

miR-133b 调控 *GSTP1* 表达降低结肠肿瘤细胞在低营养环境下的生存能力

李 昂¹, 杨 川², 胡 敏^{2△}

1. 四川大学生命科学学院(成都 610036);

2. 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041)

【摘要】 目的 探究 *GSTP1* 在不同阶段结肠癌组织中的表达水平,并查找可能对 *GSTP1* 表达产生调控作用的微小分子 RNA(miR)及其对结肠肿瘤细胞的影响。**方法** 利用实时定量 PCR 和蛋白印迹分析检测 *GSTP1* 在结肠癌组织中的表达水平;构建载体 pcDNA3.1-*GSTP1* 并转染到培养的人类结肠癌细胞系 HCT116 中,检测细胞的凋亡率与活性水平;利用 TargetScan 和 MicroCosm Targets 程序分析 *GSTP1* 的 3'UTR 序列并查找能够结合 *GSTP1* 的 miR,构建载体 pGL3-*GSTP1*-3'UTR,共转染该 miR 与 pGL3-*GSTP1*-3'UTR 到人类肾脏上皮细胞系 HEK293 中,荧光素酶报告分析验证该 miR 对 *GSTP1* 表达的靶向调控作用;转染该 miR 到 HCT116 中,检测 *GSTP1* 表达水平与细胞的活性氧(ROS)水平;共转染该 miR 与 pcDNA3.1-*GSTP1* 到 HCT116 中,检测细胞的 ROS 水平与活性水平。**结果** *GSTP1* 在不同阶段结肠癌样本中的表达水平均上升,在低营养环境下,高表达 *GSTP1* 的 HCT116 细胞凋亡率下降,细胞活性上升。而 miR-133b 在 *GSTP1* 的 3'UTR 序列区域有特异性结合位点,在转录后水平下调 *GSTP1* 的表达。在低营养环境下,过表达 miR-133b 的 HCT116 细胞活性水平显著下降,ROS 水平显著上升;在正常营养环境下,高表达 miR-133b 无显著影响。此外,在低营养环境下,过表达 miR-133b 的 HCT116 细胞同时过表达 *GSTP1*,则细胞活性水平下降程度和 ROS 水平上升程度均减小。**结论** 低营养环境下 miR-133b 能够通过抑制 *GSTP1* 的表达作用削弱结肠肿瘤细胞的生存能力。

【关键词】 *GSTP1* miR-133b 结肠癌 低营养环境

Viability of Colon Tumor Cells in Insufficient-nutritional Condition is Reduced by MiR-133b Through Regulating Expression of *GSTP1* LI Ang¹, YANG Chuan², HU Min^{2△}. 1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610036, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: 9ym_w@163.com

【Abstract】 Objective To determine the expression level of *GSTP1* in colon tumor tissues at different stages and the effects of *GSTP1* expression on colon tumor cells, and to identify miR that regulate the expression of *GSTP1*. **Methods** Real-time PCR and western blot were used to detect the expression level of *GSTP1* in colon tumor tissues. pcDNA3.1-*GSTP1* was constructed and transfected into human colon tumor cell line HCT116. The apoptosis rate and viability of HCT116 were measured. TargetScan and MicroCosm Targets programs were used to measure *GSTP1* 3'UTR and identify *GSTP1*-targeting miR. pGL3-*GSTP1*-3'UTR was constructed and transfected with the selected miR into human kidney epithelial cell line HEK293. Dual-luciferase reporter assay were performed to detect the regulation effect of the selected miR on *GSTP1* expressions. The selected miR was transfected into HCT116, and their levels of *GSTP1* expression and reactive oxygen species (ROS) were measured. The selected miR and pcDNA3.1-*GSTP1* were then transfected together into HCT116. The viability and ROS level of the transfected cells were measured. **Results** The expression levels of *GSTP1* increased in colon tumor tissues at all stages. Over-expression of *GSTP1* decreased apoptosis and increased viability of HCT116 in insufficient-nutritional condition. miR-133b could target *GSTP1* 3'UTR and repressively regulate *GSTP1* expressions in HCT116. The over-expression of miR-133b rapidly decreased viability and increased ROS level in HCT116 in insufficient-nutritional condition. But such effects were absent in normal nutritional condition. In addition, in insufficient-nutrition condition, when the HCT116 over-express miR-133b and *GSTP1* at the same time, the extent of viability decrease and ROS level increase are shortened. **Conclusion** In insufficient-nutritional condition, miR-133b decreases viability of colon tumor cells by repressively regulating *GSTP1* expressions.

【Key words】 *GSTP1* MiR-133b Colon cancer Insufficient-nutritional condition

结直肠癌是胃肠道常见的恶性肿瘤,其发病率

和死亡率近年来呈上升趋势^[1-2]。据统计^[3],2008 年结直肠癌已成为癌症发病人数第三高的癌症,而死亡人数在所有癌症中位列第四。由此,结直肠癌

受到的关注度也越来越高。

谷胱甘肽 S 转移酶(GST)超家族是一大类二期代谢酶类,这一酶类能够催化谷胱甘肽结合各种亲电子的外源性物质,包括多种环境毒素、致癌物质,以及用于治疗癌症的药物等,因而是一种参与解毒过程的重要酶类^[4]。GST- π 是 GST 超家族成员之一,该蛋白在人类组织和肿瘤中表达^[5-6]。而 *GSTP1* 是表达产生 GST- π 的基因,该基因的表达与肿瘤发生关系密切^[6-7]。在结直肠癌中,*GSTP1* 在该肿瘤发生的所有阶段均过量表达^[8-11]。虽然 *GSTP1* 表达 GST- π 在结直肠癌中的意义还不清楚,但 DANG 等^[12] 通过敲除 *GSTP1*,已表明 *GSTP1* 能够增强人类结肠癌细胞系 HCT116 的生存和增殖能力,并在低营养条件下能保护 HCT116 免于氧化和程序性死亡。

微小分子 RNA(miR)是内源性的小片段(20~25 nt)非编码 RNA 的总称,它们的功能主要是通过抑制基因的转录而抑制性调节基因表达^[13]。miR 最具特征性的功能是成熟的 miR 能够利用其子序列找到一组转录后的 mRNA。根据 miR 与目标 mRNA 之间的互补程度,mRNA 表达会不同程度受阻^[14]。虽然关于它们生物功能的了解有限,但最近的研究显示,miR 可能参与结直肠癌的发生。

本研究通过分析 *GSTP1* 在不同阶段结肠癌组织中的表达以了解结肠肿瘤细胞在低营养环境中的生存情况,同时查找出能够调控 *GSTP1* 表达的 miR,以期对结直肠癌的治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人类结肠癌细胞系 HCT116、人类肾脏上皮细胞系 HEK293 细胞系来自四川大学华西医院细胞病理平台。HEK293 细胞培养条件:含 100 ml/L FBS 的 DMEM 高糖培养基,37 °C,5% CO₂。HCT116 细胞培养条件:含 100 mL/L FBS 的 RPMI1640 培养基,37 °C,5%CO₂。低营养培养条件:含 50 mL/L FBS 的 RPMI1640 培养基,37 °C,5%CO₂。

从 Ruibo 公司购买所需的人工合成小干扰 RNA(siRNA)序列 si-*GSTP1*、miR-133b、miR-133b 抑制剂,其各自的对照物由该公司配套合成。si-*GSTP1*、miR-133b 及其对照物均使用 15 nmol/L 浓度。抑制实验的 miR-133b 抑制剂和 miR-对照物使用 30 nmol/L。

1.2 组织样本

收集 2014 年在四川大学华西医院行手术治疗的 15 例结肠癌患者的肿瘤组织和癌旁组织,样本在手术后直接冷冻保存。通过 HE 染色鉴定肿瘤区域。所有肿瘤样本分别通过 UICC 2002 TNM 系统分类并通过 Gleason 分级系统进行分级。依据 UICC2002 TNM 系统,结肠肿瘤组织分为阶段 II、阶段 III、阶段 IV,每阶段样本各 5 例。

1.3 实时定量 PCR 检测样本的 *GSTP1* mRNA

将样本碾碎后分别加入 1 mL TRIzol 试剂(Invitrogen),采用 TRIzol 法提取总 RNA。然后将 1 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA,实验使用 microRNA 逆转录试剂盒(Fementas)。*GSTP1* 特异性引物序列设计如下:F: 5'-CTGGCTGGGGAACATCAAAG-3'; R: 5'-TTCTTGTTCTCGAGGGCCTT-3'。互补 cDNA 作为模板进行实时定量 PCR,实时 PCR 实验以及 cDNA 序列特异性引物和实时定量 PCR 探针的合成均使用 RIBOBIO microRNA 分析试剂盒。产物大小为 253 bp。最后使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 评估完成定量。

1.4 蛋白印迹分析样本中 *GSTP1* 蛋白表达水平

将组织样本在液氮中粉碎后用 RIPA 裂解液提取总蛋白,15 000 $\times$ g 离心 30 min,Bradford 法测定蛋白浓度,然后使用 *GSTP1* 小鼠单克隆抗体(BD, 1:500),鼠抗人 β -actin(1:1 000)抗体作为内部参照。最后使用 ImmobilonTM 蛋白化学发光 HRP 底物通过凝胶基质系统进行检测,图像分析软件为 QuantityOne。

1.5 质粒构建

1.5.1 pcDNA3.1-*GSTP1* 的构建 *GSTP1* cDNA 序列以 HEK293 细胞 cDNA 为模板,通过 PCR 的方式获得。引物序列如下:上游 5'-TTTGGATCCATGCCGCCCTACACCGTGGTC-3',下游 5'-TATGAATTCTCACTGTTTCCCGTTGCCATT-3'。PCR 解链温度为 57.8 °C,延伸时间为 50 s,扩增 30 循环。PCR 产物经过 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后克隆至 pcDNA3.1 载体上。质粒经测序后用于后续实验。质粒终质量浓度为 1 μ g/ μ L。

1.5.2 靶向 *GSTP1* mRNA 的 microRNA 筛选和 pGL-*GSTP1*-3'UTR 的构建 使用生物信息学预测工具 TargetScan(7.0 版本;2015 年 8 月,http://www.targetscan.org/)和 MicroCosm Targets 来分析不同哺乳动物包括人、小鼠、大鼠、猪和狗中

GSTP1 的 3'UTR 区域;之后使用 TargetScan 查找可能靶向 *GSTP1* mRNA 的 miR;查找出的 miR 序列再使用 miRBase(21 版本:2014 年 6 月,http://www.mirbase.org/)进行确认。将已确认的 miR 靶向序列插入 pGL3-basic 质粒(Promega)*hRluc* 基因 3'UTR 的 *Xho*I 和 *Hind*III 限制性酶切位点之间。*GSTP1* mRNA 的 3'UTR 全部序列的引物设计为 F:5'-CTCGAGAGTGAGG GTTGGGGGGA-3', R:5'-AAGCTTAGCTCTCTTAGAAATTTTA TTGTCCT-3'。质粒终质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.6 细胞转染

1.6.1 pcDNA3.1-*GSTP1* 转染及 *GSTP1* 沉默 将 HCT116 细胞分为 4 组,分别转染 pcDNA3.1、pcDNA3.1-*GSTP1*、si-对照物和 si-*GSTP1*。转染实验过程如下:事先将细胞接种在无抗生素的细胞培养基中(50 000/孔),待细胞融合至 90%时开始转染,对于每个包含细胞和培养基的孔,将相应的质粒加入到 50 μg 无血清培养基,混匀, Lipofectamine2000 (Invitrogen)使用前摇匀,并加入到 50 μg 无血清培养基,混匀并孵育 5 min,混合质粒与 Lipofectamine2000 稀释液并室温孵育 20 min,后加入到孔中,轻轻晃动摇匀并在 5% CO_2 孵箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 d。转染后的细胞分别在 50 mL/L 血清(低营养环境)^[15] 和 100 mL/L 血清(正常环境)^[15] 中培养 72 h。检测细胞的凋亡率和细胞活性水平。

1.6.2 pGL-*GSTP1*-3'UTR 与 miR-133b 靶向结合检验 将 HEK293 细胞系分为 3 组:①单独转染 pGL-*GSTP1*-3'UTR, ②共转染 pGL-*GSTP1*-3'UTR 与 miR-133b, ③共转染 pGL-*GSTP1*-3'UTR 与 miR 对照物。转染实验过程同上。后进行双重萤光素酶报告分子分析。

1.6.3 miR-133b 对低营养环境下 HCT116 细胞 *GSTP1* 的影响检测 将 HCT116 细胞系分为 4 组:①单独转染 miR-133b, ②单独转染 miR-对照物, ③共转染 miR-133b 与 miR-113b 抑制剂, ④共转染 miR-133b 与 miR-113b 抑制剂对照物。转染实验过程同上,转染后的细胞在 50 mL/L 血清中培养 72 h,模拟低营养环境,后分别取样提取细胞总蛋白进行蛋白印迹分析检测,实验过程同上,其余细胞检测活性氧(ROS)水平。

1.6.4 miR-133b 与 pcDNA3.1-*GSTP1* 共转染对低营养环境下 HCT116 细胞的影响检测 我们将 HCT116 细胞系分为 3 组:①单独转染 miR-133b, ②单独转染 miR-对照物, ③共转染 miR-133b 与

pcDNA3.1-*GSTP1*。转染实验过程同上,转染后的细胞在 50 mL/L 血清中培养 48 h,模拟低营养环境,后检测细胞的 ROS 水平和细胞活性水平。

1.7 细胞凋亡检测

转染的前 1 d,细胞按 50 000/孔播种在 24 孔板。转染 72 h 后,细胞通过膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒(Biotool)染色,实验过程如下:PBS 洗涤 2 次,加入 100 μL Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μL 膜联蛋白 V-FITC 和 5 μL PI 染色液,室温避光反应 10 min,加入 400 μL Binding Buffer 并混匀。最后进行流式细胞仪分析,在 530 nm 定量。凋亡率按总细胞中被膜联蛋白 V 染色的细胞占总细胞的百分比计算。

1.8 MTT 法检测细胞活性水平

收集细胞,按 50 000/孔种在 24 孔板,并在 5% CO_2 孵箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 d,每孔加入 20 μL MTT 溶液,培养 4 h,吸去培养液,加入 150 μL 二甲亚砜,摇床振荡 10 min,酶联免疫检测仪在 490 nm 处测量吸光值。

1.9 双重萤光素酶报告分子分析

使用双重萤光素酶分析系统(E1910; Promega),测定 HEK293 细胞系中,海肾萤光素酶和萤火虫萤光素酶在细胞溶解产物中的活性的比值。

1.10 ROS 水平分析

使用 ROS 水平测试检测仪检测细胞系的 ROS 活性,按说明书进行操作。绿色荧光的强度代表 ROS 水平。荧光金属板阅读器在 488 nm 激发并在 525 nm 进行荧光检测。

1.11 统计学方法

所有实验重复 3 次。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌组织和癌旁组织中 *GSTP1* 基因和蛋白的表达

实时定量 PCR 和蛋白印迹检测结果均表明(图 1),与癌旁组织相比,*GSTP1* 基因和蛋白在结肠癌中表达更高,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着病程进展,表达量略有上升,但各阶段差异无统计学意义。

2.2 不同营养环境中 *GSTP1* 过表达对 HCT116 细胞的影响

低营养环境下,*GSTP1* 过量表达使细胞的凋亡

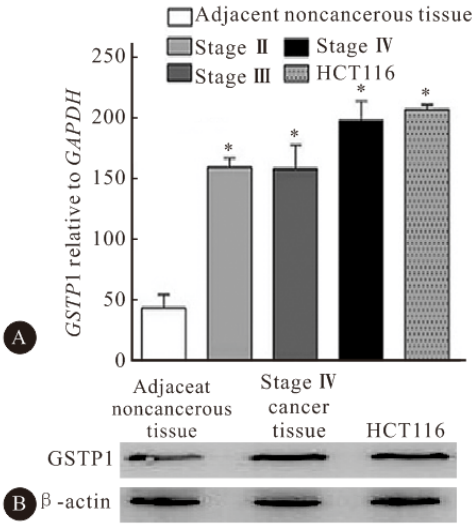


图 1 *GSTP1* mRNA(A)和蛋白(B)在结肠癌旁组织以及癌变不同阶段的组织中的表达

Fig 1 Expressions of *GSTP1* mRNA (A) and protein (B) in adjacent noncancerous tissues and different stages of colon tumor tissues

* $P < 0.05$, vs. adjacent noncancerous tissue (negative control); HCT116: Positive control

率从 37.68%降至 22.51%，而细胞的活性水平从 57%上升到 78%；而在正常环境下，*GSTP1* 过量表达对细胞的凋亡率(28.99%变为 25.32%)和活性水平(96%变为 92%)无影响。特异性 siRNA 沉默 *GSTP1* 后，低营养环境下，细胞的凋亡率从

37.68%升至 58.41%，而细胞的活性水平从 57%下降到 40%；而在正常环境下，沉默 *GSTP1* 对细胞的凋亡率(28.99%变为 29.68%)和活性水平(96%变为 94%)无显著影响。说明在低营养环境下，*GSTP1* 的表达可以提高细胞生存能力并减少细胞凋亡，而在正常环境下没有明显影响。

2.3 miR 对 *GSTP1* 表达的靶向调控

通过生物信息学分析，我们发现，*GSTP1* 的 3' UTR 中存在 50~60 bp 的区域在哺乳动物包括人、小鼠、大鼠、猪和狗中高度保守(图 2A)，而在这一区域中只显示出一个 miR-133b 结合位点，因此 miR-133b 对 *GSTP1* 可能存在靶向调控作用。为探究这一靶向调控作用，我们在 *GSTP1* 的 3'UTR 中插入荧光素酶报告基因。对 HEK293 细胞的共转染结果如图 2B 所示，共转染 miR-133b 和 pGL3-*GSTP1*-3'UTR 结构的细胞相对于仅转染 pGL3-*GSTP1*-3'UTR 的细胞荧光素酶报告分子活性明显下降，而共转染 miR-对照物和 pGL3-*GSTP1*-3'UTR 结构的细胞(图未显示)相对于仅转染 pGL3-*GSTP1*-3'UTR 的细胞无显著变化，提示 miR-133b 靶向结合到 *GSTP1* 的 3'UTR 区。在对 HCT116 细胞的转染结果中，蛋白印迹分析显示，*GSTP1* 在转染 miR-133b 后 72 h 之内蛋白质水平降低(图 2C)。最后，ROS 水平分析显示，低营养环境下，转

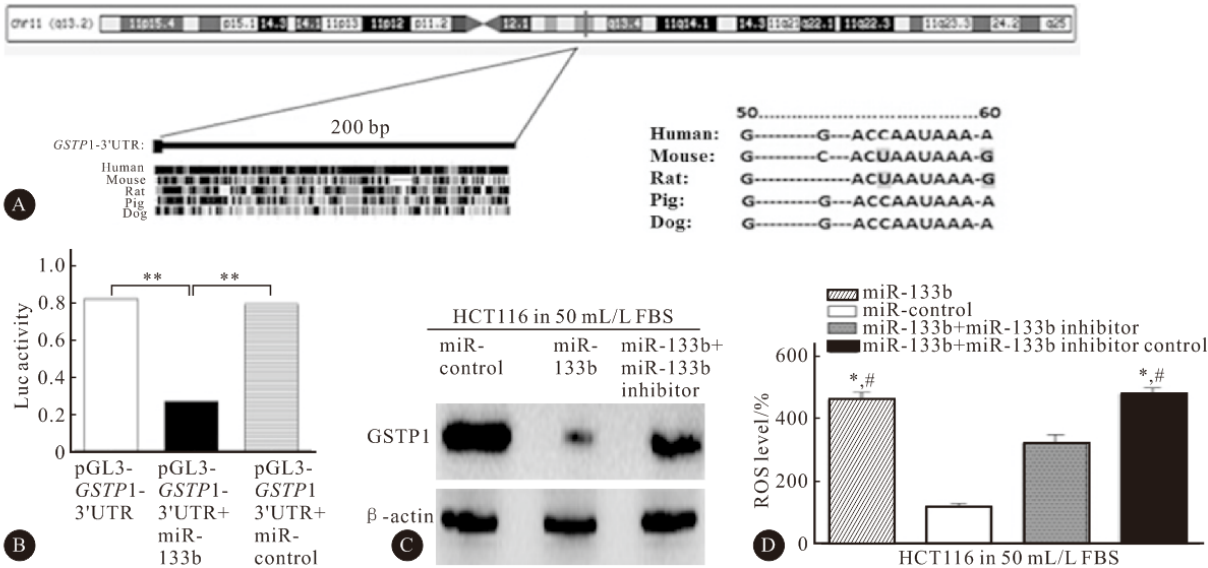


图 2 miR-133b 直接结合在 *GSTP1* 3'UTR 区域对细胞的调控作用

Fig 2 miR-133b directly targets *GSTP1*

A: The putative miR-133b binding sequence in the 3'UTR of the *GSTP1* in different mammals; B: Luciferase activity by luciferase reporter assays in cell line HEK293, * * $P < 0.01$; C: Protein expression level of *GSTP1* by Western blot analysis in different groups of cell line HCT116; D: ROS level of different groups of cell line HCT116 in RPMI1640 with 50 mL/L FBS; * $P < 0.05$, vs. miR-control; # $P < 0.05$, vs. miR-133b+miR-133b inhibitor

染 miR-133b 的细胞 ROS 水平大幅上升至 470%，而同时转染 miR-133b 和其抑制剂的细胞 ROS 的水平显著降低至 310% (图 2D)。

2.4 miR-133b 和 *GSTP1* 对结肠癌细胞生存能力的影响

结果(图 3)表明,转染 miR-133b 的细胞 ROS 水平显著增加至 420%，而 miR-对照组细胞为 145%。同时转染 *GSTP1* 和 miR-133b 的细胞则增加至 310%。之后,我们评估了 HCT116 细胞系的细胞活性水平。结果表明,细胞在转染 miR-133b 48 h 后,细胞活性水平降至 28.41%，而同时转染 *GSTP1* 和 miR-133b 的细胞活性水平则仅降至 47%。表明在低营养环境下,过量表达 miR-133b 同样会使结肠癌细胞活性水平显著下降,而 ROS 水平显著上升,同时 *GSTP1* 过量表达则可以部分逆转这一趋势,说明 miR-133b 可通过对 *GSTP1* 的抑制作用降低结肠癌细胞的生存能力。

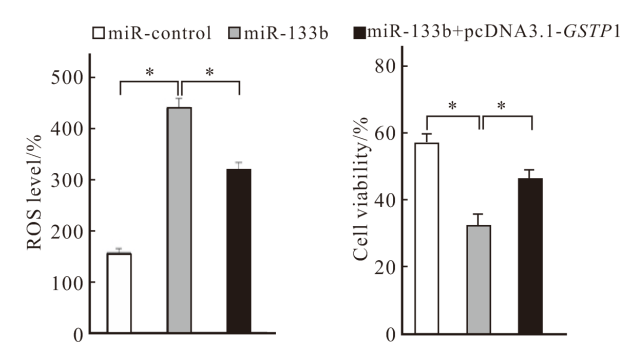


图 3 低营养环境 *GSTP1* 与 miR-133b 干预后 HCT116 细胞的 ROS 水平和细胞活性

Fig 3 ROS level and cell viability of HCT116 cell treated with miR-133b and *GSTP1* in insufficient-nutrition condition (* $P < 0.05$)

3 讨论

本研究使用两种细胞系来检测 miR-133b 与 *GSTP1* 的相互作用,其中人类肾脏上皮细胞系 HEK293 是一种易于进行转染实验的细胞系,我们使用 HEK293 细胞系作双重萤光素酶报告分子分析,检测 miR-133b 是否能够结合于 *GSTP1* 的 3' UTR 序列,一方面成功率较高,另一方面也在侧面印证了 miR-133b 在不同的细胞中均能够结合 *GSTP1* 的 3'UTR 序列并产生抑制性调控作用;而人类结肠癌细胞系 HCT116 则作为主要研究模型,用以探究在人类结肠癌中 *GSTP1* 的作用以及 miR-133b 对 *GSTP1* 是否存在调控作用。结果表明,在

低营养环境下,*GSTP1* 过量表达能提高结肠癌细胞的生存能力;而 miR-133b 靶向结合 *GSTP1* 的 3' UTR 区域并在 *GSTP1* 转录后下调 *GSTP1*,并因此在低营养条件下削弱癌细胞的生存能力和增加细胞的 ROS 水平。

3.1 *GSTP1* 在结肠肿瘤细胞中的表达与作用

GSTP1 在包括结肠在内的人体组织中广泛表达^[6]。它在各种癌症中扮演的角色不同,例如,启动子甲基化导致的 *GSTP1* 表达缺失是前列腺癌和肝细胞癌发生的一个特征性标志^[16-17],而在许多癌症包括结肠癌中,*GSTP1* 则过量表达^[18-19]。本研究也检测了 *GSTP1* 在不同阶段结肠癌中的表达水平,并证实 *GSTP1* 在结肠癌的所有阶段均过量表达。

GSTP1 表达 GST- π 在结直肠癌中的意义仍不清楚,本研究结果表明,*GSTP1* 的过表达在低营养条件下会增强肿瘤细胞的生存能力而在正常状态下没有显著影响,并且 *GSTP1* 在结直肠癌的早期阶段即大幅上调。综合这几点,我们认为,*GSTP1* 表达 GST- π 是肿瘤细胞能够在低营养条件下生存的重要因素之一。之前有动物实验表明,不表达 *GSTP1* 的老鼠结直肠癌的发病率显著上升^[20],而后来 DANG 等^[12]通过敲除 *GSTP1*,则发现 *GSTP1* 能够增强人类结肠癌细胞系 HCT116 的生存和增殖能力,并在低营养条件下保护 HCT116 免受氧化和程序性死亡,这与本研究结果是一致的。鉴于 GST 超家族是一种参与解毒过程的酶类^[4],我们猜想,在正常细胞中,GST- π 的解毒作用会帮助降解致癌物质,因而能够降低正常细胞癌变的概率;而在肿瘤细胞中,GST- π 的解毒作用可能会帮助肿瘤细胞在低营养条件下的生存并降低细胞程序性死亡的概率,因而有助于肿瘤细胞的生存和发展,而这可能是肿瘤在体内能够渡过早期阶段或是能够转移到一个新的位置并存活下来的关键因素之一。

3.2 miR-133b 在结肠肿瘤细胞中的调控作用

而人类有 30% 以上的蛋白质编码基因由 miR 调控^[21]。大量的文献报道了异常 miR 表达和许多疾病过程之间的关系^[22],这使 miR 作为小分子药物有巨大的潜力。然而,现在仍然没有有效的方法来识别调控特定目标基因的 miR。生物信息学分析针对单一目标基因会预测出大量的候选 miR。在本研究中,通过生物信息学分析,我们首次发现 *GSTP1* 的 3'UTR 区域中存在 50~60 bp 的序列在人类、小鼠、大鼠、猪和狗中高度保守。最近,越来越多的证

据表明,miR-133b 的调控障碍是多种类型的人类癌症进程中的一个重要的步骤,并有助于肿瘤的发生^[23]。但它与结肠癌临床阶段的关系仍待探究。我们通过荧光素酶报告分子分析确认了 miR-133b 对 *GSTP1* 的直接调控作用,这证实 miR-133b 是 *GSTP1* 的一个调控因子。

不过,要探明 miR-133b 对 *GSTP1* 的调控作用,还需要进一步的研究。目前,我们正在尝试检测 miR-133b 在不同阶段的人类结肠肿瘤样本中的表达水平,还计划测试 miR-133b 对一系列的小鼠模型的影响。最后,*GSTP1* 与信号蛋白分子的相互作用机制以及相关药物的开发均需要进一步的研究工作来探明。

参 考 文 献

- [1] 张思维,雷正龙,李光琳,等. 中国肿瘤登记地区 2006 年肿瘤发病和死亡资料分析. 中国肿瘤,2010,19(6):356-365.
- [2] 郑荣寿,张思维,吴良有,等. 中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析. 中国肿瘤,2012,21(1):1-12.
- [3] FERLAY J, SHIN H, BRAY F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008;GLOBOCAN 2008. Int J Cancer,2010,127(12):2893-2917.
- [4] HAYES JD, FLANAGAN JU, JOWSEY IR. Glutathione Transferases. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005, 45: 51-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
- [5] COWELL IG, DIXON KH, PEMBLE SE, *et al.* The structure of the human glutathione S-transferase π gene. Biochem J,1988,255(1):79-83.
- [6] MOSCOW JA, FAIRCHILD CR, MADDEN MJ, *et al.* Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. Cancer Res, 1989,49(6):1422-1428.
- [7] XIA CL, Taylor JB, Spencer SR, *et al.* The human glutathione S-transferase P1-1 gene;modulation of expression by retinoic acid and insulin. Biochem J,1993,292(Pt 3):845-850.
- [8] BARTEL DP. MicroRNAs;target recognition and regulatory functions. Cell,2009,136(2):215-233.
- [9] COTTON SC, SHARP L, LITTLE J, *et al.* Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. Am J Epidemiol,2000,151(1):7-32.
- [10] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, *et al.* Global cancer statistics. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.
- [11] RANGANATHAN S, TEW KD. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferases α , μ , and π in normal tissue and carcinomas from human colon. Carcinogenesis,1991,12(12):2383-2387.
- [12] DANG DT, CHEN F, KOHLI M, *et al.* Glutathione S-Transferase P1 promotes tumorigenicity in HCT116 human colon cancer cells. Cancer Res,2005,65(20):9485-9494.
- [13] YANG XL, LONG SY, DENG JP, *et al.* Glutathione S-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and their susceptibility to renal cell carcinoma: an evidence-based meta-analysis. PLoS One, 2013,8(5):e63827. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063827>
- [14] SASSEN S, MISKA EA, CALDAS C. MicroRNA; implications for cancer. Virchows Arch,2008,452(1):1-10.
- [15] AI JZ, DUAN JJ, LV XY, *et al.* Overexpression of FoxO1 causes proliferation of cultured pancreatic beta cells exposed to low nutrition. Biochemistry,2010,49(1):218-225.
- [16] DYKXHOORN DM, PALLISER D, LIEBERMAN J. The silent treatment;siRNA as small molecule drugs. Gene Ther, 2006,13(6):541-552.
- [17] RITCHIE KJ, WOLF CR, SANSOM OJ, *et al.* Markedly enhanced colon tumorigenesis in Apc (Min) mice lacking glutathione S-transferase Pi. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009,106(49):20859-20864.
- [18] KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Lessons from hereditary colon cancer. Cell,1996,87(2):159-170.
- [19] LEE WH, MORTON RA, EPSTEIN JI, *et al.* Cytidine methylation of regulatory sequences near the π -class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(24): 11733 - 11737.
- [20] CLAPPER ML, HOFFMAN SJ, TEW KD. Glutathione S-transferases in normal and malignant human colon tissue. Biochim Biophys Acta,1991,1096(3):209-216.
- [21] PILLAI RS, BHATTACHARYYA SN, FILIPOWICZ W. Repression of protein synthesis by miRNAs; how many mechanisms? Trends Cell Biol,2007,17(3):118-126.
- [22] MOYER AM, SALAVAGGIONE OE, WU TY, *et al.* Glutathione S-transferase P1: gene sequence variation and functional genomic studies. Cancer Res, 2008,68(12):4791-4801.
- [23] CLAPPER ML, HOFFMAN SJ, CARP N, *et al.* Contribution of patient history to the glutathione S-transferase activity of human lung, breast and colon tissue. Carcinogenesis,1991,12(10):1957-1961.

(2016-12-01 收稿,2017-03-27 修回)

编辑 汤 洁