

• 论 著 •

miR-192 对结直肠癌细胞系增殖、迁移和侵袭能力的影响*

陈 颖, 李伟滔, 李 娜, 周 婵, 徐咏强

南方医科大学附属东莞医院病理科, 广东东莞 523059

摘 要: **目的** 探究微小 RNA-192(miR-192)对结直肠癌(CC)细胞系增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法** 分别设立 A 组(SW1116 CC 细胞转染生理盐水)、B 组(SW1116 CC 细胞转染 miR-192 模拟物)及 C 组(SW1116 CC 细胞转染 miR-192 抑制剂)。分别以 MTT 法检测各组细胞增殖情况,以流式细胞术检测各组细胞凋亡情况,以划痕实验检测细胞迁移能力,以 Transwell 实验检测细胞侵袭能力。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测各组细胞 miR-192 及 WNT 家族成员 2B(WNT2B)mRNA 表达水平。**结果** B 组 SW1116 CC 细胞存活率、单克隆形成数目分别为 $(57.32 \pm 6.19)\%$ 、 (284.59 ± 15.08) 个,均低于 A 组的 $(76.21 \pm 8.23)\%$ 、 (601.47 ± 23.16) 个与 C 组的 $(89.52 \pm 10.62)\%$ 、 (2150.68 ± 34.79) 个,而凋亡率为 $(20.52 \pm 2.52)\%$,高于 A 组的 $(13.78 \pm 1.62)\%$ 与 C 组的 $(11.62 \pm 1.41)\%$;C 组 SW1116 CC 细胞存活率、单克隆形成数目均高于 A 组,而凋亡率低于 A 组(均 $P < 0.05$)。B 组 SW1116 CC 细胞划痕宽度为 (785.10 ± 46.18) mm,高于 A 组的 (601.32 ± 33.21) mm 与 C 组的 (326.99 ± 17.48) mm,而 C 组划痕宽度低于 A 组,B 组穿膜细胞数为 (624.67 ± 19.05) 个,少于 A 组的 (875.23 ± 27.30) 个与 C 组的 (1204.17 ± 34.59) 个,且 C 组穿膜细胞数多于 A 组(均 $P < 0.05$)。B 组 SW1116 CC 细胞 miR-192 mRNA 相对表达水平为 (3.01 ± 0.26) ,相较于 A 组的 (1.87 ± 0.20) 及 C 组的 (0.97 ± 0.23) 均更高,且 C 组 miR-192 mRNA 相对表达水平低于 A 组,B 组 WNT2B mRNA 表达水平为 (2.16 ± 0.26) ,相较于 A 组的 (4.11 ± 0.50) 与 C 组的 (6.08 ± 0.72) 均更低,且 C 组 WNT2B mRNA 表达水平高于 A 组(均 $P < 0.05$)。**结论** miR-192 可抑制 CC 的恶性演进,其主要作用机制之一可能与调控 WNT2B 表达有关。

关键词: 结直肠癌; 微小 RNA-192; WNT 家族成员 2B; 恶性演进; 机制

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.01.012 **中图法分类号:** R735.3

文章编号: 1673-4130(2024)01-0060-04 **文献标志码:** A

**Effect of miR-192 on the proliferation, migration, and invasion ability
of colorectal cancer cell lines***

CHEN Ying, LI Weitao, LI Na, ZHOU Chan, XU Yongqiang

Department of Pathology, Dongguan Hospital Affiliated to Southern
Medical University, Dongguan, Guangdong 523059, China

Abstract: **Objective** To study the effect of microRNA-192 (miR-192) on the proliferation, migration and invasion ability of colorectal cancer (CC) cell lines. **Methods** Group A (SW1116 CC transfected with physiological saline), group B (SW1116 CC transfected with miR-192 mimics) and group C (SW1116 CC transfected with miR-192 inhibitor) were set up, respectively. Cell proliferation was detected by MTT assay, cell apoptosis was detected by flow cytometry, cell migration ability was detected by scratch assay, and cell invasion ability was detected by Transwell assay. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression levels of miR-192 and WNT family member 2B (WNT2B) in each group. **Results** The survival rate and monoclonal number of SW1116 CC cells in group B were $(57.32 \pm 6.19)\%$ and (284.59 ± 15.08) , which were lower than $(76.21 \pm 8.23)\%$ and (601.47 ± 23.16) in group A and $(89.52 \pm 10.62)\%$ and (2150.68 ± 34.79) in group C, while the apoptosis rate in group B was $(20.52 \pm 2.52)\%$, which was higher than $(13.78 \pm 1.62)\%$ in group A and $(11.62 \pm 1.41)\%$ in group C. The survival rate and number of monoclonal formation of SW1116 CC cells in group C were higher than those in group A, while the apoptosis rate was lower than that in group A (all $P < 0.05$). The scratch width of SW1116 CC cells in group B was (785.10 ± 46.18) mm, which was higher than (601.32 ± 33.21) mm in group A and (326.99 ± 17.48) mm in group C, while the number of cells passing through the membrane in group B was (624.67 ± 19.05) , less than (875.23 ± 27.30) in group A and (1204.17 ± 34.59) in group C, and the number of cells passing through the membrane in group C was more than in group A (all $P < 0.05$). The miR-192 mRNA relative expression level in group B was (3.01 ± 0.26) , higher than (1.87 ± 0.20) in group A and (0.97 ± 0.23) in group C, and the WNT2B mRNA relative expression level in group C was (0.97 ± 0.23) , lower than (4.11 ± 0.50) in group A and (6.08 ± 0.72) in group B, and the WNT2B mRNA expression level in group C was higher than in group A (all $P < 0.05$).

* 基金项目: 东莞市社会发展科技面上项目(20221800901482)。

作者简介: 陈颖, 男, 主管技师, 主要从事结直肠癌临床与基础方向的研究。

17.48)mm in group C, while the scratch width in group C was lower than that in group A. The number of perforating cells in group B was (624.67 ± 19.05) , which was lower than (875.23 ± 27.30) in group A and $(1\ 204.17 \pm 34.59)$ in group C, and the number of perforating cells in group C was higher than that in group A (all $P < 0.05$). The relative expression level of miR-192 mRNA in SW1116 CC cells in group B was (3.01 ± 0.26) , which was higher than (1.87 ± 0.20) in group A and (0.97 ± 0.23) in group C, and the relative expression level of miR-192 mRNA in group C was lower than that in group A. The expression level of WNT2B mRNA in group B was (2.16 ± 0.26) , which was lower than (4.11 ± 0.50) in group A and (6.08 ± 0.72) in group C, and the expression level of WNT2B mRNA in group C was higher than that in group A (all $P < 0.05$). **Conclusion** miR-192 could inhibit the malignant evolution of CC, and one of its main mechanisms may be related to the regulation of WNT2B expression.

Key words: colorectal cancer; microRNA-192; WNT family member 2B; malignant evolution; mechanism

随着人民生活方式的转变及精神压力的持续增加,结直肠癌(CC)的发病率正呈逐年攀升趋势,尤其是在经济发达的地区该病发病率更高,已成为严重威胁人类生命健康安全的重大疾病之一^[1-2]。外科手术联合辅助疗法是当前国内外用以治疗 CC 的主要方案,但术后仍存在复发率高及存活率低等问题^[3]。因此,进一步探索 CC 恶性演进的分子机制及全新的治疗靶点显得尤为重要。微小 RNA(miRNA)是新进发现的一类非编码小 RNA,其主要功能包括调控靶基因 mRNA 的翻译,进而实现对靶基因表达的调控^[4]。有研究报道证实,miRNA 可通过调控多种信号通路,参与细胞分化、细胞周期、能量代谢及细胞凋亡等多种生物学进程,从而发挥抑癌或促癌的作用^[5-6]。目前,全球范围内有关 miRNA 和 CC 的研究并不少见,但关于 miR-192 和 CC 恶性演进过程的研究鲜有报道。因此,本研究通过分析 miR-192 对结直肠癌(CC)细胞系的增殖、迁移和侵袭能力的影响,以期对 CC 的诊治提供新的靶点与思路,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人类 SW1116 CC 细胞(购自中国科学院上海细胞库,批号:021144);MTT 试剂盒(购自上海碧云天生物科技公司,批号:02106);膜联蛋白-V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(购自美国 Sigma 生物科技公司,批号:22013);Transwell chamber(购自美国纽约康宁公司,批号:21068);DMEM 培养基、胎牛血清、Lipofectamine2000 转染试剂及 Trizol 试剂(均购自美国 Invitrogen Gibco 公司,批号:20587);miR-192 模拟物及抑制剂(均购自上海吉玛制药技术有限公司,批号:22036);结晶紫(购自美国 Sigma 公司,批号:021408);SYBR Premix Ex TaqTM II(购自日本 TaKaRa 公司,批号:220507);Multiscan Plate Reader 酶标仪(购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,型号:MK3);光谱仪(购自美国 Thermo Scientific 公司,型号:FT-IR);流式细胞仪(购自美国 BD 公司,型号:FACSAria)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组及转染 将 SW1116 CC 细胞系分为 A 组、B 组及 C 组。A 组转染生理盐水,B 组转染 miR-192 模拟物,C 组转染 miR-192 抑制剂。各组细胞转染时长以 24 h 为宜。

1.2.2 细胞活力检测 检测方式选用 MTT 法,首先将 MTT 溶液添加至每孔内孵育 4 h。待上述操作完成后滴加二甲基亚砜进行时长 10 min 的孵育。最后借助 Multiscan Plate Reader 酶标仪测量 570nm 处的吸光度,完成细胞活力曲线的绘制。

1.2.3 细胞划痕实验 分别将各组细胞接种在 6 孔板,密度以 1.0×10^5 个/孔为宜,滴加 DMEM 培养基待细胞铺满单层。之后借助移液枪头顺着培养板底部垂直划线,以 PBS 重复冲洗 3 次清除细胞碎片。更换 DMEM 培养基,放置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下持续培养 12 h。最后进行拍照,测量划痕间距。

1.2.4 Transwell 实验 分别取各组细胞以 1.0×10^5 个/毫升加入 Transwell 小室上室,置入 DMEM 培养基,放置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下持续培养 24 h。以棉签刮除上室内非迁移细胞,以 4%多聚甲醛固定迁移细胞。选用 0.2%结晶紫实施染色,并以双蒸水完成上室的冲洗,最后在显微镜下随机选取 5 个视野拍照,计数。

1.2.5 流式细胞术 分别取各组细胞置入 DMEM 培养基,放置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下持续培养 48 h。以 PBS 重复洗涤 2 次,并予以离心去除上清处理,离心速率为 3 000 r/min,时长以 2 min 为宜。预冷结合缓冲液重悬细胞,滴加 Annexin V-FITC/PI 混匀,于 4 ℃条件下避光培养 15 min,滴加 10 μL PI,避光室温条件下孵育 15 min,最后借助 FACSAria 流式细胞仪完成检测,以 FlowJo 软件分析。

1.2.6 细胞 miR-192 及 WNT 家族成员 2B (WNT2B) mRNA 表达水平检测 检测方式选用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)。分别取各组细胞置入 DMEM 培养基,放置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下持续培养 48 h。以 Trizol 试剂完成总 RNA 的提取,并以逆转录试剂盒完成第 1 链 cDNA 合成。对

cDNA 实施纯化处理后实施 PCR 扩增。反应体系为 20.0 μ L:1.5 μ L cDNA 模板,1.0 μ L 引物,10.0 μ L SYBR Premix Ex TaqTM II,7.5 μ L DDH₂O。反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,共 40 个循环。以 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法完成 mRNA 相对表达水平的计算。

1.3 评价指标 对比 3 组 SW1116 CC 细胞存活率、单克隆形成数目及凋亡率,细胞划痕宽度及穿膜细胞数,miR-192 及 WNT2B mRNA 相对表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件分析数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组细胞存活率、单克隆形成数目及凋亡率对比 B 组 SW1116 CC 细胞存活率、单克隆形成数目均低于 A 组与 C 组(*P* < 0.05),而凋亡率高于 A 组与 C 组(*P* < 0.05);C 组 SW1116 CC 细胞存活率、单克隆形成数目均高于 A 组(*P* < 0.05),而凋亡率低于 A 组(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 3 组细胞存活率、单克隆形成数目及凋亡率对比($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	存活率 (%)	单克隆形成数目 (个)	凋亡率 (%)
A 组	6	76.21 $\pm$ 8.23	601.47 $\pm$ 23.16	13.78 $\pm$ 1.62
B 组	6	57.32 $\pm$ 6.19 ^{#*}	284.59 $\pm$ 15.08 ^{#*}	20.52 $\pm$ 2.52 ^{#*}
C 组	6	89.52 $\pm$ 10.62 [#]	2 150.68 $\pm$ 34.79 [#]	11.62 $\pm$ 1.41 [#]
<i>F</i>		15.872	20.601	8.471
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 A 组比较,[#] *P* < 0.05;与 C 组比较,^{*} *P* < 0.05。

2.2 3 组细胞划痕宽度及穿膜细胞数对比 B 组 SW1116 CC 细胞划痕宽度高于 A 组与 C 组(*P* < 0.05),而 C 组划痕宽度低于 A 组(*P* < 0.05);B 组穿膜细胞数少于 A 组与 C 组(*P* < 0.05),且 C 组穿膜细胞数多于 A 组(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 3 组细胞划痕宽度及穿膜细胞数对比($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	划痕宽度(mm)	穿膜细胞数(个)
A 组	6	601.32 $\pm$ 33.21	875.23 $\pm$ 27.30
B 组	6	785.10 $\pm$ 46.18 ^{#*}	624.67 $\pm$ 19.05 ^{#*}
C 组	6	326.99 $\pm$ 17.48 [#]	1 204.17 $\pm$ 34.59 [#]
<i>F</i>		25.815	30.672
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 A 组比较,[#] *P* < 0.05;与 C 组比较,^{*} *P* < 0.05。

2.3 3 组 miR-192 及 WNT2B mRNA 相对表达水平对比 B 组 SW1116 CC 细胞 miR-192 mRNA 相对表达水平相较于 A 组和 C 组均更高(*P* < 0.05),且 C 组 miR-192 mRNA 相对表达水平低于 A 组(*P* < 0.05);B 组 WNT2B mRNA 相对表达水平相较于 A

组和 C 组均更低(*P* < 0.05),且 C 组 WNT2B mRNA 相对表达水高于 A 组(*P* < 0.05),见表 3。

表 3 3 组 miR-192 及 WNT2B mRNA 相对表达水平对比($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-192	WNT2B mRNA
A 组	6	1.87 $\pm$ 0.20	4.11 $\pm$ 0.50
B 组	6	3.01 $\pm$ 0.26 ^{#*}	2.16 $\pm$ 0.26 ^{#*}
C 组	6	0.97 $\pm$ 0.23 [#]	6.08 $\pm$ 0.72 [#]
<i>F</i>		18.476	14.787
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 A 组比较,[#] *P* < 0.05;与 C 组比较,^{*} *P* < 0.05。

3 讨 论

CC 的发病率在全球范围内仅次于肺癌及乳腺癌,是人类癌症相关死亡的第 4 大病因^[7-8]。随着外科手术及化疗药物的发展,CC 患者的临床治疗疗效获得明显提升,但患者仍存在较高的局部或全身转移风险,预后不良^[9-10]。迄今为止,有关 CC 发生、发展、侵袭与转移的具体分子生物学机制尚且存在一定的争议,一般认为其恶性演进可能涉及多基因、多步骤的调控过程。随着近年来有关 miRNA 的研究日益深入,有学者发现,人类有 10%~30% 基因受 miRNA 的调控,其可能发挥原癌基因或抑癌基因的作用^[11-12]。miR-192 属于 miRNA 家族重要成员之一,可通过调控靶基因,在 CC 发生、发展过程中发挥至关重要的作用。

本研究结果显示,B 组 SW1116 CC 细胞存活率、单克隆形成数目及穿膜细胞数均低于 A 组和 C 组,而凋亡率、划痕宽度高于 A 组和 C 组;C 组 SW1116 CC 细胞存活率、单克隆形成数目均高于 A 组,而凋亡率、划痕宽度及穿膜细胞数均低于 A 组,提示 miR-192 可能发挥抑癌基因的作用。有研究发现,miR-192 属于抑癌基因,与肠道恶性肿瘤的癌细胞增殖和迁移等能力存在密切关联^[13-15]。miR-192 基因主要定位在人类第 11 号染色体上,广泛分布在人体结肠及肝脏等组织中,可通过抑制二氢叶酸还原酶的形成,减少核酸的合成,从而抑制肿瘤细胞的增殖、分化^[16]。同时,miR-192 可直接下调细胞周期有关蛋白的表达,从而促使细胞周期 G1、G2 期出现阻滞,进而抑制肿瘤细胞的异常增殖,发挥抑癌作用^[17]。吴一峰等^[18]的研究表明,miR-192 在 CC 组织中存在异常高表达,且能抑制 CC 细胞的侵袭能力,这为本研究结果提供了强有力的佐证。然而,杨章元等^[19]的研究发现,早期 CC 患者血清外泌体中 miR-192 表达水平明显高于良性病变患者和对照者。这与本研究结果存在明显差异,导致上述差异的原因可能与检测标本不同有关,应予以重点关注。此外,WNT 信号传导通路属于高度复杂的蛋白质相互作用网络之一,可通过和靶细胞膜上的受体相互作用,在细胞增殖、分化等过程中发挥至

关重要的作用^[20-21]。WNT 基因最初是从小鼠的乳腺癌组织中所克隆形成的一种原癌基因,而 WNT2B 则是 19 个基因家族成员中的一员,属于分泌性糖蛋白,存在数个保守型半胱氨酸的残基,与消化道恶性肿瘤的形成及发展密切相关。本研究结果显示,B 组 SW1116 CC 细胞 miR-192 mRNA 相对表达水平相较于 A 组和 C 组均更高,且 C 组 miR-192 mRNA 相对表达水平低于 A 组;B 组 WNT2B mRNA 相对表达水平相较于 A 组和 C 组均更低,且 C 组 WNT2B mRNA 相对表达水平高于 A 组。这提示 miR-192 对 CC 细胞生物学行为的调控作用机制可能与负向调控 WNT2B 表达有关^[22-24]。然而,有关其具体作用机制仍需进一步研究阐明。

综上所述,miR-192 具有抑制 CC 恶性演进的作用,其主要机制之一可能与负向调控 WNT2B 表达有关,有望成为 CC 诊治的新靶点。

参考文献

[1] PATEL S G, KARLITZ J J, YEN T, et al. The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(3): 262-274.

[2] ZHOU H, ZHU L, SONG J, et al. Liquid biopsy at the frontier of detection, prognosis and progression monitoring in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 86-87.

[3] 高露露, 吕阳, 朱琳. 结直肠癌患者血清 miRNA-497、miRNA-30a-5p 的表达及临床意义[J]. *癌症进展*, 2022, 20(17): 1771-1774.

[4] 周洁, 张双燕. 结直肠癌患者血清 miRNA-1260b 和 miRNA-182-5p 等标志物的表达水平及意义[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2022, 29(7): 785-789.

[5] 储怀祝, 韩娜慧, 吕海栋, 等. miRNA-21 和 miRNA-101 表达水平对结直肠癌诊断价值的 meta 分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(1): 80-84.

[6] 孙宇, 朱琳, 刘祯璐, 等. miRNA-1236 通过靶向 FOXO3a 调控结直肠癌细胞增殖的作用及机制研究[J/CD]. *中华结直肠疾病电子杂志*, 2019, 8(4): 383-389.

[7] 闵贝贝, 朱莉, 曾娟. 结直肠癌患者血浆外泌体中 miRNA-23b 的表达及其临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(7): 863-868.

[8] 董然, 朱晓雷. MicroRNA-183 抑制结直肠癌肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(13): 2267-2271.

[9] 李红, 邓文英, 赵玉州, 等. miRNA-98-5p 靶向 HMGA2 调控结直肠癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(20): 3565-3571.

[10] 冯莉, 刘妍, 荆丽, 等. miRNA-486-3p 和 BIK 在结直肠癌中表达及与临床病理特征的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(5): 972-974.

[11] 王锐, 张书信, 王艳逊, 等. 血清 miRNA-182-5p 在结直肠癌患者中的表达水平和临床价值[J/CD]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2021, 13(4): 119-122.

[12] 李海强, 蒋红钢, 沈徐宁, 等. 上调 lncRNA TUG1 靶向 miRNA-194-5p 促进 KIAA1199 表达对结直肠癌细胞增殖侵袭和 EMT 的影响[J]. *重庆医学*, 2022, 51(15): 2532-2538.

[13] ROKAVEC M, BOUZNAD N, HERMEKING H, et al. Paracrine induction of epithelial-mesenchymal transition between colorectal cancer cells and its suppression by a p53/miR-192/215/NID1 axis[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(4): 783-802.

[14] AST V, KORDAB T, OSWALD M, et al. MiR-192, miR-200c and miR-17 are fibroblast-mediated inhibitors of colorectal cancer invasion[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(85): 35559-35580.

[15] ZHAO H, CHEN J, CHEN J, et al. miR-192/215-5p act as tumor suppressors and link Crohn's disease and colorectal cancer by targeting common metabolic pathways: an integrated informatics analysis and experimental study[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 21060-21075.

[16] 范盼红, 赵文月, 贾琳娇, 等. MicroRNA-192 对结肠癌 RKO 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响及机制研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(3): 374-379.

[17] 徐万苏, 柯飞, 许怡, 等. 藤梨根提取物通过调控 miR-192-5p/ARPP19 轴影响结直肠癌细胞的增殖和凋亡[J]. *世界华人消化杂志*, 2021, 29(8): 398-406.

[18] 吴一峰, 张亚, 樊书荣, 等. 结肠癌组织 miR-192 和 miR-23a 水平的变化及其临床意义[J]. *中国现代普通外科进展*, 2019, 22(6): 426-431.

[19] 杨章元, 周正菊. 血清外泌体中 miR-125a-3p、miR-192、miR-223 联合检测对早期结直肠癌的诊断价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(24): 3059-3061.

[20] 陈伟玲, 张永渠, 李瑶琛, 等. Notch 和 Wnt 信号通路及两者的交叉串话与乳腺癌发生、发展的关系[J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2019, 13(4): 245-248.

[21] 黄耀凭, 杨凤, 周天华, 等. Hippo 信号通路及其在消化系统肿瘤中的作用研究进展[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2020, 49(1): 35-43.

[22] NIE X, LIU H, LIU L, et al. Emerging roles of Wnt ligands in human colorectal cancer[J]. *Front Oncol*, 2020, 14(10): 1341-1342.

[23] REZAYI S A, DOLATKHAH R, RAEISI M, et al. Hypermethylation of MIR129-2 regulates SOX4 transcription and associates with metastasis in patients with colorectal cancer[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2022, 53(3): 718-724.

[24] NG L, LI X, WAN T M, et al. Investigation of miRNA dysregulation and association with immune cell profile during malignant transformation of colorectal cells[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2022, 48(1): 245-252.