

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.11.016

circFOXM1 作为新型胃癌标志物调控胃癌发生、发展的机制研究^{*}

朱沙沙,马小宏[△],程莉莉,谢逸尘

江苏省如皋市人民医院检验科,江苏如皋 226500

摘要:**目的** 分析新型胃癌标志物环状叉头框蛋白 M1(circFOXM1)在胃癌发生、发展机制中的调控作用。**方法** 选取 2022 年 1 月至 2023 年 4 月该院肿瘤科收治的 60 例胃癌患者作为研究对象,检测其胃癌组织及癌旁组织中 circFOXM1 的表达水平。根据 circFOXM1 的表达水平,将 60 例患者分为 circFOXM1 高表达组和 circFOXM1 低表达组。比较 circFOXM1 高表达组和 circFOXM1 低表达组的临床病理资料(淋巴结转移、肿瘤侵袭深度和临床分期)。采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)和免疫印迹法检测 GES-1、HGC-27、BGC-823、MKN-45、MKN-1 细胞中 circFOXM1 信使 RNA(mRNA)、微小 RNA(miR)-182-5p mRNA 与母亲信号蛋白同源物 7(SMAD7)mRNA 及 SMAD7 蛋白的表达水平。体外培养 MKN-45 细胞,将其随机分为对照组、circFOXM1 敲低组[转染 circFOXM1 小干扰 RNA(siRNA)质粒]、circFOXM1 过表达组(转染 circFOXM1 过表达质粒)、共转染阴性对照组(转染空载质粒和 miR-182-5p 抑制剂阴性对照)、circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组(转染 circFOXM1 siRNA 质粒和 miR-182-5p 抑制剂),分组转染后,采用实时荧光定量 PCR 和免疫印迹法检测各组 MKN-45 细胞 circFOXM1 mRNA、miR-182-5p mRNA 与 SMAD7 mRNA 及 SMAD7 蛋白的表达水平;采用 Transwell 侵袭及细胞划痕试验检测各组 MKN-45 细胞侵袭迁移情况;采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测各组 MKN-45 细胞增殖情况。取 50 只裸鼠随机分为对照小鼠组、circFOXM1 敲低小鼠组、circFOXM1 过表达小鼠组、共转染阴性对照小鼠组、circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂小鼠组,每组 10 只。将各组 MKN-45 细胞接种在对应裸鼠右腋附近背部皮下构建胃癌移植瘤模型,饲养 4 周后检测各组移植瘤裸鼠 MKN-45 细胞增殖率、肿瘤体积及肿瘤质量。将 MKN-45 细胞随机分为野生 miR-182-5p+空载组、野生 miR-182-5p+circFOXM1 过表达组、突变 miR-182-5p+空载组、突变 miR-182-5p+circFOXM1 过表达组、野生 SMAD7+miR-182-5p mimic 阴性对照组、野生 SMAD7+miR-182-5p mimic 组、突变 SMAD7+miR-182-5p mimic 阴性对照组、突变 SMAD7+miR-182-5p mimic 组,再按照不同方式对各组 MKN-45 细胞进行转染。采用荧光素酶报告试验检测各组 MKN-45 细胞 circFOXM1 对 miR-182-5p、SMAD7 的靶向调控。**结果** circFOXM1 低表达组有 17 例患者,circFOXM1 高表达组有 43 例患者。circFOXM1 低表达组和 circFOXM1 高表达组患者淋巴结转移、肿瘤侵袭深度和临床分期情况比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。MKN-45、HGC-27、BGC-823、MKN-1 细胞中 circFOXM1 mRNA、SMAD7 mRNA、SMAD7 蛋白表达水平平均高于 GES-1 细胞,miR-182-5p mRNA 表达水平平均低于 GES-1 细胞,差异均有统计学意义($P<0.05$)。对照组 circFOXM1 mRNA 表达水平低于 circFOXM1 过表达组,高于 circFOXM1 敲低组和 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组,差异均有统计学意义($P<0.05$);对照组 miR-182-5p mRNA 表达水平高于 circFOXM1 过表达组,低于 circFOXM1 敲低组,差异均有统计学意义($P<0.05$);对照组 SMAD7 mRNA 及 SMAD7 蛋白表达水平低于 circFOXM1 过表达组,高于 circFOXM1 敲低组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。circFOXM1 敲低组 miR-182-5p mRNA 表达水平高于 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组,SMAD7 mRNA 及 SMAD7 蛋白表达水平平均低于 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。对照组 MKN-45 细胞侵袭数、迁移率均高于 circFOXM1 敲低组,均低于 circFOXM1 过表达组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组 MKN-45 细胞侵袭数、迁移率均高于 circFOXM1 敲低组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。circFOXM1 敲低小鼠组 MKN-45 细胞增殖率低于对照小鼠组及 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂小鼠组,肿瘤体积及肿瘤质量均小于对照小鼠组及 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂小鼠组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。circFOXM1 过表达小鼠组 MKN-45 细胞增殖率高于对照小鼠组、肿瘤体积及肿瘤质量均大于对照小鼠组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。野生 miR-182-5p+circFOXM1 过表达组相对荧光素酶活性低于野生 miR-182-5p+空载组($P<0.05$)。野生 SMAD7+miR-182-5p mimic 组相对荧光素酶活性低于野生 SMAD7+miR-182-5p mimic 阴性对照组($P<0.05$)。**结论** 敲低 circFOXM1 可经上调 miR-182-5p 而抑制表达 SMAD7,从而抑制胃癌细胞增殖、侵袭、迁移及其体内肿瘤生长,可作为胃癌的新型标

^{*} 基金项目:2021 年江苏省如皋市指导性科技攻关计划项目(RG2021SZD005)。
作者简介:朱沙沙,女,主管技师,主要从事肿瘤检验方向的研究。 [△] 通信作者,E-mail:sksmw89@163.com。

志物。

关键词:环状叉头框蛋白 M1; 微小 RNA-182-5p; 母亲信号蛋白同源物 7; 胃癌; 机制

中图法分类号:R735.2;R446.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2024)11-1586-09

Study on the mechanism of circFOXM1 as a new gastric cancer marker regulating the occurrence and development of gastric cancer*

ZHU Shasha, MA Xiaohong[△], CHENG Lili, XIE Yichen

Department of Clinical Laboratory, Rugao People's Hospital, Rugao, Jiangsu 226500, China

Abstract: Objective To analyze the regulatory role of a new gastric cancer marker circular forkhead box M1 (circFOXM1) in the occurrence and development of gastric cancer. **Methods** Sixty patients with gastric cancer admitted to the Oncology Department of the hospital from January 2022 to April 2023 were selected as the research objects. The expression level of circFOXM1 in gastric cancer tissues and adjacent tissues was detected. Sixty patients were divided into circFOXM1 high expression group and circFOXM1 low expression group. The clinicopathological data (lymph node metastasis, depth of tumor invasion and clinical stage) of circFOXM1 high expression group and circFOXM1 low expression group were compared. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) and Western blot were used to detect circFOXM1 message RNA (mRNA) and microRNA (miR)-182-5p and maternal signaling protein homolog 7 (SMAD7) mRNA and SMAD7 protein expression levels in GES-1, HGC-27, BGC-823, MKN-45 and MKN-1 cells were cultured in vitro. They were randomly divided into control group, circFOXM1 knockdown group [transfected with circFOXM1 small interfering RNA (siRNA) plasmid], circFOXM1 overexpression group (transfected with circFOXM1 overexpression plasmid) and co-transfected negative control group (transfected with empty plasmid and miR-182-5p inhibitor negative control), circFOXM1 knockdown + miR-182-5p inhibitor group (transfected with circFOXM1 siRNA plasmid and miR-182-5p inhibitor). After group transfection, real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression levels of circFOXM1 mRNA, miR-182-5p mRNA, SMAD7 mRNA and SMAD7 protein in MKN-45 cells of each group. Transwell invasion and cell scratch test were used to detect the invasion and migration of MKN-45 cells in each group. The proliferation of MKN-45 cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Fifty nude mice were randomly divided into control mice group, circFOXM1 knockdown mice group, circFOXM1 overexpression mice group, co-transfection negative control mice group and circFOXM1 knockdown + miR-182-5p inhibitor mice group, with 10 mice in each group. MKN-45 cells of each group were inoculated subcutaneously into the back of the corresponding nude mice near the right axillary to construct a gastric cancer xenograft model. After 4 weeks of feeding, the proliferation rate of MNK-45 cells, tumor volume and tumor weight of nude mice with transplanted tumors in each group were detected. According to different transfection methods, MNK-45 cells were divided into wild miR-182-5p + empty vector group, wild miR-182-5p + circFOXM1 overexpression group, mutant miR-182-5p + empty vector group, mutant miR-182-5p + circFOXM1 overexpression group, wild SMAD7 + miR-182-5p mimic negative control group, wild SMAD7 + miR-182-5p mimic group, mutant SMAD7 + miR-182-5p mimic negative control group and mutant SMAD7 + miR-182-5p mimic group, and mutant SMAD7 + miR-182-5p mimic group. Luciferase reporter assay was used to detect the targeted regulation of circFOXM1 on miR-182-5p and SMAD7 in MKN-45 cells of each group. **Results** There were 17 patients in the low circFOXM1 expression group and 43 patients in the high circFOXM1 expression group. There were significant differences in lymph node metastasis, depth of tumor invasion and clinical stage between circFOXM1 low expression group and circFOXM1 high expression group ($P < 0.05$). The expression levels of circFOXM1 mRNA, SMAD7 mRNA and SMAD7 protein in MKN-45, HGC-27, BGC-823 and MKN-1 cells were higher than those in GES-1 cells, and the expression level of miR-182-5p mRNA in MKN-45, HGC-27, BGC-823 and MKN-1 cells were lower than that in GES-1 cells, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of circFOXM1 mRNA in the control group was lower than that in the circFOXM1 overexpression group and higher than that in the circFOXM1 knockdown group and circFOXM1 knockdown + miR-182-5p inhibitor group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of miR-182-5p mRNA in the control group was higher than that in the circFOXM1 overex-

pression group and lower than that in the circFOXM1 knockdown group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of SMAD7 mRNA and SMAD7 protein in the control group were lower than those in the circFOXM1 overexpression group and higher than those in the circFOXM1 knockdown group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of miR-182-5p mRNA in circFOXM1 knockdown group was higher than that in circFOXM1 knockdown + miR-182-5p inhibitor group ($P < 0.05$). The expression levels of SMAD7 mRNA and SMAD7 protein in circFOXM1 knockdown group were lower than those of circFOXM1 knockdown + miR-182-5p inhibitor group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The invasion number and migration rate of MKN-45 cells in the control group were higher than those in the circFOXM1 knockdown group and lower than those in the circFOXM1 overexpression group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The invasion number and migration rate of MKN-45 cells in circFOXM1 knockdown + miR-182-5p inhibitor group were higher than those in circFOXM1 knockdown group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The proliferation rate of MKN-45 cells in circFOXM1 knockdown mice group was lower than that in control mice group and circFOXM1 knockdown + miR-182-5p inhibitor mice group, and the tumor volume and weight in circFOXM1 knockdown mice group were smaller than those in control mice group and circFOXM1 knockdown + miR-182-5p inhibitor mice group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The proliferation rate of MKN-45 cells in the circFOXM1 overexpression mice group was higher than that in the control mice group, and the tumor volume and tumor weight in the circFOXM1 overexpression mice group were larger than those in the control mice group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The relative luciferase activity of wild miR-182-5p + circFOXM1 overexpression group was lower than that of wild miR-182-5p + empty vector group ($P < 0.05$). The relative luciferase activity in wild SMAD7 + miR-182-5p mimic group was lower than that in wild SMAD7 + miR-182-5p mimic negative control group ($P < 0.05$).

Conclusion Knockdown of circFOXM1 can up-regulate the expression of miR-182-5p and inhibit the expression of SMAD7, thereby inhibiting the proliferation, invasion, migration and tumor growth of gastric cancer cells in vivo, which can be used as a new marker of gastric cancer.

Key words: circular forkhead box M1; microrna-182-5p; maternal signaling protein homolog 7; gastric cancer; mechanism

胃癌是全球范围内最常见的消化道恶性肿瘤之一,每年有超过百万的胃癌新发病例,早期胃癌患者通过手术切除后辅助放化疗等手段的疗效较为理想,但因其早期症状较为隐匿,临床中大多胃癌患者被诊断时已进入晚期,病死率一直保持较高水平^[1-2]。胃癌的发生属于多阶段、缓慢进行的病理过程,多种 RNA、蛋白分子介入其中,环状叉头框蛋白 M1(circ-FOXM1)作为一种新型的环状 RNA,在包括胃癌在内的多种人类肿瘤中呈高表达,起到明显致癌作用,敲低 circFOXM1 能抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和上皮间充质转化过程,并诱导其凋亡^[3],还能减弱鼻咽癌和胶质瘤细胞的增殖与侵袭能力,延缓胶质瘤的生长及恶性进展^[4-5],相关分子机制研究显示, circ-FOXM1 是通过吸收下调微小 RNA(miR)-320a、miR-320b、miR-432 表达,从而激活下游致癌信号来促使癌症发生、发展。查询 Starbase 数据库并进行分子信息学分析可预知, circFOXM1 可能通过靶向下调 miR-182-5p 表达,从而增强母亲信号蛋白同源物 7(SMAD7)表达,而 miR-182-5p 在胃癌患者体内表达下调,并与其肿瘤病理分化程度、远处转移、临床分期有关^[6]。过表达 miR-182-5p 可抑制透明细胞肾细胞

癌细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导其细胞周期阻滞和细胞凋亡^[7]; SMAD7 在胃癌患者体内表达显著上调,可参与其病情发展和预后^[8],下调 SMAD7 可减弱结肠癌细胞活力和增殖活性,促使其凋亡,并抑制其在裸鼠体内生长^[9]。另外有研究表明, miR-182-5p 可靶向下调 SMAD7 的表达^[10],因此推测 circFOXM1 可能通过 miR-182-5p 调控 SMAD7 而介导胃癌的发生、发展过程。本研究基于 miR-182-5p/SMAD7 轴,探讨 circFOXM1 作为新型胃癌标志物调控胃癌发生、发展的机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 选取 2022 年 1 月至 2023 年 4 月本院肿瘤科收治的 60 例胃癌患者作为研究对象。其中,淋巴结转移: N0 12 例, N1~N3 共 48 例;肿瘤侵袭深度: T1 或 T2 共 9 例, T3 或 T4 共 51 例;临床分期: I~II 期共 18 例, III~IV 期共 42 例。本研究通过本院医学伦理委员会审批(KY20210424),且所有患者及家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 数码生物显微镜购自深圳深视光谷光学仪器有限公司,型号为 SGO-PH201;酶联免疫分析仪购自希森美康有限公司,型号为 HISCL5000;

实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪购自上海罗氏诊断产品有限公司,型号为 CobasZ480;双垂直电泳槽(型号:CC-SC)、电泳仪电源(型号:DYY-11B)、转印电泳槽(型号:VE-186)均购自南京普阳科学仪器研究所。BGC-823 细胞(货号:E0277)、MKN-1 细胞(货号:E0351)均购自上海昂科生物技术有限公司;人胃癌细胞株 HGC-27 细胞(货号:CL-0107)、MKN-45 细胞(货号:CL-0292)、GES-1 细胞(货号:CL-0563)、RPMI-1640 培养基(货号:PM150110)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;总 RNA 提取试剂 Trizol(货号:B511311-0100)、快速姬姆萨染色试剂盒(货号:E607314-0001)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)细胞增殖检测试剂盒(货号:E606334-0500)、一步法反转录荧光定量试剂盒(货号:B639277-0100)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(货号:E608001-0100)、脂质体高效转染试剂(货号:E607403)、circFOXm1 小干扰 RNA (siRNA)质粒、circFOXm1 过表达质粒、miR-182-5p 抑制剂、miR-182-5p 抑制剂阴性对照均购自上海生工生物工程股份有限公司;兔源抗人 SMAD7 抗体(货号:ab216428)、兔源抗人 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号:ab8226)、偶联 HRP 的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG)二抗(货号:ab205718)均购自美国 Abcam 公司。

1.3 方法

1.3.1 检测胃癌组织及其配对癌旁组织中的 circFOXm1 表达水平 收集所有患者胃癌组织样本及癌旁组织样本,各剪下 0.4 g 样本,剪碎后加入适量 Trizol 试剂混合研磨,并按照其试剂说明书中的提取步骤提取、纯化总 RNA。采用实时荧光定量 PCR 试剂盒进行 PCR,得出每例患者胃癌组织及癌旁组织中 circFOXm1 的 Ct 值,并以兔源抗人 β -actin 抗体作为内参对照,计算出 circFOXm1 表达水平,公式为:circFOXm1=2-(胃癌组织 circFOXm1 的 Ct-胃癌组织 β -actin 的 Ct)-(癌旁组织 circFOXm1 的 Ct-癌旁组织 β -actin 的 Ct)。当 circFOXm1 表达水平>1 时,表明 circFOXm1 在胃癌组织中呈高表达,纳入 circFOXm1 高表达组;当 circFOXm1 表达水平 $\leq$ 1 时,表明 circFOXm1 在胃癌组织中呈低表达,纳入 circFOXm1 低表达组。

1.3.2 检测不同细胞中 circFOXm1、miR-182-5p 及 SMAD7 的表达水平 采用实时荧光定量 PCR 检测 GES-1、HGC-27、BGC-823、MKN-45、MKN-1 细胞中 circFOXm1 信使 RNA(mRNA)、miR-182-5p mRNA 及 SMAD7 mRNA 表达水平。免疫印迹法检测 GES-1、HGC-27、BGC-823、MKN-45、MKN-1 细胞中 SMAD7、 β -actin 蛋白表达水平。(1)细胞培养:以 39.5℃温水处理快速解冻复苏 GES-1、HGC-27、BGC-823、MKN-45、MKN-1 细胞,以 RPMI-1640 培养基(混有 1%青链霉素和 10%胎牛血清)进行培养,待

80%的细胞完成融合后传代。(2)实时荧光定量 PCR:收集传代的 GES-1、HGC-27、BGC-823、MKN-45、MKN-1 细胞,以 Trizol 试剂提取总 RNA,采用实时荧光定量 PCR 检测 circFOXm1、miR-182-5p 及 SMAD7 的表达水平。(circFOXm1 及 SMAD7 选用 β -actin 作为内参对照,miR-182-5p 选用 U6 作为内参对照)。circFOXm1 正向引物序列为 5'-CA-GAAACGGGAGACCTGTGG-3',反向引物序列为 5'-CGACGGGGGCTAGTTTTTCAT-3'; β -actin 正向引物序列为 5'-CTCGCCTTTGCCGATCC-3',反向引物序列为 5'-GGGGTACTTCAGGGTGAGGA-3';miR-182-5p 正向引物序列为 5'-TTTGGCAATGG-TAGAACTCACACT-3',反向引物序列为 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3';U6 正向引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物序列为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';SMAD7 正向引物序列为 5'-CCTGCCATTG-TAGCGTCTTTC-3',反向引物序列为 5'-CCCTT-GGGAAGCCCATCT-3'。(3)免疫印迹法:收集传代的 GES-1、HGC-27、BGC-823、MKN-45、MKN-1 细胞,于冰水浴中以放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解液对各细胞的总蛋白进行裂解提取,以二喹啉甲酸法分别测定蛋白水平,然后将其置于沸水浴(100℃)中进行变性处理,在每种细胞中均取出 15 μ g 总蛋白进行电泳分离,然后以电转移将其转至硝酸纤维素膜上,以脱脂牛奶封闭后裁下 SMAD7 蛋白、 β -actin 蛋白进行抗原抗体反应,显色完成后摄取蛋白图像。采用 Image J1.8.0 软件分析其表达水平。

1.3.3 MKN-45 细胞分组处理并样本收集 将传代后的 MKN-45 细胞接种于 24 孔板(1×10^5 /孔)中,培养 24 h,再将其随机分为对照组、circFOXm1 敲低组、circFOXm1 过表达组、共转染阴性对照组、circFOXm1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组,接着采用脂质体高效转染试剂(具体转染步骤参照其说明书中方法操作)对除对照组以外的其余各组做分组转染。circFOXm1 敲低组细胞转染 circFOXm1 siRNA 质粒, circFOXm1 过表达组细胞转染 circFOXm1 过表达质粒,共转染阴性对照组细胞联合转染空载质粒和 miR-182-5p 抑制剂阴性对照(miR-182-5p 抑制剂的乱序序列),circFOXm1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组细胞联合转染 circFOXm1 siRNA 质粒和 miR-182-5p 抑制剂,均转染 24 h,并收集各组细胞保存于液氮中备用。

1.3.4 检测各组 MKN-45 细胞 miR-182-5p、circFOXm1 及 SMAD7 表达水平 收集 1.3.3 中各组中的 MKN-45 细胞,以 RIPA 裂解液、Trizol 试剂分别提取其总蛋白、总 RNA 后,采用实时荧光定量 PCR 及免疫印迹法检测各组 MKN-45 细胞 circFOXm1、miR-182-5p 及 SMAD7 表达水平。

1.3.5 检测各组 MKN-45 细胞侵袭、迁移情况 采用 Transwell 侵袭、细胞划痕试验检测各组 MKN-45 细胞侵袭、迁移率。Transwell 侵袭试验:将 1.3.3 中各组中的细胞沉淀后,采用磷酸缓冲盐溶液(PBS)进行洗涤,以 RPMI-1640 培养基(无胎牛血清)重悬、计数,各组分别取约 2.5×10^5 个细胞接种于 24 孔 Transwell 板上室(提前进行基质胶包被),同时将适量 RPMI-1640 培养基(10% 胎牛血清)加入 Transwell 板下室中对细胞进行培养,24 h 后对下室细胞进行洗涤、固定处理,采用快速姬姆萨染色试剂盒染色并洗涤,完成后采用生物显微镜摄取各组细胞图像。采用 Image J1.8.0 软件对图像中的细胞数进行定量处理,各组细胞侵袭数即为该细胞数目。细胞划痕试验:将 1.3.3 中各组细胞转染 24 h 后,在培养孔中央位置以枪头划出一条直线,然后将划痕中细胞弃去,在生物显微镜下摄取各组细胞图像,采用 Image J1.8.0 软件对划痕面积 V1 进行定量,培养细胞 24 h,再次摄取各组细胞图像,并对划痕面积 V2 进行定量。各组细胞迁移率 $= (V1 - V2) / V1 \times 100\%$ 。

1.3.6 检测各组 MKN-45 细胞增殖情况 采用 MTT 法检测各组 MKN-45 细胞增殖情况。MTT 法:将 1.3.3 中各组细胞转染 24 h 后,采用 MTT 细胞增殖检测试剂盒检测各组细胞活力,具体试验步骤按照试剂盒说明书进行操作。每组 6 个重复孔,并选取 6 个培养孔不接种细胞设定为空白对照组。细胞活力 $= (\text{各组细胞吸光度} - \text{空白对照组吸光度}) / (\text{对照组细胞吸光度} - \text{空白对照组吸光度}) \times 100\%$ 。

1.3.7 构建胃癌移植瘤裸鼠模型后检测其肿瘤体积及质量 取 50 只裸鼠随机分为对照小鼠组、circ-FOX M1 敲低小鼠组、circFOX M1 过表达小鼠组、共转染阴性对照小鼠组、circFOX M1 敲低+miR-182-5p 抑制剂小鼠组,每组 10 只,然后参考文献[11]中相关内容进行胃癌移植瘤裸鼠模型构建:取 1.3.3 中已进行转染的各组 MKN-45 细胞,进行 PBS 洗涤并计数,然后制备各组细胞悬浮液($5\times 10^6/\text{mL}$),将相应的 100 μL MKN-45 细胞悬液注射于各组裸鼠右腋背部皮下,1 周后观察接种部位皮下是否出现黄豆大小的硬质结节,若出现,即说明已成功构建胃癌移植瘤模型,裸鼠继续饲养 4 周,然后以颈椎脱臼方式将其处

死,将其右腋周围背部皮肤剪开,并对肿瘤组织块进行剥离,测量其短径(W)、长径(L)及质量,并按照下述公式获取裸鼠肿瘤体积。裸鼠肿瘤体积 $= (L \times W^2) / 2$ 。

1.3.8 检测 MKN-45 细胞中 circFOX M1 对 miR-182-5p、SMAD7 的靶向调控 将传代后的 MKN-45 细胞接种于 24 孔板($1\times 10^5/\text{孔}$)中,培养 24 h,再将其随机分为野生 miR-182-5p+空载组(进行野生型 miR-182-5p、空载质粒转染)、野生 miR-182-5p+circ-FOX M1 过表达组(进行野生型 miR-182-5p、circ-FOX M1 过表达质粒转染)、突变 miR-182-5p+空载组(进行突变型 miR-182-5p 及空载质粒转染)、突变 miR-182-5p+circFOX M1 过表达组(进行突变型 miR-182-5p、circFOX M1 过表达质粒转染)、野生 SMAD7+miR-182-5p mimic 阴性对照组(进行野生型 SMAD7 3'-UTR 报告质粒、miR-182-5p mimic 阴性对照转染)、野生 SMAD7+miR-182-5p mimic 组(进行野生型 SMAD7 3'-UTR 报告质粒、miR-182-5p mimic 转染)、突变 SMAD7+miR-182-5p mimic 阴性对照组(进行突变型 SMAD7 3'-UTR 报告质粒、miR-182-5p mimic 阴性对照转染)、突变 SMAD7+miR-182-5p mimic 组(进行突变型 SMAD7 3'-UTR 报告质粒、miR-182-5p mimic 转染),各组采用脂质体高效转染试剂进行 24 h 转染,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组细胞相对荧光素酶活性,具体操作按照说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件分析数据。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 circFOX M1 低表达组和 circFOX M1 高表达组病理资料比较 circFOX M1 低表达组有 17 例患者, circFOX M1 高表达组有 43 例患者。circFOX M1 低表达组和 circFOX M1 高表达组患者淋巴结转移、侵袭深度和临床分期情况比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 circFOX M1 低表达组和 circFOX M1 高表达组病理资料比较[n(%)]

组别	n	淋巴结转移		侵袭深度		临床分期	
		N0	N1~N3	T1 或 T2	T3 或 T4	I~II 期	III~IV 期
circFOX M1 高表达组	43	5(11.63)	38(88.37)	3(6.98)	40(93.02)	8(18.60)	35(81.40)
circFOX M1 低表达组	17	7(41.18)	10(58.82)	6(35.29)	11(64.71)	10(58.82)	7(41.18)
χ^2		4.930		5.602		9.384	
P		0.026		0.018		0.002	

2.2 各细胞 circFOXM1 mRNA、miR-182-5p mRNA、SMAD7 mRNA 及 SMAD7 蛋白表达水平比较 MKN-45、HGC-27、BGC-823、MKN-1 细胞中 circFOXM1 mRNA、SMAD7 mRNA 及 SMAD7 蛋白表达水平均高于 GES-1 细胞,miR-182-5p mRNA 表达水平均低于 GES-1 细胞,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1、表 2。

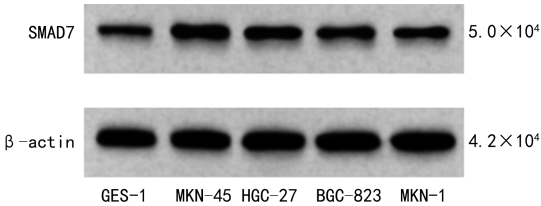


图 1 各细胞中 SMAD7、β-actin 蛋白表达

表 2 各细胞 circFOXM1 mRNA、miR-182-5p mRNA、SMAD7 mRNA 及 SMAD7 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

细胞类型	circFOXM1 mRNA	miR-182-5p mRNA	SMAD7 mRNA	SMAD7 蛋白
GES-1 细胞	0.99±0.10	1.04±0.22	0.96±0.23	0.28±0.04
MKN-45 细胞	2.41±0.32 ^a	0.30±0.05 ^a	2.39±0.21 ^a	0.81±0.09 ^a
HGC-27 细胞	2.23±0.17 ^a	0.41±0.07 ^a	2.25±0.16 ^a	0.70±0.08 ^a
BGC-823 细胞	2.12±0.20 ^a	0.49±0.06 ^a	2.14±0.15 ^a	0.59±0.06 ^a
MKN-1 细胞	1.98±0.14 ^a	0.54±0.08 ^a	2.00±0.12 ^a	0.55±0.05 ^a
F	46.340	37.131	61.242	53.422
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 GES-1 细胞比较,^a $P<0.05$ 。

2.3 不同分组 MKN-45 细胞 circFOXM1 mRNA、miR-182-5p mRNA、SMAD7 mRNA 及 SMAD7 蛋白表达水平比较 对照组 circFOXM1 mRNA 表达水平低于 circFOXM1 过表达组,高于 circFOXM1 敲低组和 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组,差异均有统计学意义($P<0.05$);对照组 miR-182-5p mRNA 表达水平高于 circFOXM1 过表达组,低于 circFOXM1 敲低组,差异均有统计学意义($P<0.05$);对照组 SMAD7 mRNA 及 SMAD7 蛋白表达水平均低于 circFOXM1 过表达组,高于 circFOXM1 敲低组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。circFOXM1 敲低组 miR-182-5p mRNA 表达水平高于 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组,SMAD7 mRNA 及

SMAD7 蛋白表达水平均低于 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 2、表 3。

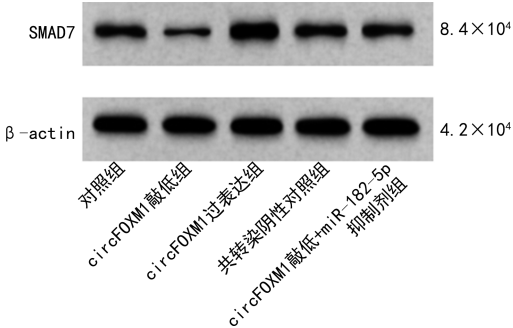


图 2 不同分组 MKN-45 细胞 SMAD7、β-actin 蛋白表达

表 3 不同分组 MKN-45 细胞 circFOXM1 mRNA、miR-182-5p mRNA、SMAD7 mRNA 及 SMAD7 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

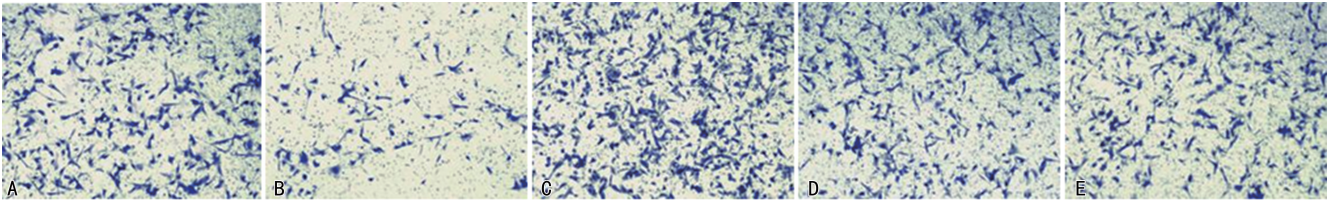
组别	circFOXM1 mRNA	miR-182-5p mRNA	SMAD7 mRNA	SMAD7 蛋白
对照组	0.98±0.18	1.00±0.15	0.97±0.23	0.78±0.07
circFOXM1 敲低组	0.31±0.04 ^a	2.18±0.17 ^a	0.37±0.04 ^a	0.19±0.03 ^a
circFOXM1 过表达组	2.20±0.19 ^a	0.36±0.06 ^a	2.13±0.21 ^a	1.37±0.23 ^a
共转染阴性对照组	1.00±0.16	1.01±0.18	0.95±0.28	0.77±0.12
circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组	0.34±0.07 ^a	1.05±0.20 ^b	0.93±0.19 ^b	0.74±0.11 ^b
F	174.922	102.000	58.340	61.393
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 circFOXM1 敲低组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 不同分组 MKN-45 细胞侵袭及迁移情况比较 对照组 MKN-45 细胞侵袭数、迁移率均高于 circFOXM1 敲低组,均低于 circFOXM1 过表达组,差异

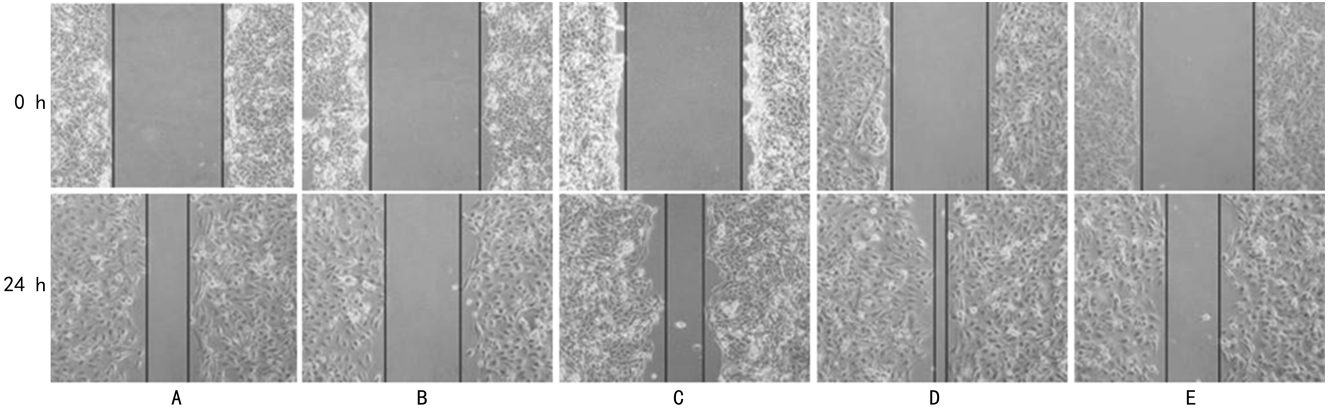
均有统计学意义($P<0.05$)。circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组 MKN-45 细胞侵袭数、迁移率均高于 circFOXM1 敲低组,差异均有统计学意义

($P<0.05$)。见图 3、4、表 4。



注:A 为对照组;B 为 circFOXM1 敲低组;C 为 circFOXM1 过表达组;D 为共转染阴性对照组;E 为 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组。

图 3 不同分组 MKN-45 细胞侵袭情况(×200)



注:0 h 为刚划痕时观察划痕情况;24 h 为细胞划痕后继续培养 24 h 再观察划痕愈合情况;A 为对照组;B 为 circFOXM1 敲低组;C 为 circFOXM1 过表达组;D 为共转染阴性对照组;E 为 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组。

图 4 不同分组 MKN-45 细胞迁移情况(×200)

表 4 不同分组 MKN-45 细胞侵袭数、 迁移率比较($\bar{x}\pm s$)		
组别	侵袭数(个)	迁移率(%)
对照组	315.25±40.25	70.54±8.32
circFOXM1 敲低组	89.15±12.85 ^a	21.68±4.01 ^a
circFOXM1 过表达组	512.05±52.10 ^a	94.25±11.05 ^a
共转染阴性对照组	308.40±48.20	71.96±9.04
circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂组	296.20±45.50 ^b	63.64±7.90 ^b
F	75.570	59.981
P	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 circFOXM1 敲低组比较,^b $P<0.05$ 。

2.5 不同分组 MKN-45 细胞增殖率、移植瘤裸鼠肿瘤体积及肿瘤质量比较 circFOXM1 敲低小鼠组 MKN-45 细胞增殖率低于对照小鼠组及 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂小鼠组,肿瘤体积及肿瘤质量均小于对照小鼠组及 circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂小鼠组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。circFOXM1 过表达小鼠组 MKN-45 细胞增殖率高于对照小鼠组、肿瘤体积及肿瘤质量均大于对照小鼠

组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 5。

2.6 不同分组细胞相对荧光素酶活性比较 野生 miR-182-5p+空载组(1.01 ± 0.21)、野生 miR-182-5p+circFOXM1 过表达组(0.31 ± 0.06)、突变 miR-182-5p+空载组(1.00 ± 0.22)、突变 miR-182-5p+circFOXM1 过表达组(0.99 ± 0.20)相对荧光素酶活性比较,差异有统计学意义($F=21.001, P<0.001$)。野生 miR-182-5p+circFOXM1 过表达组相对荧光素酶活性低于野生 miR-182-5p+空载组,差异有统计学意义($t=7.290, P<0.05$)。野生 SMAD7+miR-182-5p mimic 阴性对照组(0.98 ± 0.14)、野生 SMAD7+miR-182-5p mimic 组(0.32 ± 0.05)、突变 SMAD7+miR-182-5p mimic 阴性对照组(1.02 ± 0.20)、突变 SMAD7+miR-182-5p mimic 组(1.04 ± 0.26)相对荧光素酶活性比较,差异有统计学意义($F=22.351, P<0.001$)。野生 SMAD7+miR-182-5p mimic 组相对荧光素酶活性低于野生 SMAD7+miR-182-5p mimic 阴性对照组,差异有统计学意义($t=10.875, P<0.05$)。

表 5 不同分组 MKN-45 细胞增殖率、移植瘤裸鼠肿瘤体积及肿瘤质量比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	n	MKN-45 细胞增殖率(%)	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤质量(g)
对照小鼠组	10	100.00±0.00	604.46±70.53	1.06±0.10
circFOXM1 敲低小鼠组	10	42.25±6.54 ^a	97.58±20.45 ^a	0.32±0.03 ^a
circFOXM1 过表达小鼠组	10	178.54±32.42 ^a	972.22±121.32 ^a	1.58±0.13 ^a
共转染阴性对照小鼠组	10	96.73±12.36	615.73±81.50	1.04±0.15

续表 5 不同分组 MKN-45 细胞增殖率、移植瘤裸鼠肿瘤体积及肿瘤质量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	MKN-45 细胞增殖率(%)	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤质量(g)
circFOXM1 敲低+miR-182-5p 抑制剂小鼠组	10	93.01±16.20 ^b	573.84±76.25 ^b	0.97±0.18 ^b
<i>F</i>		47.441	89.400	72.983
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照小鼠组比较,^a*P*<0.05;与 circFOXM1 敲低小鼠组比较,^b*P*<0.05。

3 讨 论

胃癌的临床治疗主要选择手术切除,同时采用放射线照射、化疗、分子靶向药物等辅助治疗手段,越早治疗,疗效越好,但受限于诊断技术的落后,临床大多数患者为中晚期,治疗效果并不理想,因而需要寻找更高效的诊疗策略^[12-13]。circFOXM1 作为调控肿瘤发生及发展的关键调节因子,其表达下调可抑制胶质母细胞瘤增殖、迁移、侵袭及体内肿瘤生长^[14],并阻断细胞周期,抑制前列腺癌及肝细胞癌等恶性肿瘤增殖、迁移及侵袭,发挥显著的抗肿瘤功效^[15-16]。本研究结果显示,MKN-45、HGC-27、BGC-823、MKN-1 细胞中 circFOXM1 mRNA、SMAD7 mRNA、SMAD7 蛋白表达水平均高于 GES-1 细胞,miR-182-5p mRNA 表达水平均低于 GES-1 细胞,差异均有统计学意义(*P*<0.05);circFOXM1 低表达组和 circFOXM1 高表达组患者淋巴结转移、侵袭深度和临床分期情况比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。提示相比癌旁组织和 GES-1 细胞,circFOXM1 在胃癌组织及胃癌细胞系 HGC-27、BGC-823、MKN-45、MKN-1 中的表达水平升高,并与胃癌患者淋巴结转移、侵袭深度和临床分期相关,表明 circFOXM1 参与介导胃癌发生、发展过程,可作为潜在的新型胃癌标志物。本研究结果显示,circFOXM1 敲低组 MKN-45 细胞侵袭数、迁移率、circFOXM mRNA 表达水平均低于对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.05);circFOXM1 敲低小鼠组 MKN-45 细胞增殖率低于对照小鼠组,肿瘤体积及肿瘤质量均小于对照小鼠组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。提示以 circFOXM1 siRNA 质粒转染 MKN-45 细胞,可降低细胞 circFOXM1 表达水平、侵袭数、迁移率、细胞增殖率、移植瘤裸鼠肿瘤体积及肿瘤质量,circFOXM1 过表达质粒的作用与之相反,表明 circFOXM1 可诱导胃癌细胞增殖、迁移和侵袭,敲低其表达可显著抑制胃癌细胞上述生物学行为,最终对胃癌发挥明显抗癌作用。

miR-182-5p 作为一种抗肿瘤因子,在胃癌患者体内呈低表达,并参与其病情进展过程^[6],miR-182-5p 表达上调可降低胃癌细胞活力,增加凋亡,减弱其对顺铂的耐药性^[17],还可提高肝癌细胞对索拉非尼的细胞毒性并抑制其上皮间充质转化^[18];SMAD7 作为一种致癌基因,可调控细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡信号,参与介导肿瘤的发生、发展过程^[19],其在胃癌患者体内呈高表达,并与其临床分期相关^[8],敲除 SMAD7 可对结直肠癌细胞发挥增殖和抗凋亡作用^[20]。荧光

素酶报告试验结果显示,野生 miR-182-5p + circ-FOXM1 过表达组相对荧光素酶活性低于野生 miR-182-5p + 空载组(*P*<0.05)。野生 SMAD7 + miR-182-5p mimic 组相对荧光素酶活性低于野生 SMAD7 + miR-182-5p mimic 阴性对照组(*P*<0.05)。提示 MKN-45 细胞中 circFOXM1 对 miR-182-5p 靶向下调,miR-182-5p 对 SMAD7 靶向下调,表明 circFOXM1 通过调控 miR-182-5p/SMAD7 轴而介导胃癌的发生、发展过程,miR-182-5p/SMAD7 轴参与敲低 circFOXM1 对胃癌增殖、迁移和侵袭的抑制过程。本研究结果显示,circFOXM1 敲低 + miR-182-5p 抑制剂组 SMAD7 mRNA 及 SMAD7 蛋白表达水平、MKN-45 细胞侵袭数、迁移率均高于 circFOXM1 敲低组,miR-182-5p mRNA 表达水平均低于 circFOXM1 敲低组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。circFOXM1 敲低 + miR-182-5p 抑制剂小鼠组 MKN-45 细胞增殖率高于 circFOXM1 敲低小鼠组,移植瘤裸鼠肿瘤体积及肿瘤质量大于 circFOXM1 敲低小鼠组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。提示与 circFOXM1 siRNA 质粒单独转染 MKN-45 细胞相比较,circFOXM1 siRNA 质粒联合 miR-182-5p 抑制剂转染可升高 SMAD7 蛋白与 SMAD7 mRNA 表达水平、MKN-45 细胞增殖率、侵袭数、迁移率、移植瘤裸鼠肿瘤体积及质量,降低 miR-182-5p mRNA 表达水平,提示抑制 miR-182-5p 表达逆转了敲低 circFOXM1 对胃癌细胞增殖、侵袭、转移和裸鼠体内生长的抑制作用,最终逆转其对胃癌细胞的抗癌功效,揭示敲低 circFOXM1 抑制胃癌发生、发展是通过上调 miR-182-5p 实现的。

综上所述,circFOXM1 在胃癌组织及细胞中高表达,与淋巴结转移、肿瘤侵袭深度和临床分期相关,能通过 miR-182-5p 上调 SMAD7 表达,从而促使胃癌细胞生长及恶性进展,可作为潜在的新型胃癌标志物。敲低 circFOXM1 可通过 miR-182-5p 上调而减少表达 SMAD7,在抑制胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的同时降低其于裸鼠体内生长的活性,最终对胃癌起到显著抗癌功效,本文为胃癌的临床诊断和治疗提供了新型作用靶点,有助于其诊疗技术的改进。

参考文献

[1] AJANI J A,D'AMICO T A,BENTREM D J,et al. Gastric cancer,version 2.2022,NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw,2022,20

(2):167-192.

[2] YEOH K G, TAN P. Mapping the genomic diaspora of gastric cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(2):71-84.

[3] ZHANG H, ZHOU Q Q, SHEN W M. Circ-FOXM1 promotes the proliferation, migration and EMT process of osteosarcoma cells through FOXM1-mediated Wnt pathway activation[J]. *J Orthop Surg Res*, 2022, 17(1):344.

[4] PEI S, MA C X, CHEN J, et al. CircFOXM1 acts as a ceRNA to upregulate SMAD2 and promote the progression of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2022, 10(5):e1914.

[5] GONG Y, ZHANG S, WANG H X, et al. The involvement of the circFOXM1-miR-432-Gα12 axis in glioma cell proliferation and aggressiveness[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1):9.

[6] SOLIMAN S E, ELABD N S, EL-KOUSY S M, et al. Down regulation of miR-30a-5p and miR-182-5p in gastric cancer: clinical impact and survival analysis[J]. *Biochem Biophys Rep*, 2021, 27:101079.

[7] WU Y C, ZHANG C J, PENG D, et al. MiR-182-5p inhibits the tumorigenesis of clear cell renal cell carcinoma by repressing UBE2T[J]. *Hum Cell*, 2022, 35(2):542-556.

[8] HUSSEIN N A, RASHAD M M, ABDOU A S, et al. Gene profiling of SEC13, SMAD7, GHRL, long non-coding RNA GHRLOS, HIF-1α in gastric cancer patients [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):6555.

[9] SU J W, CHEN D, RUAN Y, et al. LncRNA MBNL1-AS1 represses gastric cancer progression via the TGF-β pathway by modulating miR-424-5p/SMAD7 axis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3):6978-6995.

[10] CHEN Y, ZHANG Q, ZHOU Y, et al. Inhibition of miR-182-5p attenuates pulmonary fibrosis via TGF-β/SMAD pathway[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2020, 39(5):683-695.

[11] 高慎硕, 张智凯, 尹国庆, 等. miR-875-5p 通过靶向 USF2 抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(1):23-29.

[12] KOLE C, CHARALAMPAKIS N, TSAKATIKAS S, et

al. Immunotherapy for gastric cancer: a 2021 update[J]. *Immunotherapy*, 2022, 14(1):41-64.

[13] LI G Z, DOHERTY G M, WANG J P. Surgical management of gastric cancer: a review[J]. *JAMA Surg*, 2022, 157(5):446-454.

[14] FAN X H, LIU M, FEI L, et al. CircFOXM1 promotes the proliferation, migration, invasion, and glutaminolysis of glioblastoma by regulating the miR-577/E2F5 axis[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2022, 22(2):205-216.

[15] WANG G, JIANG Y, LU C, et al. CircFOXM1 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma via regulating miR-1179/SPAG5 axis[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):23890-23898.

[16] LIU G X, ZHENG T, ZHANG Y, et al. CircFOXM1 silencing represses cell proliferation, migration and invasion by regulating miR-515-5p/Adam10 axis in prostate cancer[J]. *Anticancer Drugs*, 2022, 33(1):e573-e583.

[17] HUANG X X, ZHANG Q, HU H, et al. A novel circular RNA circFN1 enhances cisplatin resistance in gastric cancer via sponging miR-182-5p [J]. *J Cell Biochem*, 2020:1-12.

[18] CHEN B W, ZHOU Y, WEI T, et al. lncRNA-POIR promotes epithelial-mesenchymal transition and suppresses sorafenib sensitivity simultaneously in hepatocellular carcinoma by sponging miR-182-5p [J]. *J Cell Biochem*, 2021, 122(1):130-142.

[19] SADEGHIPOUR N, KUMAR S U, MASSOUD T F, et al. A rationally identified panel of microRNAs targets multiple oncogenic pathways to enhance chemotherapeutic effects in glioblastoma models[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):12017.

[20] MARESCA C, DI MAGGIO G, STOLFI C, et al. Smad7 sustains Stat3 expression and signaling in colon cancer cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(20):4993.

(收稿日期:2023-12-22 修回日期:2024-02-16)

(上接第 1585 页)

[14] XIANG X R, DIAO E J, SHANG Y T, et al. Rapid quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* via high-fidelity target-based microfluidic identification [J]. *Food Res Int*, 2022, 162(Pt A):112032.

[15] 俞露, 贺云蕾, 邓刚. 基于微流控芯片的实时荧光定量 PCR 技术快速检测血小板制剂细菌污染[J]. *临床检验杂志*, 2022, 40(7):495-497.

[16] HANNA S E, CONNOR C J, WANG H H. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations[J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(3):R49-R53.

[17] RODRÍGUEZ A, RODRÍGUEZ M, CÓRDOBA J J, et al. Design of primers and probes for quantitative real-time

PCR methods[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1275:31-56.

[18] LI K, BROWNLEY A. Primer design for RT-PCR[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 630:271-299.

[19] 徐媛媛, 于永翔, 王印庚, 等. 5 种主要海水养殖病原菌多重微流控荧光定量 PCR 快速检测技术的建立[J]. *渔业科学进展*, 2023, 44(3):222-234.

[20] 丁芳, 王国平, 易干军, 等. 不同引物对检测柑桔黄龙病菌灵敏度比较[J]. *植物保护学报*, 2007, 34(4):364-368.

[21] NOUWAIIRI R L, CUNHA L L, TURIELLO R, et al. Ultra-rapid real-time microfluidic RT-PCR instrument for nucleic acid analysis [J]. *Lab Chip*, 2022, 22(18):3424-3435.

(收稿日期:2023-11-06 修回日期:2024-03-05)