

·专题·先天性巨结肠的诊治·

先天性巨结肠中 miR-939 靶向调控 SOX4 表达抑制肠神经嵴前体细胞功能表型的实验研究



全文二维码



开放科学码

田东浩 许文耀 余 辉 杨薇粒
郑百俊 高 亚 潘伟康

【摘要】 目的 检测 MicroRNA-939 (miR-939) 和性别决定区相关 HMG 族盒蛋白 4 (Sry-related HMG box 4, SOX4) 在先天性巨结肠 (Hirschsprung's disease, HSCR) 中的表达水平, 评估 miR-939 在 SOX4 调控肠神经嵴前体细胞 (enteric neural crest cells, ENCCs) 增殖、凋亡和迁移过程中的作用, 并探讨 miR-939/SOX4 在 HSCR 干预治疗方面的潜在价值。 **方法** 采用 RT-PCR、Western blot 检测 HSCR 和肠套叠患者肠组织中 miR-939、SOX4 表达水平; 从常规孕鼠肠管取材, 体外培养 ENCCs, 通过 Nestin、GFAP 双免疫荧光染色鉴定。使用 miR-939 模拟物、SOX4-siRNA 干预, 并分别通过 CCK8 法、流式细胞仪和 Transwell 小室检测 ENCCs 增殖、凋亡和迁移。 **结果** 与肠套叠组患者相比, HSCR 患者肠组织中 miR-939 的表达水平显著提高, 而 SOX4 表达水平显著降低。miR-939 模拟物可显著抑制 ENCCs 中 SOX4 的表达水平; 上调 miR-939 和下调 SOX4 均能够显著降低 ENCCs 增殖和迁移, 并促进细胞凋亡。 **结论** HSCR 患者肠组织 miR-939、SOX4 均表达异常, 负向调控 ENCCs 增殖、凋亡和迁移可能参与 HSCR 发病过程, 靶向 miR-939/SOX4 的干预策略可为后续 HSCR 干预治疗提供潜在的治疗参考。

【关键词】 先天性巨结肠/病因学; 肠神经系统; 细胞增殖

【中图分类号】 R574 R393 R329.2*8

Experimental study of miR-939 regulating the phenotypic features of ENCCs by targeting SOX4 in Hirschsprung's disease. Tian Donghao, Xu Wen Yao, Yu Hui, Yang Weili, Zheng Baijun, Gao Ya, Pan Weikang. Department of Pediatric Surgery, Second affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710000, China. Corresponding author: Pan Weikang, Email: weikang915@mail.xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To detect the expression levels of miR-939 and SOX4 in Hirschsprung's disease (HSCR), evaluate the role of miR-939 in SOX4 regulating enteric neural crest cells (ENCCs) and explore the potential value of miR-939/SOX4 in the intervention of HSCR. **Methods** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were employed for measuring the expression levels of miR-939 and SOX4 in intestinal tissues of HSCR children with intussusception. ENCCs from pregnant Sprague Dawley (SD) rats were routinely cultured and identified by Nestin/GFAP immunofluorescent staining. And miR-939 mimics and SOX4 siRNA were applied to ENCCs and cellular proliferation, apoptosis and migration detected by CCK8, flow cytometry and Transwell chamber assay. **Results** As compared with intussusception group, the expression level of miR-939 significantly increased in HSCR group while the expression level of SOX4 markedly declined. And miR-939 mimics significantly inhibited the expression of SOX4 in ENCCs. The up-regulation of miR-939 and the down-regulation of SOX4 significantly reduced the proliferation and migration of ENCCs, and promoted apoptosis of ENCCs. **Conclusion** Conclusion The expression of miR-939/SOX4 is abnormal in HSCR children. A negative regulation of the proliferation, apoptosis and migration of ENCCs may be involved in the patho-

DOI:10.12260/lcxewkzz.2021.03.005

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: NSFC81701501, NSFC82071692, NSFC81770513); 陕西省科技新星 (编号: 2019KJXX-044); 陕西省自然科学基金 (编号: 2020JM-407)

作者单位: 西安交通大学第二附属医院小儿外科 (陕西省西安市, 710000)

通信作者: 高亚, Email: ygao@xjtu.edu.cn, 潘伟康, Email: weikang915@mail.xjtu.edu.cn

genesis of HSCR. Targeted intervention of miR-939/SOX4 signaling pathway provides potential therapeutic targets for subsequent intervention of HSCR.

【Key words】 Hirschsprung Disease/ET; Enteric Nervous System; Cell Proliferation

先天性巨结肠 (Hirschsprung's disease, HSCR) 是最常见的先天性胃肠神经系统疾病之一,活产儿中发病率为 1/5 000,男性发病率约为女性的 4 倍,主要临床表现为病变肠管痉挛、肠内容物通过受阻引起下消化道梗阻;病理学改变为病变肠管神经节缺如以及神经纤维增粗、增多^[1-4]。其发病机制为胚胎第 3~12 周时来自迷走神经的肠神经嵴前体细胞 (enteric neural crest cells, ENCCs) 沿头向尾方向迁移障碍所致^[5-7]。研究表明,多基因如 *SOX10*、*NRG1*、*RET*、*SIP1*、*GDNF* 等参与 HSCR 的发生过程,但其确切发病机制仍未完全清楚^[8]。

MicroRNA (miRNA) 是内源性小分子非编码 RNA,大小为 19~25 bp,以直接结合靶基因 mRNA 的 3'-非翻译区 (3'-UTR) 阻遏翻译和 (或) 诱导 mRNA 降解的方式,参与调控细胞周期、分化、迁徙和凋亡以及能量代谢等多种细胞活动^[9-11]。既往研究表明,HSCR 患者肠组织中存在大量异常表达的 miRNA,如 miR-206^[12,13]、miR-192/215^[14]、miR-140-5p^[15] 和 miR-132/212^[16] 等,它们可能与 HSCR 发生相关。研究表明,miR-939 可通过靶向 HDGF 诱导 WNT/ β -Catenin 途径失活,还可通过靶向 IGF-1R 诱导 PI3K/Akt 途径失活,进而调控癌细胞增殖、迁移和凋亡,发挥抑癌作用^[17,18]。陈广林等报道 miR-939 可靶向 LRSAM1 并抑制 HSCR 中 ENCCs 增殖^[19]。SOX4 为 SOX (Sry-related HMG box) 转录因子家族成员之一,广泛参与胚胎期神经元发育、轴突形成、神经元映射以及生殖系统发育等过程。有报道显示,SOX4 可能通过 Notch 信号通路调控 Mash1、Ngn1 和 Ngn2 转录因子表达,并与 SOX11 发挥协同作用^[20]。本课题组前期研究发现 SOX4 在 HSCR 患者肠组织中低表达^[21]。目前尚不清楚 miR-939 对 SOX4 的调控及二者对 ENCCs 功能表型的影响,以及 miR-939/SOX4 在 HSCR 发病中的机制。

本研究拟通过检测 miR-939 和 SOX4 在 HSCR 患者肠组织中的表达水平,评估 miR-939 对 SOX4 表达调控作用,以及 miR-939、SOX4 对 ENCCs 增殖、凋亡和迁移的影响,并探讨 miR-939/SOX4 在 HSCR 干预治疗中的潜在价值。

材料与方法

一、主要实验材料

孕龄 15~20 d 的 Sprague Dawley (SD) 大鼠购自广州弗尔博生物科技有限公司;DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶、IV 型胶原酶、Lipofectamine 2000、Trizol 试剂均购自美国 Invitrogen 公司;Nestin、GFAP、SOX4 单克隆一抗均购自美国 Abcam 公司;miR-939 模拟物、SOX4 siRNA 及阴性对照试剂均购自上海吉玛制药技术有限公司;CCK8 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Transwell 迁移室、增强的化学发光系统购自美国 Millipore 公司;Annexin V-FITC / PI 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Yeasen 公司;TaqMan MicroRNA 检测试剂盒、ABI 7900HT 荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司;SYBR GREEN 1 购自日本 TaKaRa 公司;RIPA 缓冲液购自南京森贝伽生物科技有限公司;PVDF 膜购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

二、研究方法

1. 患者组织样本采集 收集 2019 年 1 月至 2020 年 1 月在西安交通大学第二附属医院进行手术治疗的 30 例 HSCR 患者狭窄段 (无神经节细胞肠段) 肠组织,另选取 30 例经手术治疗肠套叠患者的结肠非病变处组织作为对照;所有组织标本用生理盐水冲洗后保存于 -80℃ 环境下。HSCR 患者年龄为 30 天至 5 岁,男 23 例,女 7 例。对照组患者年龄为 1~5 岁,男 20 例,女 10 例。两组患者基线资料匹配,具有可比性。本研究开展前获得患者监护人的书面知情同意书,并获取我院伦理委员会批准。

2. SD 大鼠 ENCCs 分离培养 参考肖莉等^[22]的研究方法进行 ENCCs 分离培养。取孕 15~18 天 SD 胎鼠肠管,小心剔除肠系膜后充分剪碎,分别用胰蛋白酶、IV 型胶原酶消化 30 min、10 min,添加胎牛血清终止消化,无菌滤网过滤,于 37℃ 下 1 000 r/min 离心 3 min,弃上清后 PBS 冲洗 3 次,完全培养基重悬并计数,按照 6×10^5 个细胞/mL 的密度接种到培养瓶中,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 3~5 d,然后传代培养。传代 5 次后进行克隆球的分化培养,取适量左旋多聚赖氨酸包被盖玻片于 24 孔板中

过夜,无菌双蒸水清洗3次,600 r/min 离心2 min 离心收集悬浮神经球,0.25%胰蛋白酶消化5~10 min,轻柔吹打,制成单细胞悬液,离心弃上清,添加10%胎牛血清的完全培养基重悬,以每孔 1×10^5 细胞/mL接种于24孔板,于37℃、5% CO₂条件下培养8 h,观察克隆球的分化情况。

3. SD大鼠ENCCs鉴定 收集悬浮生长状态良好的神经球离心,用4%多聚甲醛固定30 min,0.5% Triton X-100室温透膜10 min,5%胎牛血清室温封闭30 min,4℃下将盖玻片分别于1:500稀释的鼠抗Nestin和兔抗GFAP一抗中过夜孵育,室温复温1 h,PBS清洗,然后与FITC绿色和TRITC红色荧光二抗室温孵育1 h,PBS清洗,DAPI染色10 min,将盖玻片置于荧光显微镜下观察细胞染色情况。

4. ENCCs转染 收集悬浮生长状态良好的神经球于离心管中,37℃下1 000 r/min离心3 min,弃上清,0.25%胰蛋白酶消化5~10 min,轻柔吹打,制成单细胞悬液,离心弃上清,用完全培养基重悬,按照 2×10^5 细胞/孔的密度接种于6孔板中。根据制造商说明书,配合使用Lipofectamine 2 000将miR-939模拟物、SOX4-siRNA和阴性对照试剂转染细胞。

5. ENCCs增殖测定 分别用miRNA或siRNA转染48 h后,使用CCK-8细胞活力检测试剂盒测定细胞活力以评估增殖情况,使用酶标仪测量450 nm处的吸光度,记录OD值。

6. ENCCs凋亡测定 将miRNA或siRNA转染的细胞于37℃、5% CO₂条件下孵育48 h后进行收集,根据制造商说明书,使用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒进行染色,流式细胞仪检测细胞凋亡。

7. ENCCs迁移测定 使用孔径8 μm规格的Transwell迁移小室进行细胞迁移分析,将转染的细胞置于完全培养基重悬,调整密度为 1×10^5 细胞/mL,并添加100 μL到上室中,将600 μL含有10% FBS的分化培养基添加到下室中,于37℃、5% CO₂条件下孵育24 h后,用棉签小心擦拭上室,预冷PBS清洗后,乙醇固定10 min,结晶紫染色10 min,PBS充分清洗后,在显微镜下($\times 100$)随机选择5个视野留取照片进行计数。

8. RNA分离和qRT-PCR 按照试剂商说明书上方法使用Trizol试剂从组织样品和细胞中提取总RNA用于后续实验。TaqMan MicroRNA检测试

剂盒用于检测miR-939,以U6作为标准化对照。通过ABI 7900HT荧光定量PCR仪和SYBR GREEN 1检测SOX4 mRNA表达水平,以GAPDH作为内参。实验用到的引物序列如下:SOX4,正向,5'-CGAGAAAATCGGGTAGCCCA-3',反向,5'-CAGAT-TCACTCGCAATGCCC-3';GAPDH,正向5'-GTG-GAATGGTGCAGACCAAG-3',反向5'-GTCAGGAG-GTGGGATGTTGG-3'。全部实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法评估miRNA或mRNA的表达水平。

9. Western blot 按照试剂商说明书方法,使用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液从组织和细胞中提取总蛋白质。采用Bradford方法检测蛋白质浓度。采用15% SDS-PAGE分离出等量蛋白质,转移到PVDF膜上,用5%脱脂牛奶封闭,分别以1:500和1:1 000的稀释度与抗SOX4和抗GAPDH一抗孵育,4℃条件下过夜,在室温(37℃)条件下与辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗共孵育1 h,使用增强的化学发光系统进行显影,GAPDH作为内部对照。使用ImageJ软件对条带进行定量分析。

三、统计学处理

使用SPSS24.0进行统计分析,实验结果中服从正态分布的定量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,所有实验独立重复3次以上。采用独立样本 t 检验进行两组间差异性分析,采用单因素方差分析及基于Bonferroni校正的事后多重检验进行多组间差异比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、ENCCs神经球鉴定

于原代培养第3天、第5天在光学显微镜下观察ENCCs来源神经球生长情况,通过Nestin和GFAP双免疫荧光染色对ENCCs来源的神经球进行鉴定,结果可见神经球表现为Nestin(红色荧光)和GFAP(绿色荧光)双阳性,细胞核被DAPI染为蓝色,Nestin+/GFAP+双阳性表示细胞为ENCC细胞(图1)。

二、HSCR患者肠组织中miR-939和SOX4表达

分别通过RT-PCR检测HSCR患者肠组织中miR-939和SOX4 mRNA的表达水平,通过Western blot检测SOX4蛋白表达水平。结果表明,与肠套叠患者肠组织相比,HSCR患者肠组织中miR-939的表达水平显著增加(图2A),SOX4的mRNA(图2B)和蛋白(图2C,图2D)表达水平显著降低。

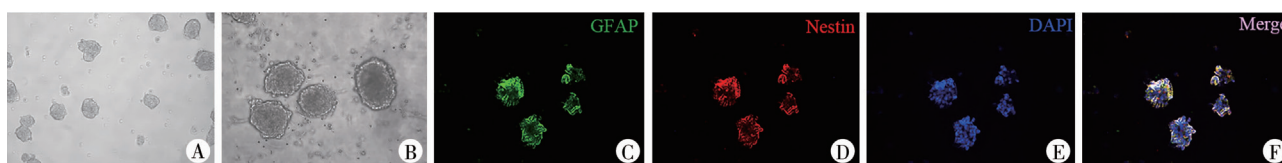


图1 ENCCs来源神经球光学显微镜观察结果和免疫荧光染色结果($\times 200$) A:原代培养第3天的神经球;B:原代培养第5天的神经球;C:GFAP阳性(绿色区域);D:Nestin阳性(红色区域);E:DAPI阳性(蓝色区域);F:染色融合

Fig.1 Observation of light microscopy and Nestin/GFAP immunofluorescence staining of ENCCs neurosphere ($\times 200$)

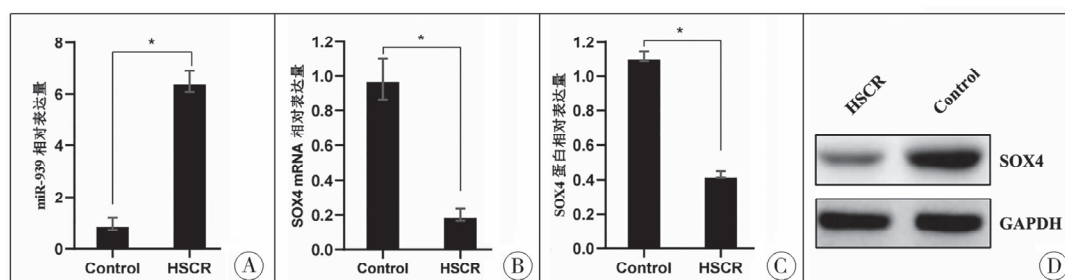


图2 先天性巨结肠患者(HSCR组)和肠套叠患者(control组)肠组织中miR-939和SOX4的表达情况 A、B:RT-PCR检测miR-939(A)和SOX4 mRNA(B)表达;C:Western blot检测SOX4蛋白表达;D:Western blot条带ImageJ定量结果;*代表与control组比较, $P < 0.05$

Fig.2 miR-939/SOX4 expression in intestinal tissues of patients with Hirschsprung's disease and intussusception

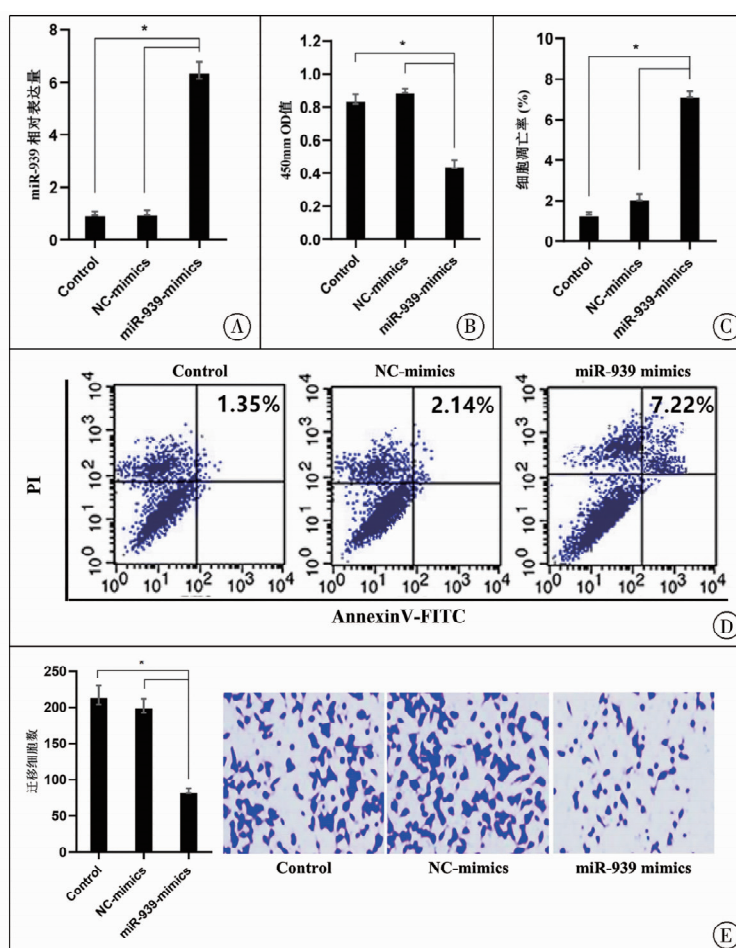


图3 上调miR-939的表达对肠神经嵴干细胞增殖、凋亡和迁移的影响 A:转染miR-939 mimic上调细胞中miR-939的表达;B:CCK8法测定细胞增殖;C,D:Annexin V-FITC/PI法测定细胞凋亡;E,F:Transwell实验检测细胞迁移;*代表与对照比较, $P < 0.05$

Fig.3 Effect of up-regulated miR-939 expression on the proliferation, apoptosis and migration of enteric neural crest stem cells

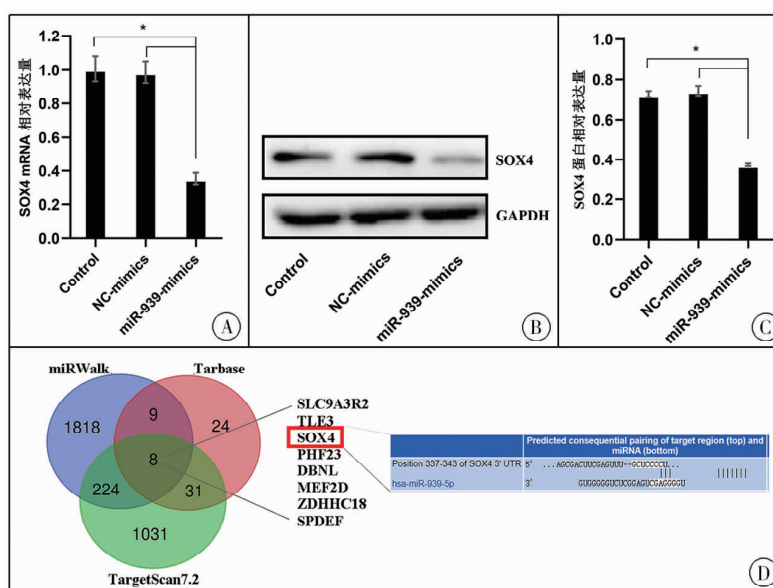


图4 ENCCs 中 miR-939 靶向调控 SOX4 表达 A: RT-PCR 检测 SOX4 mRNA 表达; B: Western blot 检测 SOX4 蛋白表达; C: Western blot 条带 ImageJ 定量结果; D: 通过 miRWalk、Tarbase 和 TargetScan 数据库预测到 miR-939 靶基因; * 表示与对照比较, $P < 0.05$

Fig. 4 Up-regulated miR-939 regulated SOX4 expression in enteric neural crest stem cells

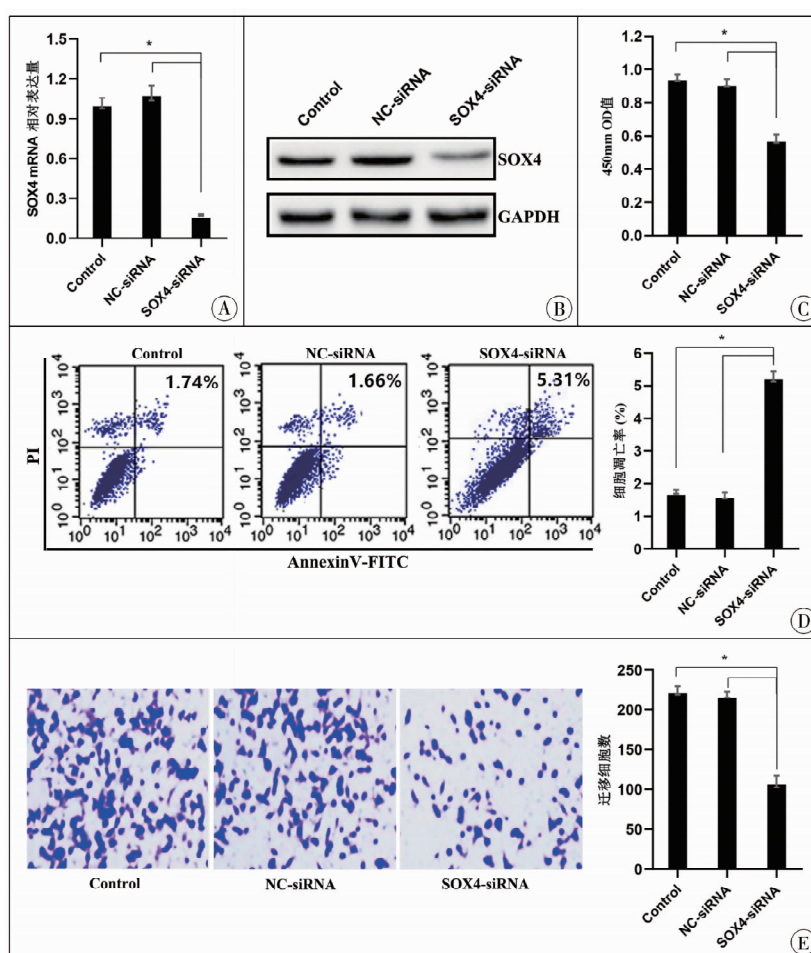


图5 下调 SOX4 的表达对肠神经嵴干细胞增殖、凋亡和迁移的影响 A、B: RT-PCR 和 Western blot 证实转染 SOX4-siRNA 可敲低 ENCCs 细胞中 SOX4 的 mRNA 和蛋白表达; C: CCK8 法测定细胞增殖; D: Annexin V-FITC / PI 法测定细胞凋亡; E: Transwell 实验检测细胞迁移; * 代表与对照比较, $P < 0.05$

Fig. 5 Effect of down-regulation of SOX4 expression on proliferation, apoptosis and migration of enteric neural crest stem cells

三、miR-939 表达上调对 ENCCs 增殖、凋亡和迁移能力的影响

使用 miR-939 mimic 转染 ENCCs, RT-PCR 检测结果显示 miR-939 的表达水平上调(图 3A)。CCK-8 实验结果表明,与对照组相比,上调 miR-939 的表达显著抑制 ENCCs 细胞增殖(图 3B);流式细胞仪分析表明,与对照组相比,上调 miR-939 的表达显著促进 ENCCs 细胞凋亡(图 3C,图 3D);Transwell 实验结果表明,与对照组相比,上调 miR-939 的表达显著抑制 ENCCs 细胞迁移(图 3E,图 3F)。

四、miR-939 靶向调控 ENCCs SOX4 表达水平

转染 miR-939 mimic 后,分别通过 RT-PCR 和 Western blot 检测 SOX4 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果显示,与对照组相比,转染 miR-939 mimic 显著抑制 ENCCs 细胞中 SOX4 的表达(图 4A—图 4C)。在 miRWalk、Tarbase 和 TargetScan 数据库分别预测到 miR-939 靶基因数分别为 2 059 个、72 个和 1 294 个,三个数据预测到的共同靶基因有 8 个,其中包含 SOX4,在 TargetScan 获得 miR-939 与 SOX4 结合位点信息(图 4D)。

五、下调 SOX4 对 ENCCs 增殖、凋亡和迁移能力的影响

使用 SOX4-siRNA 转染 ENCCs 细胞, RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示 SOX4 的 mRNA 和蛋白表达下调(图 5A,图 5B),分别检测 ENCCs 细胞增殖、迁移和凋亡(方法同前),结果表明,下调 SOX4 的表达可显著抑制 ENCCs 细胞的增殖(图 5C)和迁移(图 5E),并促进凋亡(图 5D)。

讨论

肠神经系统(enteric nervous system, ENS)属于直接调节胃肠系统的独立神经系统,而肠神经嵴前体细胞(enteric neural crest cells, ENCCs)发育障碍是导致 ENS 相关疾病,引发肠道功能异常的主要原因之一^[23]。当 ENCCs 增殖、凋亡、迁移和分化等过程出现异常时可引起先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HSCR)^[24]。HSCR 的发生是一个复杂的过程,涉及多个基因转录和表达异常,尽管很多学者已经鉴定出一些导致 HSCR 发生的关键基因,但尚不清楚导致其发病机理的主要机制。

在胚胎发生过程中,ENCCs 从结肠前端到远端的迁移需要持续数周,此过程中影响 ENCCs 增殖、迁移和凋亡的各种因素均可能影响神经节的形成。

大量研究已证明 miRNA 在胚胎发育过程中起着至关重要的作用,而关于 miRNA 参与 HSCR 的发病过程也有较多研究。据报道,miR-192/215 在 HSCR 组织样品中显著下调,且沉默 miR-192/215 通过靶向 Nidogen 1(NID1)抑制人 293T 和 SH-SY5Y 细胞的增殖和迁移^[14]。另外,miR-206 的下调通过抑制细胞增殖和迁移而参与 HSCR 的发生^[12,13]。下调 miR-200a/141 通过调节磷酸酶-张力蛋白同源物的表达在 HSCR 发病过程中起关键作用^[25]。此外,有学者研究报道,HSCR 患者血浆外泌体中存在异常高表达的 miRNAs 分子,有可能参与细胞外基质-受体相互作用,通过干扰细胞连接而促进 HSCR 发生^[26]。本研究发现 miR-939 在 HSCR 患者结肠组织样本中显著上调,并且上调 miR-939 的表达显著抑制 ENCCs 的迁移和增殖,并促进细胞凋亡。这些结果表明 miR-939 的异常高表达可能直接参与破坏 ENCCs 功能的过程,从而促进先天性巨结肠的发展。

性别决定区相关高迁移率族盒蛋白 4(Sry-related HMG box 4, SOX4)为 SOX(Sry-related HMG box)转录因子家族成员之一,广泛参与胚胎期神经元发育、轴突形成和神经元映射,以及生殖系统发育等过程,并在多种类型的人类恶性肿瘤患者组织中呈高表达状态。SOX4 的高表达与肿瘤血管生成以及对放化疗的抗性有关^[27]。据报道,SOX4 的上调促进结直肠癌细胞的增殖和侵袭,SOX4 的高表达可抑制宫颈癌细胞对化疗药物的敏感性。SOX4 可能通过 Notch 信号通路调控 Mash1、Ngn1 和 Ngn2 转录因子表达,并与 SOX11 发挥协同作用调控神经发生^[20]。课题组前期研究发现,先天性巨结肠组织样本中 SOX4 表达显著下调^[21],提示 SOX4 可能参与 HSCR 的发病过程。基于此,本研究通过转染靶向 SOX4 的 siRNA 敲低 ENCCs 细胞中 SOX4 的表达,结果显示,下调 SOX4 可显著抑制 ENCCs 细胞增殖和迁移能力,促进细胞凋亡。本研究还观察到上调 miR-939 可显著抑制 ENCCs 细胞中 SOX4 的表达,并获得与敲低 SOX4 类似 ENCCs 表型变化结果。此外,通过 miRWalk、Tarbase 和 TargetScan 数据库分别预测到 miR-939 可能的靶基因为 SOX4,在 TargetScan 获得 miR-939 与 SOX4 结合位点信息。以上结果表明,miR-939 可能通过靶向调控 SOX4 表达来影响 ENCCs 细胞功能,进而参与 HSCR 发生过程。

HSCR 的早期诊断和治疗是改善患者预后的关

键。然而,临床上 HSCR 具有多种亚型及复杂的临床表现,钡灌肠、直肠肛门测压、家族史和基因诊断技术等均不能对 HSCR 进行可靠预测,主要依赖于直肠活组织检查发现特征性神经节细胞数量的减少来做出最终诊断。有学者^[26]提到循环生物标志物对 HSCR 的诊断意义,肝癌和结肠癌患者血液中 miR-939 表达水平对疾病诊断和预后具有独立预测价值,并对促炎基因表达有调控作用。因此,有必要开展针对 HSCR 患者血液循环 miRNAs 的研究,为临床上通过检测血液循环 miR-939 作为 HSCR 诊断的辅助手段提供证据支持。

综上所述,本研究认为,miR-939 和 SOX4 均参与 HSCR 的发病过程。HSCR 患者肠组织中 miR-939 显著上调,而 SOX4 显著下调。上调 miR-939 或下调 SOX4 均可抑制 ENCCs 的增殖和迁移,并诱导细胞凋亡。miR-939 的高表达通过靶向抑制 SOX4 表达,从而抑制 ENCCs 的生长、迁移和促进凋亡,从而参与 HSCR 的发生发展过程。因此,靶向 miR-939 或 SOX4 的干预措施可能是 HSCR 临床诊断与治疗的新思路。

参考文献

- 1 朱天琦. 先天性巨结肠的诊断及治疗专家共识[J]. 中华小儿外科杂志, 2017, 38(11): 805-815. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3006. 2017. 11. 002.
Zhu TQ. Expert consensus of diagnosis and treatment of Hirschsprung's disease[J]. Chin J Pediatr Surg, 2017, 38(11): 805-815. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3006. 2017. 11. 002.
- 2 沈涤华, 施诚仁, 吴晔明, 等. 先天性巨结肠患儿肠道内 Smoothelin 的表达[J]. 中华小儿外科杂志, 2017, 38(4): 288-291. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3006. 2017. 04. 010.
Shen DH, Shi CR, Wu YM, et al. Expression levels of smoothelin in colonic tissues from patients with Hirschsprung's disease[J]. Chin J Pediatr Surg, 2017, 38(4): 288-291. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3006. 2017. 04. 010.
- 3 张建军, 刘丰丽, 唐维兵, 等. 深化的加速康复外科理念在婴儿先天性巨结肠症围手术期的应用[J]. 中华小儿外科杂志, 2019, 40(3): 245-248. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3006. 2019. 03. 011.
Zhang JJ, Liu FL, Tang WB, et al. Promoting perioperative application of enhanced recovery after surgery for infantile Hirschsprung's disease[J]. Chin J Pediatr Surg, 2019, 40(3): 245-248. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3006. 2019. 03. 011.
- 4 Borrego S, Ruiz-Ferrer M, Fernandez RM, et al. Hirschsprung's disease as a model of complex genetic etiology[J]. Histology & Histopathology, 2013, 28(9): 1117-1136. DOI: 10. 14670/HH-28. 1117.
- 5 牛鑫, 景雅, 李海荣, 等. 神经嵴细胞和胰岛因子-1 阳性细胞与小鼠胚胎心脏动脉端的发育[J]. 解剖学杂志, 2012, 35(5): 553-557. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-1633. 2012. 05. 001.
Niu X, Jing Y, Li HR, et al. Distribution patterns of neural crest cells and ISL-1 positive cells during the development of arterial pole of murine embryonic heart[J]. Chinese Journal of Anatomy, 2012, 35(5): 553-557. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-1633. 2012. 05. 001.
- 6 Luzón-Toro B, Gui H, Ruiz-Ferrer M, et al. Exome sequencing reveals a high genetic heterogeneity on familial Hirschsprung disease[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 16473. DOI: 10. 1038/srep16473.
- 7 Nishikawa R, Hotta R, Shimajima N, et al. Migration and differentiation of transplanted enteric neural crest-derived cells in murine model of Hirschsprung's disease[J]. Cytotechnology, 2015, 67(4): 661-670. DOI: 10. 1007/s10616-014-9754-8.
- 8 Rogers JM. Search for the missing lncs: gene regulatory networks in neural crest development and long non-coding RNA biomarkers of Hirschsprung's disease[J]. Neurogastroenterol Motil, 2016, 28(2): 161-166. DOI: 10. 1111/nmo. 12776.
- 9 Feng A, Yuan X, Li X. MicroRNA-345 inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer by targeting FOXQ1[J]. Oncology Reports, 2017, 38(5): 2752-2760. DOI: 10. 3892/or. 2017. 6001.
- 10 Liu Y, Wang Y, Xu Q, et al. Prognostic evaluation of microRNA-210 in various carcinomas[J]. Medicine, 2017, 96(43): e8113. DOI: 10. 1097/MD. 00000000000008113.
- 11 Zhang Z, Wang J, Li J, et al. MicroRNA-150 promotes cell proliferation, migration, and invasion of cervical cancer through targeting PDCD4[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 97: 511-517. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2017. 09. 143.
- 12 Sharan A, Zhu H, Xie H, et al. Down-regulation of miR-206 is associated with Hirschsprung disease and suppresses cell migration and proliferation in cell models[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 9302. DOI: 10. 1038/srep09302.
- 13 Gunadi, Budi Nyp, Kalim As, et al. Aberrant expressions of miRNA-206 target, FN1, in multifactorial Hirschsprung disease[J]. Orphanet J Rare Dis, 2019, 14(1): 5. DOI: 10. 1186/s13023-018-0973-5.
- 14 Zhu D, Xie H, Li H, et al. Nidogen-1 is a common target of microRNAs MiR-192/215 in the pathogenesis of Hirschsprung's disease[J]. J Clin Pediatr Surg, 2019, 18(3): 245-248. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3006. 2019. 03. 011.

- prung's disease [J]. Journal of Neurochemistry, 2015, 134 (1): 39-46. DOI:10.1111/jnc.13118.
- 15 Du G, Wang X, Wu Y, et al. Downregulation of miR-140-5p affects the pathogenesis of HSCR by targeting EGR2 [J]. Pediatr Surg Int, 2020, 36 (8): 883-890. DOI: 10.1007/s00383-020-04686-0.
 - 16 Li H, Zhou L, Zhi Z, et al. Lipopolysaccharide upregulates miR-132/212 in Hirschsprung-associated enterocolitis, facilitating pyroptosis by activating NLRP3 inflammasome via targeting Sirtuin 1 (SIRT1) [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12 (18): 18588-18602. DOI: 10.18632/aging.103852.
 - 17 Situ J, Zhang H, Jin Z, et al. MicroRNA-939 directly targets HDGF to inhibit the aggressiveness of prostate cancer via deactivation of the WNT/ β -Catenin pathway [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 4257-4270. DOI: 10.2147/OTT.S250101.
 - 18 Zhao X, Li J, Yu D. MicroRNA-939-5p directly targets IGF-1R to inhibit the aggressive phenotypes of osteosarcoma through deactivating the PI3K/Akt pathway [J]. Int J Mol Med, 2019, 44 (5): 1833-1843. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4333.
 - 19 Chen G, Du C, Shen Z, et al. MicroRNA-939 inhibits cell proliferation via targeting LRSAM1 in Hirschsprung's disease [J]. Aging (Albany NY), 2017, 9 (12): 2471-2479. DOI: 10.18632/aging.101331.
 - 20 Kavyanifar A, Turan S, Lie DC. SoxC transcription factors; multifunctional regulators of neurodevelopment [J]. Cell Tissue Res, 2018, 371 (1): 91-103. DOI: 10.1007/s00441-017-2708-7.
 - 21 Pan W, Yu H, Zheng B, et al. Upregulation of MiR-369-3p suppresses cell migration and proliferation by targeting SOX4 in Hirschsprung's disease [J]. J Pediatr Surg, 2017, 52 (8): 1363-1370. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2017.04.002.
 - 22 肖莉, 刘勇, 高亚. 小鼠胚胎肠神经嵴干细胞的分离培养及鉴定 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2007, 28 (5): 595-597. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8259.2007.05.034. Xiao L, Liu Y, Gao Y. Isolation, culturing and identification of murine embryonic enteric neural crest stem cells [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University, 2007, 28 (5): 595-597. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8259.2007.05.034.
 - 23 Fattahi F, Steinbeck JA, Kriks S, et al. Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease [J]. Nature, 2016, 531 (7592): 105-109. DOI: 10.1038/nature16951.
 - 24 肖俊, 李智. 肠神经系统发育的研究进展 [J]. 中华小儿外科杂志, 2018, 39 (12): 952. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2018.12.019. Xiao J, Li Z. Recent advances in the development of enteric nervous system [J]. Chin J Pediatr Surg, 2018, 39 (12): 952. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3006.2018.12.019.
 - 25 Li H, Tang J, Lei H, et al. Decreased MiR-200a/141 suppress cell migration and proliferation by targeting PTEN in Hirschsprung's disease [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2014, 34 (2): 543-553. DOI: 10.1159/000363021.
 - 26 Lv X, Li Y, Li H, et al. Molecular function predictions and diagnostic value analysis of plasma exosomal miRNAs in Hirschsprung's disease [J]. Epigenomics, 2020, 12 (5): 409-422. DOI: 10.2217/epi-2019-0190.
 - 27 Yoon TM, Kim SA, Cho WS, et al. SOX4 expression is associated with treatment failure and chemoradioresistance in oral squamous cell carcinoma [J]. BMC Cancer, 2015, 15 (1): 888. DOI: 10.1186/s12885-015-1875-8.
 - 28 Wang B, Li Y, Tan F, et al. Increased expression of SOX4 is associated with colorectal cancer progression [J]. Tumor Biology, 2016, 37 (7): 9131-9137. DOI: 10.1007/s13277-015-4756-5.

(收稿日期: 2020-12-15)

本文引用格式: 田东浩, 许文耀, 余辉, 等. 先天性巨结肠中 miR-939 靶向调控 SOX4 表达抑制肠神经嵴前体细胞功能表型的实验研究 [J]. 临床小儿外科杂志, 2021, 20 (3): 222-229. DOI: 10.12260/lcxewkzz.2021.03.005.

Citing this article as: Tian DH, Xu WY, Yu H, et al. Experimental study of miR-939 regulating the phenotypic features of ENCCs by targeting SOX4 in Hirschsprung's disease [J]. J Clin Ped Sur, 2021, 20 (3): 222-229. DOI: 10.12260/lcxewkzz.2021.03.005.