

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00940

· 论 著 ·

微小 RNA136 过表达对结直肠癌细胞中钙结合蛋白 S100A6 含量及细胞增殖和凋亡的影响

霍中华*, 胡君, 储著凌, 宋博, 吕盛, 尹鹏

解放军 454 医院普外科, 南京 210002

[摘要] **目的** 构建携带微小 RNA136(mir136)的真核表达载体并将其转染人结直肠癌细胞,观察外源性 mir136 表达对人结直肠癌细胞中钙结合蛋白 S100A6 表达及细胞增殖活性的影响。**方法** 提取人肾上皮 HEK293 细胞基因组 DNA, PCR 扩增包含 mir136 前体序列的 DNA 片段并构建重组载体,采用阳离子脂质体法将重组载体转染人结直肠癌 HCT116 细胞。转染后 48 h,采用实时定量 PCR 法检测细胞内 mir136 含量变化,以蛋白质印迹法检测细胞中 S100A6 蛋白的表达;转染后 24 和 48 h,采用 CCK-8 试剂盒检测肿瘤细胞增殖活性;转染后 48 h,以双染法检测细胞凋亡情况。**结果** 成功构建重组 mir136 真核表达载体并转染 HCT116 细胞。转染后 48 h,重组载体转染组 HCT116 细胞内 mir136 相对表达量高于未转染组 ($P<0.01$),而 S100A6 蛋白的相对表达量则低于未转染组 ($P<0.01$)。同时,重组载体转染组 HCT116 细胞增殖活性较未转染对照组降低 ($P<0.05$),而细胞凋亡则较未转染对照组增加 ($P<0.01$)。**结论** Mir136 可能通过抑制 S100A6 基因表达而抑制结直肠癌细胞增殖活性,同时引起细胞的凋亡。

[关键词] 微 RNAs; S100A6 蛋白; 结直肠肿瘤; HCT116 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R 735.35 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)09-0940-05

Effects of miRNA-136 overexpression on S100 calcium binding protein A6 contents, proliferation and apoptosis in HCT116 cells

HUO Zhong-hua*, HU Jun, CHU Zhu-ling, SONG Bo, LÜ Sheng, YIN Peng

Department of General Surgery, No. 454 Hospital of PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of exogenous microRNA 136(mir136) on contents of S100 calcium binding protein A6 (S100A6) and proliferation in human colon cancer cell line HCT116 through constructing a eukaryotic expression vector of mir136 (pcDNA-mir136) and cationic liposome-mediated transfection. **Methods** Human genomic DNA was extracted from HEK293 cells and the DNA fragment containing mir136 precursor sequence was amplified by PCR and cloned into pcDNA to construct pcDNA-mir136. The plasmid was transfected into HCT116 cells via cationic liposome. The content of mir136 was determined by Real-time PCR, S100A6 protein was examined by Western blotting analysis, and apoptosis was detected by Flow Cytometry at 48 h after transfection. The proliferation ability of the tumor cells was examined by CCK-8 at 24 and 48 hours after transfection. **Results** The eukaryotic expression vector of mir136 was successfully constructed and transfected into HCT116 cells. Expression of mir136 was significantly higher in the transfected group than that in the untransfected group ($P<0.01$) and the content of S100A6 protein was significantly lower than that of the untransfected group ($P<0.05$) 48 h after transfection. Meanwhile, cell proliferation activity of the transfected group was significantly lower than that of the untransfected group ($P<0.05$) and cell apoptosis was significantly increased compared with the untransfected group ($P<0.01$). **Conclusion** Mir136 may inhibit proliferation and induce apoptosis of HCT116 cells by inhibiting the expression of S100A6 gene.

[Key words] microRNAs; S100A6 protein; colorectal neoplasms; HCT116 cells; cell proliferation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(9): 940-944]

结肠癌是临床三大恶性肿瘤之一,也是世界上病死率较高的主要肿瘤类型之一。尽管寻求早期肠癌筛查的生物学方法和可用于早期诊断的肠癌生物标

志物不断取得进展,除手术、化放疗等传统治疗手段外,包括介入和靶向治疗在内的一些新的方法也已应用于临床,但结肠癌患者的预后依然不容乐观。进一

[收稿日期] 2012-05-08

[接受日期] 2012-08-09

[作者简介] 霍中华,主任医师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 025-80865220, E-mail: huozhonghua12@163.com

步揭示结肠癌的分子发病机制, 寻找新的治疗途径, 成为肠癌相关研究领域的热点。S100A6 是钙结合蛋白 S100 家族中的重要成员, 可通过与钙离子结合而发挥一系列生物学作用, 如影响细胞的胞吞、胞吐、物质转运等^[1]。除了涉及细胞骨架动力学外, S100A6 也与细胞的增殖及肿瘤发生相关^[2]。已有研究表明, S100A6 可在结直肠癌、结肠癌肝转移组织中高表达, 且随着 S100A6 在结肠癌上皮组织中的表达升高, 肿瘤恶性程度也相应增加^[3-5], 提示 S100A6 基因的异常表达在肠癌形成及发展中可能发挥重要作用。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类位于染色体上的、高度保守的短链 RNA, 在肿瘤的发病机制中发挥着重要作用, 并逐渐成为肿瘤领域的研究热点^[6-7]。我们通过 miRNA 的谱系分析发现, 肠癌细胞中 miRNA136 (mir136) 含量明显低于正常肠上皮细胞; 同时, 利用 miRNAs 靶位的生物学预测在线软件 TargetScan 进行分析, 发现在 S100A6 基因的 3' 非翻译区 (UTR) 存在 mir136 的结合位点; 进一步通过荧光素酶报告基因证实 S100A6 基因 3' UTR 区确实存在 mir136 的结合位点 (资料待发表)。据此我们推测, 肠癌细胞内 S100A6 蛋白异常表达可能与 mir136 的异常表达及其对 S100A6 基因的调控作用有关。本实验拟通过构建 mir136 重组表达载体并转染至人结直肠癌 HCT116 细胞, 观察转染后细胞中 S100A6 蛋白的表达变化, 以及 mir136 高表达对 HCT116 细胞增殖活性及凋亡的影响, 以探讨两者在结肠癌发生发展中可能的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人结直肠癌细胞株 HCT116、人永生化正常肠上皮细胞系 HIEC 和人肾上皮细胞株 HEK293 均购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所。McCoy 5 α 培养液、胎牛血清 (FBS)、0.25% 胰蛋白酶、Lipofectamine2000 转染试剂、TRIzol 及反转录试剂盒均为 Invitrogen 公司产品; pcDNA 载体购于美国 System Biosciences 公司; 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I、感受态细胞、DNA marker 及荧光定量试剂盒等购于 TaKaRa 公司, CCK-8 细胞活性检测试剂盒为日本同仁公司产品; 基因组提取试剂盒及无内毒素质粒提取试剂盒为 Qiagen 公司产品; 细胞凋亡检测试剂盒为 BD 公司产品; S100A6、GAPDH 一抗及二抗均为 CST 公司产品, 蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒及 ECL 发光试剂盒均购于 Pierce 公司。定量 PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品, 梯度 PCR 仪为 ABI 公司产品, 流式细胞仪为 BD 公司产品。

1.2 Mir136 重组表达载体的构建 根据 mir136 的前体序列及人基因组 DNA 序列信息, 设计 PCR 扩增引物 (两端添加酶切位点 *Bam*H I、*Eco*R I 及保护性碱基), 序列如下: 正向, 5'-GGA ATT CTG GAT GGC TCC TCC ATG TCT TGG -3'; 反向, 5'-CGG GAT CCT TGG ATG GTG CTG AGA TGT GAC C-3'。PCR 产物长度为 773 bp。收集处于对数生长期的 HEK293 细胞, 采用基因组 DNA 提取试剂盒按说明书要求提取基因组 DNA。用紫外分光光度计检测 DNA 纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。取 1 μ l 基因组 DNA 作为模板, 采用 PCR 法扩增目的片段, 条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 反应循环数为 35。采用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小, 对于大小正确的 PCR 产物进行双酶切, 回收酶切产物并连接到 pcDNA 线性化载体, 转化涂布 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 通过氨苄西林 (Amp) 抗性和 PCR 方法筛选阳性质粒, 对重组质粒进行测序分析。对于测序正确的重组表达载体, 扩增其对应的转化菌株, 进行无内毒素质粒 DNA 提取。提取方法和步骤严格按照 Qiagen 公司无内毒素质粒抽提试剂盒说明书进行。

1.3 细胞转染 选取生长状况良好且处于对数生长期的 P3 代 HCT116 细胞, 用胰酶消化并制备细胞悬液, 使用完全培养液 (McCoy 5 α +10% FBS) 调整细胞密度为 1×10^5 /ml, 将细胞接种到 6 孔板, 每孔加 2 ml 细胞悬液, 在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 条件下培养 24 h, 参照 Lipofectamine2000 转染试剂说明书进行质粒 (pcDNA-mir136 或 pcDNA) 转染。转染后 48 h, 用荧光显微镜观察并进行细胞计数, 将有绿色荧光蛋白 (GFP) 表达的细胞数除以细胞总数, 计算细胞转染效率。收集转染 pcDNA-mir136 或 pcDNA 的 HCT116 细胞、未转染的 HCT116 细胞以及正常人肠上皮 HIEC 细胞, 进行后续实验。

1.4 细胞内 mir136 检测 转染后 48 h, 收集各组细胞, 用 TRIzol 裂解法提取总 RNA, 取 1 μ g RNA, 以反转录法制备 cDNA。反转录引物: U6 为 5'-GTT TAA GCA CTT CGC AAG GTA-3', mir136 为 5'-GTC GTA TCC AGT GCG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TGC ACT GGA TAC GAC AGA ACC-3'。再取 1 μ l 反转录产物进行 PCR 检测, 引物序列: U6 正向为 5'-GTG CTC GCT TCG GCA GCA CAT-3', 反向为 5'-GTT TAA GCA CTT CGC AAG GTA-3'; mir136 正向为 5'-ACT CCA TTT GTT TTG ATG ATG GA-3', 反向为 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'。PCR 反应总体系: TaKaRa SYBR Premix *Ex Taq* 10 μ l, 上下游引物

(10 μmol/L)各 0.4 μl, cDNA 2 μl, 以去离子水补足反应体系至 20 μl。反应条件: 95°C, 10 min; 60°C, 20 min; 72°C, 20 min, 共 40 个循环。以 U6 作为对照, 通过 Ct 值进行数据分析, 确定 mir136 相对含量。目的基因相对于内参基因的表达式为 $2^{-\Delta Ct} = 2^{C_{im} - C_{tm}}$ 。

1.5 S100A6 蛋白的检测 收集转染后 48 h 的 HCT116 细胞, 加入细胞裂解液[含 50 mmol/L Tris (pH 8.0), 1 mg/ml 亮抑肽酶(leupeptin), 150 mmol/L NaCl, 0.5% 乙基苯基聚乙二醇(P-40), 5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 100 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride), 1 mol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol)和 1 mg/ml 抑肽酶(aprotinin)]提取细胞总蛋白, 以 BCA 法检测总蛋白浓度。每组样本取 10 μl 进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 用湿法将胶中蛋白水平转移至 PVDF 膜上, 以 5% 的脱脂牛奶常温封闭 2 h, 加入 TBST 稀释后的一抗, 4°C 过夜, 取出后以 TBST 洗膜 3 次, 再加入二抗, 孵育 2 h; 再洗膜 3 次, 添加 ECL 发光液反应底物, 进行 X 线曝光, 采用相关图像分析软件进行条带光密度扫描分析。S100A6 蛋白相对含量 = 目的条带的光密度值 / GAPDH 条带的光密度值。

1.6 细胞增殖活性检测 转染后 24 h 和 48 h, 取各组细胞, 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖活性。每孔加入 10 μl 的 CCK-8 溶液, 置于 37°C 和 5% CO₂ 培养箱内继续培养 4 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度值并记录结果。

1.7 细胞凋亡检测 转染后 48 h, 取各组细胞, 用胰酶(不含 EDTA)消化, 收集细胞沉淀, 以双染法检测细胞凋亡。按膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素 (FITC) 凋亡检测试剂盒操作步骤进行, 流式细胞仪 (FACS Calibur, BD) 激发波长 Ex = 488 nm, Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道 (FL1) 检测, 红色荧光通过溴化丙啶 (PI) 通道 (FL2) 检测。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析, 数据结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用析因分析进行组间差异及组内差异的比较。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 Mir136 重组表达载体的构建及鉴定 成功提取人基因组 DNA, 凝胶电泳显示, DNA 无明显断裂, 无明显 RNA 污染(图 1A)。含 mir136 前体序列的 PCR 扩增产物大小与理论值完全相符(图 1B)。使用载体多克隆位点上游的通用引物对重组质粒进行测序, 测序结果经与标准序列比对, 完全一致。

2.2 HCT116 细胞转染结果 转染 pcDNA-mir136

或 pcDNA 的 HCT116 细胞在荧光显微镜下观察, 多数呈现绿色荧光(图 2), 细胞的转染效率约为 80%。

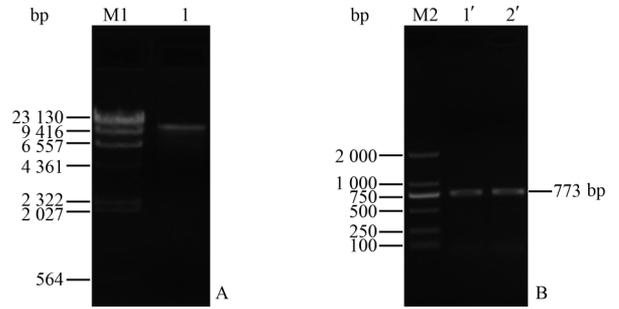


图 1 基因组 DNA(A) 及 PCR 产物(B) 的琼脂糖凝胶电泳
Fig 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA(A) and PCR product(B)

M1: λHindIII DNA marker; 1: Genomic DNA; M2: DL2000 DNA marker; 1': PCR products (1 μl); 2': PCR products (2 μl)

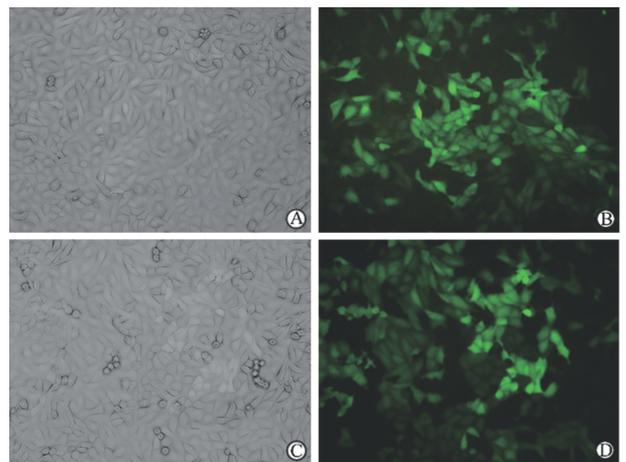


图 2 HCT116 细胞转染 pcDNA(A, B) 或 pcDNA-mir136(C, D) 后显微镜下观察

Fig 2 Observation of HCT116 cells transfected with pcDNA (A, B) or pcDNA-mir136 (C, D) under microscope

A, C: Cells under light microscope; B, D: Cells under fluorescence microscope. Original magnification: ×200

2.3 细胞内 mir136 含量检测 对实时定量 PCR 检测得到的数据进行分析, 结果(图 3)显示: HCT116 细胞中 mir136 的相对含量低于正常人肠上皮细胞 ($P < 0.01$); 转染 pcDNA-mir136 后 48 h, HCT116 细胞中 mir136 相对含量较未转染组升高 ($P < 0.01$), 而转染对照质粒组 HCT116 细胞 mir136 相对含量与未转染组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 细胞内 S100A6 蛋白含量检测 转染后 48 h, 提取各组细胞总蛋白, 进行蛋白质印迹分析, 结果(图 4)显示: HCT116 细胞中 S100A6 蛋白相对含量

高于正常肠上皮细胞 ($P < 0.01$); 转染 pcDNA-mir136 后 48 h, HCT116 细胞中 S100A6 蛋白相对含量较未转染组降低 ($P < 0.01$), 而转染对照质粒组细胞 S100A6 蛋白相对含量与未转染组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

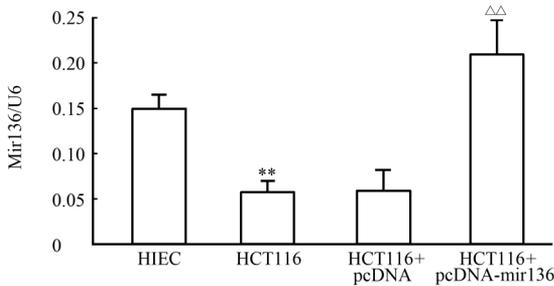


图 3 mir136 相对含量检测

Fig 3 Detection of the relative mir136 levels

** $P < 0.01$ vs HIEC (human intestinal epithelial cell) group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs HCT116 group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

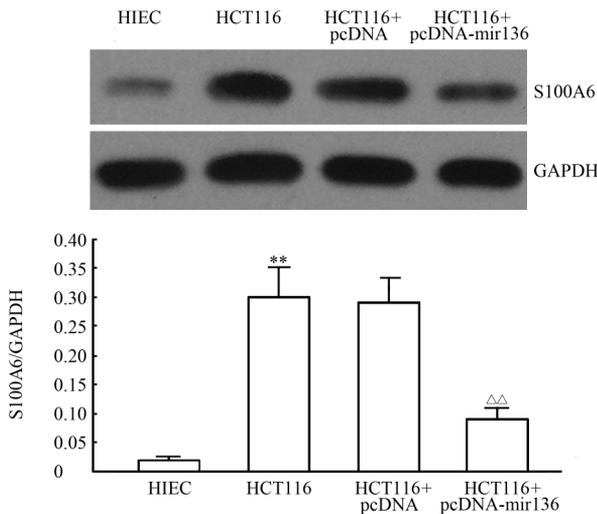


图 4 S100A6 的蛋白质印迹分析

Fig 4 Western blotting analysis of S100A6 protein

** $P < 0.01$ vs HIEC (human intestinal epithelial cell) group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs HCT116 group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5 细胞增殖活性检测 结果(图 5)显示: HCT116 细胞的增殖活性高于正常肠上皮细胞 ($P < 0.01$)。转染 pcDNA-mir136 后, HCT116 细胞增殖活性降低, 转染后 24 h 和 48 h 细胞增殖活性较未转染对照组 (HCT116) 分别降低 21.3% ($P < 0.05$) 和 34.2% ($P < 0.01$)。转染对照质粒的 HCT116 细胞增殖活性与未转染对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 细胞凋亡检测 结果(图 6)显示: 转染 pcDNA-mir136 后 HCT116 细胞凋亡增加, 与未转染组比较, 细胞凋亡率从平均 8% 升高至 55%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 转染对照质粒的 HCT116 细胞与未转染组比较, 细胞凋亡率则无明显变化 ($P > 0.05$)。

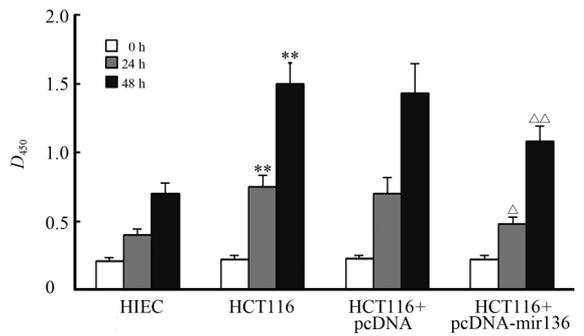


图 5 细胞增殖活性检测

Fig 5 Cell viability assay

** $P < 0.01$ vs HIEC (human intestinal epithelial cell) group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs HCT116 group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

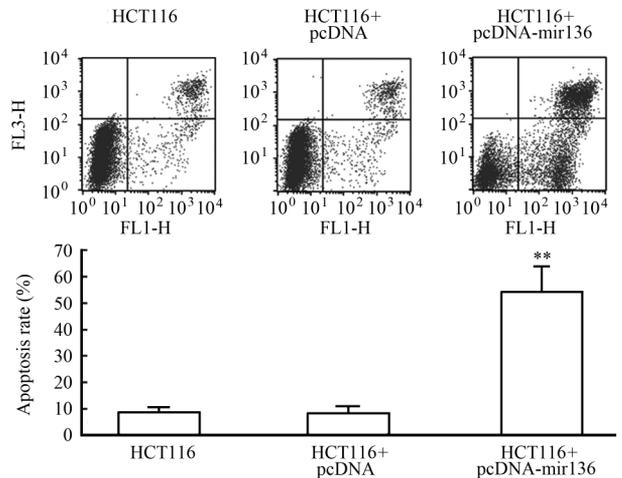


图 6 细胞凋亡检测

Fig 6 Detection of cell apoptosis

** $P < 0.01$ vs HCT116 group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

微小 RNA (miRNAs) 是一类分布广泛的内源性非编码蛋白质的 RNA, 最初发现于真核生物, 大小约 20~25 个核苷酸, 在遗传学高度保守, 可负调控或者正调控其靶基因的表达。成熟的 miRNAs 是由较长的初级转录物经过一系列核酸酶的剪切加工而产生的, 成熟体 miRNA 通过碱基互补配对的方式识别靶基因 mRNA 3' UTR 区种子序列, 抑制或者消减靶 mRNA 的翻译。研究表明, 多数 miRNAs 都位于已知肿瘤相关基因组区域或脆性位点上, 而 miRNAs 突变或者异位表达与多种人类癌症相关, 提示 miRNAs 与多种肿瘤的发生发展关系密切^[8]。近年来的研究也证实, miRNAs 的表达与多种肿瘤 (包括血液系统肿瘤及肺癌) 进展及预后相关^[8-9]。研究已表明几种 miRNAs 可调控结肠癌细胞的浸润和转移, 如 Schimanski 等^[10] 研究指出 mir169a 通过调控转录因子而影响肠癌的发展; Yamamichi 等^[11] 报道

mir21 在肠癌的形成及发展中有重要作用。

S100 蛋白是 EF 手型蛋白超家族中最大的多基因家族,目前共发现 23 个 S100 蛋白家族成员^[12]。S100A6 蛋白在细胞内广泛分布,主要存在于胞质、胞膜以及核被膜上,其诸多生物学功能中最重要的项是影响细胞钙离子浓度。近期研究表明,S100A6 在多数上皮肿瘤如黑素瘤、肝癌、胰腺癌、卵巢癌和结肠中都有异常表达的状况,且其异常表达与肿瘤细胞的增殖和分化密切相关^[13]。Kilańczyk 等^[14]在肠癌与钙结合蛋白的相关研究中发现,S100A6 与 lamin A/C 蛋白通过相互作用在肠癌细胞的发生、发展中有重要的作用;Ning 等^[15]的研究则表明,S100A6 蛋白可以负调控 CacyBP/SIP 途径介导的胃癌细胞增殖抑制活性。陈英华等^[16]则通过实验证明 S100A6 具有抑制黑素瘤增殖、促进凋亡的作用。

我们前期研究发现,S100A6 在肠癌细胞中表达量高于正常肠上皮细胞,使用 siRNA 对 S100A6 基因进行沉默后,发现肠癌细胞增殖活性明显降低,且钙离子浓度发生明显改变。因此,我们推测,S100A6 高表达在肠癌的形成、发生及发展中有着重要的作用。Mir136 定位于 14 号染色体,其与肿瘤相关的研究比较少,我们通过在线数据库分析,在 S100A6 基因 3'UTR 区存在理论靶位的 miRNA,之后通过实时定量的方法对预测 miRNA 含量进行检测,发现肠癌细胞中 mir136 含量低于正常细胞,且与 S100A6 表达呈负相关。

本实验通过构建 mir136 重组表达载体,脂质体瞬时转染人结直肠癌细胞株 HCT116, mir136 及 S100A6 蛋白含量检测结果说明,通过质粒转染的方法可以在 HCT116 细胞中高表达外源性 mir136。细胞活性检测结果则说明,外源性 mir136 的高表达可抑制 HCT116 细胞增殖活性以及促进肿瘤细胞凋亡率的上升,同时,蛋白质印迹分析及定量检测结果说明, mir136 的高表达可下调 S100A6 蛋白的表达,提示这可能是 mir136 抑制 HCT116 细胞肿瘤活性的分子机制。

近年来,寻找和发现新的肿瘤标志基因,并以此作为基因治疗潜在的靶点,利用基因工程的方法对癌基因进行靶向干预,已成为肿瘤治疗最具有意义的研究方向之一。本实验通过脂质体转染途径在 HCT116 细胞中高表达外源性 mir136,从而抑制细胞肿瘤活性,这不仅为肠癌的基因治疗提供了新的理论依据,也可为以后的临床应用提供新的思路。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Schäfer B W, Heizmann C W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21: 134-140.
- [2] Leśniak W, Słomnicki Ł P, Filipek A. S100A6 - new facts and features[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390: 1087-1092.
- [3] Stulik J, Osterreicher J, Koupilová K, Knížek J, Bures J, Jandík P, et al. Differential expression of the Ca²⁺ binding S100A6 protein in normal, preneoplastic and neoplastic colon mucosa[J]. Eur J Cancer, 2000, 36: 1050-1059.
- [4] Bronckart Y, Decaestecker C, Nagy N, Harper L, Schäfer B W, Salmon I, et al. Development and progression of malignancy in human colon tissues are correlated with expression of specific Ca²⁺-binding S100 proteins[J]. Histol Histopathol, 2001, 16: 707-712.
- [5] Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, von Eggeling F. Colon-derived liver metastasis, colorectal carcinoma, and hepatocellular carcinoma can be discriminated by the Ca²⁺-binding proteins S100A6 and S100A11[J]. PLoS One, 2008, 3: e3767.
- [6] Griffiths-Jones S, Grocock R J, van Dongen S, Bateman A, Enright A J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34 (Database issue): D140-144.
- [7] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob S T, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer[J]. Gastroenterology, 2007, 133: 647-658.
- [8] Gardlund B. Activated protein C(Xigris) treatment in sepsis: a drug in trouble[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2006, 50: 907-910.
- [9] Barie P S. Current role of activated protein C therapy for severe sepsis and septic shock[J]. Curr Infect Dis Rep, 2008, 10: 368-376.
- [10] Schimanski C C, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Gallego P R, et al. High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15: 2089-2096.
- [11] Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, et al. Locked nucleic acid *in situ* hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 4009-4016.
- [12] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type cellular functional roles[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33: 637-668.
- [13] Schneider G, Filipek A. S100A6 binding protein and Siah-1 interacting protein (CacyBP/SIP): spotlight on properties and cellular function[J]. Amino Acids, 2011, 41: 773-780.
- [14] Kilańczyk E, Graczyk A, Ostrowska H, Kasacka I, Leśniak W, Filipek A. S100A6 is transcriptionally regulated by β-catenin and interacts with a novel target, lamin A/C, in colorectal cancer cells[J]. Cell Calcium, 2012, 51: 470-477.
- [15] Ning X, Sun S, Zhang K, Liang J, Chuai Y, Li Y, et al. S100A6 protein negatively regulates CacyBP/SIP-mediated inhibition of gastric cancer cell proliferation and tumorigenesis[J]. PLoS One, 2012, 7: e30185.
- [16] 卫佳, 李星星, 陈英华, 吴丽美, 马闻, 何通川, 等. 外源性 S100A6 对黑色素瘤 B16 细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25: 304-308.

[本文编辑] 魏学丽, 邓晓群