

ZNF267 在恶性黑色素瘤中的表达及其对细胞增殖、凋亡和周期的影响

金丹 周烈 刘启祥 吴明勇 全柳霞 叶夏潮 刘旭阳 肖修兰

摘要 目的 研究锌指蛋白 267(zinc finger 267, ZNF267)在恶性黑色素瘤组织及细胞中的表达,以及 ZNF267 对恶性黑色素瘤细胞增殖、凋亡和转移的影响。**方法** 应用荧光实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)方法检测恶性黑色素瘤组织及细胞中 ZNF267 的表达水平。沉默恶性黑色素瘤细胞中 ZNF267 的表达后,应用细胞增殖试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)检测 ZNF267 对恶性黑色素瘤细胞增殖的影响,应用流式细胞术检测 ZNF267 对恶性黑色素瘤细胞凋亡及周期的影响。**结果** ZNF267 在恶性黑色素瘤组织及细胞中表达水平显著高于癌旁组织及表皮黑素细胞。沉默恶性黑色素瘤细胞中 ZNF267 的表达后,细胞增殖受到明显抑制,凋亡细胞率显著升高,细胞周期被阻滞于 G₁ 期。**结论** ZNF267 在恶性黑色素瘤中表达显著升高并可促进恶性黑色素瘤细胞的增殖并抑制其凋亡。

关键词 ZNF267 恶性黑色素瘤 增殖 凋亡

中图分类号 R739.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.045

Expression of ZNF267 in Malignant Melanoma and Its Effects on Cell Proliferation, Apoptosis, and Cell Cycle. Jin Dan, Zhou Lie, Liu Qixiang, et al. Department of Oncology, Chongqing City State District People's Hospital, Chongqing 405400, China

Abstract Objective To investigate the expression of ZNF267 in malignant melanoma tissues and cells, and further investigate the effects of ZNF267 on cell proliferation, cell apoptosis, and cell cycle of malignant melanoma cells. **Methods** We detected the expression of ZNF267 in tissues and cells of malignant melanoma by qRT-PCR. After silencing the expression of ZNF267 in malignant melanoma cells, we detected the effects of ZNF267 on cell proliferation by CCK-8, we also detected the effects of ZNF267 on cell apoptosis and cell cycle by flow cytometry. **Results** The expression of ZNF267 was significantly higher in the tissues and cells of malignant melanoma than adjacent tissues and human melanocyte cells. After silencing the expression of ZNF267 in malignant melanoma cells, the cell proliferation was significantly inhibited, cell apoptosis was significantly promoted, and cell cycle was arrested as G₁ phase. **Conclusion** ZNF267 was upregulated in the tissues and cells of malignant melanoma, and could promote the cell proliferation and inhibit cell apoptosis of malignant melanoma.

Key words ZNF267; Malignant melanoma; Proliferation; Apoptosis

恶性黑色素瘤是一种常见的发生于皮肤的恶性肿瘤,其侵袭性强,致死率高,且发病具有明显的家族聚集趋势^[1]。在所有皮肤肿瘤致死的患者中,恶性黑色素瘤患者约占 80%^[2]。在美国恶性黑色素瘤的发生率呈逐年上升趋势,每年约增长 3.1%^[3]。外科手术根治性切除是局灶性恶性黑色素瘤的有效的治疗手段,但是就诊时已发生局部侵袭或远处转移的恶性黑色素瘤患者即使接受放化疗,中位生存期也仅为 6~9 个月^[4]。因此,阐明恶性黑色素瘤发生及进展

的分子机制,对于提高恶性和色素瘤患者生存期及研制有效的靶向治疗药物至关重要。

Kruppel 样因子(Kruppel-like factor, KLF)家族分子可调控多项生理进程,包括发生、进展、分化、增殖、应激^[5]。锌指蛋白 267(ZNF267)为 Kruppel 样锌指家族成员,其结构包括 1 个氨基酸末端的高度保守的 Kruppel 相关盒(Kruppel associated box, KRAB)结构域,并通过连接区与锌指结构区分隔^[6]。研究发现,在一氧化氮治疗后,ZNF267 的 mRNA 在静脉内皮细胞中表达水平上调^[7]。此外,另有研究发现,在肝星状细胞活化过程及肝硬化患者的肝组织中 ZNF267 的表达水平亦上调^[8]。值得注意的是,研究证实 ZNF267 在肝细胞癌中表达上调,并可促进肿瘤细胞的增殖与转移^[9]。然而,截至目前,尚无研究阐

作者单位:405400 重庆市开州区人民医院肿瘤科(金丹、吴明勇、全柳霞、叶夏潮、刘旭阳),设备科(周烈、肖修兰),泌尿外科(刘启祥)

通讯作者:刘启祥,电子信箱:liuqixiang2005@163.com

明 ZNF267 在恶性和色素瘤组织及细胞中的表达及功能。利用 qRT - PCR 及小干扰 RNA 沉默技术,本研究检测了恶性黑色素瘤组织及细胞中 ZNF267 的表达及其对恶性黑色素瘤细胞癌细胞增殖、凋亡、周期的影响。

材料与方法

1. 材料: RPMI 1640 培养基购自美国 HyClone 公司, 青霉素 - 链霉素双抗购自美国 HyClone 公司, 胎牛血清购自美国 Gibeo 公司。Lipofect TRANSfection 转染试剂、QuantScript 反转录试剂盒 (KR103)、RNA 提取试剂盒、qRT - PCR 所应用的 Real Master 试剂盒均购自天根生化科技有限公司。FITC 标记的 Annexin - V 及 PI 抗体购自美国 Biolegend 公司。液氮罐够自美国 Thermo 公司, 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司, ABI 7900 型 PCR 仪购自美国 ABI 公司, BD FACS Calibur 流式细胞仪够自于美国 BD 公司。恶性黑色素瘤 WM451 细胞、A375 细胞和人正常表皮黑素细胞均购自中国科学院上海细胞库。

2. 方法:(1) 组织标本: 恶性黑色素瘤组织标本及癌旁正常皮肤组织收集自重庆市开州区人民医院皮肤科。所有入选患者均同意使用其组织标本用于本项研究中,并签署了知情同意书及授权书。本研究经重庆市开州区人民医院伦理委员会批准。入组患者均经病理诊断为恶性黑色素瘤,且术前未接受放疗或化疗等治疗。术中收集恶性黑色素瘤组织及癌旁正常皮肤组织后,立刻放入液氮罐中备用。(2) 细胞培养: 人表皮黑素细胞 HM、恶性黑色素瘤细胞 WM451 与 A375 细胞细胞用含 10% 浓度胎牛血清及 1% 浓度青霉素 - 链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基, 培养箱孵育条件为 37℃、5% CO₂ 浓度及 95% 湿度。(3) RNA 提取及 qRT - PCR: TRIzol 裂解人恶性黑色素瘤组织或细胞系, 4℃、12000r/min 离心 15min, 吸取水相层, 而后加入等体积的异丙醇。4℃、12000r/min 离心 10min, 弃去上清, 所得胶状沉淀即为 RNA。将所得 RNA 反转录为 cDNA 作为模板。而后加入 125μl 的 20 × SYBR 溶液至 1.0ml 2.5 × Real Master Mix 中, 所得溶液作为试剂 A。实验采用 20μl 体系, 内还有 9μl 试剂 A, 1μl 20 × ROX Reference Dye, 1μl 正向引物, 1μl 反向引物, cDNA 模板 2μl, 6μl 去离子水。qRT - PCR 的反应条件: 95℃ 2min; 95℃ 20s, 60℃ 20s, 72℃ 30s, 共 35 个循环。ZNF267 正向引物序列为: 5' - ATG GGA GCT GTG ATC TTG AGA - 3'; 负向引物序列为: 5' - GCA ATG ATG AAT GAG

TAA AGA CC - 3'。β - actin 正向引物序列为: 5' - CTC CAT CCT GGC CTC GCT - 3'; 负向引物序列为: 5' - GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC - 3'。(4) 细胞转染: 转染前一日将细胞转染至含血清不含抗生素的生长培养基内, 使其转染时密度为 95%。每孔细胞, 使用 50μl 无血清培养基稀释 1μg DNA。每孔细胞, 使用 50μl 无血清培养基稀释 2μl Lipofect 试剂, 室温放置 5 min。将系时候的 DNA 及 Lipofect 混合在一起, 室温保温 20min。将 100μl 混合液加入每孔细胞中, 轻轻摇动培养板混匀。培养 48h 后更换为正常培养基。(5) 细胞增殖实验: 取对数生长期的人恶性黑色素瘤细胞, 制备为单细胞悬液, 以 2.0 × 10³/孔的细胞密度接种于 96 孔板中, 每组实验设 8 个复孔, 分别培养 1 ~ 5 天, 各孔中加入 10μl CCK - 8 试剂, 培养 4h 后, 在 450nm 波长处测定吸光度值, 所得数据作为第 1 天的 A 值。而后每天在同一时间再次测定吸光度值, 根据 5 天内各组所得 A 值绘制细胞增殖曲线。(6) 细胞凋亡和周期: 取对数生长期的人恶性黑色素瘤, 制备为单细胞悬液。10ml PBS, 1000r/min 离心 10min, 反复洗涤 3 次, 弃去上清; 若检测细胞周期则在各组细胞中加入 100μl 流式洗液和 PI (50μg/ml) 5μl 或同型对照抗体, 避光反应 15min 后。尼龙膜过滤细胞, 除去细胞团块后, 立即利用 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测。若检测细胞凋亡则在清洗细胞后加入 FITC 标记的 Annexin - V (20μg/ml) 10μl 及再加入 PI (50μg/ml) 5μl 或 Annexin - V 及 PI 的同型对照抗体, 避光反应 15min。尼龙膜过滤细胞, 除去细胞团块后, 立即利用 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测。

3. 统计学方法: 本研究所有数据均采用 IBM SPSS Statistic 23.0 统计软件进行统计分析, 计数资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间的数据差异比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ZNF267 在人正常皮肤与恶性黑色素瘤组织及细胞系中的表达: qRT - PCR 结果显示, 20 例人正常皮肤组织中 ZNF267 的相对表达量为 0.783 ± 0.464 , 20 例恶性黑色素瘤组织中 ZNF267 的相对表达量为 3.975 ± 0.915 , ZNF267 在两者中的表达差异具有统计学意义 ($t = 3.194, P = 0.027$, 图 1A), ZNF267 在恶性黑色素瘤组织中的表达水平显著高于正常皮肤组织。此外, ZNF267 在人正常黑素细胞 HM 中的相对表达水平为 1.000 ± 0.047 , 在人恶性黑色素瘤细胞

系 WM451 和 A375 细胞中的相对表达水平分别为 3.381 ± 0.014 和 2.583 ± 0.016 , ZNF267 在 3 种细胞系中的表达差异有统计学意义 ($t = 4.371, P = 0.015$,

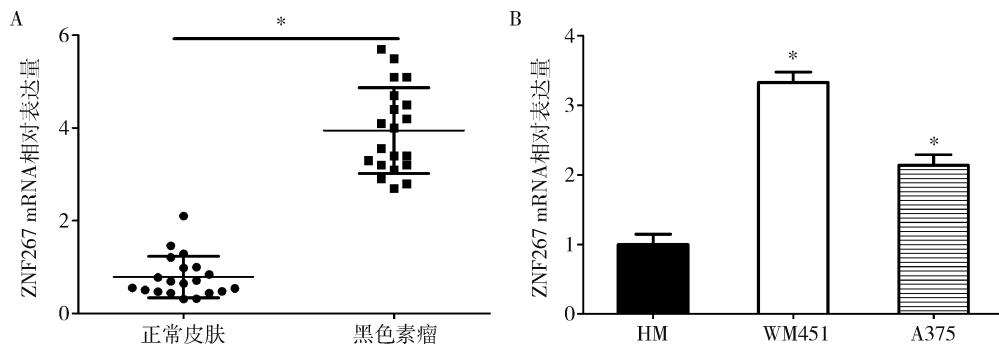


图 1 ZNF267 mRNA 在人正常皮肤与恶性黑色瘤组织与 3 种细胞系中的相对表达量

A. ZNF267 mRNA 在人正常皮肤与恶性黑色素瘤组织中的相对表达量, * $P < 0.05$; B. ZNF267 mRNA 在 HR、WM451、A375 细胞系中的相对表达量, 与 HM 比较, * $P < 0.05$

2. ZNF267 siRNA 的干涉效率:为了研究 ZNF267 在恶性黑色素瘤中的功能,本研究应用小干扰 RNA 技术干涉掉恶性黑色素瘤细胞系中 ZNF267 的表达。结果显示,转染 ZNF267 - siRNA 的 WM451 细胞与 A375 细胞的 ZNF267 的表达水平低于转染 ZNF267 -

NC 者,两组细胞中 ZNF - NC 组与 ZNF - siRNA 组的 ZNF267 表达水平差异具有统计学意义 ($t = 4.239, P = 0.014$, 图 2A; $t = 3.122, P = 0.021$, 图 2B), ZNF267 - siRNA 组的恶性黑色素瘤细胞中 ZNF267 的水平显著低于 ZNF - 267 - NC 组。

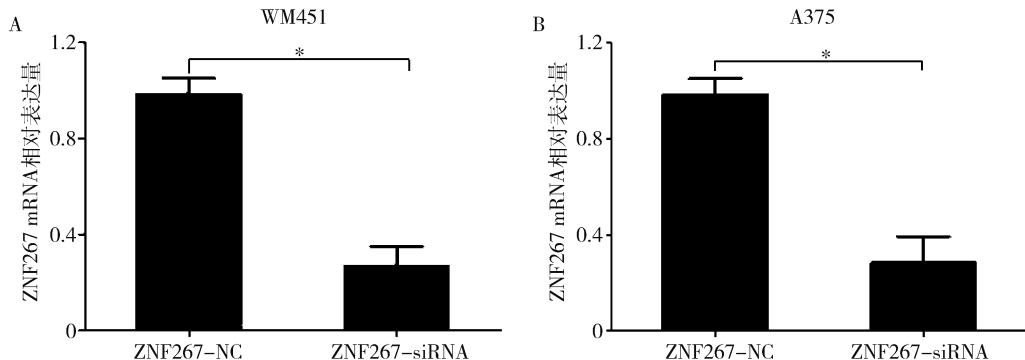


图 2 ZNF267 siRNA 在恶性黑色素瘤细胞中的干涉效率

A. WM451 细胞系; B. A375 细胞系; * $P < 0.05$

3. ZNF267 对恶性黑色素瘤细胞增殖的影响:自转染后的第 3 天起,转染 ZNF267 - siRNA 的 WM451 细胞与 A375 细胞的吸光度 A 值显著低于转染 ZNF267 - NC 者,两组细胞中 ZNF - NC 组与 ZNF - siRNA 组的细胞增殖水平差异具有统计学意义 ($t = 3.117, P = 0.021$, 图 3A; $t = 2.879, P = 0.032$, 图 3B), ZNF267 - siRNA 组的恶性黑色素瘤细胞增殖水平显著低于 ZNF - 267 - NC 组。

4. ZNF267 对恶性黑色素瘤细胞凋亡的影响:转染 ZNF267 - NC 的恶性黑色素瘤细胞系的细胞凋亡

率显著低于 ZNF267 - siRNA 组,两组细胞早期凋亡率比较,差异有统计学意义 ($t = 5.327, P = 0.018$, 图 4A; $t = 7.417, P = 0.013$, 图 4B)。

5. ZNF267 对恶性黑色素瘤细胞周期的影响:转染 ZNF267 - NC 的 WM451 细胞 G_1 期细胞百分比为 49.614 ± 2.195 , 转染 ZNF267 - siRNA 的 WM451 细胞 G_1 期细胞百分比为 63.184 ± 3.914 , 经 t 检验, 两组间 G_1 期细胞百分比比较, 差异有统计学意义 ($t = 4.518, P = 0.034$, 图 5A); 转染 ZNF267 - NC 的 A375 细胞 G_1 期细胞百分比为 43.145 ± 3.471 , 转染

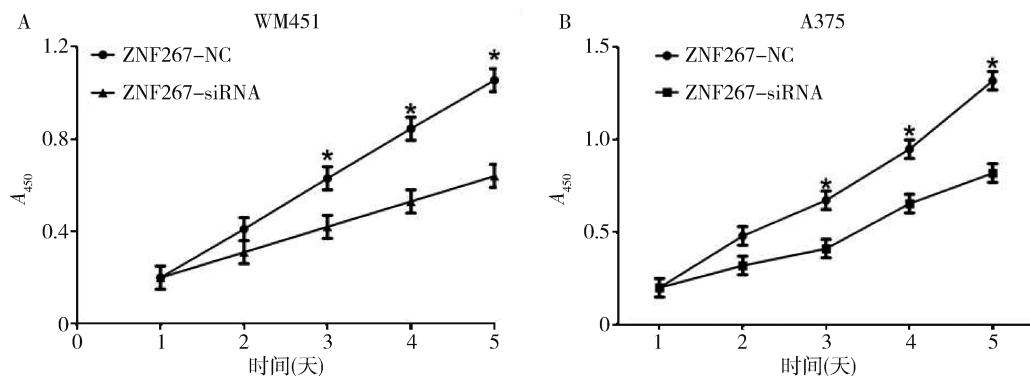


图3 ZNF267对恶性黑色素瘤细胞增殖的影响

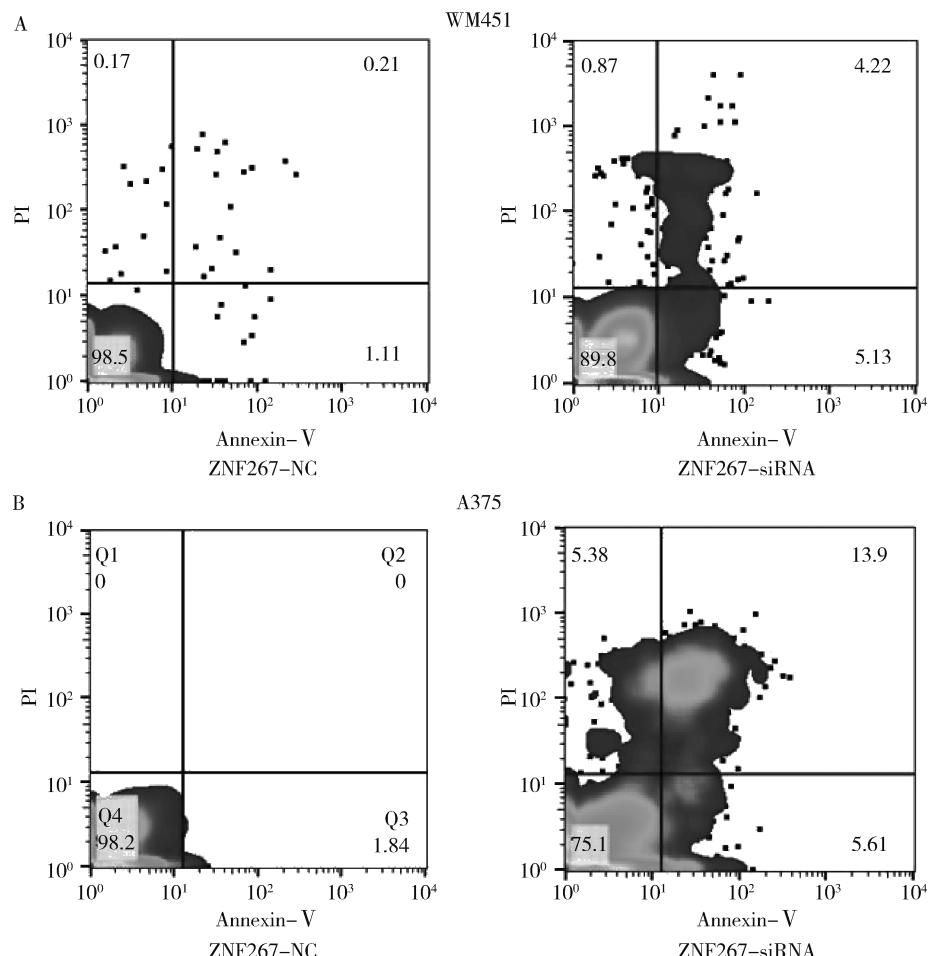
A. WM451 细胞系; B. A375 细胞系; * $P < 0.05$ 

图4 ZNF267对恶性黑色素瘤细胞凋亡的影响

A. WM451 细胞系; B. A375 细胞系

ZNF267 - siRNA 的 A375 细胞 G₁ 期细胞百分比为 56.873 ± 2.983 , 两组间 G₁ 期细胞百分比差异有统计学意义 ($t = 3.841$, $P = 0.039$, 图 5B)。ZNF267 - siRNA 组细胞周期较 ZNF - NC 组相比明显阻滞于 G₁ 期, 细胞增殖受到抑制。

讨 论

本课题研究发现, ZNF267 在恶性黑色素瘤组织中的表达显著高于正常皮肤。根据既往文献和研究结果, 本课题组推测 ZNF267 可能在恶性黑色素瘤中也发挥着促癌分子的作用^[9]。细胞学实验证实,

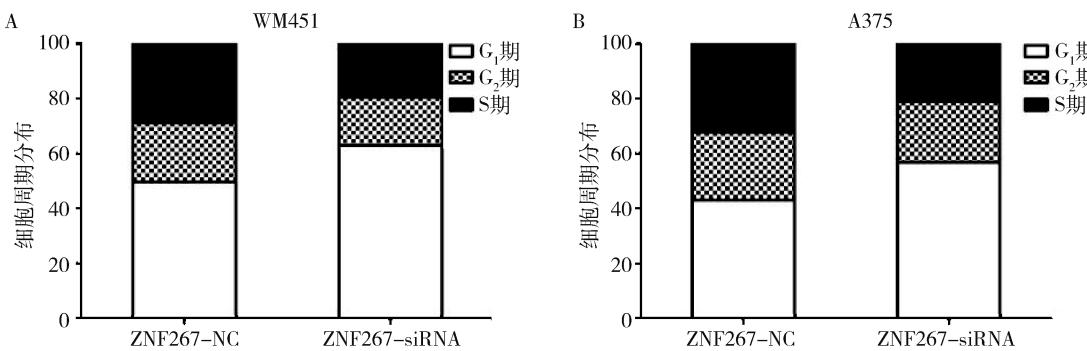


图 5 ZNF267 对恶性黑色素瘤细胞周期的影响

A. WM451 细胞系; B. A375 细胞系

ZNF267 在恶性黑色素瘤细胞系中的表达亦显著高于人正常黑色素细胞。利用 RNA 干涉技术沉默恶性黑色素细胞系中 ZNF267 的表达后, 研究发现, 恶性黑色素瘤细胞增殖能力受到显著抑制, 而凋亡能力则显著增强。进一步研究发现, 其潜在的机制为沉默 ZNF267 表达后, 细胞周期被阻滞于 G₁ 期, S 期细胞数目减少, 导致细胞增殖受到抑制。本课题首次检测了 ZNF267 在恶性黑色素瘤中的表达及其功能。

既往研究显示 ZNF267 在肝细胞癌细胞中表达上调, 并可促进肝细胞癌细胞的增殖和转移, 是潜在的促癌分子^[9]。其潜在的机制可能为肝细胞癌中转录因子 Ets - 1 为 ZNF267 的关键调控分子并可诱导 ZNF267 表达上调。此外, 抑制 Ets - 1 在肝细胞活性的重要调控分子 HIF - 1 α , 则 ZNF267 在肝细胞癌中的表达亦显著降低。缺氧可显著提高肝细胞癌中 HIF - 1 α 的表达, 并促进 ZNF267 的表达^[9~11]。研究还显示, 活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS) 也通过诱导 Ets - 1 的表达而参与 ZNF267 的调控中^[12]。与该研究结果相符, 本研究亦显示, ZNF267 在恶性黑色素瘤可能作为促癌分子存在而促进恶性黑色素瘤细胞增殖。其潜在机制与上述研究类似, Ets - 1 在恶性黑色素瘤和肝细胞癌中表达均上调且在肿瘤的发生及进展中均起着重要的作用。因此, 在恶性黑色素瘤中 Ets - 1 可能同样通过上调 ZNF267 的表达而使其发挥促癌分子作用^[13~15]。更为确切的 ZNF267 表达的调控机制需要进一步的研究明确。

综上所述, 本研究首次证实了 ZNF267 在恶性黑色素瘤组织及细胞中表达上调, 并可促进恶性黑色素瘤细胞的增殖、抑制及其凋亡。本研究结果为进一步解释恶性黑色素瘤发生及进展中的分子机制以及寻找有效的治疗分子靶点研究奠定了基础。

参考文献

- Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification [J]. In Vivo, 2014, 28 (6): 1005 - 1011
- Trotter SC, Sroa N, Winkelmann RR, et al. A Global review of melanoma follow-up guidelines [J]. J Clin Aesthet Dermatol, 2013, 6 (9): 18 - 26
- Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, et al. Increasing burden of melanoma in the United States [J]. J Invest Dermatol, 2009, 129 (7): 1666 - 1674
- Eggermont AM, Chiarion - Sileni V, Grob JJ, et al. Prolonged survival in stage III melanoma with ipilimumab adjuvant therapy [J]. New Engl J Med, 2016, 375 (19): 1845 - 1855
- McConnell BB, Yang VW. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases [J]. Physiol Rev, 2010, 90 (4): 1337 - 1381
- Abrink M, Aveskogh M, Hellman L. Isolation of cDNA clones for 42 different Kruppel-related zinc finger proteins expressed in the human monoblast cell line U - 937 [J]. DNA Cell Biol, 1995, 14 (2): 125 - 136
- Schafer U, Schneider A, Neugebauer E. Identification of a nitric oxide-regulated zinc finger containing transcription factor using motif-directed differential display [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1494 (3): 269 - 276
- Schnabl B, Hu K, Muhlbauer M, et al. Zinc finger protein 267 is up-regulated during the activation process of human hepatic stellate cells and functions as a negative transcriptional regulator of MMP - 10 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335 (1): 87 - 96
- Schnabl B, Valletta D, Kirovski G, et al. Zinc finger protein 267 is up-regulated in hepatocellular carcinoma and promotes tumor cell proliferation and migration [J]. Exp Mol Pathol, 2011, 91 (3): 695 - 701
- Maegdefrau U, Amann T, Winklmeier A, et al. Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression [J]. J Pathol, 2009, 218 (4): 520 - 529
- Amann T, Maegdefrau U, Hartmann A, et al. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis [J]. Am J Pathol, 2009, 174 (4): 1544 - 1552

(下转第 188 页)

(HR-QOL)与对照组相比有显著的差异,并且HR-QO呈恶化趋势,这说明了重叠症患者的生活质量严重下降,给患者带来了生活的不便。

综上所述,IBS和GERD有着密切的联系,国内外科学家也都进行了积极的探索,多数研究者认为这种重叠现象的发生可能与其有共同的危险因素、相同的病理生理学和遗传易感性等有关,但两者间究竟通过何种途径和方式相联系,目前尚不明确。IBS与GERD各个亚型之间的关系也还值得进一步探究。针对这种重叠疾病的治疗,临床医生需要的是先仔细诊断,后制定且进行个体化的综合治疗,才有望提高对重叠症的治疗效果,从而改善患者生活质量。所以,探索GERD与IBS之间的联系,对于预防和治疗该重叠症具有很好的临床指导作用。

参考文献

- 1 Gasiorowska A, Poh CH, Fass R. Gastroesophageal reflux disease (GERD) and irritable bowel syndrome (IBS) – is it one disease or an overlap of two disorders? [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54: 1829–1834
- 2 Neumann H, Moenkemueller K, Von AU, et al. IBS – symptoms in patients with GERD [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(5): 295–295
- 3 Pourhoseingholi A, Vahedi M, Pourhoseingholi MA, et al. Irritable bowel syndrome, gastro – oesophageal reflux disease and dyspepsia: overlap analysis using loglinear models [J]. *Arab J Gastroenterol*, 2012, 13: 20–23
- 4 朱传会,李学良,林琳.胃食管反流病与功能性肠道疾病的重叠及相关因素[J].世界华人消化杂志,2009,17(22):2303–2307
- 5 罗程,陈惠新,徐永成,等.惠州地区胃食管反流病与肠易激综合征重叠的特征[J].临床消化病杂志,2013,25(6):371–372,378
- 6 平静娜,袁耀宗.胃食管反流病和肠易激综合征的异同[J].国际消化病杂志,2009,29(5):308–310
- 7 吴琚玮,诸琦.肠易激综合征重叠症的研究进展[J].胃肠病学,2010,15(5):302–304
- 8 Lee SY, Lee KJ, Kim SJ, et al. Prevalence and risk factors for overlaps between gastroesophageal reflux disease, dyspepsia, and irritable bowel syndrome: a population – based study [J]. *Digestion*, 2009, 79: 196 – 201
- 9 Fujiwara Y, Kubo M, Kohata Y, et al. Cigarette smoking and its association with overlapping gastroesophageal reflux disease, functional dyspepsia, or irritable bowel syndrome [J]. *Intern Med*, 2011, 50: 2443–2447
- 10 Nam SY, Ryu KH, Park BJ. Irritable bowel syndrome is associated with gastroesophageal reflux symptom but not erosive esophagitis [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2013, 19: 521–531
- 11 Lovell RM, Ford AC. Prevalence of gastro – esophageal reflux – type symptoms in individuals with irritable bowel syndrome in the community: a meta – analysis [J]. *Gastroenterology*, 2012, 107 (12) : 1793 – 1801
- 12 McCullough RW. IBS. NERD and functional dys – pepsia are immuno – neuronal disorders of mucosal cytokine imbalances clinically reversible with high potency sucralfate [J]. *Med Hypoth*, 2013, 80 (3): 230 – 233
- 13 Garcia – Arredondo MM, Barcelo M, Garcia – Sanchez R, et al. GERD associated with IBS: is clinically different than GERD without IBS [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142 (5): 758
- 14 Noh YW, Jung HK, Kim SE, et al. Overlap of erosive and non – erosive reflux diseases with functional gastrointestinal disorders according to rome III criteria [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2010, 16: 148 – 156
- 15 Yarandi SS, Nasseri – Moghaddam S, Mostajabi P, et al. Overlapping gastroesophageal reflux disease and irritable bowel syndrome: Increased dysfunctional symptoms [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16 (10) : 1232 – 1238
- 16 Mönnikes H, Schwan T, van Rensburg C, et al. Randomised clinical trial: sustained response to PPI treatment of symptoms resembling functional dyspepsia and irritable bowel syndrome in patients suffering from an overlap with erosive gastro – oesophageal reflux disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 35:1279 – 1289
- 17 Mönnikes H, Heading RC, Schmitt H, et al. Influence of irritable bowel syndrome on treatment outcome in gastroesophageal reflux disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17:3235 – 3241
- 18 Heading RC, Mönnikes H, Tholen A, et al. Prediction of response to PPI therapy and factors influencing treatment outcome in patients with GORD: a prospective pragmatic trial using pantoprazole [J]. *BMC Gastroenterol*, 2011, 11:52 – 52
- 19 袁周礼.雷贝拉唑联用醋氨已酸锌治疗胃食管反流病合并腹泻为主型肠易激综合征疗效观察[J].陕西医学杂志,2010,39(7):917–917
- 20 Rey E, Garcia – Alonso M, Moreno – Ortega M, et al. Influence of psychological distress on characteristics of symptoms in patients with GERD: the role of IBS comorbidity [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54 (2): 321 – 327
- 21 Kaji M, Fujiwara Y, Shiba M, et al. Prevalence of overlaps between GERD, FD and IBS and impact on health – related quality of life [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25: 1151 – 1156

(收稿日期:2016-10-18)

(修回日期:2016-10-30)

(上接第 176 页)

- 12 Wilson LA, Gemin A, Espiritu R, et al. Ets – 1 is transcriptionally up – regulated by H₂O₂ via an antioxidant response element [J]. *FASEB J*, 2005, 19 (14): 2085 – 2087
- 13 Spangler B, Kappelmann M, Schittek B, et al. ETS – 1/RhoC signaling regulates the transcription factor c – Jun in melanoma [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130 (12): 2801 – 2811
- 14 Dong L, Jiang CC, Thorne RF, et al. Ets – 1 mediates upregulation

of McI – 1 downstream of XBP – 1 in human melanoma cells upon ER stress [J]. *Oncogene*, 2011, 30 (34): 3716 – 3726

- 15 Cao L, Xie B, Yang X, et al. MiR – 324 – 5p suppresses hepatocellular carcinoma cell invasion by counteracting ECM degradation through post – transcriptionally downregulating ETS1 and SP1 [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (7): e0133074

(收稿日期:2016-10-12)

(修回日期:2016-10-31)