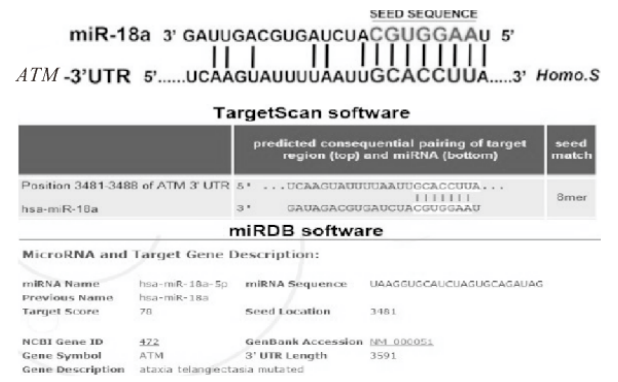


图 1 miRNA18a 与 ATM 基因 3'UTR 互补配对结果

Fig 1 Complementary pairing of miRNA18a and ATM

2.2 流式细胞仪检测转染效率

转染 40、60、80、100 nmol/L FAM-miRNA 后的转染效率分别是 7.80%、39.36%、86.37%、94.78%。各组间差异有统计学意义($P<0.01$)。最终确定 miRNA 转染效率最佳浓度(终浓度)为 100 nmol/mL(此时转染效率最高)。

2.3 转染 miRNA 合成物后 HCT116 中 miR-18a 的表达

结果(图 2)显示:转染 miR-18a mimics 48 h 后能特异性上调 HCT116 细胞中 miR-18a mRNA 的表达($P<0.01$)。而 miR-18a inhibitor 能特异性下调 miR-18a mRNA 表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。

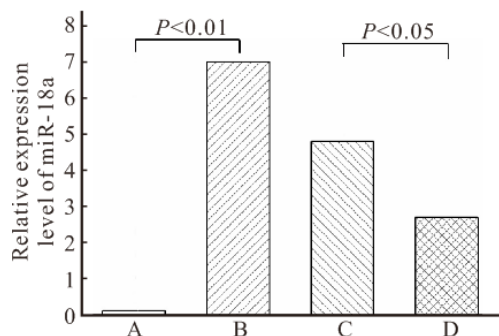


图 2 转染 HCT116 细胞后 miR-18a 表达的 qRT-PCR 结果

Fig 2 qRT-PCR result of miR-18a on HCT116 cell

A: Blank group; B: miR-18a mimics group; C: NC group; D: miR-18a inhibitor group

2.4 miR-18a 对 HCT116 细胞 ATM 蛋白表达的影响

结果如图 3 所示, HCT116 细胞在转染 miR-18a mimics 后, 其靶蛋白 ATM 表达水平下调, miR-18a mimics 组表达量低于 NC 组 ($P < 0.05$)。而转染了 miRNA-18a inhibitor 后, ATM 蛋白表达水平上调, miR-18a inhibitor 组表达量皆高于 NC 组和 miR-18a mimics 组 ($P < 0.05$)。

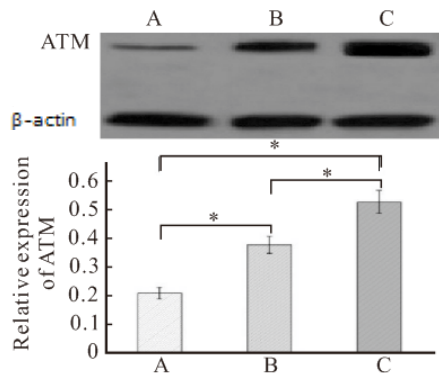


图 3 蛋白质印迹分析 HCT116 细胞 ATM 蛋白的表达

Fig 3 Western blot analysis of ATM expression in HCT116 cells

A: miRNA-18a mimics group; B: NC group; C: miR-18a inhibitor group. * $P < 0.05$

2.5 miR-18a 过表达对 HCT116 细胞增殖活性的影响

MTT 法检测结果如图 4 所示, 各时点 HCT116 细胞增殖活性趋势均为: 转染 miR-18a mimics 组 $<$ NC 组 $<$ miR-18a inhibitor 组, 其中在转染 36 h 后各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 miR-18a 过表达对 HCT116 细胞克隆形成能力的影响

平板克隆实验结果见图 5。转染 miR-18a mimics 组较 NC 组及空白组的克隆形成能力显著

降低。而 miR-18a inhibitor 组与 NC 组及空白组比较, 其克隆形成能力明显升高。菌落形成率趋势为 miR-18a mimics 组 $<$ 空白组 $<$ NC 组 $<$ miR-18a inhibitor 组 ($P < 0.05$)。

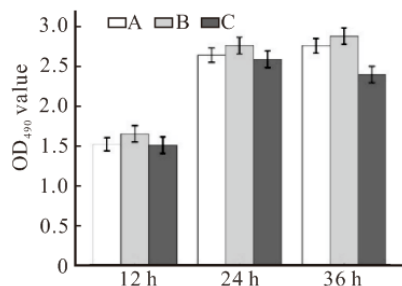


图 4 MTT 实验测定 HCT116 细胞的增殖活性

Fig 4 Cellular viability of HCT116 determined by MTT assay

A: NC group; B: miR-18a inhibitor group; C: miR-18a mimics group

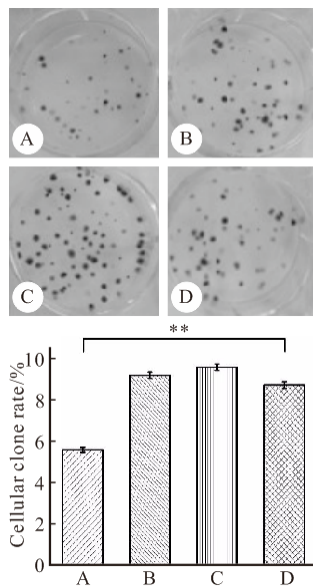


图 5 不同处理对 HCT116 细胞克隆形成能力的影响

Fig 5 Effect of different treatments on HCT116 cellular clone formation

A: miRNA-18a mimics group; B: Blank group; C: miR-18a inhibitor group; D: NC group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.7 miR-18a 过表达对 HCT116 细胞横向迁移能力的影响

细胞划痕实验结果见图 6。转染 miR-18a mimics 的结肠癌细胞与 NC 组细胞相比, 其横向迁移能力降低。转染 miR-18a inhibitor 较 NC 组显著增强。

2.8 miR-18a 过表达对 HCT116 细胞纵向迁移能力的影响

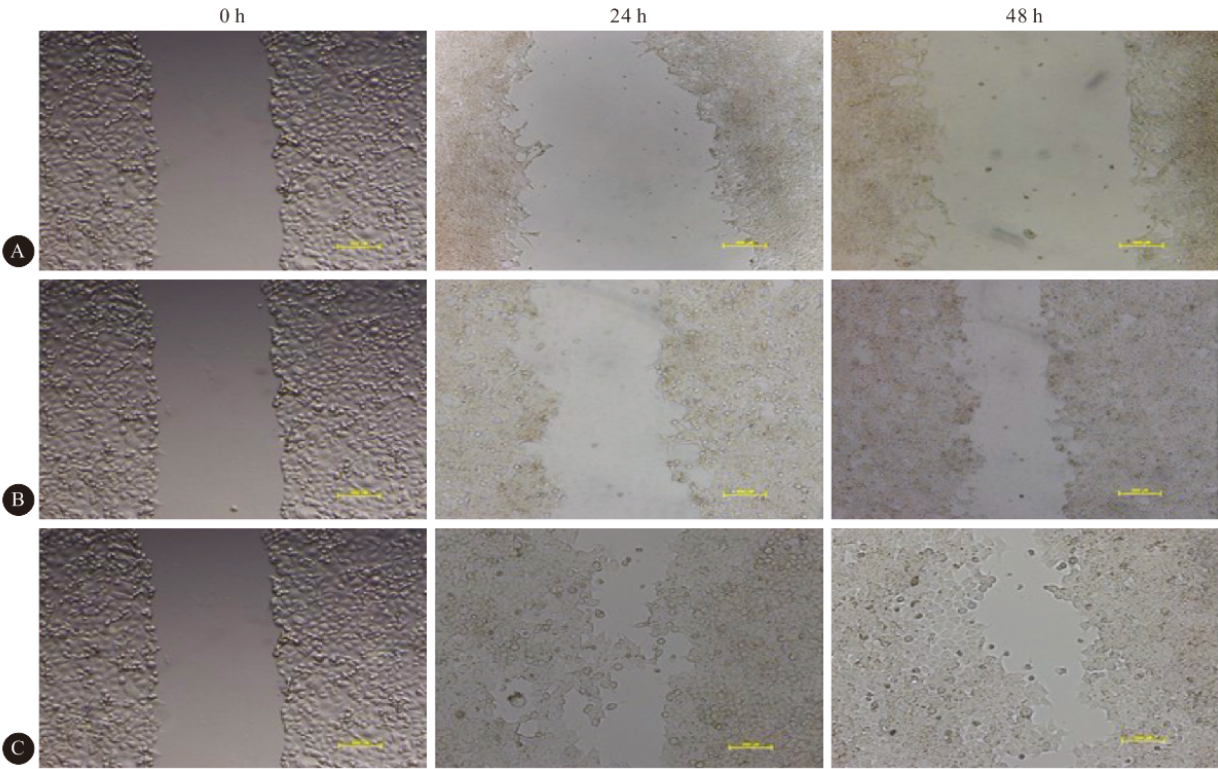


图 6 不同处理对 HCT116 细胞横向迁移能力的影响

Fig 6 Effect of different treatments on HCT116 cellular lateral migration

A:miR-18a mimics group; B: NC group; C: miR-18a inhibitor group

Transwell 移行实验结果见图 7。转染 miR-18a mimics 的细胞与 NC 组细胞相比,其穿膜数降低,转染 miR-18a inhibitor 较 NC 组增加(P 均 <0.05)。

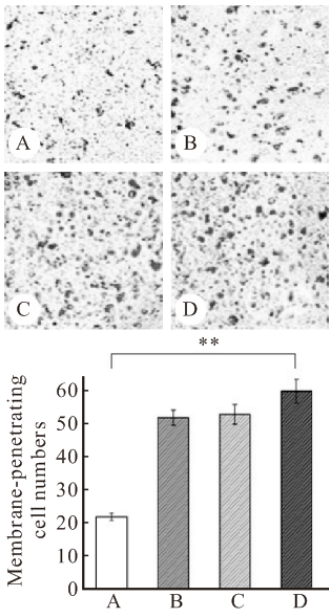


图 7 不同处理对 HCT116 细胞侵袭能力的影响

Fig 7 Effect of different treatments on HCT116 cellular invasion

A: miR-18a mimics group; B: Blank group; C: NC group; D: miR-18a inhibitor group. * * $P<0.05$

3 讨论

结肠癌是一种高发的恶性肿瘤,全世界每年因结肠癌死亡人数超过 600 000^[8]。因此研究和验证能够显著影响结肠癌进程的肿瘤标志物极其重要。近年来研究发现 miRNA 的表达异常在多种肿瘤中起到调节作用^[9],在 TSANG 等^[3]的研究中,miR-18a 被报道在肿瘤组织中低水平表达,它可能作为抑癌基因起作用^[10-11],但其调节肿瘤发生发展的分子机制尚不清楚。而肿瘤转移是影响结肠癌不良预后的最主要因素。越来越多的证据表明 miRNA 参与了癌症的进程,对细胞的增殖、生长、分化、凋亡等生理过程均起重要的调控作用^[12]。

miR-18a 属于庞大的致癌基因家族,也叫 miR-17-92 家族,包罗了 5 个 miRNAs,分别是 miR-17、miR-19a、miR-20a、miR-19b、miR-18a。miR-17-92 家族被发现在淋巴瘤及多种恶性实体肿瘤包括乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌及胰腺癌中均高表达^[13]。但家族中各 miRNA 的调节作用不同,每一个 miRNA 的表达水平并不具有协同作用。虽然一些研究表明 miRNA 的表达异常通常发生在癌症的转移环节,如 miR-7^[11]、miR-363^[14]、miR-99a^[7]、miR-132^[15]、miR-103、miR-107^[16] 和 miR-143^[17],但迄今为止

miR-18a 在结肠癌发生和发展中的病理作用和调控机制仍然不明确。

ATM 激酶在维护整个基因组的稳定性中有举足轻重的作用,在肿瘤治疗过程中受到越来越多的关注。ATM 作为一种酶通过激活不同效应的底物,发挥着细胞周期调控、DNA 修复和细胞凋亡等多种功能。而另一报道指出 ATM 激酶能够活化 TGF- β_1 -ROS-ATM-CREB 的信号通路对乳腺癌肿瘤细胞 MCF7 侵袭力产生影响^[18],这样的通路有待于在结肠癌的细胞研究中进行确证。本实验结果初步显示 miR-18a 过表达后对结肠癌细胞 HCT116 的增殖能力和侵袭迁移能力有显著降低效果。研究结果推断 miR-18a 在结肠癌细胞中可能起到肿瘤抑制基因的作用。初步认为其 miR-18a 通过作用于靶基因 ATM 发挥其通路中的调节功能在肿瘤细胞增殖和转移中发挥重要作用。

miRNA 可同时扮演着癌基因或者抑癌基因的双重角色,这样的界定取决于与其靶基因相互作用时复杂的分子机制^[19]。研究显示,miR-18a * 可以通过抑制 *K-ras* 基因的表达从而抑制肿瘤的生长,充当着抑癌基因的角色^[3]。也有研究结果表明 miR-18a 在乳腺癌^[20]、膀胱癌^[21]和胰腺癌^[15]等癌症中均高水平表达,具有促癌基因的作用。有关文献支持 miR-18a 在结肠癌组织中均为内源性的低表达,并显著下调大肠癌细胞的生长增殖^[22-23]。本研究重点探究了结肠癌中过表达 miR-18a 对其靶基因 ATM 的调控,并考察 miR-18a 在结肠癌中的功能及影响。实验结果有效地证明 miR-18a 的过表达能抑制体外结肠癌细胞的生长、迁移和侵袭,而下调 miR-18a 的表达反而促进了结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭。虽然确切机制尚未完全明确,但可预示 miR-18a 在影响结肠癌中扮演了重要的角色。

一般情况下,miRNA 的功能是发生在转录后阻遏,通过抑制它们的靶基因发挥其生物学功能^[24]。每个 miRNA 都有可能通过其具有约束力的 3'非翻译区去下调一些目标基因^[25]。在本研究中,我们通过预测的生物信息学进行了荧光素酶报告基因的分析验证,结果与肖悦等^[26]的研究一致,均说明 ATM 是 miR-18a 主要调控的目标基因之一,miR-18a 可通过与该靶基因的相互调节起作用。我们通过 Western blot 分析证实了过表达 miR-18a 能够抑制 ATM 蛋白的表达。相反,下调 miR-18a 的表达可以增强 ATM 的表达。这样的结果说明 ATM 能受到 miR-18a 的负调控。此外,过表达

miR-18a 能够抑制体外结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭,表明 miR-18a 具有抑癌因子的功能。

综上所述,本研究首次证实了 miR-18a 通过负向调控 ATM 的表达水平,抑制结肠癌细胞 HCT116 的增殖和迁移能力。miR-18a 在整体水平是否有同样作用,能否将 miR-18a 或 ATM 作为结肠癌临床综合治疗靶点有待进一步的研究验证。本研究结果有助于在 miRNA 水平上为结肠癌的治疗提供新的研究思路 and 探索潜在的肿瘤标记物。

参 考 文 献

- [1] SONG BJ, MATSUNAGA T, HARDWICK JP, *et al.* Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Mol Endocrinol*,1987,1(8):542-547.
- [2] LI P, GAO Y, LI F, *et al.* MicroRNA-18a regulates invasive meningiomas via hypoxia-inducible factor-1 α . *Exp Ther Med*,2015,10(3):1165-1170.
- [3] TSANG WP, KWOK TT. The miR-18a * microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. *Carcinogenesis*,2009,30(6):953-959.
- [4] ZHANG GJ, ZHOU T, LIU ZL, *et al.* Plasma miR-200c and miR-18a as potential biomarkers for the detection of colorectal carcinoma. *Mol Clin Oncol*,2013,1(2):379-384.
- [5] LIU G, LIU Y, YANG Z, *et al.* Tumor suppressor microRNA-18a regulates tumor proliferation and invasion by targeting TBPL1 in colorectal cancer cells. *Mol Med Rep*, 2015,12(5):7643-7648.
- [6] JIANG H, REINHARDT HC, BARTKOVA J, *et al.* The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. *Genes Dev*,2009,23(16):1895-1909.
- [7] JI Q, HAO X, ZHANG M, *et al.* MicroRNA mir-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One*, 2009,4(8):e6816[2015-11-19]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006816>.
- [8] LU J, GETZ G, MISKA EA, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, 435 (7043): 834-838.
- [9] MOQADAM FA, LANGE-TURENHOUT E, ARIÈS I, *et al.* MiR-125b, miR-100 and miR-99a co-regulate vincristine resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*,2013,37(10):1315-1321.
- [10] TAO J, WU D, LI P, *et al.* MicroRNA-18a, a member of the oncogenic miR-17-92 cluster, targets Dicer and suppresses cell proliferation in bladder cancer T24 cells. *Mol Med Rep*,2012,5(1):167-172.
- [11] HSU T, HSU C, LEE K, *et al.* MicroRNA-18a is elevated in prostate cancer and promotes tumorigenesis through suppressing STK4 *in vitro* and *in vivo*. *Oncogenesis*,2014 (3): e99. [2015-08-23]. <http://www.nature.com/oncsis/>

- journal/v3/n4/pdf/oncisis201412a. pdf. doi: 10. 1038/oncisis. 2014. 12.
- [12] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, *et al.* Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
- [13] SONG LB, LIN CY, WU ZQ, *et al.* MiR-18a impairs DNA damage response through down regulation of ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM). PLoS One, 2011, 6(9): e25454 [2015-08-23]. <http://dx. doi. org/10. 1371/ journal. pone. 0025454>.
- [14] 徐学虎, 吴小兵, 伍尚标, 等. MiR-490-5p 和 miR-363 作为结肠癌诊断标记的研究. 中华胃肠外科杂志, 2014, 17(1): 45-50.
- [15] ZHENG YB, LUO HP, SHI Q, *et al.* MiR-132 inhibits colorectal cancer invasion and metastasis via directly targeting ZEB2. World J Gastroenterol, 2014, 20(21): 6515-6522.
- [16] CHEN HY, LIN YM, CHUNG HC, *et al.* MiR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4. Cancer Res, 2012, 72(14): 3631-3641.
- [17] ZHANG Y, WANG ZQ, CHEN M, *et al.* MicroRNA-143 targets MACC1 to inhibit cell invasion and migration in colorectal cancer. Mol Cancer, 2012(11): 23 [2015-08-23]. <http://molecular-cancer. biomedcentral. com/articles/10. 1186/1476-4598-11-23>. doi: 10. 1186/1476-4598-11-23.
- [18] SINGH R, SHANKAR BS, SAINIS KB. TGF- β 1-ROS-ATM-CREB signaling axis in macrophage mediated migration of human breast cancer MCF7 cells. Cell Signal, 2014, 26(7): 1604-1615.
- [19] WU F, HUANG W, WANG X. MicroRNA-18a regulates gastric carcinoma cell apoptosis and invasion by suppressing hypoxia-inducible factor-1 α expression. Exp Ther Med, 2015, 10(2): 717-722.
- [20] O'DAY E, LAL A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. Breast Cancer Res, 2010, 12(2): 201 [2015-08-23]. <http://breast-cancer-research. biomed-central. com/articles/10. 1186/bcr2484>. doi: 10. 1186/bcr2484.
- [21] MORIMURA R, KOMATSU S, ICHIKAWA D, *et al.* Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. Br J Cancer, 2011, 105(11): 1733-1740.
- [22] MOTOYAMA K, INOUE H, TAKATSUNO Y, *et al.* Over-and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. Int J Oncol, 2009, 34(4): 1069-1075.
- [23] QASED AB, YI H, LIANG N, *et al.* MicroRNA-18a upregulates autophagy and ataxia telangiectasia mutated gene expression in HCT116 colon cancer cells. Mol Med Rep, 2013, 7(2): 559-564.
- [24] TAZAWA Y, USUKUBO I, TAKADA K, *et al.* Schedule-dependent cytotoxicity of etoposide and cyclophosphamide in P-glycoprotein-expressing human leukemic K-562 cells. Biol Pharm Bull, 2014, 37(8): 1323-1329.
- [25] VOLINIA S, CALIN GA, LIU CG, *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [26] 肖悦, 胡蓉. MiR-18a 通过靶定 ATM 调节白血病细胞 HL-60 对 VP-16 和 VCR 化疗敏感性. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(4): 999-1004.

(2016-01-20 收稿, 2016-05-25 修回)

编辑 汤洁