

文章编号 1006-8147(2018)06-0469-05

论著

miR-27a 对胃癌细胞凋亡影响的体外研究

张悦,管叙文,王婧雅,黄鼎智

(天津医科大学肿瘤医院消化肿瘤内科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津市恶性肿瘤临床医学研究中心,天津 300060)

摘要 目的:探讨 miR-27a 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响及其作用机制。方法:分别构建 miR-27a 过表达和敲除 FOXO1 的 SGC-7901 细胞株,采用流式细胞术检测细胞凋亡情况。蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞凋亡和自噬相关蛋白 p53、BCL-2、LC3I/LC3II 水平,同时检测上调及下调 miRNA-27a 的胃癌细胞 FOXO1 的表达水平。双荧光素酶报告基因分析法验证 miR-27a 的靶基因。实时聚合酶链式反应(Realtime PCR)检测 miR-27a 高表达质粒、miR-27a 低表达质粒的转染效率,并检测过表达/敲低 miRNA-27a 的胃癌细胞中 FOXO1 mRNA 的水平。结果:(1)上调 miR-27a 的细胞凋亡率较对照组明显下降,且凋亡相关蛋白 BCL-2 表达上调,p53 水平下降,自噬相关蛋白 LC3I/LC3II 的表达较对照组下调 ($P<0.05$)。而敲低胃癌细胞中 FOXO1 后得到了与上调 miR-27a 相似的实验结果。(2)双荧光素酶报告基因验证结果显示 miR-27a 与 FOXO1 存在靶点关系。miR-27a 高表达质粒、miR-27a 低表达质粒分别成功转染至胃癌细胞中。上调或下调胃癌细胞中 miR-27a 后,SGC-7901 细胞中 FOXO1 mRNA 水平无明显变化($P>0.05$),FOXO1 基因表达在蛋白水平相应下调或上调。结论:体外实验中,miR-27a 可通过靶向抑制 FOXO1 的表达抑制胃癌细胞凋亡,miR-27a/FOXO1 轴可以为胃癌治疗提供新的策略。

关键词 胃癌;miR-27a;FOXO1;凋亡

中图分类号 R735.2

文献标志码 A

Influence of miR-27a on apoptosis of gastric cancer cells in vitro

ZHANG Yue, GUAN Xu-wen, WANG Jing-ya, HUANG Ding-zhi

(Department of Gastrointestinal Medical Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To explore the influence of miR-27a on apoptosis and mechanism in gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods:** Gastric cancer (GC) cell lines SGC-7901 of over-expressed miR-27a and less-expressed FOXO1 were established. Flow cytometry was used to measure cell apoptosis. The protein expressions of p53, BCL-2, LC3I and LC3II were detected by Western blot (WB). The expressions of FOXO1 in cells of up-regulated and down-regulated miR-27a were also examined by WB. Dual luciferase reporter assay was used to verify the target gene of miR-27a. Real-time PCR was employed to determine miR-27a levels of cells transfected by miR-27a mimics and inhibitors and levels of FOXO1 mRNA. **Results:** Compared with normal control cells, apoptosis rates of miR-27a up-regulated cells were decreased. WB suggested that BCL-2 expressions were up-regulated while p53, LC3I and LC3II expressions were down-regulated as compared to control groups ($P<0.05$). Experiments in cells of low-expressed FOXO1 had similar results. Results of dual luciferase reporter assay showed that FOXO1 was target gene of miR-27a. MiR-27a mimics and inhibitors were successfully transfected into GC cells. FOXO1 mRNA levels had no significant change in cells transfected by miR-27a mimics and inhibitors ($P>0.05$). MiR-27a negatively regulated FOXO1 protein expression. **Conclusion:** In vitro, miR-27a inhibits GC cell apoptosis by targeting FOXO1. miR-27a/FOXO1 axis maybe a new therapeutic target in gastric cancer.

Key words gastric cancer; miR-27a; FOXO1; apoptosis

胃癌是消化系统常见恶性肿瘤之一,其死亡率位于恶性肿瘤第二位^[1]。虽然胃癌治疗方式有一定进展,但预后并没有得到相应的改善。近年来,肿瘤治疗进入了靶向治疗新时代,随着对胃癌发生、发

展分子机制的深入探索,靶向药物在胃癌中的应用逐渐增多^[2],但尚未有突破性的结果,因此寻找新的治疗靶点具有重要的临床意义。微小 RNA (miRNA) 是一种小分子非编码 RNA,可通过与靶基因 mRNA 分子 3'非翻译区 (3'untranslated region, 3'UTR) 结合而影响肿瘤细胞的生物学行为。miR-27a 位于人 19 号染色体上,属于 miRNA-23a-24-27a 簇,已证实在肾细胞癌、肝细胞癌、神经胶质瘤及乳腺癌等多种

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81572321);天津市应用基础与前沿技术研究计划(15JCYBJC28200)

作者简介 张悦(1991-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤学;通信作者:黄鼎智, E-mail:hdz199109@163.com。

恶性肿瘤中表达上调,参与调控细胞增殖、凋亡、分化等病理生理过程^[3-6]。有文献报道 miR-27a 在胃腺癌中高表达,并通过与抑制素基因靶向结合而抑制胃癌细胞生长^[7]。笔者前期的研究表明 miR-27a 在胃癌中表达显著上调,进一步的预后分析显示 miR-27a 高表达者预后欠佳^[8-9]。以上研究结果提示 miR-27a 在胃癌中可能发挥了癌基因的作用。叉头框蛋白 O1 (forkhead box transcription factors O1, FOXO1) 是 FOXO 家族中研究较为成熟的一员,在肿瘤或其他疾病中发挥了重要的作用。研究表明,FOXO1 在一些肿瘤中可作为 miRNA 的靶基因,如在乳腺癌中,miR-27a、miR-182 及 miR-96 可以协同靶向抑制 FOXO1 表达,进而促进了细胞增殖并参与了细胞周期转换^[10]。在肺癌中,miR-411 通过沉默 FOXO1 表达促进肺癌细胞增殖^[11]。基于上述研究背景,本实验旨在探讨 miR-27a 对胃癌细胞株 SGC-7901 的凋亡作用,同时研究敲低 FOXO1 对胃癌细胞凋亡的影响,并对 miR-27a 与 FOXO1 的关系进行验证与分析,以期对胃癌治疗新靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃腺癌细胞株 SGC-7901 购自北京协和医科大学细胞资源中心;Trizol Reagent, lipofectamine 2000 Reagent 购自美国 Invitrogen 公司;SYBR@ PrimeScript@ miRNA RT-PCR Kit 购自大连宝生物公司;miR-27a mimics 质粒、miR-27a mimics 对照质粒、miR-27a inhibitors 质粒、miR-27a inhibitors 对照质粒、si-FOXO1 质粒及 si-FOXO1 对照质粒均购自上海吉玛公司;FOXO1 一抗购自美国 Abcam 公司;辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司;报告基因质粒购自美国 ProGada 公司;细胞凋亡 Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 SGC-7901 细胞培养于含有 10% 的胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中。取生长状态良好的细胞,于转染前一天将细胞接种于培养皿中,按照说明书用 lipofectamine 2000 转染试剂盒分别转染 miR-27a mimics 质粒,miR-27a mimics 对照质粒,miR-27a inhibitors 质粒,miR-27a inhibitors 对照质粒,si-FOXO1 质粒及 si-FOXO1 对照质粒,细胞培养 24~48 h 后进行后续的实验。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率-Annexin V/PI 双染色法 收集胃癌细胞 SGC-7901 到 10 mL 的离

心管中,每样本细胞数为 3×10^6 /mL,1 000 r/min 离心 5 min 后弃去培养液。用孵育缓冲液洗涤 1 次,1 000 r/min 离心 5 min。用 100 μ L 的标记溶液重悬细胞,室温下避光孵育 15 min,1 000 r/min 离心 5 min 沉淀细胞,孵育缓冲液洗 1 次。加入 Annexin V-FITC/PI 溶液,4℃下孵育 20 min。最后补 400 μ L PBS,随即进行流式细胞仪检测,Annexin V-FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光。加入 Annexin V-FITC/PI 溶液 4℃下孵育 20 min,避光并不时振动。随即进行流式细胞仪分析,流式细胞仪激发光波长 488 nm,用波长 515 nm 的通带滤器检测 FITC 荧光,用波长大于 560 nm 的滤器检测 PI。凋亡细胞对所有用于细胞活性鉴定的染料如 PI 有抗染性,坏死细胞则无此特性。细胞膜有损伤的细胞的 DNA 可被 PI 着染产生红色荧光,而细胞膜保持完好的细胞则不会有红色荧光产生。因此,在细胞凋亡的早期 PI 不会着染而没有红色荧光信号。正常活细胞与此相似。

1.2.3 Western blot 检测 p53、BCL-2、LC3I、LC3II 及 FOXO1 蛋白表达 收集转染后 48 h 的 SGC-7901 细胞,加入 RIPA 细胞裂解液后离心收集 SGC-7901 细胞中总蛋白,经 10%-15%SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,4℃、5%脱脂牛奶封闭 1 h 后,加入一抗,4℃孵育过夜。TBS-T 洗去一抗,辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1 h,TBS-T 洗涤 3 次,ECL 试剂盒显影,以 β -actin 作为内参。

1.2.4 双荧光素酶报告基因试验 根据生物信息学预测结果得到 miR-27a 的潜在靶基因 FOXO1,同时得到 miR-27a 在 FOXO1 基因 3'UTR 中结合位点,将含有靶位点的 3'UTR 序列及突变型 3'UTR 序列进行全基因合成,然后将目的序列构建至荧光素酶报告基因载体,将 miR-27a 表达质粒单独转染或者与荧光素报告载体共转染至 SGC-7901 细胞。转染后 48 h 以酶标仪检测荧光素酶的活性。

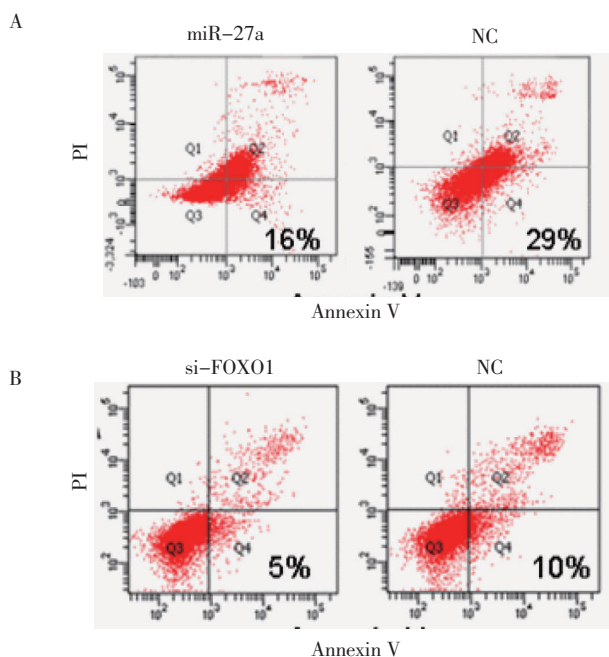
1.2.5 RNA 的提取及 Real-time PCR 检测 采用 Trizol 试剂提取 SGC-7901 细胞总 RNA,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 质量。根据 SYBR@ PrimeScript@ miRNA RT-PCR Kit 试剂盒说明书加入 500 ng 的总 RNA 及逆转录反应所需试剂。得到的逆转录产物用相应的 PCR 引物在定量 PCR 仪进行实时定量 PCR。PCR 条件为 95℃ 5 s,60℃ 34 s,进行 40 个循环。miR-27a PCR 引物序列上游:5'-CGGCGGTTTCACAGTGGCTAAG-3',下游:5'-CCAGTGCAGGTCC GAGGTAT-3';FOXO1 基因引物序列上游 5'-TGGACATGCTCAGCAGACATC-3',下游:5'-TTGGGTCAGGCGGTTCA-3'; β -actin 基因引物序列上游:

5'-ACACCTTCTACAATGA GCTG-3',下游:5'-CAT GATGGAGTTGAAGGTAG-3'。

1.3 统计学分析 所有数据都至少来自3组独立的实验。数据处理采用SPSS软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有统计结果以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

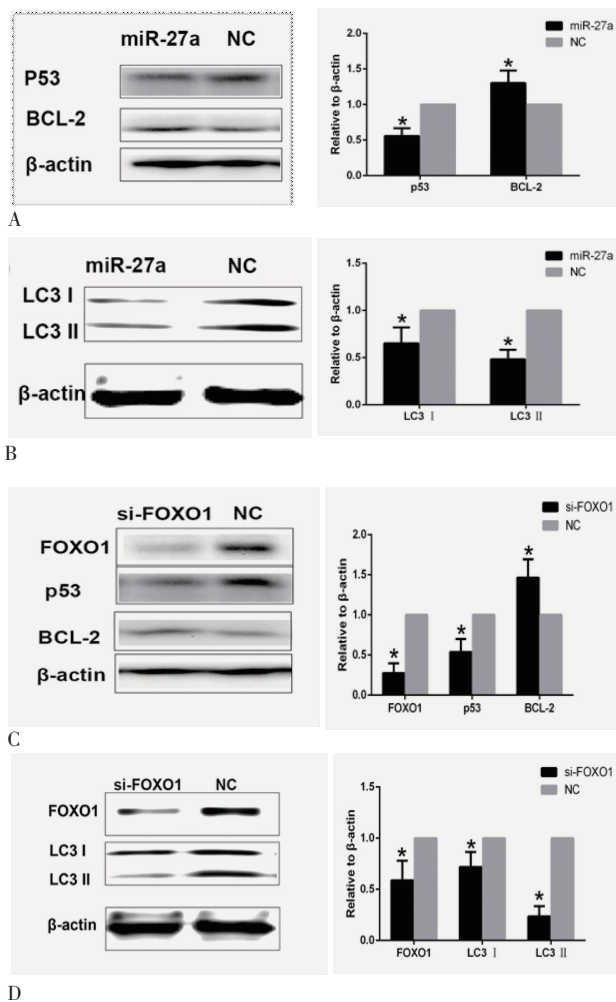
2.1 上调 miR-27a 及敲低 FOXO1 对胃癌细胞 SGC-7901 细胞凋亡的影响 Annexin V/PI 双染色法可以区分不同凋亡时期的细胞。在双变量流式细胞仪的散点图上,左上象限表示机械损伤细胞(Annexin-FITC-/PI+);左下象限显示正常活细胞(Annexin-FITC-/PI-);右上象限是凋亡中晚期细胞(Annexin-FITC+/PI+);右下象限为早期凋亡细胞(Annexin-FITC+/PI-)。凋亡率为右上象限与右下象限细胞占总细胞数的比例。实验结果如图1A,miR-27a 过表达组及其对照组细胞凋亡率分别为16%、29%,表明 miR-27a 过表达可显著抑制 SGC-7901 细胞凋亡($P < 0.05$)。而如图1B所示,FOXO1 低表达组及其对照组细胞凋亡率分别为5%、10%,表明 FOXO1 低表达亦显著抑制 SGC-7901 细胞凋亡($P < 0.05$)。



A.miR-27a 过表达抑制 SGC-7901 细胞凋亡;B. si-FOXO1 可抑制 SGC-7901 细胞凋亡

图1 上调 miR-27a 或敲低 FOXO1 抑制胃癌细胞凋亡
Fig 1 Over-expression of miR-27a or low-expression of FOXO1 inhibited gastric cancer cell apoptosis

2.2 上调 miR-27a 及敲低 FOXO1 对胃癌细胞 SGC-7901 p53、BCL-2、LC3I 及 LC3II 的表达水平的影响 Western blot 检测结果显示,敲低 FOXO1 组,FOXO1 蛋白表达较对照组下调($P < 0.05$);相对各自的对照组,上调 miR-27a 组及 si-FOXO1 组凋亡相关蛋白 p53 表达水平下降,BCL-2 表达上调,自噬相关蛋白 LC3I、LC3II 表达下降($P < 0.05$)(图2)。



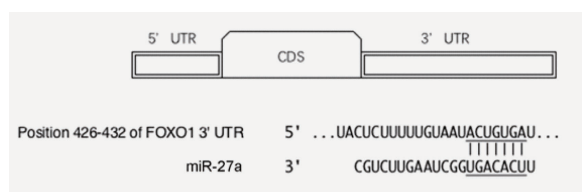
A&B. 上调 miR-27a 后 BCL-2 表达上调,p53、LC3I、LC3II 表达下调; C&D. 敲低 FOXO1 后 BCL-2 表达上调,p53、LC3I、LC3II 表达下调
图2 上调 miR-27a 及敲低 FOXO1 后 p53、BCL-2、LC3I、LC3II 蛋白表达变化

Fig2 Changes in expression of p53, BCL-2, LC3I and LC3II in miR-27a over-expression and FOXO1 low-expression

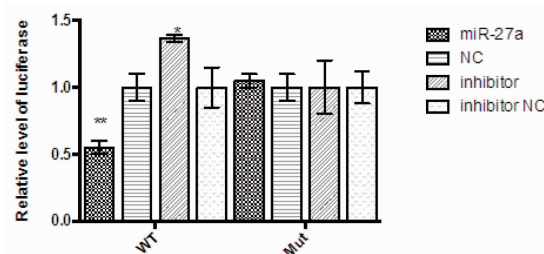
2.3 miR-27a 靶基因的验证 通过生物信息学方法,用靶基因预测数据库 Target Scan、miRDB及miRanda 网站预测 miRNA-27a 的靶基因,获得潜在的靶点 FOXO1。Realtime-PCR 检测结果显示 miR-27a 高表达质粒、miR-27a 低表达质粒转染至胃癌细胞后 miR-27a 水平分别上调、下调,表明了 miR-27a 高表达质粒、miR-27a 低表达质粒成功转染至胃癌细

胞中。应用双荧光素酶报告基因验证,结果显示,在野生型 FOXO1 3'UTR 组,miR-27a 高表达组的荧光素酶活性比相应的对照组低,miR-27a 低表达组的荧光素酶活性则比相应的对照组高($P<0.05$)。而在突变型 FOXO1 3'UTR 组,miR-27a 高表达或低表达后荧光素酶活性与对照组相比并没有明显变化($P<0.05$) (图 3)。

A



B

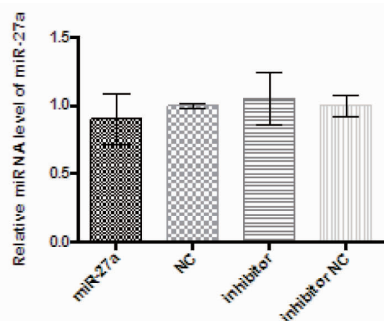


A 通过靶基因预测网站得到 miR-27a 在 FOXO1 中的作用位点,并将其突变;B 双荧光素酶报告基因检测验证了 miR-27a 靶向结合 FOXO1

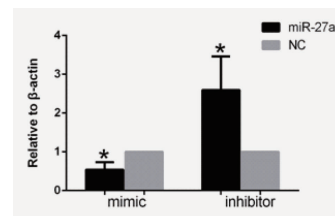
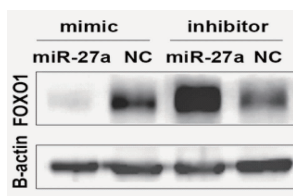
图 3 验证 miR-27a 与 FOXO1 之间的靶点关系

Fig 3 Verification of target relationship between miR-27a and FOXO1

A



B



A 上调或下调 miR-27a 对 SGC-7901 细胞中 FOXO1 mRNA 水平无明显变化;B miR-27a 负性调控 SGC-7901 细胞中 FOXO1 蛋白水平

图 4 miR-27a 在蛋白水平上负性调控 FOXO1 的表达

Fig 4 miR-27a negatively regulated the protein expression of FOXO1

3 讨论

近年来,miRNA 在人类肿瘤研究领域获得较多关注。miRNA 是一种非编码短链 RNA,通过与靶基因 mRNA 3'UTR 完全或不完全碱基互补配对,促进靶基因 mRNA 的降解或抑制靶基因的翻译,发挥了癌基因或抑癌基因的功能。目前 miR-27a 在胃癌中的体内外研究多集中于其对肿瘤细胞增殖、侵袭迁移能力及细胞周期阻滞的影响,而针对细胞凋亡的研究尚属空白。因而本研究对 miR-27a 在胃癌细胞凋亡中的作用及作用机制进行了初步探索。

细胞凋亡是由基因控制的程序化细胞主动死亡,在调节机体正常发育和维持稳态中发挥重要作用。肿瘤细胞存在凋亡逃逸,从而获得了无限增殖的能力。本研究对转染 miR-27a 过表达质粒的中分化人胃腺癌 SGC-7901 细胞株的凋亡情况进行了研究,结果显示,在胃癌细胞中 miR-27a 过表达可以显著抑制细胞凋亡,提示 miR-27a 在胃癌的发生发展中发挥了癌基因的作用并可作为潜在的胃癌治

2.4 miR-27a 对胃癌细胞 SGC-7901 中 FOXO1 表达的影响 Realtime PCR 结果显示,相对于各自对照组,上调或下调 miR-27a 后,SGC-7901 细胞中 FOXO1 mRNA 水平无明显变化($P>0.05$)。转染 miR-27a mimic 组细胞中 FOXO1 蛋白水平较其对照组低($P<0.05$),转染 miR-27a inhibitor 组细胞中 FOXO1 蛋白水平较其相应对照组高($P<0.05$) (图 4)。

疗新靶点。

FOXO 是 FOX 家族中的 O 亚族,是生理及病理状态下均发挥重要作用的转录因子,由 FOXO1、FOXO3、FOXO4 及 FOXO6 组成,4 个成员各自发挥着不同的功能^[12]。研究表明 FOXO1 在乳腺癌、肺癌、原发性肝癌、骨肉瘤等肿瘤中呈低表达,可通过调控下游的肿瘤相关基因的表达而参与细胞增殖、凋亡及转移等过程,发挥着抑癌基因的功能^[10,13-14]。Reagan-Shaw 等发现抑制乳腺癌细胞中 PI3K 表达后,FOXO1 表达上调,进而促进了细胞凋亡和导致细胞周期阻滞^[15]。本研究中敲低 SGC-7901 细胞中 FOXO1 表达后得到了与转染 miR-27a mimics 类似的实验结果,即 FOXO1 表达下调抑制胃癌细胞凋亡。提示 FOXO1 可以为胃癌治疗提供新的方向。

通过生物信息学方法得到 miR-27a 潜在的靶点 FOXO1,目前研究亦提示在一些肿瘤中 miR-27a 与 FOXO1 存在靶点关系^[10,15]。本研究应用双荧光素酶报告基因进行了验证,结果表明 pre-miR-27a 前

体能够显著降低野生型 FOXO1 3'UTR 组质粒的荧光活性,而对突变型 FOXO1 3'UTR 组质粒没有影响,最终证实了 FOXO1 是胃癌 SGC-7901 细胞中 miR-27a 的靶基因。进一步研究显示上调/下调 miR-27a 后,SGC-7901 细胞中 FOXO1 mRNA 水平无明显变化,FOXO1 蛋白水平相应下调/上调,这提示 miR-27a 能够在蛋白翻译水平负性调控 FOXO1 蛋白的表达。由此推断:miR-27a 通过抑制靶基因 FOXO1 的表达抑制胃癌细胞凋亡。

BCL-2 是细胞凋亡相关研究中研究最多的一种抗凋亡蛋白。而 p53 蛋白是重要的细胞凋亡调控因子,可以监视 DNA 损伤及诱导细胞凋亡,抑制细胞增殖。据文献报道 BCL-2 能够抑制 p53 介导的凋亡^[16]。本研究应用 Western blot 法对上调 miR-27a/敲低 FOXO1 的胃癌细胞中 BCL-2 及 p53 水平进行检测,结果显示 BCL-2 表达上调,p53 表达下降,由此进一步印证了 miR-27a 抑制胃癌细胞凋亡及 FOXO1 促进细胞凋亡的结论。同时可以推断,BCL-2 通过抑制 p53 的表达参与了 miR-27a/FOXO1 轴对胃癌细胞凋亡的影响过程,进而促进胃癌的发生发展,但其中的作用机制尚需深入研究。

肿瘤细胞受细胞程序性死亡的调控,而凋亡和自噬是程序性死亡的两种形式,且凋亡和自噬有着密切的关系。有文献报道,葡萄籽原花青素可以通过调控 ROS 表达而诱导凋亡和自噬,当加入 3-MA 抑制自噬时,葡萄籽原花青素诱导细胞凋亡的能力下降,表明了自噬可以促进凋亡^[17]。本研究对上调 miR-27a/敲低 FOXO1 的胃癌细胞中自噬相关蛋白 LC3I/LC3II 进行检测,结果表明 LC3I/LC3II 表达下降,由此我们可初步推断 miR-27a 过表达及 si-FOXO1 可以抑制自噬而抑制胃癌细胞凋亡,从而在胃癌的进展过程中发挥重要作用。

由于胃癌早期筛查及诊断率低,多数胃癌患者在被确诊时已为晚期,化疗为主要治疗手段,但因原发或获得性耐药的出现,胃癌治疗陷入瓶颈。由于胃癌具体的发病机制未被阐明,故尚无良好的靶点。本研究分析了 miR-27a 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响及其作用机制,初步得出了 miR-27a 可通过靶向抑制 FOXO1 的表达抑制胃癌细胞凋亡的结论,这提示 miR-27a/FOXO1 轴可以作为胃癌治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] Ferro A, Peleteiro B, Malvezzi M. Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980–2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(7):1330
- [2] Satoh T, Lee K H, Rha S Y, et al. Randomized phase II trial of nimotuzumab plus irinotecan versus irinotecan alone as second-line therapy for patients with advanced gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2014, 18(4):824
- [3] Peng H, Wang X, Zhang P, et al. miR-27a promotes cell proliferation and metastasis in renal cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2):2259
- [4] Li S, Li J, Fei B Y, et al. MiR-27a promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation through suppression of its target gene peroxisome proliferator-activated receptor gamma[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(7):941
- [5] Xu W, Liu M, Peng X, et al. miR-24-3p and miR-27a-3p promote cell proliferation in glioma cells via cooperative regulation of MXI1[J]. *Int J Oncol*, 2012, 42(2):757
- [6] Kong L Y, Xue M, Zhang Q C, et al. In vivo and in vitro effects of microRNA-27a on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through targeting of SFRP1 gene via Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9):15507
- [7] Liu T, Tang H, Lang Y, et al. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin[J]. *Cancer Lett*, 2008, 273(2):233
- [8] Liu R, Zhang C, Hu Z, et al. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 47(5):784
- [9] Huang D, Wang H, Liu R, et al. miRNA27a is a biomarker for predicting chemosensitivity and prognosis in metastatic or recurrent gastric cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(3):549
- [10] Guttilla I K, White B A. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(35):23204
- [11] Zhao Z, Qin L, Li S. miR-411 contributes the cell proliferation of lung cancer by targeting FOXO1[J]. *Tumour Biol*, 2015, 37(4):5551
- [12] Farhan M, Wang H, Gaur U, et al. FOXO Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(7):815
- [13] Pei H, Jin Z, Chen S, et al. MiR-135b promotes proliferation and invasion of osteosarcoma cells via targeting FOXO1[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 400(1–2):245
- [14] Yang X W, Shen G Z, Cao L Q, et al. MicroRNA-1269 promotes proliferation in human hepatocellular carcinoma via downregulation of FOXO1[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:909
- [15] Reagan-Shaw S, Ahmad N. RNA interference-mediated depletion of phosphoinositide 3-kinase activates forkhead box class O transcription factors and induces cell cycle arrest and apoptosis in breast carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2):1062
- [16] 张克君, 李德春, 朱东明. NF-κBp65、Bcl-2、Bcl-xL 蛋白在胰腺癌中的表达及其与 P53 和凋亡指数的关系[J]. *中国癌症杂志*, 2007(2):105
- [17] Hah Y S, Kim J G, Cho H Y, et al. Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds induce apoptotic and autophagic cell death via generation of reactive oxygen species in squamous cell carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2):1925

(2018-02-27 收稿)