

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.08.006
文章编号: 1005-8982(2019)08-0030-06

MicroRNA-196a 在喉癌组织中的表达及其对喉癌细胞侵袭和转移的影响

冯国飞, 尤慧华, 张志锋

(金华市中心医院 耳鼻咽喉科, 浙江 金华 321000)

摘要: **目的** 探讨 microRNA-196a(miR-196a) 在喉癌组织中表达及其对喉癌细胞侵袭和转移的影响。**方法** 选取 2015 年 1 月—2017 年 12 月金华市中心医院 70 例喉癌手术切除标本的喉癌组织和癌旁组织。将人喉癌 Hep-2 细胞分为空白对照组、阴性对照组及 siRNA 组。siRNA 组细胞转染 pcDNA/miR-196a, 阴性对照组细胞转染 pcDNA/miR-NC, 空白对照组不做处理。采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定癌旁组织和喉癌细胞中 miR-196a 水平; Transwell 小室测定喉癌细胞侵袭和迁移能力; Western blotting 检测喉癌细胞磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(p-PKB)、Bax 及 Bcl-2 蛋白水平; RT-PCR 测定喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 mRNA 水平。**结果** 喉癌组织中 miR-196a 水平高于癌旁组织($P < 0.05$)。与空白对照组和阴性对照组比较, siRNA 组喉癌细胞中 miR-196a 水平降低($P < 0.05$), 细胞侵袭和迁移能力下降($P < 0.05$), PI3K、p-PKB 及 Bcl-2 蛋白和 mRNA 水平降低($P < 0.05$), Bax 蛋白和 mRNA 水平升高($P < 0.05$); 空白对照组与阴性对照组细胞各指标比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 喉癌组织中 miR-196a 水平升高, 沉默 miR-196a 可降低喉癌细胞的侵袭和迁移能力, 其机制可能与 PI3K/PKB 信号通路有关。

关键词: 喉肿瘤; microRNAs; 肿瘤浸润; 肿瘤转移; 磷脂酰肌醇-3-激酶

中图分类号: R739.65

文献标识码: A

Expression of miR-196a in laryngeal carcinoma and its effect on invasion and metastasis of laryngeal carcinoma cells

Guo-fei Feng, Hui-hua You, Zhi-feng Zhang

(Department of Otorhinolaryngology, Jinhua Municipal Central Hospital, Jinhua, Zhejiang 321000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-196a in laryngeal carcinoma, the effect of miR-196a on invasion and metastasis of laryngeal carcinoma cells and its mechanism. **Methods** A total of 70 cases of laryngeal cancer tissues and its adjacent tissues from laryngeal cancer which were surgically removed were collected from the department of otorhinolaryngology in Jinhua Central Hospital from January 2015 to December 2017. Human laryngeal carcinoma Hep-2 cells were divided into blank control group, negative control group and siRNA group. The siRNA group cells were transfected with pcDNA/miR-196a and the negative control group cells were transfected with pcDNA/miR-NC, while the blank control group cells were not treated. The miR-196a levels in tissues and laryngeal carcinoma cells were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The transwell chamber was used to measure the invasion and migration ability of laryngeal cancer cells. Western blot was used to detect the levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-PKB), Bax and Bcl-2 in laryngeal carcinoma cells. The mRNA levels of PI3K, p-PKB, Bax and Bcl-2 in laryngeal carcinoma cells

were determined by RT-PCR. **Results** The level of miR-196a in laryngeal carcinoma tissues was higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). Compared with the blank control group and the negative control group, the level of miR-196a in the siRNA group was decreased ($P < 0.05$), the cell invasion and migration ability were decreased ($P < 0.05$), the levels of PI3K, p-PKB, Bcl-2 protein and mRNA were decreased ($P < 0.05$), and the levels of Bax protein and mRNA were increased ($P < 0.05$). There were no significant difference in each index between the blank control group and the negative control group ($P > 0.05$). **Conclusions** The level of miR-196a is elevated in laryngeal carcinoma. Silence of miR-196a can reduce the invasion and migration of laryngeal carcinoma cells, and the mechanism may be related to PI3K/PKB signaling pathway.

Keywords: laryngeal neoplasms; microRNAs; neoplasm invasion; neoplasm metastasis; phosphatidylinositol 3-kinase

喉癌治疗方法主要为手术和放化疗为主的综合性治疗,而对于转移和复发的喉癌患者5年生存率和生活质量较差。因此,探索治疗喉癌的新方法具有重要意义^[1]。MicroRNA(miRNA)在恶性肿瘤中发挥癌基因和抑制基因的作用,研究miRNA在恶性肿瘤中的表达可为恶性肿瘤的靶基因治疗提供依据^[2-3]。miR-196a在多种恶性肿瘤中表达异常^[4-5],可影响恶性肿瘤的侵袭和迁移,但miR-196a对喉癌细胞侵袭和迁移的影响尚不清楚。本文探讨miR-196a对喉癌细胞侵袭和迁移的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 选取2015年1月—2017年12月金华市中心医院70例喉癌患者的手术切除标本,术中采集每例患者喉癌组织和癌旁组织(距离癌组织边缘 ≥ 0.5 cm)于液氮中保存备用。患者均经病理证实,术前未接受放化疗等其他抗肿瘤治疗,签署知情同意书。

1.1.2 细胞株 人喉癌Hep-2细胞株(美国菌种保藏中心)。

1.1.3 主要试剂 Transwell小室、Matrigel胶、DMEM培养液、胎牛血清、胰蛋白酶及BCA蛋白浓度测定试剂盒等购自美国Sigma公司,兔抗人磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)多克隆抗体、兔抗人磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, p-PKB)多克隆抗体、兔抗人Bax多克隆抗体、兔抗人Bcl-2多克隆抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)抗体购自美国Gibco公司,逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase

chain reaction, RT-PCR)试剂盒、转染试剂盒、脂质体Lipofectamine™ 2000及Trizol试剂盒购自美国Santa Cruze公司,miR-196a引物和内参由上海天根生化科技有限公司设计并合成,pcDNA/miR-196a和pcDNA/miR-NC重组质粒购自武汉巴菲尔生物技术服务有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 将人喉癌Hep-2细胞株接种到6孔板中,恒温培养箱中培养24 h,待细胞融合 $\geq 80\%$ 时将其分为空白对照组、阴性对照组及siRNA组,每组设7个复孔。采用Lipofectamine™ 2000转染试剂盒,siRNA组细胞转染pcDNA/miR-196a,阴性对照组细胞转染pcDNA/miR-NC,空白对照组不做处理。转染后再恒温培养箱中培养48 h,收集细胞备用。

1.2.2 组织和细胞中miR-196a水平测定 从液氮中取出喉癌组织和癌旁组织标本各50 mg,充分研磨后加入Trizol裂解液冰浴裂解10 min,提取喉癌组织和癌旁组织总RNA。取各组生长良好的喉癌细胞加入Trizol裂解液冰浴裂解10 min,提取喉癌细胞总RNA。紫外分光光度计测定RNA纯度,取组织和细胞总RNA进行逆转录,取逆转录产物为模板,采用RT-PCR测定组织和细胞中miR-196a水平,反应条件:95℃预变性30 s,95℃变性10 s,60℃退火40 s,72℃延伸5 min,共35个循环。以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算组织和细胞中miR-196a水平。

1.2.3 喉癌细胞侵袭能力测定 取3组培养48 h的喉癌细胞置于EP管中(每组取 1×10^5 个细胞),加入培养基重悬。Transwell小室铺Matrigel胶,重悬后的细胞置于Transwell小室中,在小室下层加入含胎牛血清的培养基,每组设7个复孔。在恒温培养箱中培养24 h,取出小室,擦除小室内细胞,染色固定,在显微镜下观察细胞侵袭情况。

1.2.4 喉癌细胞迁移能力测定 取 3 组培养 48 h 的喉癌细胞加入到 24 孔 Transwell 小室的上室（每组取 1×10^5 个细胞）。将含血清培养基加入到小室的下室，每组设 7 个复孔，培养 48 h 后取出小室，进行固定和染色，去除小室上层侧位细胞，显微镜下观察喉癌细胞迁移情况。

1.2.5 喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 蛋白水平测定 取各组培养 48 h 喉癌细胞，弃去培养液，介入离心管中，加入 RIPA 裂解液冰浴裂解 30 min，提取喉癌细胞总蛋白，BCA 蛋白浓度试剂盒测定总蛋白纯度。采用 Western blotting 检测喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 蛋白水平。将蛋白提取液电泳分离，湿法转膜，脱脂奶粉封闭，加入一抗（一抗为兔抗人 PI3K 多克隆抗体、兔抗人 p-PKB 多克隆抗体、兔抗人 Bax 多克隆抗体、兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体及 GAPDH 抗体）孵育 24 h；加入二抗（辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG）孵育 2 h，以 GAPDH 为内参，用 ECL 化学发光显影试剂盒进行显影。采用 BioRad 图像分析系统测定各蛋白条带吸光度，目标蛋白的相对表达量 = 目标蛋白的吸光度值 / GAPDH 蛋白吸光度值。

1.2.6 喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 mRNA 水平测定 取各组培养 48 h 喉癌细胞，加入 Trizol 裂解液冰浴裂解 10 min，提取各组喉癌细胞总 RNA。采用 RT-PCR 测定喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 mRNA 水平，方法同 1.2.5。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，比较用 t 检验或方差分析，进一步两两比较采用 LSD- t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 喉癌组织和癌旁组织中 miR-196a 水平比较

喉癌组织和癌旁组织中 miR-196a 水平分别为别 (1.87 ± 0.13)、(1.00 ± 0.02)，经 t 检验，差异有统计学意义 ($t = 55.341$, $P = 0.000$)；喉癌组织中 miR-196a 水平高于癌旁组织。见图 1。

2.2 3 组喉癌 Hep-2 细胞株中 miR-196a 水平比较

空白对照组、阴性对照组及 siRNA 组喉癌 Hep-2 细胞株中 miR-196a 水平分别为 (1.00 ± 0.01)、(0.97 ± 0.03) 及 (0.42 ± 0.05)。3 组喉癌 Hep-2 细胞

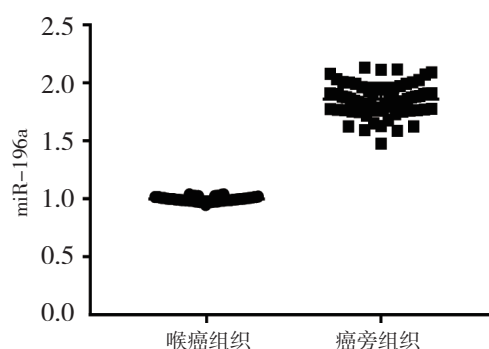


图 1 喉癌组织和癌旁组织中 miR-196a 水平比较 ($n = 70$)

株中 miR-196a 水平比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($F = 639.800$, $P = 0.000$)；siRNA 组喉癌 Hep-2 细胞株中 miR-196a 水平低于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$)，空白对照组与阴性对照组喉癌 Hep-2 细胞株中 miR-196a 水平比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 3 组喉癌 Hep-2 细胞株侵袭和迁移能力比较

3 组喉癌 Hep-2 细胞株侵袭和迁移能力比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；siRNA 组喉癌 Hep-2 细胞株侵袭和迁移细胞数低于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$)，空白对照组与阴性对照组喉癌 Hep-2 细胞株侵袭和迁移细胞数比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1 和图 2、3。

表 1 3 组喉癌 Hep-2 细胞株侵袭和迁移细胞数比较

(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	侵袭细胞数	迁移细胞数
空白对照组	185.26 ± 21.35	213.24 ± 24.35
阴性对照组	182.37 ± 22.56	211.17 ± 23.54
siRNA 组	98.19 ± 11.47	107.46 ± 12.07
F 值	46.852	59.427
P 值	0.000	0.000

2.4 3 组喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 蛋白水平比较

3 组喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 蛋白相对表达量比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；siRNA 组喉癌细胞 PI3K、p-PKB 及 Bcl-2 蛋白水平低于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$)，而 Bax 水平高于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$)。空白对照组与阴性对照组喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 蛋白水平比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2 和图 4。

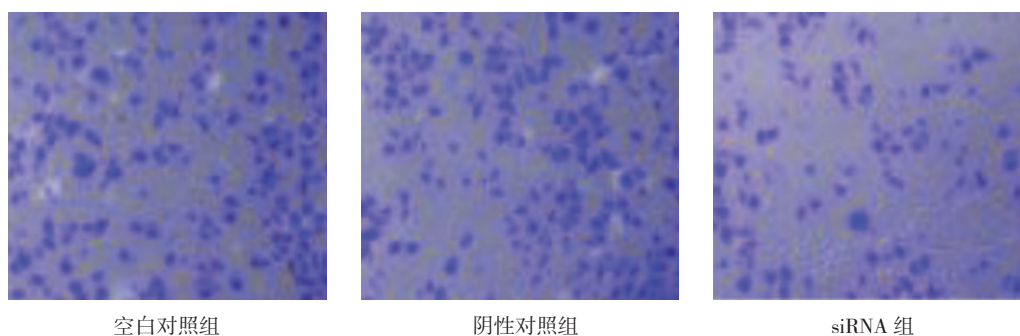


图 2 3 组喉癌 Hep-2 细胞株侵袭能力 (×200)

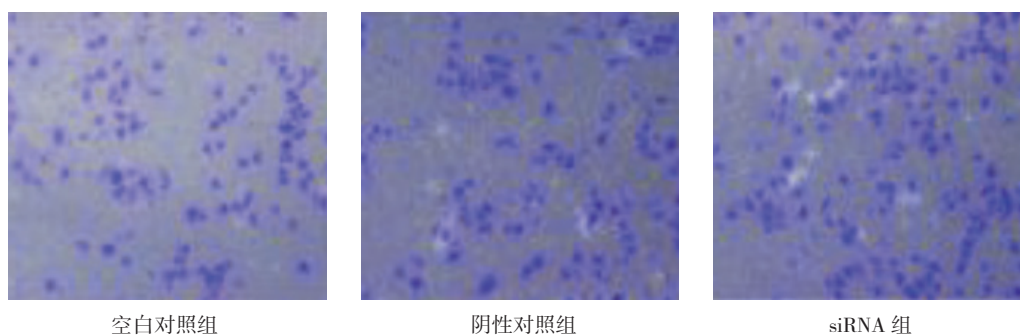
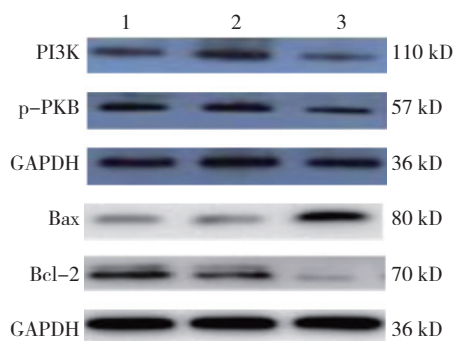


图 3 3 组喉癌 Hep-2 细胞株迁移能力 (×200)

表 2 3 组喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K 蛋白	p-PKB 蛋白	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白
空白对照组	0.53 ± 0.09	0.62 ± 0.11	0.37 ± 0.06	0.45 ± 0.06
阴性对照组	0.51 ± 0.07	0.61 ± 0.12	0.38 ± 0.05	0.44 ± 0.07
siRNA 组	0.23 ± 0.04	0.32 ± 0.07	0.59 ± 0.10	0.19 ± 0.04
F 值	40.466	19.417	20.130	45.119
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: siRNA 组

图 4 3 组喉癌细胞中 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达

2.5 3 组喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 mRNA 水平比较

空白对照组、阴性对照组、siRNA 组喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, siRNA 组喉癌细胞 PI3K、p-PKB 及 Bcl-2 mRNA 水平低于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$), Bax mRNA 水平高于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$), 空白对照组与阴性对照组喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 mRNA 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 3 组喉癌细胞 PI3K、p-PKB、Bax 及 Bcl-2 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K mRNA	p-PKB mRNA	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA
空白对照组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.02
阴性对照组	1.01 ± 0.02	1.00 ± 0.01	1.03 ± 0.02	0.98 ± 0.01
siRNA 组	0.48 ± 0.07	0.54 ± 0.08	1.76 ± 0.14	0.42 ± 0.05
F 值	311.274	214.667	193.527	758.800
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

3 讨论

miRNAs 在人类和真核生物中广泛存在, 其为内源性小分子非编码 RNA。在恶性肿瘤方面, miRNAs 可作为癌基因或者抑癌基因参与恶性肿瘤的发生、发展^[6-7]。miR-196a 为 miRNA 家族成员之一, 近年来在恶性肿瘤中的作用备受关注, 其在恶性肿瘤的发生、发展中发挥类似癌基因的作用^[8], 在胃癌、头颈癌及肝癌等多种恶性肿瘤组织和细胞中呈高表达, 可促进恶性肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移, 抑制恶性肿瘤细胞的凋亡^[9-10]。国外 JIN 等^[11] 研究发现, miR-196a 在喉癌中表达上调, 并通过下调喉癌中的 p27kip1 促进喉癌细胞增殖。SAITO 等^[12] 研究发现, miR-196a 在喉癌组织中表达上调, 有望成为喉癌的诊断生物标志物和治疗靶点。国内关于 miR-196a 在喉癌组织中表达的研究较少, 本文对金华市中心医院喉癌患者进行研究, 发现 miR-196a 在喉癌组织中升高, 与国外研究结果一致^[11-12]。

喉癌是头颈部恶性程度比较高的恶性肿瘤之一, 喉癌的复发和远处转移是影响喉癌治疗和预后的主要因素。在喉癌的早期治疗中, 如能在消灭喉癌细胞的同时抑制喉癌细胞的远处转移, 则对改善喉癌的预后具有重要意义。miR-196a 与恶性肿瘤细胞的侵袭、转移有关。吴晓鹏等^[13] 研究发现, miR-196a 可通过抑制 ANXA1 等基因的表达参与食管癌细胞的侵袭和转移。张健等^[14] 研究发现, 沉默 miRNA-196a 可抑制结肠癌细胞侵袭和转移。目前国内外关于 miR-196a 对喉癌细胞侵袭、转移影响的研究较少, 本研究发现沉默 miR-196a 可抑制喉癌细胞的侵袭、转移, 表明 miR-196a 参与喉癌的侵袭、转移过程, 下调 miR-196a 有望成为防止喉癌转移的靶点。

喉癌的发生、发展受多种信号通路调控, PI3K/PKB 信号通路在喉癌细胞的增殖、侵袭和转移中发挥重要作用^[15]。YANG 等^[16] 发现, PI3K/PKB/mTOR

通路参与喉癌细胞的侵袭、转移。miR-196a 可通过 PI3K/PKB 信号通路参与恶性肿瘤的发生、发展。GUERRIERO 等^[17] 研究发现, miR-196a 为肺癌细胞中异常 PI3K/PKB 信号传导的关键介质。SHANG 等^[18] 研究发现, miR-196a 过表达通过 PTEN/PKB/FOXO1 途径促进细胞增殖, 并抑制细胞凋亡。miR-196a 是否通过 PI3K/PKB 信号通路参与喉癌细胞的侵袭转移? 本文研究发现, 沉默 miR-196a 可降低 PI3K、p-PKB 及 Bcl-2 水平, Bax 水平升高。PI3K 被激活后可催化产生 PIP3, 促使 PKB 被激活, 激活的 PKB 激活其下游的靶基因, 从而参与对细胞增殖、凋亡、侵袭及转移的调控作用^[19]。Bcl-2 和 Bax 为 PI3K/PKB 信号通路的下游基因, Bcl-2 为抑制细胞凋亡基因, Bax 为促凋亡基因^[20-21]。沉默 miR-196a 可降低喉癌细胞 PI3K、p-PKB 及 Bcl-2 水平, 升高 Bax 水平, 表明下调 miR-196a 水平可能通过 PI3K/PKB 信号通路及其下游的 Bcl-2 和 Bax 基因参与喉癌细胞的侵袭和转移。

综上所述, 喉癌组织中 miR-196a 水平升高, 下调 miR-196a 水平可抑制喉癌细胞侵袭、转移, 其机制可能为 miR-196a 通过 PI3K/PKB 信号通路及其下游靶基因抑制细胞侵袭和转移。

参 考 文 献:

- [1] BRITT C J, GOURIN C G. Contemporary management of advanced laryngeal cancer[J]. Laryngoscope Investig Otolaryngol, 2017, 2(5): 307-309.
- [2] 来卫东, 戴尊收, 赵爱国, 等. miRNA-30a-5p 过表达对肾癌细胞株 786-0 增殖, 凋亡的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(38): 23-26.
- [3] CHEN S, SUN Y Y, ZHANG Z X, et al. Transcriptional suppression of microRNA-27a contributes to laryngeal cancer differentiation via GSK-3 β -involved Wnt/ β -catenin pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 14708-14718.
- [4] SHANG Y, WANG L Q, GUO Q Y, et al. MicroRNA-196a overexpression promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through PTEN/Akt/FOXO1 pathway[J]. Int J Clin Exp

- Pathol, 2015, 8(3): 2461-2472.
- [5] LI J H, LUO N, ZHONG M Z, et al. Inhibition of microRNA-196a might reverse cisplatin resistance of A549/DDP non-small-cell lung cancer cell line[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(2): 2387-2394.
- [6] 刘悦, 王晓雨, 曲春安, 等. miRNA-520e 对 HeLa 细胞 FOXL2 基因的靶向调控作用及细胞迁移增殖的影响 [J]. *山东医药*, 2017, 57(29): 8-11.
- [7] WANG S, GUO D, LI C. Downregulation of miRNA-26b inhibits cancer proliferation of laryngeal carcinoma through autophagy by targeting ULK2 and inactivation of the PTEN/AKT pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1679-1687.
- [8] CHEN T H, LEE C, CHIU C T, et al. Circulating microRNA-196a is an early gastric cancer biomarker[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(12): 10317-10323.
- [9] 辛鹤, 王传卓. MicroRNA-196a 与肿瘤相关性的研究进展 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 32(1): 42-46.
- [10] SUH Y E, RAULF N, GÄKEN J, et al. MicroRNA-196a promotes an oncogenic effect in head and neck cancer cells by suppressing annexin A1 and enhancing radioresistance[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(5): 1021-1034.
- [11] JIN C, ZHANG Y, LI J. Upregulation of miR-196a promotes cell proliferation by downregulating p27kip1 in laryngeal cancer[J]. *Biol Res*, 2016, 49(1): 40.
- [12] SAITO K, INAGAKI K, KAMIMOTO T, et al. MicroRNA-196a is a putative diagnostic biomarker and therapeutic target for laryngeal cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71480.
- [13] 吴晓鹏, 陈强, 刘勤, 等. MicroRNA-196a 对食管癌预后的评估价值及其生物学行为的调控机制 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(13): 50-57.
- [14] 张健, 李亚兰, 韩广森, 等. 微小 RNA-196a 在结肠癌组织中表达及小干扰 RNA 沉默对结肠癌细胞侵袭和转移的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(3): 588-591.
- [15] YANG L Y, HE C Y, CHEN X H, et al. Aurora kinase A revives dormant laryngeal squamous cell carcinoma cells via FAK/PI3K/Akt pathway activation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 48346-48359.
- [16] YANG N, HUI L, WANG Y, et al. SOX2 promotes the migration and invasion of laryngeal cancer cells by induction of MMP-2 via the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(6): 2651-2659.
- [17] GUERRIERO I, D'ANGELO D, PALLANTE P, et al. Analysis of miRNA profiles identified miR-196a as a crucial mediator of aberrant PI3K/AKT signaling in lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19172-19191.
- [18] SHANG Y, WANG L Q, GUO Q Y, et al. MicroRNA-196a overexpression promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through PTEN/Akt/FOXO1 pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2461-2472.
- [19] BAO Y Y, ZHOU S H, LU Z J, et al. Inhibiting GLUT-1 expression and PI3K/Akt signaling using apigenin improves the radiosensitivity of laryngeal carcinoma in vivo[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(4): 1805-1814.
- [20] GUO H, CUI H, PENG X, et al. Modulation of the PI3K/Akt Pathway and Bcl-2 family proteins involved in Chicken's tubular apoptosis induced by nickel chloride (NiCl₂) [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 22989-23011.
- [21] LIANG K, YE Y, WANG Y, et al. Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Neurol Sci*, 2014, 344(1/2): 100-104.

(唐勇 编辑)