

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.24.006

MiR-935 通过其靶基因 Notch1 调控胃癌 SGC7901 细胞的发生发展 *

何 彩¹ 奉 镭² 石 蕾^{3Δ} 徐骁骑¹ 叶美玲¹

(1 宜宾市第一人民医院消化内科 四川 宜宾 644100; 2 遂宁市中心医院消化内科 四川 遂宁 629000;

3 西南医科大学附属医院消化内科 四川 泸州 646000)

摘要 目的:探究 MiR-935 调控胃癌 SGC7901 细胞的增殖和浸润与 Notch1 基因表达的关系。**方法:**分别检测 40 例正常人胃粘膜组织与 40 例胃印戒细胞癌的 Notch1 表达情况,并分析胃印戒细胞癌组织中 Notch1 表达与患者年龄、性别、组织进展程度、TNM 分期、有无淋巴结转移的关系;采用 MiR-935 转染体外培养的 SGC7901 细胞系,检测 Notch1 的表达情况,其后采用 MiR-935 抑制剂处理,通过 Transwell 实验检测胃癌细胞的侵袭能力,细胞划痕实验检测胃癌细胞迁移能力。**结果:**正常人胃粘膜组织中 Notch1 表达呈阴性,而胃印戒细胞癌组织中 Notch1 表达呈阳性;Notch1 的表达与胃印戒细胞癌的 TNM 分期、有无淋巴结转移存在着显著的相关性;转染 MiR-935 的 SGC7901 细胞 Notch1 表达明显上调,采用 MiR-935 抑制剂处理后,Notch1 的表达显著下降。**结论:** MiR-935 可能通过调控 Notch1 的表达调控胃癌的扩增和浸润。

关键词: MiR-935; Notch1; 胃癌; 发生发展

中图分类号: R-33; R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)24-4628-05

MiR-935 Regulates the Development of Gastric Cancer SGC7901 Cells through Its Target Gene Notch1 *

HE Cai¹, FENG Lei², SHI Lei^{3Δ}, XU Xiao-qi¹, YE Mei-ling¹

(1 Digestive System Department, the First People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan, 644100, China;

2 Digestive System Department, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan, 629000, China;

3 Digestive System Department, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the relationship between MiR-935 regulation of expansion and infiltration of gastric cancer SGC7901 cells and Notch1 gene expression. **Methods:** The expression of Notch1 in 40 normal gastric mucosa tissues and 40 signet ring cell carcinomas was detected, and the relationship between Notch1 expression and age, sex, tissue progression, TNM stage and lymph node metastasis was analyzed. The expression of Notch1 in SGC7901 cell lines was detected by MiR-935 in vitro. MiR-935 inhibitor was used to treat these transfected cell lines. Transwell test was used to detect the invasive ability of gastric cancer cells before and after transfection. Cell scratch test was used to detect the migration of gastric cancer cells before and after transfection. Change of migration ability and detection of Notch1 expression. **Results:** The expression of Notch1 was negative in normal gastric mucosa, but positive in signet ring cell carcinoma. After analysis, it was found that the expression of SIX was significantly correlated with TNM stage and lymph node metastasis of signet ring cell carcinoma. After transfection of SGC7901 cell line into MiR-935, the expression of Notch1 was significantly up-regulated, while after treatment with MiR-935 inhibitor, Notch1 was expressed. It showed a significant decline. **Conclusion:** Notch1 is overexpressed in human gastric signet ring cell carcinomas and promotes the proliferation and infiltration of cancer cells. MiR-935 regulates the proliferation and infiltration of gastric cancer by regulating Notch1 expression.

Key words: MiR-935; Notch1; Gastric cancer; Occurrence and development

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)24-4628-05

前言

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,早期症状不明显,发现时多为中晚期,且并发转移。侵袭和转移是胃癌患者生存期较短的主要原因,与治疗 and 预后密切相关^[1-3]。恶性肿瘤转

移是多因子调控的过程,肿瘤细胞从原发灶的增殖生长到形成远处转移要经历漫长的行程,并有诸多调控基因参与。Notch1 信号通路在细胞的生长及凋亡过程中有着重要的作用,主要对器官的生长、发育起一定作用。近年来的研究表明其在乳腺癌、肺癌、胰腺癌、基底细胞癌等多种肿瘤的形成和发展中扮演着

* 基金项目:四川省卫生厅科研基金项目(140094)

作者简介:何彩(1984-),女,硕士,主治医师,研究方向:急性胰腺炎,电话:15892557035, E-mail: lihongfeizjzs@163.com

Δ 通讯作者:石蕾(1983-),女,硕士,副教授,副主任医师,研究方向:肝胆胰疾病

(收稿日期:2019-07-23 接受日期:2019-08-18)

重要的角色^[4-7]。

MiRNA 是一种无编码的短小核苷酸链, 其对细胞基因的表达起着重要的调控作用。MiR-935 是一种无编码的短小核苷酸链, 其主要作用为调控基因含量与表达, 多项研究表明 MiR-935 在癌症的发生发展中起着重要的作用, 而其在胃癌中的表达模式以及 MiR-935 是否对胃癌的生物学行为有影响, 目前仍知之甚少。有研究人员发现在膀胱癌组织中, MiR-935 的表达量较正常膀胱组织减低, 且可以通过降低膀胱癌 LAPT4B 的含量抑制膀胱癌细胞的增殖及浸润, MiR-935 在肝癌中也起着类似的作用^[8]。此外, 研究表明 miRNA-935 与

Notch1 基因的表达存在着密切的联系, 且调控着多种肿瘤的发生发展^[9-11]。因此, 本研究主要探讨了 miRNA 与 Notch1 在胃癌中的表达情况与肿瘤浸润转移的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

本次研究所用到的主要材料有 40 例正常人胃黏膜组织与 40 例胃印戒细胞癌组织、免疫组织化学染色试剂盒、Notch1 抗体、一抗二抗剥脱液、SGC7901 细胞株。

表 1 实验材料及来源统计表

Table 1 Statistical table of experimental materials and sources

Laboratory materials and reagents	Source
Normal human gastric mucosa and gastric imprinted carcinoma	Yibin First People's Hospital
Immunohistochemical Staining Kit	Beijing Bioss Biotechnology Co., Ltd.
Notch1 antibody	Sigma Company
Anti-stripping solution	Biyuntian Company
SGC7901 cell line	Shanghai Cell Bank, Chinese Academy of Sciences

1.2 方法

1.2.1 组织免疫组化染色 采用甲醛溶液固定标本, 固定完成后将所有标本进行石蜡切片, 每张切片厚度大约 5 μm , 将上述切片在二甲苯中脱蜡三次, 每次脱蜡时间不低于 2 min 但不高于 4 min, 脱蜡完成后在梯度乙醇中脱水, 蒸馏水冲洗, 采用苏木精对切片染色 3 min, 蒸馏水冲洗至肉眼无法看到蓝色染液, 伊红染色 40s, 蒸馏水冲洗, 最后用树胶将切片封闭, 将上述剩余石蜡切片进行二甲苯脱蜡, 在体积分数为 3% 的双氧水 - 甲醛溶液中作用 15 min 左右, 其后用蒸馏水冲洗, 于 10 g/L 胃蛋白酶溶液中孵化 20 min, 在孵化液中滴加 50 μL 小牛血清, 室温下封闭 30 min 后晾干, 分别加入抗体, 于 4℃ 冰箱内孵育一整晚, 第二日早上采用缓冲液冲洗, 滴加牛抗羊 IgG 于室温下孵育 1h, 其后在切片上滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 37℃ 孵育半小时, 缓冲液冲洗, DAB 显色, 然后用自来水反复冲洗, 复染完成后, 采用树胶将切片封闭。

1.2.2 细胞培养 将 SGC7901 细胞株培养于 DMEM 培养基, 对 SGC7901 细胞株进行培养(培养条件设定为 5% 体积分数的二氧化碳, 37℃), 隔天更换细胞培养液, 每日对细胞生长状况进行观察, 当发现 SGC7901 细胞生长达 85% 左右融合时, 采用胰酶对细胞间质进行消化处理, 其后进行传代培养。

1.2.3 细胞转染 转染前 1 天, 以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种生长至对数期的 Detroit-562 细胞于 6 孔板, 转染前先对细胞系进行饥饿处理 1 h, 并配备转染溶液(无血清培养基、转染试剂、质粒)并置于 37℃ 温育 15 min。将配置好的转染溶液缓慢滴注到 6 孔板内, 轻晃孔板后置于 37℃ 温育 5 h; 去除转染液后, 继续将细胞培育于 DMEM 液体培养基, 孵育条件为 5% 体积分数的二氧化碳、37℃ 饱和湿度。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达 采用胰酶消化离心生长至对数期的 SGC7901 细胞, 并加入细胞裂解液, 反复吹打细胞混

液使裂解液充分作用, 30 min 后对其进行离心取上清液, Bradford 法对上清液进行蛋白定量处理, 取上清液 0.05 mL 与 0.1 mL SDS 混匀后再加入 4 倍体积的 PBS 溶液, 加热至沸腾变性; 将变性蛋白进行凝胶电泳处理后用 5% 脱脂奶粉封闭转好的 PVDF 膜 1 h, 加入已孵育好的一抗, 过夜, 洗膜, 加入二抗后孵育 120 min, 显影, 与标准蛋白曲线进行比对。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 制备好 Transwell 小室; 取对数生长期细胞制成细胞悬液并与无血清培养液, 其后对细胞悬液内的细胞进行计数; 将制备好细胞加入 Transwell 小室并固定染色后记录由小室迁移至基底膜下的细胞数量, 计算细胞侵袭抑制率, 对各组侵袭细胞拍照计数, 统计各组差异。重复三次统计结果。

1.2.6 细胞划痕实验 ① 灭菌直尺和 marker 笔在操作前紫外照射 30 min(超净台内)。② 先用 marker 笔在 6 孔板背后, 用直尺比着, 均匀得划横线, 大约每隔 0.5-1 cm 一道, 横穿过孔。每孔至少穿过 5 条线。③ 在孔中加入约 3×10^5 个细胞, 具体数量因细胞不同而不同。④ 于 24 h 后用枪头比着直尺, 尽量垂直于背后的横线划痕, 枪头要垂直, 不能倾斜。⑤ 用 PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入无血清培养基。⑥ 放入培养箱培养。按 6、12、24 小时取样, 拍照。重复三次。⑦ 采用 photoshop 对图片处理后进行迁移距离的测量。

1.3 免疫组化染色结果评估

SIX1 的免疫组化阳性表达位于细胞核和细胞质内, 细胞着色强度分级为: 无色 -0 分, 淡棕色 -1 分, 棕黄色 -2 分, 棕褐色 -3 分; 阳性细胞百分率积分: 无阳性 -0 分, 阳性率 $\leq 25\%$ -1 分, $25\% <$ 阳性率 $\leq 50\%$ -2 分, $50\% <$ 阳性率 $\leq 75\%$ -3 分, $75\% <$ 阳性率 $\leq 100\%$ -4 分。将两项积分相乘得出每个视野的 0-12 分的范围积分, 将五个视野的积分算出一个平均值, 其中阴性表达 < 4 分, 阳性表达 ≥ 4 分^[12-14]。

1.4 统计学方法

本研究所有数据均采用 SPSS19.0 软件进行统计分析, 计量资料组间比较采用 t 检验, 计数资料组间比较采用卡方检验, 以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Notch1 表达与人胃印戒细胞癌临床病理特征的关系

如表 2 所示, Notch1 的表达与人胃印戒细胞癌患者的年龄、性别、组织分化程度无关, 而与胃癌的 TNM 分期、周围淋巴结转移显著相关($P<0.05$)。

表 2 Notch1 表达与胃印戒细胞癌病理特征的相关性

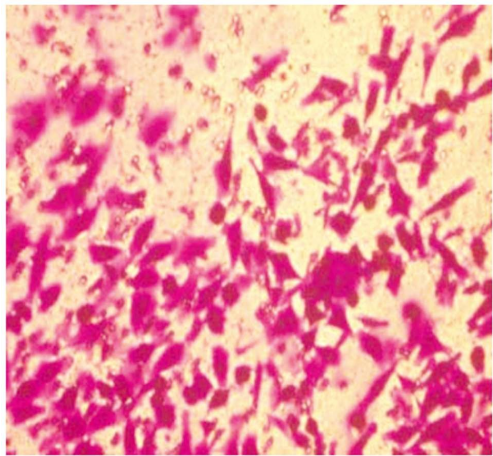
Table 2 Relationship between Notch1 expression and pathological characteristics of signet ring cell carcinoma of stomach in patients with gastric cancer

Project	Number of cases(n)	Notch1		χ^2 value	P value
		Positive	Negative		
Age					
<60 years	30	22	8	1.104	0.062
60 years	10	7	3		
Gender					
Male	24	18	6	0.953	0.085
Female	16	11	5		
Organization ty-pe					
poorly different-iated	8	6	2	1.005	0.072
Medium to high differentiation-n	32	23	9		
TNM					
I	9	2	7	4.332	0.033
II~IV	31	27	4		
Lymph node metastasis					
Yes	27	26	1	3.963	0.042
No	13	3	10		

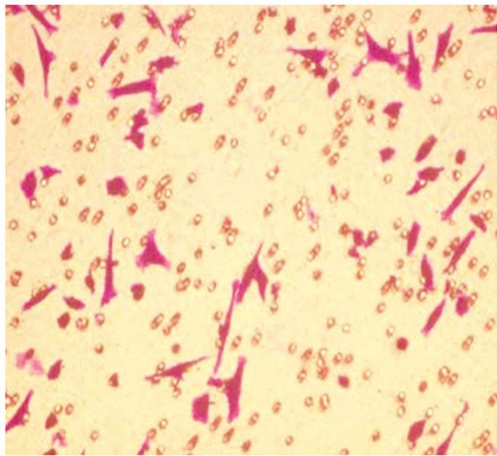
2.2 干扰 Notch1 的表达对 SGC7901 细胞侵袭能力的影响

采用 Transwell 侵袭实验对各组干扰后 SGC7901 细胞的

侵袭能力: 转染前人胃癌 SGC7901 细胞的侵袭能力高于转后的, 如下图所示:



Before transfection



After transfection

Fig.1 Effect of interference on invasive ability of SGC7901 cells in each group

2.3 细胞划痕实验结果

对人胃癌 SGC7901 细胞采用 MiR-935 抑制剂处理后, 经细胞划痕实验检测, 转染前后 SGC7901 细胞的迁移距离相比,

差异具有统计学意义。

2.4 切 MiR-935 对 SGC7901 细胞 Notch1 表达的影响

采用 MiR-935 转染 SGC7901 细胞系和采用 MiR-935 抑制

剂处理这些转染细胞系后 Notch1 表达情况如下图 2 所示:

表 3 各组 SGC7901 细胞受干扰后侵袭能力的变化($\bar{x} \pm s$, 个)

Table 3 Effect of interference on invasive ability of SGC7901 cells in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Membrane-penetrating cell count
Before transfection	53.21± 2.34
After transfection	30.00± 1.32
t value	8.932
P	0.017

Groups	Migration distance(μm)
Before transfection	32.84± 0.93
After transfection	17.35± 0.44
t value	6.932
P	0.026

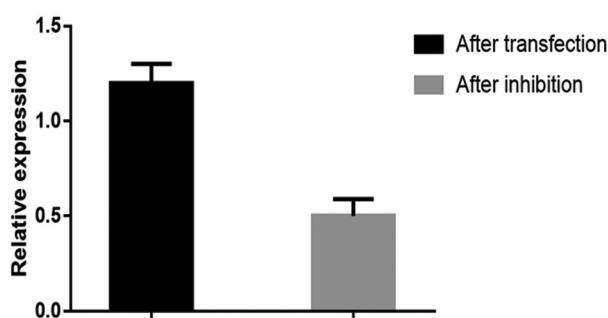


图 2 采用 MiR-935 及 MiR-935 抑制剂转染细胞对 Notch1 表达的影响
Fig.2 Effects of MiR-935 and MiR-935 inhibitors on Notch1 expression in transfected cells

3 讨论

胃癌是消化道中最常见的恶性肿瘤之一,胃癌的早期症状不明显,发现时多为中晚期,且并发转移,胃癌的侵袭和转移是胃癌患者生存期较短的主要原因,它与胃癌的治疗和预后密切相关。胃癌恶性程度高,尤以印戒细胞癌恶性程度高,胃癌的侵袭和转移能力强,远隔脏器或组织的转移是导致胃癌患者死亡的最主要的原因,胃癌的转移与侵袭能力与其治疗和预后密切相关^[15-17]。目前的研究认为,恶性肿瘤的侵袭和转移是一个涉及细胞外基质降解、肿瘤细胞的转移、新生血管形成等多步骤及多基因的复杂的过程,胃癌也不例外^[18-20]。

Notch 信号通路的主要作用是调控细胞分化、发育。有研究指出,在人体细胞内,Notch 蛋白的进化高度保守,其是一种跨膜受体蛋白。在人体细胞内,目前已经发现了四种同源体 Notch 蛋白,即 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4^[21,22]。其中,Notch1 的受体主要在人体干细胞或其他类型的原始细胞表面分布,同时在多种免疫细胞:B 细胞、T 细胞、巨噬细胞、NK 细胞表面也有一定的分布^[23,24]。早在上个世纪 90 年代,国外即有学者通过分离 T 淋巴细胞白血病表面的蛋白成分即发现 Notch1 的存在,这也是首次发现 Notch 相关信号通路在肿瘤细胞表面分布^[25]。近年来日渐增多的证据表明 Notch1 与肿瘤发

生密切相关。研究表明 Notch1 在各种肿瘤中起致癌作用,目前认为,其致癌作用机制是上调 NF- κ B 活性,从而影响细胞周期而进行的^[26]。有研究指出,抑制肿瘤组织中 Notch1 的表达,可降低肿瘤的扩增、浸润和转移能力,有人研究发现,对宫颈癌中的 Notch1 下调表达后,宫颈癌细胞增殖及侵袭能力均显著降低,且阻滞细胞在 G₂/M 期^[27,28]。由此我们质疑在胃癌这类易转移、侵袭能力强的肿瘤中是否存在 Notch1 的过表达?在对比正常胃黏膜组织和胃癌组织后发现,正常人胃黏膜组织中 Notch1 表达阴性,而胃癌组织中 Notch1 表达呈阳性。同时将 Notch1 表达与胃癌的病理特征进行分析后发现,Notch1 的表达与胃癌患者的年龄、性别、组织分化程度无关,而与胃癌的 TNM 分期、周围淋巴结转移有关,由此可见,Notch1 与胃癌的扩增、浸润紧密相关,即 Notch1 表达水平高的胃癌组织更易扩增、浸润,更易发生转移。

MiR-935 是一种无编码的短小核苷酸链,其主要作用为调控基因含量与表达,多项研究表明 MiR-935 在癌症的发生发展中起着重要的作用,而其在胃癌中的表达模式以及 MiR-935 是否对胃癌的生物学行为有影响,目前仍知之甚少^[29]。有研究人员发现在膀胱癌组织中,MiR-935 的表达量较正常膀胱组织减低,而且 MiR-935 可以降低膀胱癌 LAPT4B 的含量来抑制膀胱癌细胞的扩增及浸润,并且发现 MiR-935 在肝癌中也起着类似的作用^[30]。RNA 干扰是沉默基因表达的一种方法,在本次研究中我们通过对胃癌 SGC7901 细胞系转染 MiR-935 和 MiR-935 抑制剂后发现,与转染 MiR-935 相比,加入 MiR-935 抑制剂后胃癌 SGC7901 细胞的 Notch1 表达明显下降,因此可以认为在胃癌中 MiR-935 是通过调控 Notch1 表达来抑制其进行扩增和浸润的。

综上所述,Notch1 在人类胃印戒细胞癌组织中过表达,并且对于肿瘤细胞的增殖、浸润有促进作用,而 MiR-935 通过调控 Notch1 的表达达到调控胃癌的扩增和浸润的目的。

参考文献 (References)

- [1] Vaheri A, Carpén O, Heiska L, et al. The ezrin protein family:membrane Cytoskeleton interactions and disease associations [J]. Curr Opin Cell Biol, 2013, 9(12): 659-666
- [2] Huang YS, Xie N, Su Q, et al. Dialllyl disulfide inhibits the proliferation of HT-29 human colon cancer cells by inducing differentially expressed genes[J]. Mol Med Report, 2011, 4(3): 553-559
- [3] 吕秀芳,孟庆宇,郭新民,等.白花蛇舌草对人肝癌 Ble7402 细胞凋亡的影响[J].中医药信息杂志, 2013, 11(9): 02-05
- [4] 朱大诚,高永涛,马晓鹏,等.白花蛇舌草化学成分的研究进展[J].江西中医学院学报, 2011, 23(2): 84-88
- [5] Yao J, Qian C. Over-activated Notch-1 protects gastric carcinoma BGC-823 cells from TNF α -induced apoptosis [J]. Dig Liver Dis, 2015, 41(12): 867-874
- [6] 孙立新,毕开顺,王敏伟.中药白英的研究进展[J].沈阳药科大学学报, 2016, 23(4): 251-255
- [7] 余乐涵,许宝华,吴剑,等.白英水提物对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡与基因 bcl-xl/bid 表达的影响[J].中成药, 2018, 30(11): 12-15
- [8] Koch U, Radtke F. Notch and cancer: a double-edged sword[J]. Cellular and molecular life sciences, 2017, 64(21): 2746-2762
- [9] Yeh TS, Wu CW, Hsu KW, et al. The activated Notch1 signal pathway

- is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2[J]. *Cancer Res*, 2016, 69(12): 5039-5048
- [10] Loeng KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis[J]. *Blood*, 2016, 107(6): 2223-2233
- [11] Miele L, Miao H, Nickoloff BJ. NOTCH Signaling as another therapeutic target[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2016, 6(4): 313-323
- [12] 白广平,李俊,陈国辉,等.miRNA-93 调控细胞信号转导与转录激活因子 3 信号通路影响喉癌细胞机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(5): 446-448+454
- [13] Yeo SG. Association of pretreatment serum carcinoembryonic antigen levels with chemoradiation-induced downstaging and downsizing of rectal cancer [J]. *Molecular and clinical oncology*, 2016, 4 (4): 631-635
- [14] Haines RJ, Beard RS Jr, Eitner RA, et al. TNF α /IFN γ Mediated Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction Is Attenuated by MicroRNA-93 Downregulation of PTK6 in Mouse Colonic Epithelial Cells[J]. *PloS one*, 2016, 11(4): e0154351
- [15] Zheng G, Wang H, Zhang X, et al. Identification and validation of reference genes for qPCR detection of serum microRNAs in colorectal adenocarcinoma patients[J]. *PloS one*, 2016, 8(12): e83025
- [16] 周赞华,董海娜,朱莉,等.miR-93 在子宫内膜癌中的表达及意义[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(12): 1925-1927
- [17] Wang L, Lee AY, Wigg JP, et al. miRNA involvement in angiogenesis in age-related macular degeneration [J]. *Journal of physiology and biochemistry*, 2016, 72(4): 583-592
- [18] Wang P, Liang X, Lu Y, et al. MicroRNA-93 Downregulation Ameliorates Cerebral Ischemic Injury Through the Nrf2/HO-1 Defense Pathway[J]. *Neurochemical research*, 2016, 1(10): 2627-2635
- [19] Sun Y, Jia X, Hou L, et al. Screening of Differently Expressed miRNA and mRNA in Prostate Cancer by Integrated Analysis of Transcription Data[J]. *Urology*, 2016, 94: 313-U398
- [20] Algrain M, Turunen O, Vaheri A, et al. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker[J]. *Cell Biol*, 2013, 120(34): 129-139
- [21] 陈玉,冯大刚,胡荣,等.半枝莲和白花蛇舌草总多糖对 S180 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J]. *新中医*, 2017, 45(5): 171-174
- [22] Bretscher A, Edwards K, Fehon R G, et al. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex[J]. *Cell Biol*, 2015, 3(10): 586-599
- [23] Fievet BT, Gautreau A, Roy C, et al. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin[J]. *Cell Biol*, 2014, 164(12): 653-659
- [24] 兰梅,时永全,魏茂富,等.缺氧诱导因子 HIF-1 α 在胃癌细胞系中的表达和意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 13(1): 21-23
- [25] Alp  zar-Alp  zar W, Nielsen BS, Sierra R, et al. Urokinase plasminogen activator receptor is expressed in invasive cells in gastric carcinomas from high- and low-risk countries [J]. *Int J Cancer*, 2016, 126(2): 405-415
- [26] An SS, Pennant WA, Ha Y, et al. Hypoxia-induced expression of VEGF in the organotypic spinal cord slice culture [J]. *Neuroreport*, 2016, 22(2): 55-60
- [27] 张安华,孙华文,苏锦松,等.胃癌组织中 Notch1 和 DLL4 蛋白的表达及其临床意义[J]. *临床外科杂志*, 2018, 18(4): 257-259
- [28] Hu C, Dievart A, Lupien M, et al. Overexpression of activated murine Notch1 and Notch3 in transgenic mice blocks mammary gland development and induces mammary tumors [J]. *Am J Pathol*, 2016, 168(3): 973-990
- [29] Riksen AH, Andersen RF, Pallisgaard N, et al. MicroRNA Expression Profiling to Identify and Validate Reference Genes for the Relative Quantification of microRNA in Rectal Cancer [J]. *PloS one*, 2016, 11 (3): e0150593
- [30] Xiao ZG, Deng ZS, Zhang YD, et al. Clinical significance of microRNA-93 downregulation in human colon cancer [J]. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 2015, 25(3): 296-301

(上接第 4627 页)

- [14] Tian F, Zheng X, Li J, et al. kappa-Opioid Receptor Stimulation Improves Endothelial Function via Akt-stimulated NO Production in Hyperlipidemic Rats[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 2045-2322
- [15] Headrick J P, See H L, Du Toit E F, et al. Opioid receptors and cardioprotection - 'opioidergic conditioning' of the heart[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(8): 2026-2050
- [16] 赵灿,吴永全.心肌细胞钙信号与心血管疾病研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(03): 492-495
- [17] Szepesi J, Acsai K, Sebok Z, et al. Comparison of the efficiency of Na⁺/Ca²⁺ exchanger or Na⁺/H⁺ exchanger inhibition and their combination in reducing coronary reperfusion-induced arrhythmias [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2015, 66(2): 215-226
- [18] Hoeker G S, Hanafy M A, Oster R A, et al. Reduced Arrhythmia Inducibility With Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Inhibition in Heart Failure Rabbits [J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2016, 67(3): 260-265
- [19] Fu-zheng Q, Xiao-lu Z, Jing-wu S, et al. Changes of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase-II in Myocardium Nucleus and Sarcoplasmic Reticulum in Heart Failure Rabbits[J]. *Chinese Circulation Journal*, 2015, 30(10): 1000-1003
- [20] Kong L, Chen Y, Sun N, et al. Inhibition of CaMKII alleviates myocardial ischemia reperfusion injury by reducing mitochondrial oxidative stress in isolated perfused rat heart[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2018, 38(2): 181
- [21] He J M, Yao J P, Sheng H P, et al. Involvement of the Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A-Alternative Splicing Factor-Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II δ Signaling Pathway in Myocardial Infarction-Induced Heart Failure of Rats[J]. *Journal of Cardiac Failure*, 2015, 21(9): 751-760