

## • 药理与临床 •

## 黑树莓花青素靶向调控 miR-338-5p/SIRT1 相关信号通路对结直肠癌的化学预防作用

郭君<sup>1</sup>, 毛丽萍<sup>1</sup>, 李倩倩<sup>1</sup>, 张秋华<sup>2</sup>, 李晓龙<sup>3</sup>, 毕秀丽<sup>1\*</sup>

1. 辽宁大学生命科学院 生物技术系, 辽宁 沈阳 110036
2. 辽宁中医药大学基础医学院 药理系, 辽宁 沈阳 110847
3. 深圳福山生物科技有限公司, 广东 深圳 518000

**摘要:** 目的 研究 miR-338-5p/SIRT1 相关信号通路在黑树莓花青素化学预防结直肠癌中的作用。方法 小鼠分为健康对照组, 氧化偶氮甲烷 (AOM) /葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的炎症相关性结直肠癌小鼠模型组, AOM/DSS 诱导联合黑树莓花青素处理组。利用 miRNA 基因芯片筛选差异表达 miRNAs, 选定 miR-338-5p, 采用 RT-qPCR 确认 miR-338-5p 在小鼠结肠组织及在人结直肠癌细胞株 Caco-2、LoVo、HCT-116、HT29、SW480 中的 mRNA 表达, 生物信息学软件预测 miR-338-5p 和 SIRT1 靶向调节关系。Western blotting 检测小鼠结肠组织中 SIRT1 蛋白及其下游 mTOR 等信号通路相关蛋白表达。结果 miRNA 基因芯片分析发现, 与常规饮食的模型小鼠相比, 喂食添加黑树莓花青素的模型小鼠结肠肿瘤组织中 miR-338-5p 表达量显著减少, 进一步研究几种结肠癌细胞系, 确认了 miR-338-5p 表达趋势; 黑树莓花青素处理结直肠癌细胞, miR-338-5p 的表达能够显著降低。生物信息学预测 miR-338-5p 和 SIRT1 存在靶向调节关系。机制研究发现黑树莓花青素可以促进肠上皮细胞 SIRT1 蛋白的表达, 并对其下游 mTOR 等相关信号通路分子蛋白水平具有调控作用。结论 黑树莓花青素可能通过靶向调控 miR-338-5p/SIRT1 相关信号通路而发挥对结直肠癌的化学预防作用, 进而为结直肠癌提供新的化学预防策略。

**关键词:** 黑树莓; 花青素; 结直肠癌; miR-338-5p; SIRT1; 化学预防

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)04-0853-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.016

## miR-338-5p/SIRT1 signaling pathway involved in black raspberry anthocyanin colorectal cancer chemoprevention

GUO Jun<sup>1</sup>, MAO Li-ping<sup>1</sup>, LI Qian-qian<sup>1</sup>, ZHANG Qiu-hua<sup>2</sup>, LI Xiao-long<sup>3</sup>, BI Xiu-li<sup>1</sup>

1. Department of Biotechnology, College of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China
2. Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China
3. Shenzhen Fushan Biotechnology, Shenzhen 518000, China

**Abstract: Objective** To investigate the role of miR-338-5p/SIRT1-related signaling pathway in the treatment of colorectal cancer by the chemopreventive effects of black raspberry (BRB) anthocyanins. **Methods** Mice were divided into normal healthy control group, AOM/DSS-induced colorectal cancer groups with or without BRB anthocyanin. miRNA microarray was used to investigate differentially expressed miRNAs and RT-qPCR was applied to verify the expression of selected miR-338-5p/SIRT1 in colon tissue of mice and human colorectal cancer cell lines of Caco-2, LoVo, HCT-116, HT29, and SW480. TargetScan and miRanda bioinformatics software was used to predict the targeted regulation relationships between miR-338-5p and SIRT1. The expression of SIRT1 protein in colon tissue of mice and downstream signaling pathway-related proteins were determined by Western blotting. **Results** miRNA microarray differential analysis demonstrated that the expression of miR-338-5p was significantly reduced in colon tissues of AOM/DSS induced mice fed with BRB anthocyanin. While after 9 weeks administration of BRB anthocyanins, the level of miR-338-5p in AOM/DSS induced mice was decreased. The expression pattern of miR-338-5p was confirmed in the colon tissue and several colon cancer cell lines. Meanwhile, colorectal cancer cells

收稿日期: 2017-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81272333, 81472821)

作者简介: 郭君 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为结直肠肿瘤化学预防。E-mail: 960298382@qq.com

\*通信作者 毕秀丽 (1977—), 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为肿瘤发生机制与肿瘤化学预防。E-mail: xiulibi@gmail.com

were treated with BRB anthocyanin, miR-338-5p expression was reduced. TargetScan and miRanda predicted that the SIRT1 was one of target genes of miR-338-5p. BRB anthocyanins could promote the expression of SIRT1 protein in intestinal epithelial cells and regulate the protein levels of downstream molecules including mTOR *et al.* **Conclusion** miR-338-5p/SIRT1-related signaling pathway might involve in the chemoprevention effects of BRB anthocyanin on colorectal cancer, which provided a new strategy for chemoprevention of colorectal cancer.

**Key words:** black raspberry; anthocyanins; colorectal cancer; miR-338-5p; SIRT1; chemoprevention

微小 RNA (micro RNAs, miRNAs) 是在动植物中发现的一个大小为 19~25 bp 非蛋白质编码的小分子 RNA 家族。通过与靶基因 mRNA 作用,使其在转录后的翻译过程被抑制或直接被降解致其蛋白表达水平降低,从而参与多种生物学过程,如细胞发育、增殖、分化、凋亡以及代谢等<sup>[1-3]</sup>。miRNAs 也可以发挥癌基因或抑癌基因作用参与人体多种肿瘤的发生和发展。结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,在欧美国家报告的发病率最高,其发病率在我国呈现上升趋势。研究发现,多个 miRNAs 在结直肠癌中表达异常,在结直肠癌的发生、发展中发挥重要作用。过表达 miR-155-5p 可增加结肠癌增殖和侵袭能力<sup>[4]</sup>。miR-433 通过调节结直肠癌中的结直肠癌转移相关基因 1 (MACC1) 来降低细胞活力并促进细胞凋亡<sup>[5]</sup>。miR-338-5p 为 miR-338 的亚型之一,miR-338 及其亚型在胃癌<sup>[6-7]</sup>和神经母细胞瘤<sup>[8]</sup>中表达下调,在宫颈癌<sup>[9]</sup>和胰腺癌<sup>[10]</sup>中高表达,在结直肠癌中,Sun 等<sup>[11]</sup>发现 miR-338-3p 低表达,通过作用于 SMO (smoothened, 一种原癌基因) 抑制结直肠癌的细胞增殖。在肝癌中,有研究发现 miR-338-5p 表达上调,可以作为肝细胞癌生物标记物<sup>[12]</sup>。但是 miR-338-5p 在结直肠癌中的研究较少。

黑树莓 (black raspberry, BRB) 属蔷薇科悬钩子属浆果,是北美膳食中食用量较大的水果,在我国其作为水果也越来越多的受到人们的喜爱。研究证明黑树莓中含有大量的活性物质,如酚酸类、黄酮类、原花青素和鞣质等酚类化合物<sup>[13]</sup>。酚类化合物已被证实具有促进脂类代谢及自由基清除等生理作用,人们已经获得证据表明酚类化合物在预防人类某些疾病方面有一定功效,如预防心脑血管疾病、癌症等方面<sup>[14]</sup>。前期研究证明黑树莓中原花青素和鞣花酸类含量丰富,对于癌症的预防有很好的作用,尤其对结直肠癌<sup>[15-16]</sup>、食管癌<sup>[17]</sup>等有一定的预防及治疗作用。但是黑树莓能否通过影响 miRNAs 表达发挥对结直肠癌的预防作用尚未见报道。本研究利用化学致癌物氧化偶氮甲烷 (AOM) / 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 联合诱导的炎症相关性结直肠癌小鼠模型,饮食给予黑树莓花青素,考察黑树

莓花青素对结肠组织和结直肠癌细胞中表达异常的 miRNAs 的影响,选定 miR-338-5p 进行后续研究,初步探索 miR-338-5p 在结直肠癌化学预防中的作用机制。此研究将为黑树莓的肿瘤化学预防作用和作用机制提供新的理论依据,miR-338-5p 的研究有望成为结直肠癌的化学预防新靶点。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

C57 小鼠雄性,体质量 18~22 g,辽宁长生生物技术有限责任公司,合格证号 SCXK-(辽)-2015-0001。

### 1.2 实验细胞

10 代以内人结直肠癌细胞株 Caco-2、LoVo、HCT-116、HT29、SW480,来源于中国科学院北京协和肿瘤医院。

### 1.3 主要试剂

MiRNA cDNA Synthesis Kit (CW2141, 25Rxns)、miRNA Real-Time PCR Assay Kit (CW2142, 100Rxns) 购自北京康为世纪生物科技有限公司; Anti-SIRT1 抗体 (D121218-0200)、Anti-SIRT3 抗体 (D221219-0200)、Anti-HIF-1 $\alpha$  抗体 (D262108-0010) 购自上海生工生物有限公司; Anti- $\beta$ -actin 抗体 (AB10024) 购自 BBI 公司; Anti-VEGF 抗体 (GTX102643) 购自 GeneteX 公司; Anti-E-cadherin 抗体 (3195s) 购自 Cell Signaling Technology 公司; Anti-mTOR 抗体 (BS3611) 购自 Bioword Technology 公司; Trizol (B900044-100) 购自 BBI 公司; RIPA 裂解液 (R0010) 购自索莱宝生物科技有限公司; AOM (A5486) 和 DSS (42867) 购自 Sigma 公司。

### 1.4 主要仪器

Applied Biosystems 7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; 高速冷冻离心机购自安徽中科中佳科学仪器有限公司; 化学发光仪购自以色列 DNR 公司。

## 2 方法

### 2.1 黑树莓花青素的提取

黑树莓花青素由天津尖峰天然产物提取有限责任公司提取 (批号 20130901), 质量分数 >90%。提取步骤简述如下: 冷冻干燥的黑树莓冻干粉在 35 °C 用乙醇-水 (75:25) 萃取 3 h, 得到粗酚提取液。将所

得提取物滤过, 色谱分离, 经 Sephadex 进一步色谱, 通过制备型 HPLC 纯化得到提纯的黑树莓花青素。

## 2.2 实验动物模型制备

C57 小鼠 (18~22 g), 适应 1 周后, 开始造模, 首先在第 1、8 天小鼠单次 ip AOM (10 mg/kg), 然后 2% DSS 饮水进行 3 个循环, 即 1、4、7 周分别给予 2% DSS 饮水, 其他时间均为正常饮水, 实验周期为 12 周, 检测小鼠肠中的肿瘤情况以确认模型是否成功。该研究由辽宁中医药大学伦理委员会批准。模型成功小鼠分 2 组, 模型组为 AOM/DSS 诱导的结直肠癌小鼠 (10 只), 给予正常饲料; 黑树莓花青素组为 AOM/DSS 诱导的结直肠癌小鼠 (10 只), 自造模开始给予含 7.0  $\mu\text{mol/g}$  黑树莓花青素饲料, 直到造模结束; 另取正常喂养状况良好的 C57 小鼠 (7 只), 给予正常饲料为对照组。在第 12 周造模结束, 将小鼠断颈处死, 另取结肠组织、提取上皮细胞-80  $^{\circ}\text{C}$  保存。7.0  $\mu\text{mol/g}$  黑树莓花青素剂量的选择参照前期研究中 10% 黑树莓冻干粉的剂量, 结合花青素的提取比例计算而来<sup>[16]</sup>。

## 2.3 人结直肠癌细胞处理、收集

Caco-2、LoVo、HCT-116、HT29、SW480 细胞复苏, 待细胞生长到 90% 贴壁时取约  $2 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板, 每孔补充培养基至 2 mL。实验分为对照组, 黑树莓花青素低剂量 (25  $\mu\text{g/mL}$ ) 组和高剂量 (50  $\mu\text{g/mL}$ ) 组, 药物处理细胞 48 h, 收集细胞备用。

## 2.4 miRNA 基因芯片检测

取结肠组织进行 Agilent Mouse miRNA (8\*60 K, Design ID: 070155) 芯片检测, 完成 10 个样本检测和分析。样品总 RNA 利用 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific 公司) 定量并经 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) 检测 RNA 完整性。RNA 质检合格后, 对样本进行标记、芯片的杂交以及洗脱等处理, 此步骤是参照芯片标准流程严格操控的。第 1 步: 将总 RNA 去磷酸化, 变性后进一步用 Cyanine-3-CTP (Cy3) 标记。第 2 步: 将标记好的 RNA 纯化后与芯片杂交, 洗脱后利用 Agilent Scanner G2505C (Agilent Technologies 公司) 扫描得到原始图像。第 3 步: 采用 Feature Extraction 软件 (version10.7.1.1, Agilent Technologies 公司) 处理原始图像提取原始数据。接着利用 Genespring 软件 (version13.1, Agilent Technologies 公司) 进行 quantile 标准化和后续处理。最后, 对差异 miRNAs 进行非监督层次聚类, 利用热图的形式展示差异

miRNAs 在不同样本间的表达模式。上述 miRNA 基因芯片检测分析由上海欧意公司完成。

## 2.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 miR-338-5p 的表达量

RT-qPCR 检测组织和细胞 miR-338-5p 的表达量, 组织及细胞用 Trizol 试剂提取总 RNA, 参照 micro RNA 逆转录试剂盒说明书行逆转录, RT-qPCR 反应采用 SYBR 染料法, 选用 U6 作为内参基因, 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 miR-338-5p 相对表达量, mmu-miR-338-5p 引物序列: 5'-GAACAATATCCTGGTGCTGAGTG-3'; hsa-miR-338-5p 引物序列: 5'-TGAACAATATCCTGGT-GCTGAGTG-3'。

## 2.6 生物信息学分析 miR-338-5p 的靶基因

利用 TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/))、miRanda (<http://www.microna.org/microna/home.do>) 在线软件分析 miR-338-5p 和沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 的靶向关系。

## 2.7 Western blotting 检测相关蛋白表达

蛋白质印迹法检测结肠癌组织上皮细胞 SIRT1 蛋白及其下游 mTOR 等相关信号通路分子蛋白。结肠组织上皮细胞, 加入 RIPA 裂解液和 PMSF 蛋白酶抑制剂提取总蛋白, BCA 法测定蛋白含量。20  $\mu\text{g}$  总蛋白上样, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 封闭, 孵育一抗、二抗, 凝胶成像系统拍照、分析。

## 2.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 组间比较采用 *t* 检验及方差分析, Image J 和 Graphpad Prism 5.0 进行统计绘图。

## 3 结果

### 3.1 miRNA 基因芯片结果

从小鼠结肠组织 miRNA 基因芯片结果发现, 模型组和黑树莓花青素组的小鼠结肠组织中所有 miRNAs 表达特征共发现 6 个差异表达 miRNAs (差异倍数 > 2.5), 将差异表达 miRNAs 聚类分析。miR-338-5p 在模型组小鼠中高水平表达, 在给予黑树莓花青素饮食 12 周后, 其表达水平显著下调 (图 1), 提示 miR-338-5p 在黑树莓花青素抑制肿瘤形成和化学预防中可能发挥作用。

### 3.2 小鼠结肠组织和结直肠癌细胞系 miR-338-5p 表达量

为了进一步验证 miRNA 基因芯片结果。通过

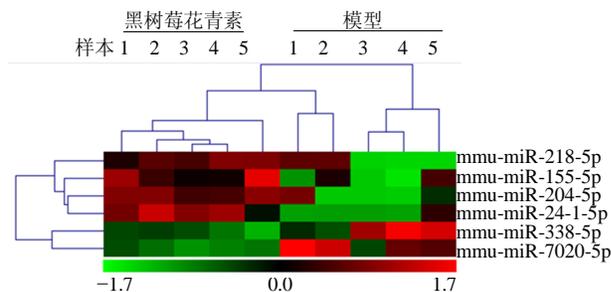
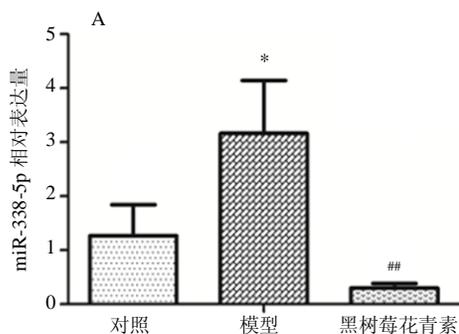


图 1 小鼠结肠组织 miRNA 芯片聚类分析模型组和黑树莓花青素组差异表达 miRNAs

Fig. 1 Differential expression analysis of miRNAs by hierarchical clustering in AOM/DSS induced mice with or without BRB anthocyanin group

RT-qPCR 检测小鼠结肠组织和结直肠癌细胞系中 miR-338-5p 的表达量变化。同对照组比较, 模型组小鼠组织中 miR-338-5p 显著上调; 喂食黑树莓花青素组小鼠组织中 miR-338-5p 显著下调 (图 2-A)。体外细胞水平, 黑树莓花青素处理后结直肠癌细胞 miR-338-5p 表达量同样下调 (图 2-B), 与基因芯片结果相符。提示 miR-338-5p 表达参与了黑树莓花青素结直肠肿瘤的化学预防作用。

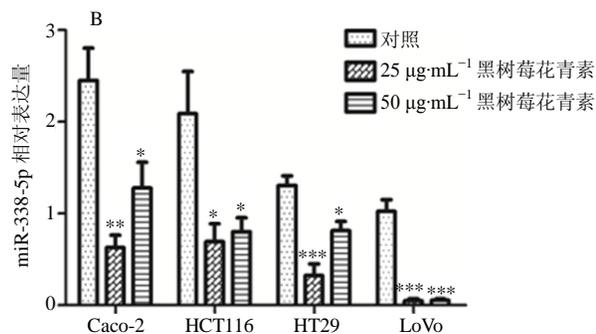


### 3.3 生物统计软件预测 SIRT1 基因是 MiR-338-5p 的靶基因

进一步利用生物信息学软件分析预测, miR-338-5p 的种子区域和 SIRT1 基因 3'UTR 存在互补配对的序列 (图 3), 因此生物信息学分析认为 SIRT1 可能是 miR-338-5p 的靶基因。

### 3.4 小鼠结肠组织上皮细胞 SIRT1 蛋白及 mTOR 等相关信号通路分子检测

进一步对上述生物信息分析预测结果进行验证, 考察了 SIRT1 蛋白及其介导的下游信号通路相关分子的表达。结果 (图 4) 发现, 与模型组相比, 黑树莓花青素组 SIRT1 蛋白、E-cadherin 蛋白表达升高, 下游相关信号通路相关分子 mTOR、SIRT3、HIF-1 $\alpha$  的表达下降。SIRT1 抑制结直肠癌的发生和发展, SIRT1 表达上调抑制 mTOR 蛋白表达<sup>[18]</sup>。mTOR 可以从转录水平激活 HIF-1 $\alpha$  的表达, 所以相应的 HIF-1 $\alpha$  表达下调<sup>[19]</sup>。HIF-1 $\alpha$  可以通过控制 VEGF 的编码基因来调节 VEGF 的表达, HIF-1 $\alpha$  表达受抑制, 相应 VEGF 的表达也受抑制<sup>[20]</sup>。所以, 当前研究提示黑树莓花青素可以通过影响 miR-338-5p, 进而调控 SIRT1 蛋白的表达, 调控结直肠癌的发生发展。



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组: ## $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group

图 2 RT-qPCR 检测小鼠结肠组织 (A) 和人结直肠癌细胞系 (B) miR-338-5p 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 miR-338-5p expression in colon tissue of mice (A) and human CRC cell lines (B) confirmed by RT-qPCR ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



图 3 生物信息学分析 miR-338-5p 和 SIRT1 的序列匹配规律

Fig. 3 Bioinformatics analysis of sequence alignment of miR-338-5p and SIRT1

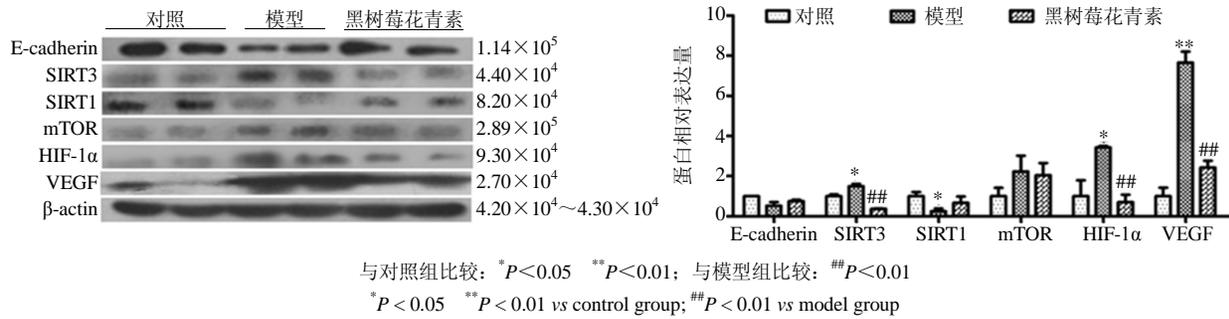


图 4 黑树莓花青素对小鼠结肠组织上皮细胞中 SIRT1 信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effects of BRB anthocyanin on SIRT1 and related signaling pathway factors in mouse colon epithelial cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.5 黑树莓花青素在结直肠癌中发挥化学预防作用的机制

经过上述实验验证, 推测在结直肠癌的发生发展中, 黑树莓花青素能通过多重作用激活 SIRT1 及其介导的下游相关信号通路分子来发挥对结直肠癌的化学预防作用。在此过程中 miR-338-5p 作为黑树莓和 SIRT1 相关信号通路的中间信使, 传递黑树莓花青素化学预防作用, 并通过自身的靶向功能, 作用于 SIRT1 相关信号通路 (图 5)。

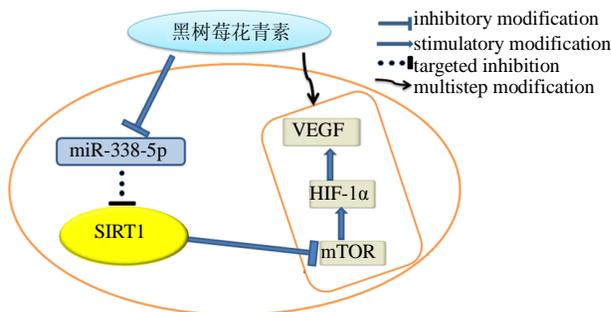


图 5 黑树莓花青素在结直肠癌化学预防中的作用机制

Fig. 5 Schematic diagram of pharmacological mechanism of BRB anthocyanins in the chemoprevention of colorectal cancer

## 4 讨论

酚类化合物是植物体极为重要的次生代谢产物, 由于酚类物质在预防疾病方面的发现, 作为化学预防剂广泛应用, 刘秀芳等<sup>[21]</sup>研究证明了茶多酚抑制结直肠癌细胞生长。杏仁中鞣花酸含量丰富, 鞣花酸在诸多物质中显示出具有抗癌性, 通过影响信号转导通路抑制结直肠癌细胞增殖<sup>[22-23]</sup>。黑树莓中原花青素和鞣花酸类含量丰富, 在前期的研究中发现黑树莓花青素能抑制结直肠癌细胞的增殖, 迁移, 抑制肿瘤的发生发展<sup>[24]</sup>。本研究中, 小鼠组织 miRNA 基因芯片研究结果及体外细胞体系深入机制研究发现: 黑树莓花青素能通过下调 miR-338-5p,

从而激活 miR-338-5p 的靶蛋白 SIRT1 及其介导的下游相关信号通路分子, 来发挥对结直肠癌的化学预防作用。

本研究中发现利用 RT-qPCR 检测 miR-338-5p 在结直肠癌组织相比于正常组织表达量升高, miR-338-5p 作为癌基因发挥作用, 同时生物信息学的预测发现 miR-338-5p 与 SIRT1 可能是有靶向关系的。SIRT-1 是 NAD<sup>+</sup> 依赖性 III 类组蛋白脱乙酰酶的成员, 其参与多种病理生理过程, 例如抗炎, 调节细胞生长和代谢, 抗癌发生<sup>[25-27]</sup>。SIRT1 使 β-catenin 脱乙酰基, 从而抑制 β-catenin 的激活转录和细胞增殖<sup>[28]</sup>。SIRT3 的作用与 SIRT1 相反。SIRT1 的升高会降低 mTOR 表达量<sup>[16]</sup>。mTOR 可以从转录水平激活 HIF-1α 的表达<sup>[17]</sup>。HIF-1α 在结直肠癌增殖、侵袭和转移的发生中的表达, HIF-1α 通过控制 VEGF 的编码基因从而来控制 VEGF 的表达, 进而促进血管生成<sup>[18]</sup>。SIRT1 能够抑制结直肠癌的发展和进展。本研究中相比于 AOM/DSS 模型组, 黑树莓组结直肠组织中 SIRT1 蛋白表达量提高, 下游 mTOR 等信号通路相关蛋白表达量也发生变化, 黑树莓能通过某种方式调控 SIRT1 信号通路, 而且黑树莓降低 miR-338-5p 表达同时提高 SIRT1 蛋白表达, 同样证实 miR-338-5p 与 SIRT1 可能是有靶向关系的。

综上所述, 黑树莓花青素能通过调控 miR-338-5p/SIRT1 信号通路影响结直肠癌的发生发展, 从而发挥对结直肠癌的化学预防作用, 上述研究结果为结直肠癌提供新的化学预防和治疗策略。

### 参考文献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Le X F, Merchant O, Bast R C, *et al*. The roles of

- microRNAs in the cancer invasion-metastasis cascade [J]. *Cancer Microenviron*, 2010, 3(1): 137-147.
- [3] Kim S W. The role of microRNAs in colorectal cancer [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2017, 69(4): 206-211.
- [4] Qu Y L, Wang H F, Sun Z Q, *et al.* Up-regulated miR-155-5p promotes cell proliferation, invasion and metastasis in colorectal carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6988-6994.
- [5] Li J, Mao X, Wang X, *et al.* miR-433 reduces cell viability and promotes cell apoptosis by regulating MACC1 in colorectal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1): 81-88.
- [6] Li P, Chen X, Su L, *et al.* Epigenetic silencing of miR-338-3p contributes to tumorigenicity in gastric cancer by targeting SSX2IP [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66782.
- [7] Chen J T, Yao K H, Hua L, *et al.* MiR-338-3p inhibits the proliferation and migration of gastric cancer cells by targeting ADAM17 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10922-10928.
- [8] Chen X, Pan M, Han L, *et al.* miR-338-3p suppresses neuroblastoma proliferation, invasion and migration through targeting PREX2a [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(22): 3729-3737.
- [9] Cheung T H, Man K N, Yu M Y, *et al.* Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(15): 2876-2884.
- [10] Yu J, Li A, Hong S M, *et al.* MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(4): 981-992.
- [11] Sun K, Deng H J, Lei S T, *et al.* miRNA-338-3p suppresses cell growth of human colorectal carcinoma by targeting smoothed [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(14): 2197-2207.
- [12] Chen Y, Chen J, Liu Y, *et al.* Plasma miR-15b-5p, miR-338-5p, and miR-764 as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 1864-1871.
- [13] Lee J. Marketplace analysis demonstrates quality control standards needed for black raspberry dietary supplements [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2014, 69(2): 161-167.
- [14] Wang L S, Hecht S S, Carmella S G, *et al.* Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2009, 2(1): 84-93.
- [15] Maria S D, Scognamiglio I, Lombardi A, *et al.* Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces cell cycle arrest and differentiation of human colorectal Caco-2 cell [J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1): 264.
- [16] Bi X L, Fang W, Wang L S, *et al.* Black raspberries inhibit intestinal tumorigenesis in *apc1638+/-* and *Muc2-/-* mouse models of colorectal cancer [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(11): 1443-1450.
- [17] Kresty L A, Morse M A, Morgan C, *et al.* Chemoprevention of esophageal tumorigenesis by dietary administration of lyophilized black raspberries [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16): 6112-6119.
- [18] Ghosh H S, McBurney M, Robbins P D. SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9199.
- [19] Brugarolas J B, Vazquez F, Reddy A, *et al.* TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and-independent pathways [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(2): 147-158.
- [20] Xu Q, Briggs J, Park S, *et al.* Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways [J]. *Oncogene*, 2005, 24(36): 5552-5560.
- [21] 刘秀芳, 金黑鹰, 丁义江. 抗突变中药对错配修复基因缺失结肠癌细胞的抑制作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(20): 2201-2204.
- [22] Qiu Z, Zhou B, Jin L, *et al.* *In vitro* antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59: 428-437.
- [23] Mishra S, Vinayak M. Ellagic acid induces novel and atypical PKC isoforms and promotes caspase-3 dependent apoptosis by blocking energy metabolism [J]. *Nutr Cancer*, 2014, 66(4): 675-681.
- [24] 毕秀丽, 赵余庆, Stoner G D. 美国黑树莓的肿瘤预防生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2295-2299.
- [25] Howitz K T, Bitterman K J, Cohen H Y, *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan [J]. *Nature*, 2003, 425(6954): 191-196.
- [26] Kojima K, Ohhashi R, Fujita Y, *et al.* A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(3): 423-428.
- [27] Ford J, Jiang M, Milner J. Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(22): 10457-10463.
- [28] Firestein R, Blander G, Michan S, *et al.* The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth [J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e2020.