

· 健脾消癌方抑制结直肠癌转移分子机制研究专题 ·

[编者按] 结直肠癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,随着我国人口老龄化、生活方式、饮食习惯的改变,发病率和死亡率均处于高水平,中医药可通过多靶点、多层次、多环节的综合调控作用抑制结直肠癌的发生、发展与转移,是不可缺少的结直肠癌综合治疗手段之一。健脾消癌方由我国著名中医肿瘤专家蒋益兰教授多年临床经验总结而来,临床疗效明确,该方能有效降低结直肠癌中晚期患者的复发转移率,提高患者生活质量,稳定瘤体,延长生存期。在此基础上,课题组基础研究团队从现代肿瘤分子学角度,采用流式细胞技术,实时荧光定量PCR法技术,蛋白质免疫杂交技术对该中药方剂的药理机制进行深入研究。通过这一系列研究,本课题组希望从结直肠癌“虚”、“瘀”、“毒”的中医病因病机特点入手,从肿瘤的mRNA, miRNA, lncRNA以及蛋白质等多个生物大分子层面,对健脾消癌方抑制结直肠癌的发生、发展和转移进行了深入研究,找到健脾消癌方治疗结直肠癌的确切靶点,以期开发治疗结直肠癌的有效中成药。

健脾消癌方抑制结肠癌增殖的作用机制

罗燕¹, 罗吉¹, 蒋益兰^{1*}, 李勇敏¹, 谭小宁¹, 吕元¹, 马荣丽²

(1. 湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006; 2. 湖南中医药大学研究生院, 长沙 410208)

[摘要] 目的:观察健脾消癌方对结肠癌 HCT116 细胞中微小 RNA-21 (microRNA-21, miR-21), 第 10 号染色体丢失的磷酸酶基因 (phosphatase and tensin homo-log deleted in chromosome 10, PTEN) 表达的影响,探讨健脾消癌方抑制结肠癌转移的可能作用机制。方法:10%, 15%, 20% 健脾消癌方含药血清处理 HCT116 细胞后,实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 miR-21, PTEN mRNA 的表达水平,蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 PTEN 蛋白的表达水平。结果:与空白组比较,健脾消癌方低剂量组 miR-21 mRNA 相对表达量降低,PTEN mRNA 相对表达量升高,但差异无统计学意义;健脾消癌方中剂量组 miR-21 mRNA 相对表达明显降低,PTEN mRNA 相对表达明显升高 ($P < 0.05$);健脾消癌方高剂量组 miR-21 mRNA 相对表达量显著降低,PTEN mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.01$);与健脾消癌方中、低剂量组比较,健脾消癌方高剂量组 miR-21 mRNA 相对表达量明显降低,PTEN mRNA 相对表达量明显升高 ($P < 0.05$)。与空白组比较,健脾消癌方中、低剂量组 PTEN 蛋白相对表达量升高,差异无统计学意义;与空白组比较,健脾消癌方高剂量组 PTEN 蛋白相对表达量明显上升 ($P < 0.05$);与健脾消癌方中、低剂量组比较,健脾消癌方高剂量组 PTEN 蛋白相对表达量明显升高 ($P < 0.05$)。结论:健脾消癌方可能通过降低 miR-21 的表达,上调 miR-21 靶基因 PTEN 蛋白表达抑制结肠癌的增殖。

[关键词] 健脾消癌方; 结肠癌; HCT116 细胞; 微小 RNA-21; 第 10 号染色体丢失的磷酸酶基因

[中图分类号] R285.1; R22; R241.6; R2-031 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2018)06-0151-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180683

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171212.1742.016.html>

[网络出版时间] 2017-12-13 13:31

Mechanism of Jianpi Xiaocai Prescription in Inhibiting Colon Cancer Proliferation

LUO Yan¹, LUO Ji¹, JIANG Yi-lan^{1*}, LI Yong-min¹, TAN Xiao-ning¹, LYU Yuan¹, MA Rong-li²

(1. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Changsha 410006, China;

2. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[收稿日期] 20170829(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373602);湖南省自然科学基金青年基金项目(2017JJ3186);湖南省中医药研究院重点项目(201604,201504)

[第一作者] 罗燕, 硕士, 研究实习员, 从事中西医结合防治肿瘤疾病的研究, Tel:0731-85920129, E-mail:360319179@qq.com

[通信作者] *蒋益兰, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合防治肿瘤疾病的研究, Tel:0731-88889828, E-mail:tianshangren624@163.com

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Jianpi Xiaoi prescription on the expressions of microRNA-21 (miR-21), phosphatase and tensin homo-log deleted in chromosome 10 (PTEN) in colon cancer HCT116 cells, in order to investigate the possible mechanism of Jianpi Xiaoi prescription on the metastasis of colon cancer. **Method:** After the treatment with drug serum (10%, 15% and 20%), Real-time PCR was used to detect the mRNA expressions of miR-21, PTEN, and the protein expression of PTEN was detected by Western blot. **Result:** Compared with control group, the relative mRNA expression of miR-21 was decreased, while the relative mRNA expression of PTEN was significantly increased in the low-dose Jianpi Xiaoi prescription group. Compared with control group, the relative mRNA expression of miR-21 in high-dose group was statistically lower, while the mRNA relative expression of PTEN in high-dose group was higher ($P < 0.05$). Compared with the low and middle-dose groups, the relative mRNA expression of miR-21 in high-dose group was decreased, while the relative mRNA expression of PTEN was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with control group, the relative protein expression of PTEN in high-dose group was significantly higher than that in low-dose group ($P < 0.05$). The relative protein expression of PTEN in high-dose group was higher than that in low-dose group and middle-dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Jianpi Xiaoi prescription can inhibit the proliferation of colon cancer by reducing the expression of miR-21 and improving the expression of anti-cancer protein PTEN.

[Key words] Jianpi Xiaoi prescription; colon cancer; HCT116 cell; microRNA-21 (miR-21); phosphatase and tensin homo-log deleted in chromosome 10 (PTEN)

结直肠癌是临床常见恶性肿瘤之一,我国结直肠癌年均发病人数为 37.63 万人,死亡人数为 19.10 万人,发病率与死亡率均居消化道肿瘤第 2 位^[1]。中医药治疗结直肠癌是我国的一大特色,其可通过多靶点、多层次、多环节的综合调控作用抑制肿瘤的发生、发展,稳定瘤体,改善症状和生活质量,抗术后复发和转移,延长生存期,是结直肠癌综合治疗中不可缺少的治疗手段之一^[2]。中医药治疗肿瘤的作用机制主要是抑制肿瘤细胞增殖和诱导分化、诱导细胞自噬和凋亡、影响细胞的生长周期、抑制端粒酶活性、抗血管生成等^[3]。

健脾消癌方由著名中医肿瘤专家蒋益兰教授多年临床经验总结而来,课题组前期临床研究表明其可有效降低大肠癌晚期患者的复发转移,提高患者生活质量,稳定瘤体,延长生存期,并初步证明健脾消癌方治疗结直肠癌与调节免疫因子 CD4⁺CD25⁺ 等调节性 T 细胞相关^[4-5]。基础研究显示通过抑制结直肠癌组织中血管内皮生长因子,基质金属蛋白酶-9,金属蛋白酶抑制剂-1 表达水平,提高血管内皮抑素表达水平,抑制结直肠癌血管生成,拮抗结直肠癌转移,从血管生成方面阐释了健脾消癌方治疗结直肠癌的作用机制^[6-7]。而后,本课题组进一步研究表明健脾消癌方可通过阻滞 HCT116 细胞周期,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,通过上调凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 因子 (Bax),下调半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3),B 淋巴细胞瘤 2 相关 xL 因

子 (Bcl-xL) 蛋白的表达诱导细胞凋亡^[8]。但健脾消癌方抑制细胞增殖的机制尚不明确,因此本实验在前期研究基础上,通过检测肿瘤细胞增殖相关基因微小 RNA-21 (miR-21) 及靶基因第 10 号染色体丢失的磷酸酶基因 (PTEN) 的表达,进一步明确健脾消癌方抑制结直肠癌增殖的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株和动物 人结肠癌细胞株 HCT116 细胞购自中国科学院上海细胞中心,编号 TCHU99; SPF 级 SD 大鼠 20 只,雌雄各半,体质量 (220 ± 20) g,购自湖南省长沙斯莱克实验动物中心,合格证号 SCXK(湘)2016-0002,动物实验符合湖南省中医药研究院附属医院实验动物伦理委员会规定。

1.2 药物 健脾消癌方药物组成为人参 10 g,薏苡仁 30 g,半枝莲 30 g,重楼 10 g,莪术 10 g,郁金 15 g 等,药物购自湖南省中医药研究院附属医院中药房,经湖南省中医药研究院附属医院药剂科主任田其学主任药师鉴定所有药材符合 2015 年版《中国药典》标准。2 倍量处方,温水浸泡 1 h,水量超出药物 5 ~ 6 cm,大火煮沸后转小火煎 30 min,趁热过滤,药渣按前法再煎 2 次,将 3 次药液混匀、过滤,减压浓缩为含生药 1.5 g·mL⁻¹,4 ℃ 保存,1 周内用完。

1.3 试剂 Dulbecco's modified Eagle Media (DMEM) 培养基,胎牛血清(美国 Life Technology 公司,批号分别为 05197,1640958);cDNA 逆转录试剂

盒,实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 试剂盒 (日本 Takara 公司,批号分别为 RR047Q,RR430A); PTEN 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司,批号 ab32199); β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体 (美国 Sigma 公司,批号 A5316);二抗 (中杉金桥公司,批号 T14987)。

1.4 仪器 HERAcell2401 型二氧化碳细胞培养箱 (美国 Thermo 公司);FACSCalibur 型流式细胞分析仪 (美国 BD 公司);SE300 型蛋白质电泳仪,TE22 型蛋白质转膜仪 (美国 Hoefer 公司);GBOX 型凝胶成像系统 (美国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HCT116 细胞培养于含 10% 胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素和链霉素的 DMEM (高糖) 培养液中,置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内进行培养,细胞汇合率达 80% 左右,胰酶消化细胞成单个细胞悬液,1:3 进行传代培养。

2.2 健脾消癌方含药血清制备^[9] SD 大鼠 20 只,雌雄各半,随机分成空白组和药物组,每组 10 只。按照人与大鼠体表面积换算大鼠用药剂量,药物组按 70 kg 成年人 105 g·d⁻¹ 的药物量,即 9.45 g·kg⁻¹ 药物量对大鼠进行灌胃;空白组按大鼠体质量灌胃等容积的生理盐水。每天灌胃 1 次,连续 6 d,于第 7 天最后 1 次灌胃后 1 h,10% 水合氯醛按 3 mL·g⁻¹ 腹腔麻醉大鼠,腹主动脉取血,4 °C,2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,吸取血清,合并同组动物血清,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,-20 °C 保存备用。

2.3 分组及给药 选择对数生长期的 HCT116 细胞,按 5 × 10⁵ 个/孔接种于 60 mm 培养皿中,每组设置 3 个重复,每皿 6 mL 培养基;置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内进行培养过夜,次日,更换新鲜培养基。将 HCT116 细胞分为空白组 (15% 空白血清),健脾消癌方高剂量组 (20% 含药血清),健脾消癌方中剂量组 (15% 含药血清),健脾消癌方低剂量组 (10% 含药血清),置于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内进行培养 48 h。

2.4 Real-time PCR 检测 miR-21,PTEN mRNA 表达 各组细胞分别培养 48 h 后,酚-三氯甲烷法提取各组细胞总 RNA,琼脂糖凝胶电泳以及紫外分光光度仪测定 RNA 的完整性,各组样品的吸光度 A 比值均在 1.8 ~ 2.1,符合下一步逆转录实验要求。按 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara) 试剂盒说明书进行总 RNA 逆转录实验,逆转录条件:37 °C 30 min,98 °C 5 min,-20 °C 保存。

再以 cDNA 以模板,与基因特异性引物,通过 PCR 扩增 PTEN,miR-21,扩增条件:94 °C 30 s;94 °C 5 s,59 °C 30 s,40 个循环;95 °C 2 s,60 °C 15 s,95 °C 2 s,50 °C 保存。反应结束后首先对解离曲线进行分析,确保只有单一产物被扩增;之后对被扩增基因进行相对定量分析,实验重复 3 次。PTEN mRNA 表达水平,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参,以 $\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{目的基因}}} - \Delta C_{t_{\text{内参基因}}}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{最低样本}}} - \Delta C_{t_{\text{其他样本}}}$,计算相对表达 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。miR-21 表达水平以 U6 作为内参,方法同 PTEN。所用引物均由生工生物工程 (上海) 有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 List of primers

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
PTEN	上游 CGGCAGCATCAAATGTTTCAG	245
	下游 AACTGGCAGGTAGAAGGCAACTC	
GAPDH	上游 GAAGGTGAAGGTCGGAGT	226
	下游 GAAGATGGTGATGGGATTC	
miR-21	上游 GCCCGCTAGCTTATCAGACTGATG	75
	下游 GTGCAGGGTCCGAGGT	
U6	上游 GCGCGTCGTGAAGCGTTC	75
	下游 GTGCAGGGTCCGAGGT	

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 PTEN 蛋白表达 各组细胞分别培养 48 h 后,使用蛋白裂解液提总蛋白,二喹啉甲酸 (BCA) 法测定蛋白质浓度。取蛋白 40 μ g/孔进行 10% SDS-PAGE 分离,湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上,5% BSA 室温封闭 2 h,分别加入适量稀释后兔单克隆抗体 PTEN (1:5 000),鼠单克隆抗体 β -actin (内参,1:10 000),在摇床上 4 °C 孵育过夜;聚山梨酯与三乙醇胺缓冲盐水溶液 (TBST) 洗涤 3 次,分别加入相应二抗,山羊抗兔 (1:5 000,应用于 PTEN),山羊抗小鼠 (1:5 000,应用于 β -actin),室温摇床合适转速孵育 1 h,TBST 洗涤 2 次,TBS 洗涤 1 次,加入适量增强化学发光法 (ECL) 发光试剂,暗室内曝光显影,图像分析,读取灰度值。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据进行正态分布检验及组间方差齐性检验,符合正态分布及方差齐性,采用单因素方差分析;不符合正态分布、方差分析,采用 Kruska-Wallis H 进行统计处理;组间两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学

意义。

3 结果

3.1 健脾消癌方对 miR-21 mRNA 表达的影响 与空白组比较,健脾消癌方低剂量组 miR-21 mRNA 相对表达量降低,但差异无统计学意义;与空白组比较,健脾消癌方中剂量组 miR-21 mRNA 相对表达量明显降低 ($P < 0.05$),健脾消癌方高剂量组 miR-21 mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.01$);与健脾消癌方低、中剂量组比较,健脾消癌方高剂量组 miR-21 mRNA 相对表达量明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 健脾消癌方对结肠癌细胞 HCT116 中 miR-21 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on expression of miR-21 in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	miR-21 相对表达
空白	15	1.000 ± 0.011
健脾消癌方	10	0.813 ± 0.091
	15	0.654 ± 0.045 ¹⁾
	20	0.234 ± 0.087 ^{2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与健脾消癌方低、中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.2 健脾消癌方对 PTEN mRNA 表达的影响 与空白组比较,健脾消癌方低剂量组 PTEN mRNA 相对表达量升高,但差异无统计学意义;与空白组比较,健脾消癌方中剂量组 PTEN mRNA 相对表达量明显升高 ($P < 0.05$),健脾消癌方高剂量组 PTEN mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.01$);与健脾消癌方低、中剂量组比较,健脾消癌方高剂量组 PTEN mRNA 相对表达量明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

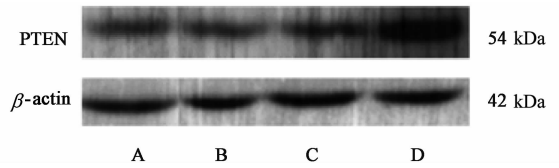
表 3 健脾消癌方对结肠癌细胞 HCT116 中 PTEN mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on mRNA expression of PTEN in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	PTEN
空白	15	1.000 ± 0.011
健脾消癌方	10	1.112 ± 0.055
	15	1.356 ± 0.069 ¹⁾
	20	2.135 ± 0.035 ^{2,3)}

3.3 健脾消癌方对 PTEN 蛋白表达的影响 与空白组比较,健脾消癌方高剂量组 PTEN 蛋白相对表达量明显升高 ($P < 0.05$),健脾消癌方低、中剂量组

相对表达量虽有升高,但差异无统计学意义;与健脾消癌方低、中剂量组比较,健脾消癌方高剂量组 PTEN 蛋白相对表达量明显升高 ($P < 0.05$)。见图 1,表 4。



A. 空白组;B. 健脾消癌方低剂量组(10% 含药血清);C. 健脾消癌方中剂量组(15% 含药血清);D. 健脾消癌方高剂量组(20% 含药血清)

图 1 健脾消癌方作用结肠癌细胞 HCT116 PTEN 蛋白表达电泳
Fig.1 Electrophoresis of PTEN protein expression in HCT116 cells

表 4 健脾消癌方对结肠癌细胞 HCT116 中 PTEN 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Jianpi Xiaoi prescription on expression of PTEN in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	PTEN/ β -actin
空白	15	1.000 ± 0.012
健脾消癌方	10	1.031 ± 0.061
	15	1.352 ± 0.045
	20	1.782 ± 0.065 ^{1,3)}

4 讨论

中医学认为,结直肠癌的病因多责之于正气不足,尤其是脾虚气弱,外邪趁虚而入,正虚无法驱邪外出以及维持机体内环境,邪气留滞,影响脏腑、气血、津液的正常功能,日久积聚成毒,气血运行不畅,滞而成瘀,癌毒内生;“虚”、“瘀”、“毒”相互作用,相互影响,共同促进了结直肠癌的发生和转移^[10]。健脾消癌方针对结直肠癌“虚”、“瘀”、“毒”病因病机而设,方中以人参、薏苡仁益气健脾,以健生化之源,而疗诸虚不足,从而达到扶正固本的目的;莪术、郁金活血化瘀,半枝莲、重楼清热解毒、消痈散结,全方配伍精要,攻补兼施,共奏益气健脾,化痰解毒之功。

PTEN 是一个具有脂质和蛋白磷酸酶活性的抑癌基因,它参与细胞的增殖、分化、凋亡、侵袭迁移,其低表达或缺失与肿瘤的进展和不良预后密切相关^[11-12]。Hocking 等^[13]通过收集 51 例结直肠癌患者的组织,采用免疫组化法进行检测,发现 37(51)例(73%)的结直肠癌组织中存在 PTEN 表达的缺失。microRNA 是一类小的(18~25 核苷酸)内源性非编码 RNA,在细胞的增殖、分化、凋亡过程中充当转录因子,miR-21 是微小 RNA 的重要一员,其在结

直肠癌、胃癌、肺癌、乳腺癌等诸多肿瘤中均呈高表达,与肿瘤的不良预后密切相关^[14-15]。CHEN等^[16]进行的一项结直肠癌与miR-21相关性Meta分析纳入了11项研究,3669例患者,结果提示,miR-21高表达的结直肠癌患者无病生存期、总生存期均较低。而作为miR-21靶基因的PTEN表达水平在结直肠癌组织中与miR-21呈负相关,且miR-21靶向作用于PTEN影响结直肠癌细胞的发生、发展^[17]。本课题组在前期研究基础上,进一步从microRNA角度研究健脾消癌方的作用机制。

本实验发现健脾消癌方可降低miR-21,升高PTEN mRNA的表达,且与健脾消癌方的药物浓度呈正相关;低、中浓度健脾消癌方含药血清作用于HCT116细胞后,其对抑癌基因PTEN蛋白的调控作用较弱,而增加至高浓度健脾消癌方含药血清时,健脾消癌方对PTEN具有明显的调控作用。这阐释了健脾消癌方可能通过降低miR-21的表达,进而调控其靶基因PTEN来拮抗结肠癌的转移,且其调控作用与其使用剂量呈正相关。

[参考文献]

[1] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[2] 许云, 杨宇飞. 结直肠癌中医药研究进展与思考[J]. 世界中医药, 2014, 9(7): 828-832.

[3] 朱元章, 张贵彪, 朱国福. 中药复方抗肿瘤机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 227-234.

[4] 王容容, 王其美, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1732-1736.

[5] 蒋益兰, 俞天俊, 赵晔. 健脾消癌方治疗老年中晚期大肠癌临床观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(3): 94-96.

[6] 李勇敏, 谭小宁, 徐琳本, 等. 健脾消癌方对结直肠癌转移模型裸鼠血管内皮生长因子与血管内皮抑素表达的影响[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2883-2886.

[7] 杨晓, 蒋益兰, 李勇敏, 等. 健脾消癌方对大肠癌肝转移裸鼠模型肝组织MMP-9、TIMP-1表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(10): 1323-1325.

[8] 简小兰, 杨晓, 蒋益兰, 等. 健脾益气化痰解毒方含药血清对结肠癌HCT116细胞增殖、周期、凋亡的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(11): 909-914.

[9] 张君涛, 王平, 刘爱峰, 等. 中药含药血清制备方法的研究概述[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11): 4006-4009.

[10] 吴霜霜, 戚溢铭, 阮善明, 等. 结直肠癌中医证候及临证用药规律的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(8): 1857-1860.

[11] CHEN L, GUO D. The functions of tumor suppressor PTEN in innate and adaptive immunity [J]. Cell Mol Immunol, 2017, 14(7): 581-589.

[12] Milella M, Falcone I, Conciatori F, et al. PTEN; multiple functions in human malignant tumors [J]. Front Oncol, 2015, doi: 10. 3389/fonc. 2015. 00024.

[13] Hocking C, Hardingham J E, Broadbridge V, et al. Can we accurately report PTEN status in advanced colon cancer? [J]. BMC Cancer, 2014, doi: 10. 1186/1471-2407-14-128.

[14] Lee K S, Nam S K, Koh J, et al. Stromal expression of microRNA-21 in advanced colon cancer patients with distant metastases [J]. J Pathol Transl Med, 2016, 50(4): 270-277.

[15] 王阶, 李敏, 刘咏梅, 等. miRNA在冠心病治疗中的作用及与中医药的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22): 1-5.

[16] CHEN Z, LIU H, JIN W, et al. Tissue microRNA-21 expression predicted recurrence and poor survival in patients with colon cancer-a Meta-analysis [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9(1): 2615-2624.

[17] Yazdani Y, Farazmandfar T, Azadeh H, et al. The prognostic effect of PTEN expression status in colon cancer development and evaluation of factors affecting it: miR-21 and promoter methylation [J]. J Biomed Sci, 2016, 23(1): 1-8.

[责任编辑 张丰丰]