

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.06.007

ATAD3A 在结直肠癌组织中的表达及其对细胞生长的影响 *

杨世荣^{1,3} 白翔宇^{2,3} 吴迪¹ 韩悦¹ 何显力^{1Δ}

(1 空军军医大学唐都医院普外科 陕西 西安 710032; 2 河南大学药学院 河南 开封 475004;

3 空军军医大学肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 探讨三磷酸腺苷酶家族蛋白 3A (ATAD3A) 在结直肠癌组织中的表达情况, 并验证其对结直肠癌细胞 RKO 和 HCT116 生长的影响。方法: 收集结直肠癌患者配对癌与癌旁组织 115 例, 通过免疫组化方式验证 ATAD3A 在结直肠癌组织与癌旁的表达差异。采用慢病毒转染和 si-RNA 干涉的方式构建 ATAD3A 过表达和敲低肠癌细胞系, 并采用 MTS, 流式检测细胞周期和细胞凋亡等方法验证 ATAD3A 对结直肠癌细胞系 RKO 和 HCT116 的影响。结果: ATAD3A 在结直肠癌组织中表达较癌旁组织显著升高 ($P < 0.001$)。在结直肠癌细胞系 RKO 和 HCT116 中过表达 ATAD3A 后, 细胞增殖能力明显增强, 处于 S 期的细胞比例明显增加, 而且细胞凋亡数量明显减少。反之, 在上述肠癌细胞中干涉 ATAD3A 后, 细胞增殖能力减弱, 细胞大部分停滞于 G1 期, 而且凋亡细胞数量明显增多。结论: ATAD3A 在结直肠癌组织中表达升高, 且 ATAD3A 通过促进细胞增殖、细胞周期进程和抑制细胞凋亡等方式促进肠癌细胞的生长。

关键词: ATAD3A; 结直肠癌; 细胞周期; 增殖; 凋亡

中图分类号: R-33; R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)06-1033-05

The Expression of ATAD3A in Colorectal Cancer and Its Influence on Cell Growth*

YANG Shi-rong^{1,3}, BAI Xiang-yu^{2,3}, WU Di¹, HAN Yue¹, HE Xian-li^{1Δ}

(1 Department of General Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng, Henan, 475004, China;

3 State Key Laboratory of Cancer Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of ATPase family AAA Domain-containing protein 3A (ATAD3A) in colorectal cancer (CRC), and its influence on cell growth in CRC cell lines RKO and HCT116. **Methods:** 115 paired CRC tissues were collected to detect the expression of ATAD3A by immunohistochemistry staining. Lentivirus transfection and siRNA interference were used to overexpression and knockdown ATAD3A in CRC cells, and western blot was used to determine the ATAD3A expression in these cells. Cell proliferation was measured by MTS assay. Flow cytometry was used to detect the cell cycle and apoptosis. **Results:** The expression of ATAD3A in CRC was significantly upregulated than adjacent normal tissues ($P < 0.001$). Overexpression of ATAD3A in RKO and HCT116 significantly promoted cell proliferation, upregulated the S phase fractions and reduced cell apoptosis. In contrast, knockdown ATAD3A in CRC cells obviously inhibited cell proliferation, G1 phase arrest and enhanced cell apoptosis. **Conclusions:** ATAD3A was frequently upregulated in CRC tissues, and promoted CRC cell proliferation, advanced cell cycle procession and inhibited cell apoptosis.

Key words: ATAD3A; Colorectal cancer; Cell cycle; Proliferation; Apoptosis

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

Article ID: 1673-6273(2020)06-1033-05

前言

结直肠癌 (Colorectal cancer, CRC) 是目前世界范围内发病率排名第三, 死亡率排名第四的恶性肿瘤, 每年仍约有 900,000 万人死于结直肠癌^[1]。而且随着我国经济条件改善和饮食生活习惯的西化, 总体发病人数仍处于上升趋势^[2]。线粒体作为人体

细胞重要的能量供应场所, 不仅在正常生理情况下支持细胞的新陈代谢, 其功能异常也与肿瘤的发生进展也息息相关^[3-5]。既往我们的研究发现线粒体功能异常在结直肠癌恶性进展中发挥着重要作用^[6,7], 三磷酸腺苷酶家族蛋白 3A (ATPase family AAA Domain-containing protein 3A, ATAD3A) 作为一种重要的线粒体膜蛋白, 已被证实多种肿瘤恶性进展及患者不良预后

* 基金项目: 国家自然科学基金国际科技合作项目 (2013DFA32110)

作者简介: 杨世荣 (1988-), 硕士研究生, 住院医师, 主要研究方向: 结直肠癌临床与基础研究,

电话: 18396502961, E-mail: yangshirong8819@163.com

Δ 通讯作者: 何显力, 博士, 教授, 主任医师, 主要研究方向: 结直肠癌临床与基础研究, E-mail: xianlihefmmu@163.com

(收稿日期: 2019-12-10 接受日期: 2019-12-31)

息相关^[8-10],但在结直肠癌中的表达及作用方面研究尚未系统开展。因此,本研究通过免疫组化方法验证了 ATAD3A 在结直肠癌患者癌与相应癌旁组织中表达差异,并且采用 MTS、流式检测细胞周期和凋亡等方式验证 ATAD3A 过表达和敲除后对肠癌细胞 RKO 和 HCT116 生长的影响,揭示了 ATAD3A 在结直肠癌进展中的作用,也为其防治提供了一个新潜在的药物靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和组织样本 人结直肠癌细胞 RKO 和 HCT116 购自 ATCC 细胞库并且由本实验室细胞库保存。纳入本研究的 115 例结直肠癌患者配对癌与癌旁组织,于 2017 年 2 月至 2019 年 2 月自空军军医大学唐都医院普外科收集,所有患者具有完整临床资料并已签署知情同意书,本研究已通过空军军医大学唐都医院医学伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 免疫组化试剂盒、DAB 显色液购自福州迈新试剂;新生胎牛血清、DMEM 培养基、Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司;ATAD3A 过表达慢病毒及干扰片段及对照购自上海吉玛公司;MTS 试剂盒购自索莱宝公司;细胞周期试剂盒及 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物公司;ATAD3A 抗体购自 Abclonal 公司,货号 A8230;β-actin 抗体购自北京天德悦公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法检测 ATAD3A 的表达 免疫组化染色采用 sp 法,即脱蜡水化、抗原修复、封闭内源性过氧化物酶、山羊血清封闭,滴加一抗过夜,第二天滴加生物素标记的二抗、链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶三抗孵育后,使用新鲜配置的 DAB 工作液显色,再用苏木精复染,脱水、透明、封片,镜下观察。免疫组化评分采用每个样本中的染色强度值(0 分:无染色;1 分:弱染色;2 分:中度染色;3 分:强染色)和阳性细胞百分比值(0 分:<10%;1 分:10%-25%;2 分:26-50%;3 分:51-75%;4 分:76-100%)的乘积,最低为 0 分,最高为 12 分。

1.2.2 细胞培养 结直肠癌细胞 RKO、HCT116 用含 10% FBS,1%双抗的 DMEM 细胞培养基,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中正常培养,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2.3 构建 ATAD3A 过表达的结直肠癌细胞株 将 5×10^4 细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后将含有 ATAD3A 基因 CDS 区序列的慢病毒质粒按 20 MOI 的比例对结直肠癌细胞进行转染,10 h 后换含血清 DMEM 培养基,48 h 后加嘌呤霉素进行阳性筛选。

1.2.4 构建 ATAD3A 干扰的结直肠癌细胞株 取适量对数生长期细胞接种于 6 孔培养板,24 h 后细胞培养板覆盖率为 70%-80%后,将 4 μg siRNA 和 8 μL Lipofectamine 2000 加入 250 μL 无血清培养基,轻柔混匀,离心 5 s,室温静置孵育 20 min。将待转染细胞换为无血清培养基,将混合的转染试剂轻轻滴加入培养孔,混匀试剂,8 h 后更换为含 10% 血清的 DMEM 培养基。48 h 后收集细胞进行后续实验。ATAD3A siRNA 干扰序列:正义链 5'-CCCUGAAUCUGGCACAGAU-3';反义链 5'-AUCUGUGCCAGAUUCAGGG-3';siCtrl 序列:正义链 5'-U-

UCUCCGAACGUGUCACGU-3';反义链 5'-ACGUGACACGU-UCGGAGAA-3'。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达水平 胰蛋白酶消化细胞后离心,PBS 洗涤两遍,加入 RIPA 强裂解液,冰上孵育 30 min,4℃ 12000 r/min 离心 20 min,收集上清液。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后,加入蛋白上样缓冲液,100℃ 煮沸 10 min 使其变性。按每孔 40 μg 上样,蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,加一抗 4℃ 孵育过夜。用 1× TBST 充分洗膜 3 次,每次 5 min。加二抗室温孵育 1 h。用 1× TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。采用 ECL 化学发光液显影分析。

1.2.6 MTS 法检测细胞活性 取对数生长期细胞,调整细胞悬液浓度为 100 μL/孔,加入 96 孔板,2× 10³ 个/孔;37℃、5% CO₂ 孵育过夜,显微镜观察;每孔加入 20 μL MTS 溶液(5 mg/mL),孵育 1 h 后,使用酶标仪在 490 nm 波长检测细胞吸光度值记录为起始值,同样方法与 24、48、72、96h 检测吸光度值。每组采用 5 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.7 流式细胞仪分析细胞周期 收集对数生长期细胞,1000 r/min 离心 5 min 后收集细胞,弃上清液。用预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次,加入预冷 75%乙醇于 4℃ 固定 2 h。离心收集细胞,加入 RNaseA 溶液 20 μL 于 37℃ 水浴 30 min,加入 400 μL PI 后轻轻混匀于 4℃ 避光孵育 1 h。处理后细胞使用流式细胞仪分析。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集对数生长期细胞,用无 EDTA 胰酶消化,1000 r/min 离心 5 min 后收集细胞,弃上清液。用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,1000 r/min 离心 5 min;用 400 μL 1×Binding Buffer 缓冲液悬浮细胞,调整细胞浓度约为 1× 10⁶ 个/mL;向上述细胞悬液中加入 5 μL Annexin V-FITC 染料,轻轻混匀,4℃ 冰箱中避光孵育 15 min;加入 10 μL PI 染料,轻轻混匀,4℃ 冰箱中避光孵育 5 min;1 h 内用流式细胞仪检测。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0,Graph Pad Prism8.0 对数据进行统计分析。计量数据采用均数±标准差(mean±SD)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料采用百分比表示。以 P<0.05 为差异有统计学意义。(**P<0.01;***P<0.001)。

2 结果

2.1 ATAD3A 在结直肠癌及相应癌旁组织中的表达

本研究采用免疫组化的方法,验证 115 例结直肠癌患者肠癌组织及相应癌旁组织中 ATAD3A 的表达差异,发现 ATAD3A 在结直肠癌组织中的免疫组化评分(8.08±2.16)要显著高于相应癌旁组织(3.42±1.69),差异具有统计学意义(P<0.001),见图 1。

2.2 结直肠癌细胞中过表达和干扰 ATAD3A 效果验证

采用 western blot 对结直肠癌细胞系 RKO 和 HCT116 过表达和干扰效果进行验证,结果显示,经含 ATAD3A 质粒转染后的 RKO 和 HCT116 细胞中,ATAD3A 蛋白水平明显较空载质粒转染细胞增高;而经 siATAD3A 处理的 RKO 和 HCT116 细胞中,ATAD3A 蛋白水平较阴性对照细胞明显降低,见图 2。

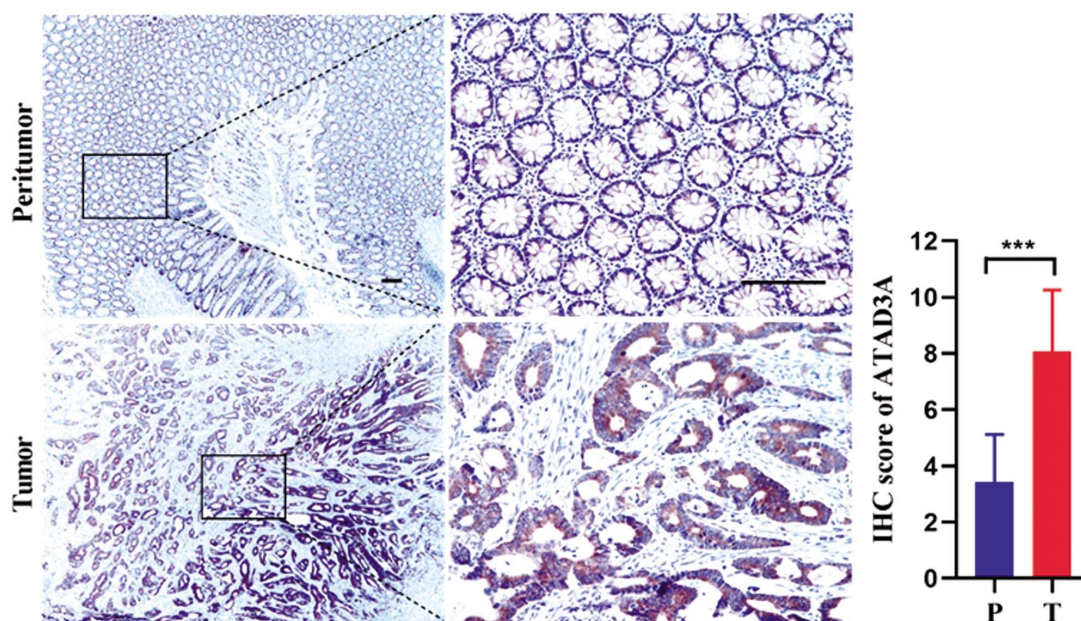


图1 结直肠癌及相应癌旁组织中 ATAD3A 的表达比较

Fig.1 Comparison of ATAD3A expression in CRC and paired peritumor tissues

Note: Data are shown as mean $\pm$ SD, n=115. P: peritumor; T: tumor. *** $P < 0.001$, bar: 100 μ m, compared with peritumor group.

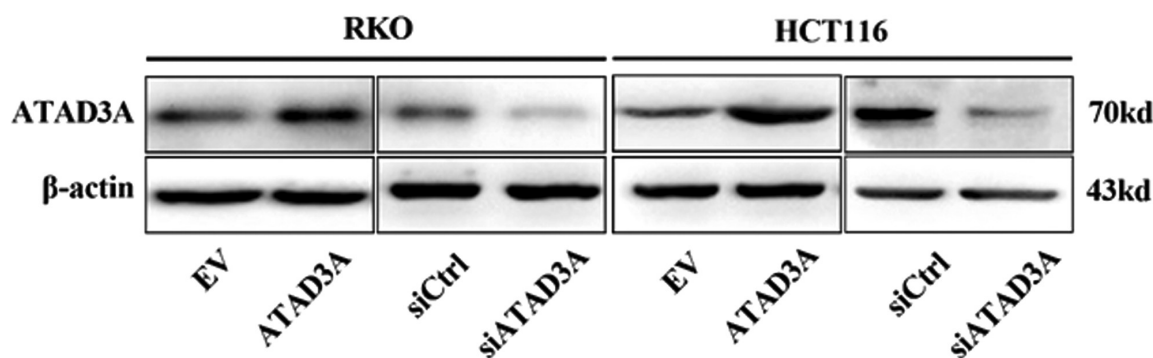


图2 Western blot 验证 ATAD3A 在结直肠癌细胞 RKO 和 HCT116 中过表达和干涉效果

Fig.2 Expression of ATAD3A in CRC cell lines RKO and HCT116 after overexpression and knockdown was detected by western blot

Note: Representative result are shown as above, n=3. EV: Empty Vector; ATAD3A: Vector expressing ATAD3A; siCtrl: siRNA treated as Control; siATAD3A: siRNA treated against ATAD3A. *** $P < 0.001$, bar: 100 μ m, compared with EV or siRNA group respectively.

2.3 MTS 法检测过表达和干涉 ATAD3A 后结直肠癌细胞增殖能力

通过 MTS 法检测结果发现,过表达 ATAD3A 后肠癌细胞

RKO 和 HCT116 的增殖能力较对照组细胞显著增强 (Fig.3 A 和 B, $P < 0.01$),而干涉 ATAD3A 后肠癌细胞 RKO 和 HCT116 的增殖能力则较对照组细胞显著减弱 (Fig.3 C 和 D, $P < 0.01$)。

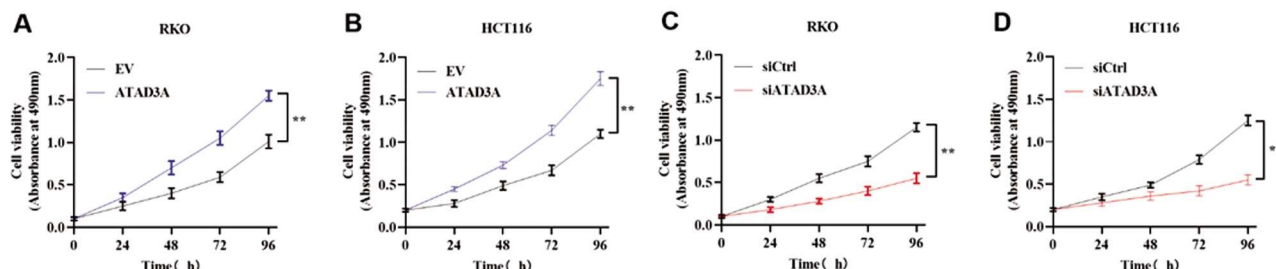


图3 MTS 验证过表达和干涉 ATAD3A 后结直肠癌细胞 RKO 和 HCT116 细胞增殖能力

Fig.3 Cell proliferation was detected by MTS in in CRC cell lines RKO and HCT116 after ATAD3A overexpression and knockdown.

Note: Data are shown as mean $\pm$ SD, n=3. EV: Empty Vector; ATAD3A: Vector expressing ATAD3A; siCtrl: siRNA treated as Control; siATAD3A: siRNA treated against ATAD3A. ** $P < 0.01$, compared with EV or siRNA group respectively.

2.4 验证过表达和干涉 ATAD3A 对结直肠癌细胞周期的影响

采用 PI 染色流式检测的方法检测细胞周期, 发现过表达

ATAD3A 后 RKO 和 HCT116 细胞 G1 期百分数较对照组明显减少,而 S 期细胞百分数较对照组显著增加 (Fig.4 A 和 B, $P < 0.01$)。

0.05), 而干涉 ATAD3A 后 RKO 和 HCT116 细胞 G1 期百分数 (Fig.4 C 和 D, $P < 0.05$)。则较对照组明显增加, 而 S 期细胞百分数较对照组显著减少

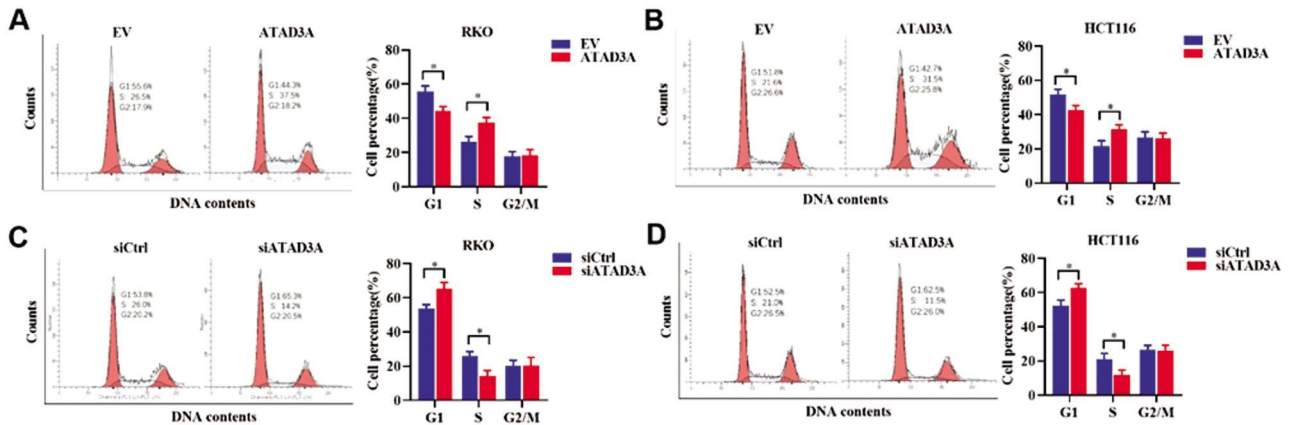


图 4 PI 法验证过表达和干涉 ATAD3A 后结直肠癌细胞 RKO 和 HCT116 细胞周期

Fig.4 Cell cycle was measured by flow cytometry after PI staining in CRC cell lines RKO and HCT116 after ATAD3A overexpression and knockdown.

Note: Data are shown as mean $\pm$ SD, n=3. EV: Empty Vector; ATAD3A: Vector expressing ATAD3A; siCtrl: siRNA treated as Control; siATAD3A: siRNA treated against ATAD3A. ** $P < 0.01$, compared with EV or siRNA group respectively.

2.5 验证过表达和干涉 ATAD3A 对结直肠癌细胞凋亡的影响

采用 Annexin V-FITC/PI 双染法流式检测细胞凋亡, 结果显示过表达 ATAD3A 后 RKO 和 HCT116 细胞凋亡百分数较

对照组明显减少 (Fig.5 A 和 B, $P < 0.01$), 而干涉 ATAD3A 后 RKO 和 HCT116 细胞凋亡比例则较对照组细胞显著增加 (Fig.5 C 和 D, $P < 0.01$)。

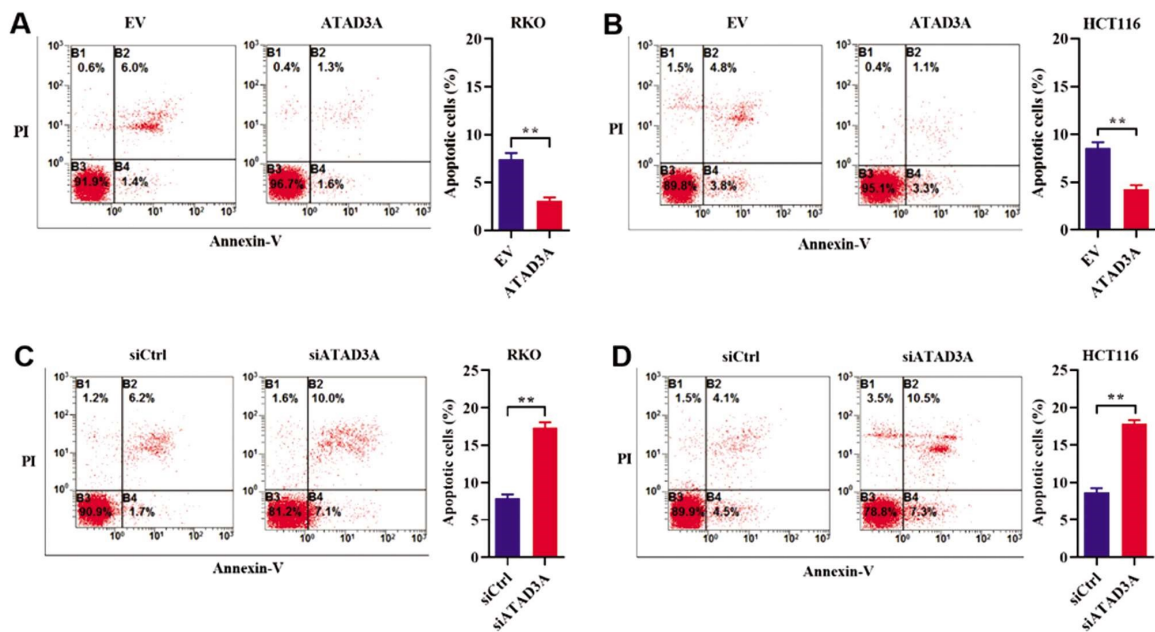


图 5 Annexin V-FITC/PI 双染法验证过表达和干涉效 ATAD3A 后结直肠癌细胞 RKO 和 HCT116 细胞凋亡

Fig.5 Cell apoptosis was measured by Annexin V-FITC/PI double staining in CRC cell lines RKO and HCT116 after ATAD3A overexpression and knockdown.

Note: Data are shown as mean $\pm$ SD, n=3. EV: Empty Vector; ATAD3A: Vector expressing ATAD3A; siCtrl: siRNA treated as Control; siATAD3A: siRNA treated against ATAD3A. ** $P < 0.01$, compared with EV or siRNA group respectively.

3 讨论

结直肠癌是目前世界范围内发病率最高的恶性肿瘤之一, 这不仅是受人口老龄化的影响, 最近有研究显示结直肠癌患者中年轻群体比例正在迅速增加, 给整个社会及患者家庭带来沉重的经济负担^[16]。众所周知, 结直肠癌和其他实体瘤一样, 发病

机制复杂, 受遗传和环境因素共同影响^[17-20]。目前临床上用于结直肠癌的靶向药物只有抗 EGFR 的西妥昔单抗和抗 VEGF 的贝伐单抗等少数几种生物制剂^[23,24], 包括近年来兴起的抗 PD1 免疫治疗^[25], 受个体差异影响仍有很大部分患者无法从中获益^[21]。因此, 有必要扎实开展结直肠癌方面的基础研究, 尽早发现更多有意义的潜在治疗靶点。

作为人体细胞中主要能量来源的细胞器,线粒体通过生物学发生、代谢重编程、氧化应激信号通路参与肿瘤细胞生长、生存和转移,与肿瘤的恶性进展密切相关^[11,12]。三磷酸腺苷酶家族蛋白3(ATAD3)是一类核基因编码并定位于线粒体内膜的ATP酶家族蛋白,包括ATAD3A、ATAD3B和ATAD3C^[26,27],参与细胞内包括基因组转录、翻译、蛋白水解和囊泡运输等多个生物过程^[22]。已有研究证实小鼠体内全身敲除ATAD3会导致胚胎致死^[28],而在体外培养细胞中敲除ATAD3会引起线粒体胆固醇稳态的改变^[13],并且还会导致线粒体结构的异常改变和脊数量的减少,ATAD3缺失还可引起mtDNA复制减少,氧化磷酸化复合体I和V相关蛋白表达降低^[14],以上结果均证实ATAD3是维持线粒体正常功能的关键分子,ATAD3的缺失可能通过损害线粒体功能给细胞生长带来损害。早在2003年ATAD3被首次发现时就证实是受原癌基因c-MYC调控的下游分子^[15]。与此同时,ATAD3A也曾被报道在恶性胶质瘤中表达显著增高,且与患者不良预后显著相关^[29],而ATAD3A在结直肠癌组织中的研究还未开展。因此我们采用免疫组化的方法分析115例结直肠癌患者组织中ATAD3A的表达,发现ATAD3A在结直肠癌组织中表达要较癌旁组织显著增高,提示ATAD3A在结直肠癌恶性进展中发挥着重要作用。

既往还有研究证实非小细胞肺癌细胞中干扰ATAD3显著破坏线粒体的正常网状形态,并且抑制肿瘤细胞的增殖^[9]。我们在结直肠癌细胞系中发现了相同现象,RKO和HCT116细胞中过表达ATAD3A后,MTS法证实细胞增殖能力和增殖细胞比例明显增强和增加,而干扰ATAD3A后,细胞增殖能力和增殖细胞比例明显减弱和减少。与此同时,通过细胞周期检测还发现,过表达RKO和HCT116细胞中ATAD3A后,处于分裂期S期的细胞比例较对照组细胞明显增多,而处于合成前期的G1期细胞比例减少。RKO和HCT116细胞干扰ATAD3A后较对照组S期细胞比例明显减少,而大部分停滞于G1期。肿瘤细胞的快速生长和分裂增殖需要大量的能量供应,ATAD3A作为影响线粒体氧化磷酸化功能的关键分子,发挥着显著促进肿瘤细胞生长的作用。我们的研究还发现ATAD3A与肠癌细胞的凋亡抵抗密切相关。通过在RKO和HCT116细胞中过表达ATAD3A后,流式检测凋亡细胞比例较对照组明显减少,而干扰ATAD3A后,凋亡细胞比例则较对照组明显增加。这与之前关于ATAD3A促进肺癌细胞凋亡抵抗,进而对化疗药物顺铂产生耐药的报道结果一致^[8]。

综上,我们的研究通过收集临床手术切除样本发现ATAD3A在结直肠癌组织中表达显著高于相应癌旁组织。并且在结直肠癌细胞RKO和HCT116中过表达ATAD3A后,细胞增殖能力增强,处于分裂期细胞比例增多,且凋亡细胞数量减少,而干扰ATAD3A后,结果与上述相反。提示ATAD3A在结直肠癌细胞中发挥着显著促增殖和抗凋亡的作用,可作为结直肠癌患者的潜在药物治疗靶点。下一步我们将在动物水平进一步验证及探索ATAD3A促进结直肠癌细胞生长的作用与机制,通过ATAD3A相关研究进一步揭示线粒体功能异常参与结直肠癌恶性进展的新方式,并为结直肠癌防治提供新的思路。

参考文献(References)

[1] Dekker E, Tanis P J, Vleugels J, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet,

2019, 394(10207): 1467-1480

- [2] Pan R, Zhu M, Yu C, et al. Cancer incidence and mortality: A cohort study in China, 2008-2013[J]. Int J Cancer, 2017, 141(7): 1315-1323
- [3] Whitehall J C, Greaves L C. Aberrant mitochondrial function in ageing and cancer[J]. Biogerontology, 2019
- [4] Altieri D C. Mitochondrial dynamics and metastasis [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(5): 827-835
- [5] Badrinath N, Yoo S Y. Mitochondria in cancer: in the aspects of tumorigenesis and targeted therapy [J]. Carcinogenesis, 2018, 39(12): 1419-1430
- [6] Wang G, Wang Q, Huang Q, et al. Upregulation of mtSSB by interleukin-6 promotes cell growth through mitochondrial biogenesis-mediated telomerase activation in colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2019, 144(10): 2516-2528
- [7] Sun X, Zhan L, Chen Y, et al. Increased mtDNA copy number promotes cancer progression by enhancing mitochondrial oxidative phosphorylation in microsatellite-stable colorectal cancer[J]. Signal Transduct Target Ther, 2018, 3, 8
- [8] Fang H Y, Chang C L, Hsu S H, et al. ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells[J]. J Cell Sci, 2010, 123(pt7): 1171-1180
- [9] Li S, Rousseau D. ATAD3, a vital membrane bound mitochondrial ATPase involved in tumor progression [J]. J Bioenerg Biomembr, 2012, 44(1): 189-197
- [10] Liu X, Li G, Ai L, et al. Prognostic value of ATAD3 gene cluster expression in hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Lett, 2019, 18(2): 1304-1310
- [11] Vyas S, Zaganjor E, Haigis M C. Mitochondria and Cancer [J]. Cell, 2016, 166(3): 555-566
- [12] Valcarcel-Jimenez L, Gaude E, Torrano V, et al. Mitochondrial Metabolism: Yin and Yang for Tumor Progression [J]. Trends Endocrinol Metab, 2017, 28(10): 748-757
- [13] Gerhold J M, Cansiz-Arda S, Lohmus M, et al. Human Mitochondrial DNA-Protein Complexes Attach to a Cholesterol-Rich Membrane Structure[J]. Sci Rep, 2015, 5: 15292
- [14] Peralta S, Goffart S, Williams S L, et al. ATAD3 controls mitochondrial cristae structure in mouse muscle, influencing mtDNA replication and cholesterol levels[J]. J Cell Sci, 2018, 131(13)
- [15] Zeller K I, Jegga A G, Aronow B J, et al. An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets[J]. Genome Biol, 2003, 4(10): R69
- [16] Kasi P M, Shahjehan F, Cochuyt J J, et al. Rising Proportion of Young Individuals With Rectal and Colon Cancer[J]. Clin Colorectal Cancer, 2019, 18(1): e87-e95
- [17] Henrikson N B, Webber E M, Goddard K A, et al. Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review [J]. Genet Med, 2015, 17(9): 702-712
- [18] Walter V, Jansen L, Hoffmeister M, et al. Smoking and survival of colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis [J]. Ann Oncol, 2014, 25(8): 1517-1525
- [19] Cai S, Li Y, Ding Y, et al. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis [J]. Eur J Cancer Prev, 2014, 23(6): 532-539

(下转第 1074 页)

- fectiveness of the physical activity intervention program in the PREDIMED-Plus study: a randomized controlled trial [J]. *Int J Behav Nutr Phys Act*, 2018, 15(1): 110
- [22] Karim H, Kim S H, Lauderdale K, et al. Analogues of ERbeta ligand chloroindazole exert immunomodulatory and remyelinating effects in a mouse model of multiple sclerosis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 503
- [23] Qin L Z, Li W, Huang Y, et al. PTX3 expression in the plasma of elderly ACI patients and its relationship with severity and prognosis of the disease[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(19): 4112-4118
- [24] Russell A E, Jun S, Sarkar S, et al. Extracellular Vesicles Secreted in Response to Cytokine Exposure Increase Mitochondrial Oxygen Consumption in Recipient Cells[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 51
- [25] Wu N, Zhang X, Du S, et al. Upregulation of miR-335 ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury via targeting hypoxia inducible factor 1-alpha subunit inhibitor[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(12): 4082-4094
- [26] Zhang H, Wu J, Wu J, et al. Exosome-mediated targeted delivery of miR-210 for angiogenic therapy after cerebral ischemia in mice [J]. *J Nanobiotechnology*, 2019, 17(1): 29
- [27] Zhao Y, Huang W, Kim T M, et al. MicroRNA-29a activates a multi-component growth and invasion program in glioblastoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 36
- [28] Zou R, Zhang D, Lv L, et al. Bioinformatic gene analysis for potential biomarkers and therapeutic targets of atrial fibrillation-related stroke [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 45
- [29] Xie L, Li W, Hersh J, et al. Experimental ischemic stroke induces long-term T cell activation in the brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018[Epub ahead of print]
- [30] Rajkovic I, Wong R, Lemarchand E, et al. Pentraxin 3 promotes long-term cerebral blood flow recovery, angiogenesis, and neuronal survival after stroke[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2018, 96(12): 1319-1332
- [31] Sezer S, Ucar F, Ulusoy E K, et al. Serum amyloid A, fetuin-A, and pentraxin-3 levels in patients with ischemic stroke: novel prognostic biomarkers?[J]. *Turk J Med Sci*, 2014, 44(1): 16-23
- [32] Shindo A, Maki T, Mandeville E T, et al. Astrocyte-Derived Pentraxin 3 Supports Blood-Brain Barrier Integrity Under Acute Phase of Stroke[J]. *Stroke*, 2016, 47(4): 1094-100
- [33] Umbria M, Ramos A, Caner J, et al. Involvement of mitochondrial haplogroups in myocardial infarction and stroke: A case-control study in Castile and Leon (Spain) population[J]. *Mitochondrion*, 2019, 44: 1-6
- [34] Zurita Rendon O, Fredrickson E K, Howard C J, et al. Vms1p is a release factor for the ribosome-associated quality control complex [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2197
- [35] Noz M P, Ter Telgte A, Wiegertjes K, et al. Trained Immunity Characteristics Are Associated With Progressive Cerebral Small Vessel Disease[J]. *Stroke*, 2018, 49(12): 2910-2917
- [36] Shimada K, Porritt R A, Markman J L, et al. T-Cell-Intrinsic Receptor Interacting Protein 2 Regulates Pathogenic T Helper 17 Cell Differentiation[J]. *Immunity*, 2018, 49(5): 873-885.e7

(上接第 1037 页)

- [20] Kyrgiou M, Kalliala I, Markozannes G, et al. Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature [J]. *BMJ*, 2017, 356: j477
- [21] Eng C, Kim T W, Bendell J, et al. Atezolizumab with or without cobimetinib versus regorafenib in previously treated metastatic colorectal cancer (IMblaze370): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(6): 849-861
- [22] Frickey T, Lupas A N. Phylogenetic analysis of AAA proteins [J]. *J Struct Biol*, 2004, 146(1-2): 2-10
- [23] Stintzing S, Modest D P, Rossius L, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(10): 1426-1434
- [24] Venook A P, Niedzwiecki D, Lenz H J, et al. Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients with KRAS Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA*, 2017, 317(23): 2392-2401
- [25] Le DT, Durham J N, Smith K N, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade[J]. *Science*, 2017, 357(6349): 409-413
- [26] Baudier J. ATAD3 proteins: brokers of a mitochondria-endoplasmic reticulum connection in mammalian cells [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2018, 93(2): 827-844
- [27] Gilquin B, Taillebourg E, Cherradi N, et al. The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(8): 1984-1996
- [28] Hoffmann M, Bellance N, Rossignol R, et al. C. elegans ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development [J]. *PLoS One*, 2009, 4(10): e7644
- [29] You W C, Chiou S H, Huang C Y, et al. Mitochondrial protein ATPase family, AAA domain containing 3A correlates with radioresistance in glioblastoma[J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(10): 1342-1352