

miR-205-5p 靶向 ERBB3 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制 血管生成在痔疮中的分子机制

李志霄¹⁾, 郑霞¹⁾, 李春玲²⁾, 刘庆圣²⁾, 张衡²⁾
(1) 云南中医药大学第三附属医院, 云南昆明 650500;
2) 昆明市中医医院肛肠科, 云南昆明 650500)

[摘要] 目的 探讨 miR-205-5p 靶向 ERBB3 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制血管生成在痔疮中的分子机制。方法 收集 2021 年 07 月至 2022 年 06 月临床 12 例患者的痔核和正常肛周组织, 通过 qRT-PCR 检测临床病理样本中 miR-205-5p 和 ERBB3 的表达情况, 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-205-5p 与 ERBB3 的靶向关系。将 miR-205-5p mimic、pcDNA-ERBB3、miR-205-5p inhibitor、sh-ERBB3、oe-ERBB3 及阴性对照质粒分别或共同转染至痔疮模型大鼠和 HUVEC 细胞。HE、TUNEL 染色观察组织病理和细胞凋亡情况, 免疫组化检测 ERBB3、VEGFR2 蛋白定位及表达水平, Western blot 检测 ERBB3、VEGFR2、Cyclin D1、Cleaved-caspase 3、Bax、Bcl-2 和 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白的表达水平。MTT、划痕愈合、Transwell 实验、流式细胞术、血管形成实验检测各组 HUVEC 细胞增殖、迁移、侵袭能力、凋亡率和血管生成量。结果 痔疮临床样本中 miR-205-5p 呈低表达, ERBB3 呈高表达 ($P < 0.001$), miR-205-5p 与 ERBB3(WT) 的 3'UTR 靶向结合 ($P < 0.001$)。miR-205-5p mimic 组痔疮大鼠和 HUVEC 细胞中 ERBB3 表达量显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), VEGFR2 ($P < 0.001$)、Cyclin D1 ($P < 0.01$)、Bcl-2 ($P < 0.001$)、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR ($P < 0.001$) 水平显著下调, Cleaved-caspase 3 和 Bax 水平显著上调 ($P < 0.01$), 大鼠肛周组织病理状况改善, HUVEC 细胞增殖、迁移和侵袭力均降低 ($P < 0.001$), 凋亡率升高 ($P < 0.001$), 血管生成数量及分支减少 ($P < 0.001$), pcDNA-ERBB3 逆转了这一效应 ($P < 0.001$)。结论 miR-205-5p 能通过靶向抑制 ERBB3 表达, 下调 PI3K/AKT/mTOR 通路活性, 抑制细胞增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡, 减少血管生成, 从而缓解痔疮进展。

[关键词] 痔疮; miR-205-5p; ERBB3; PI3K/AKT/mTOR 通路; 血管生成

[中图分类号] R657.18 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)06-0022-14

The Molecular Mechanism of miR-205-5p Targeting ERBB3 to Regulate PI3K/AKT/mTOR Pathway and Inhibit Angiogenesis in Hemorrhoids

LI Zhixiao¹⁾, ZHENG Xia¹⁾, LI Chunling²⁾, LIU Qingsheng²⁾, ZHANG Heng²⁾

(1) The 3rd Affiliated Hospital of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650500; 2) Dept. of Anorectal, Kunming Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To explore the molecular mechanism of miR-205-5p targeting ERBB3 to regulate PI3K/AKT/mTOR pathway and inhibit angiogenesis in hemorrhoids. **Methods** The hemorrhoidal nucleus and normal perianal tissues of 12 patients from July 2021 to June 2022 were collected, the expression of miR-205-5p and ERBB3 in the samples was detected by qRT-PCR, and the targeting relationship was verified by dual-

[收稿日期] 2024-01-27

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2023Y0436); 云南省科技厅科技计划基金资助项目 (202101AZ070001-245)。

[作者简介] 李志霄(1997~), 男, 云南曲靖人, 在读硕士研究生, 主要从事中医肛肠疾病的防治与研究工作。

[通信作者] 张衡, E-mail: 296114872@qq.com

luciferase. miR-205-5p mimic, pcDNA-ERBB3, miR-205-5p inhibitor, sh-ERBB3, oe-ERBB3 and negative control plasmids were respectively or co-transfected into hemorrhoidal model rats and HUVEC cells. The pathological changes and apoptosis of perianal tissue in each group were observed by HE and TUNEL staining, and the localization of expression of ERBB3 and VEGFR2 proteins were detected by immunohistochemistry, and the expression levels of ERBB3, VEGFR2, Cyclin D1, cleaved-caspase 3, Bax, Bcl-2 and PI3K/AKT/mTOR pathway related proteins were detected by Western blot. The proliferation, migration, invasion, apoptosis and angiogenesis of HUVEC were detected by MTT, wound healing, transwell, flow cytometry and angiogenesis assay. **Results** MiR-205-5p was lowly expressed and ERBB3 was highly expressed in clinical samples of hemorrhoids ($P < 0.001$), and miR-205-5p targeted the 3'UTR of ERBB3 (WT) ($P < 0.001$). The expression of ERBB3 in hemorrhoidal rats and HUVEC cells in miR-205-5p mimic group was significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.001$), and the levels of VEGFR2 ($P < 0.001$), Cyclin D1 ($P < 0.01$), Bcl-2 ($P < 0.001$), p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, p-mTOR/mTOR ($P < 0.001$) were significantly down-regulated, the levels of Cleaved-caspase 3 and Bax were significantly up-regulated ($P < 0.01$), the perianal histopathology of rats was improved, the proliferation, migration and invasion activities of HUVEC cells were reduced ($P < 0.001$), the apoptosis rate was increased ($P < 0.001$), and the number and branches of angiogenesis were reduced ($P < 0.001$), and these effects were eventually reversed by pcDNA-ERBB3 ($P < 0.001$). **Conclusion** MiR-205-5p can reduce angiogenesis and relieve hemorrhoids by targeting the inhibition of ERBB3 expression, down-regulating the activity of PI3K/AKT/mTOR pathway, inhibiting cell proliferation, migration and invasion, and promoting apoptosis.

[**Key words**] Hemorrhoids; miR-205-5p; ERBB3; PI3K/AKT/mTOR pathway; Angiogenesis

痔疮(Hemorrhoids)是正常解剖学肛垫向下移位所导致一系列症状的一种常见的肛门直肠良性疾病。在国际公认的痔疮发病机制研究中,静脉曲张学说和血管增生学说的认可度最高^[1-2],尽管血管增生正在被更多的研究证实,但细胞异常增殖、迁移和血管新生与基因表达调控的关系仍是研究的难点,其表观遗传机制还有待进一步研究。微小RNA(microRNAs, miRNAs)作为表观遗传调节因子,在痔疮发病中参与相关蛋白和多种通路的调控^[3-4]。研究发现,miR-412-5p可以靶向 xpo1 调控痔核组织的血管增生^[5]。此外, METTL14 表达受 miR-4729 调控,影响痔疮血管内皮细胞的增殖,从而调节血管生成^[6]。因此,研究 miRNAs 在痔疮血管生成中的应用极为重要。miR-205-5p 是 miRNAs 的 1 种亚型,目前已被证实参与多种疾病的血管生成^[7-8]。比如 miR-205-5p 通过靶向负调控 VEGFA 和磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target protein of rapamycin, mTOR)信号通路在肾细胞癌中抑制细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成^[9]。miR-205-5p 过表达能直接靶向 VEGF 抑制 PI3K/AKT 通路,降低细胞活力,诱导细胞凋亡进而拮抗瘢痕疙瘩^[10]。miRNAs 种类繁多,探究多种 miRNAs 在痔疮形成中的作用机制,可

能为治疗痔病提供更多的理论基础。然而,miR-205-5p 在痔疮中的表达和转录后调控痔病发生发展的机制尚未明确。因此,本研究将分析 miR-205-5p 在痔疮中的作用机制。

ERBB2 受体酪氨酸激酶 3 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 3, ERBB3)是位于细胞表面的酪氨酸激酶受体ERBB 家族成员之一,具有促进肿瘤细胞增殖、分化、迁移的能力^[11]。ERBB3 可参与鼻咽癌内皮细胞增殖和血管生成的调控^[12]。ERBB3/4 配体刺激人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)可诱导钙离子快速流动、受体酪氨酸磷酸化和细胞增殖,促进血管形成^[13]。PI3K/AKT/mTOR 通路广泛参与细胞增殖、粘附、迁移、侵袭、代谢等多种信号传导和生物学过程,在调节血管生成中发挥重要作用^[14]。然而 miR-205-5p 能否通过 ERBB3 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路影响痔病发生发展目前尚不清楚。鉴于此,本研究选取临床病理样本检测 miR-205-5p 和 ERBB3 的表达量,预测并验证两者的靶向关系,通过动物和细胞实验,进一步探讨 miR-205-5p 是否通过靶向 ERBB3 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路,影响血管内皮细胞增殖和血管生成,进而缓解痔疮。这项研究可能为阐明痔疮发病机制和寻找新的治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料

1.1.1 临床样本 选取 2021 年 07 月至 2022 年 06 月期间昆明市中医医院肛肠科 12 例痔疮手术患者的痔核组织、痔核 3 cm 外正常肛周组织, 分别标记为疾病组和正常组。所有患者年龄在 28 ~ 50 岁之间, 纳入标准: 患者以痔疮脱出肛门外、瘙痒、便血为主要临床表现。排除标准^[15]: 严重肾、肝、心脑血管疾病、造血系统疾病患者; 感染性疾病患者, 包括性传播疾病、乙型肝炎、肺结核; 药物过敏的患者; 思维异常、精神疾病且依从性差的患者。所有患者均签署知情同意书, 本研究已获得昆明市中医医院伦理委员会批准(2021 伦备字 21 号)。

1.1.2 实验动物 60 只 8 ~ 10 周龄的 SPF 级 SD 大鼠购自于昆明医科大学实验动物学部, 体质量 180 ~ 220 g, 饲养在可控的环境中(温度 22 ± 2 °C, 湿度 45%, 光照 12 h/d) 1 周, 本实验经昆明医科大学动物实验伦理审查委员会批准(KMMU20211591)。

1.1.3 主要试剂和仪器 HUVEC、HEK-293T 细胞(中国科学院上海细胞库); DMEM 培养基、FBS(美国 Gibco); Trizol 试剂、PrimeScript RT Reagent Kit 逆转录试剂盒、SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒、Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒(美国 Invitrogen); MTT 溶液、RIPA 裂解液(美国 sigma-Aldrich); BCA 试剂盒(美国 Thermo Scientific); PVDF 膜、ECL 显影剂(美国 Millipore); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国 Promega); TUNEL 试剂盒、蛋白酶抑制剂(中国 Beyotime); Matrigel 基质胶、Transwell 小室(美国 Becton Dickinson); Annexin V-FITC/PI 试剂盒(加拿大 BD Biosciences); 抗 ERBB3、VEGFR2、CyclinD1、Cleaved-caspase3、Bax、Bcl-2、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR、IgG 和 β -catenin 抗体购自美国 Abcam; PCR 引物、NC mimic、miR-205-5p mimic、NC inhibitor、miR-205-5p inhibitor、sh-NC、sh-ERBB3、oe-ERBB3、pcDNA、pcDNA-ERBB3 由上海 Genepharma 合成并提供; 细胞培养箱、qRT-PCR 仪(美国 Invitrogen); Thermo 酶标仪、FACS 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson); 荧光显微镜(日本 Nikon)。

1.2 研究方法

1.2.1 建模及转染 根据文献^[16] 制备大鼠痔疮模型: 在大鼠肛门外周皮下注射 75% 冰醋酸 0.05 mL, 24 h 后大鼠肛周出现白色溃疡面、肿胀伴炎症渗出, 即痔疮模型建立成功。将阴性对照模拟物(NC mimic)、miR-205-5p 模拟物(miR-205-5p mimic)、ERBB3 敲低质粒载体(sh-ERBB3)和阴性对照(sh-NC)、阴性对照抑制剂(NC inhibitor)、miR-205-5p 抑制剂(miR-205-5p inhibitor)载体质粒经尾静脉注射至模型大鼠; 注射 miR-205-5p mimic 载体的同时, 分别注射 ERBB3 过表达载体(pcDNA-ERBB3)及阴性对照(pcDNA), 各组连续注射 3 周, 2 次/周; 空白组和模型组经尾静脉注射 10 mL/kg 生理盐水, 分别记为 Control 组、Model 组、Model + NC mimic 组、Model + miR-205-5p mimic 组、Model + sh-NC 组、Model + sh-ERBB3 组、Model + sh-ERBB3 + NC inhibitor 组、Model + sh-ERBB3 + miR-205-5p inhibitor 组、Model + miR-205-5p mimic + pcDNA 组、Model + miR-205-5p mimic + pcDNA-ERBB3 组。

1.2.2 细胞培养与转染 将 HUVEC 添加至含有 10% FBS、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞密度约 60 ~ 70% 时, 分为 NC 组、oe-ERBB3 组、sh-ERBB3 组、NC mimic 组、miR-205-5p mimic 组、miR-205-5p mimic + pcDNA-ERBB3 组、miR-205-5p mimic + pcDNA 组。严格按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书操作, 将 ERBB3 过表达(oe-ERBB3)和 ERBB3 敲低(sh-ERBB3)质粒分别转染至 oe-ERBB3 组和 sh-ERBB3 组 HUVEC 细胞中; miR-205-5p mimic + pcDNA-ERBB3 组及 miR-205-5p mimic + pcDNA 组在 miR-205-5p mimic 组基础上分别转染 pcDNA-ERBB3 及 pcDNA 质粒, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后用于后续实验。

1.2.3 qRT-PCR Trizol 试剂分别从组织和细胞中提取总 RNA, 使用 PrimeScript RT Reagent Kit 将总 RNA 逆转录成 cDNA, 使用 SYBR Green PCR Master Mix 进行 PCR 反应, 引物序列, 见表 1, 以 U6 和 β -actin 为内源性参照, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.2.4 Western blot 使用含有 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液提取细胞或组织的总蛋白, 使用 BCA 检测试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离总蛋白质, 并将分离的蛋白转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封膜 2 h。加入一抗

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

基因	引物序列(5'-3')	
miR-205-5p	Forward	CGTCCTTCATTCCACCGG
	Reverse	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
ERBB3	Forward	CAAGATTCCAGTCTGCATTAAGTC
	Reverse	CAGCATATGATCTGTACAGCTTG
U6	Forward	CTCGCTTCGGCAGCACATA
	Reverse	AACGCTTCACGAATTTGCGT
β -actin	Forward	TGACGTGGACATCCGCAAAG
	Reverse	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG

ERBB3、VEGFR2、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR、Cyclin D1、Caspase-3、Bax、Bcl-2 (1 : 1000) 4 °C 孵育过夜, 加入二抗 (1 : 20000) 室温孵育 2 h, 避光加入 ECL 显影剂, 以 β -actin 作为内参蛋白, 采用 Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.2.5 免疫荧光染色 4% 多聚甲醛固定组织, 0.1% TritonX-100 室温透化 20 min, 5% BSA 封闭 1 h, 加入一抗 VEGFR2 (1 : 1000), 4 °C 孵育过夜, 加入 FITC 荧光标记的二抗 (1 : 200) 避光孵育 1 h, PBS 漂洗, DAPI 复染细胞核 20 min, PBS 清洗 3 次, 滴加抗荧光淬灭剂, 中性树胶封片, 置于荧光显微镜下观察 VEGFR2 蛋白的表达情况。

1.2.6 HE 染色 将大鼠痔疮组织制成切片脱蜡, 苏木精染色 5 min, 5% 乙酸分化 30 s, 置于水中返蓝 1 ~ 2 min, 用伊红染色液染色 1 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯溶液浸泡 2 遍, 用中性树胶密封观察。

1.2.7 TUNEL 染色 用 PBS 洗涤各组织标本 2 次, 各组滴加 50 μ L TUNEL 检测液 (2 μ L TdT 酶+ 48 μ L 荧光素标记的 dUTP 溶液), 加盖玻片 37 °C 避光孵育 1 h, PBS 漂洗组织样品 3 次, 甘油密封。随机选取 5 个不同视野, 在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.8 免疫组织化学染色 组织切片经二甲苯 2 次脱蜡和梯度乙醇脱水后置于 PBS 缓冲溶液中 5 min, 加入枸橼酸钠缓冲液 (0.1 mol/L, pH = 6.0) 修复抗原, 滴加一抗 ERBB3 (1 : 1000) 和 VEGFR2 (1 : 1000) 4 °C 孵育过夜。PDS 冲洗 3 次, 滴加 HRP 标记的羊抗鼠/兔二抗在 37 °C 下孵育 30 min, 滴加二氨基联苯胺 (DAB) 显色剂, 苏木素复染、脱水透明、封片, 置于显微镜下观察染色情况并拍照。

1.2.9 免疫共沉淀 (Co-IP) 收集细胞后加入适量 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂混合物), 冰上

裂解 15 min, 12000 r/min 离心 10 min 后吸取上清液, 取少量裂解液以备 Western blot 分析。剩余裂解液加入 1 μ g 相应的抗体和 10 μ L Protrin A/G 琼脂糖珠, 在 4 °C 下缓慢摇晃孵育 4 h, 非特异性 IgG 作为对照。免疫沉淀物在裂解缓冲液中洗涤 3 ~ 4 次, 加入 15 μ L 的 2 \times SDS 缓冲液后, 沸水煮 5 min。

1.2.10 双荧光素酶报告基因检测 采用 TargetScan 数据库预测 miR-205-5p 和 ERBB3 的靶向结合位点, 将含有 ERBB3 3'-UTR 的 miR-205-5p 结合位点克隆到 pGL3 载体中, 分别构建 ERBB3 野生型质粒 (WT) 和突变型质粒 (MUT)。将 2 种质粒分别与 miR-205-5p mimic、NC mimic 共转染到 HEK-293T 细胞中, 培养 24 h 后, 通过双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组细胞的荧光素酶活性。

1.2.11 MTT 用胰蛋白酶消化 HUVEC 细胞, 单层接种至 96 孔板中 (1 \times 10⁴ 个/孔), 每孔加入 20 μ L MTT 孵育 4 h 后, 加入 150 μ L 二甲基亚砷, 震荡 10 min, 在酶标仪 490 nm 处测量 OD 值, 计算 0 ~ 48 h 每组细胞增殖活性。

1.2.12 划痕愈合和 Transwell 划痕愈合: 将各组细胞接种至 6 孔板中 (1 \times 10⁵ 个/孔), 待细胞汇合度为 90% 时, 用 200 μ L 枪尖垂直划痕, PBS 清洗 3 次, 加入划痕用培养基, 37 °C、5% CO₂ 恒温箱培养 24 h, 在倒置显微镜下观察拍照。Transwell: 将细胞消化并转移到涂有 Matrigel 基质胶的 Transwell 上室, 下室加入含 20% 胎牛血清的培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 恒温箱中培养 24 h, 弃培养基, 上室用 4% 多聚甲醛固定。0.1% 结晶紫染色, 洗涤风干, 在显微镜下对细胞进行观察和计数。

1.2.13 流式细胞术 严格按照 FACS 流式细胞仪和 Annexin V-FITC/PI 试剂盒操作, 随机选取 5

个不同视野, 计算每个视野细胞凋亡率。

1.2.14 体外血管形成实验 胰酶消化, 将各组细胞按每孔 2×10^4 个的密度接种到涂有 Matrigel 凝胶的 96 孔板上, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 恒温培养箱中培养 12 h, 最后在显微镜下观察血管生成情况并拍照。

1.3 统计学处理

所有数据至少重复 3 次独立实验, 采用 GraphPad Prism 8.1 进行数据统计分析。数据以均值 \pm 标准差(SD)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较的方法用 Fishers LSD 方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-205-5p 和 ERBB3 在痔疮中的表达情况

采用 qRT-PCR 检测临床病理组织样本中 miR-205-5p 和 ERBB3 的表达情况, 结果显示, 与正常组样本相比, 疾病组样本中 miR-205-5p 表达量降低 ($P < 0.001$), ERBB3 mRNA 表达量升高 ($P < 0.001$), 见图 1A ~ B; Western blot 结果显示,

疾病组样本中 ERBB3 蛋白表达量高于健康组 ($P < 0.05$), 见图 1C。此外, 对临床样本进行免疫荧光染色检测 VEGFR2 蛋白定位及表达水平, 结果发现 VEGFR2 主要定位于细胞质中, 相比正常组, 疾病组样本中 VEGFR2 蛋白荧光强度增加, 见图 1D。

2.2 miR-205-5p 靶向结合 ERBB3

TargetScan 数据库预测结果显示, miR-205-5p 与 ERBB3 存在靶向关系, 见图 2A。双荧光素酶实验结果显示, 与 NC mimic 组比较, miR-205-5p mimic 组中 ERBB3-WT 的荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.001$), 而 ERBB3-MUT 的荧光素酶活性无明显变化, 见图 2B。Western blot 结果显示, miR-205-5p mimic 组 ERBB3 蛋白水平较 NC mimic 组显著降低 ($P < 0.01$), 见图 2C。可见, miR-205-5p 能直接靶向结合 ERBB3, 并且负调控 ERBB3 的表达。

2.3 miR-205-5p 对痔疮的影响

qRT-PCR 检测各组大鼠肛周组织中 miR-205-5p 的相对表达量, 模型组大鼠中 miR-205-5p 表达量降低 ($P < 0.001$), 转染 miR-205-5p mimic 后表达量升高 ($P < 0.001$), 见图 3A。HE 染色显示

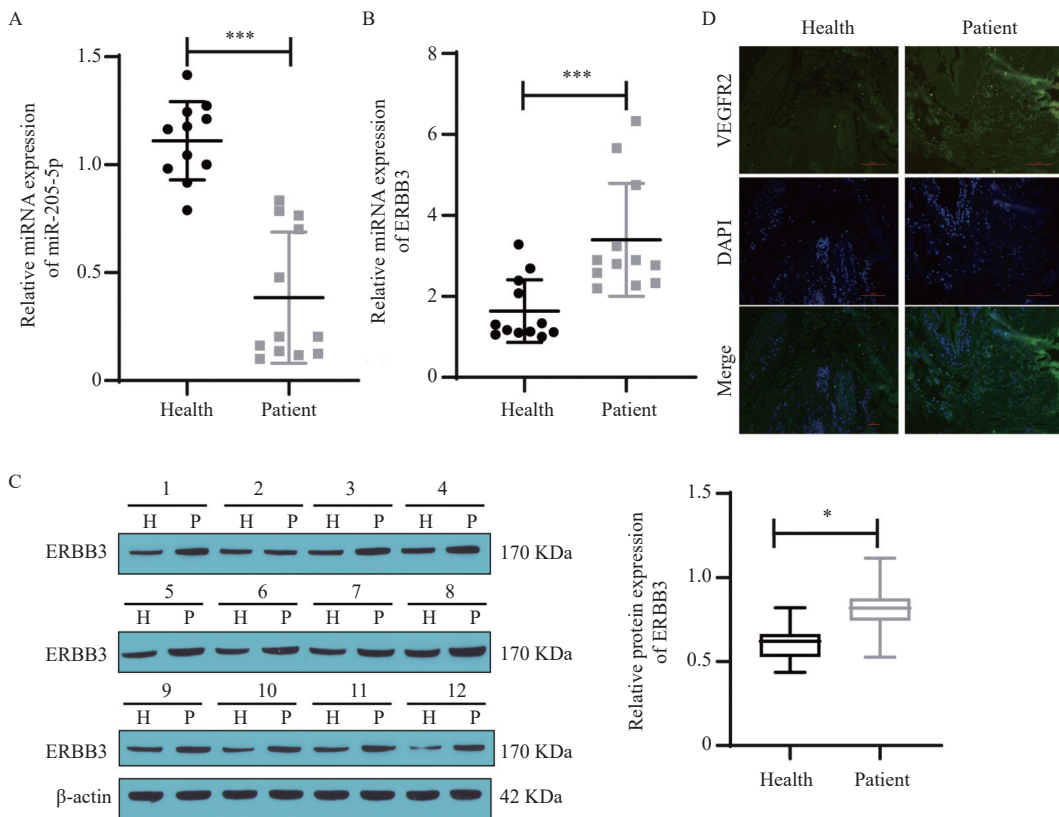


图 1 miR-205-5p 和 ERBB3 在临床病理样本中的表达水平

Fig. 1 The expression of miR-205-5p and ERBB3 in clinicopathological samples

A ~ B: qRT-PCR 检测 miR-205-5p 和 ERBB3 的相对表达量; C: Western blot 检测 ERBB3 蛋白表达(H: 正常组, $n=12$; P: 疾病组, $n=12$); D: 免疫荧光染色检测 VEGFR2 蛋白表达($200 \times$, 标尺 $50 \mu\text{m}$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

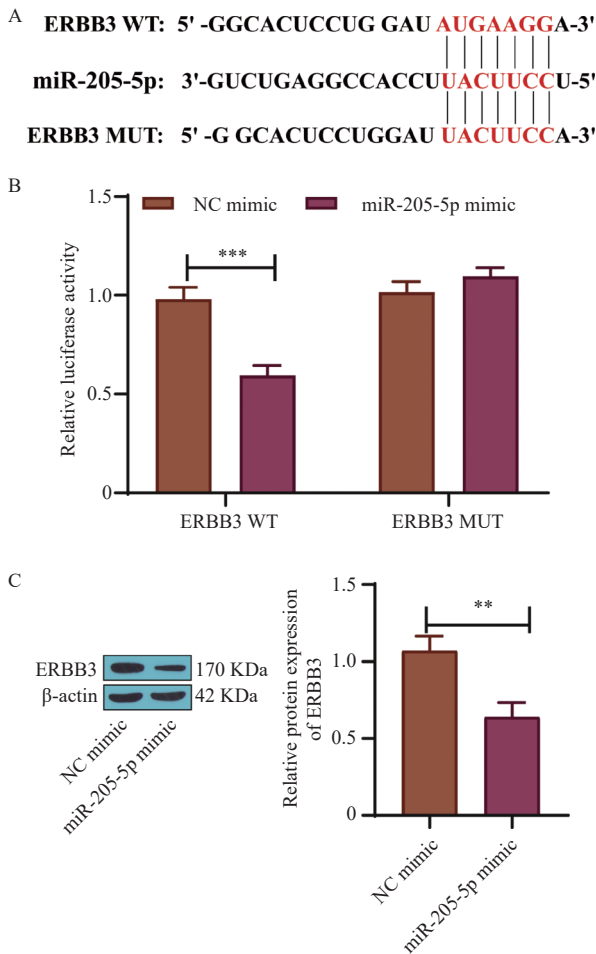


图 2 miR-205-5p 与 ERBB3 的靶向关系

Fig. 2 The targeting relationship between miR-205-5p and ERBB3

A: TargetScan 数据库预测 miR-205-5p 和 ERBB3 的结合位点; B: 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-205-5p 与 ERBB3 的靶向关系; C: Western blot 检测过表达 miR-205-5p 后 ERBB3 蛋白表达水平, $n=3$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

模型组大鼠肛周组织血管明显增生, 血管内皮细胞核增大, 大量炎性细胞浸润, 血管周围间质层连接不紧密, 转染 NC mimic 后无明显变化, 转染 miR-205-5p mimic 后大鼠肛周组织病理情况得到改善, 见图 3B。TUNEL 染色结果显示, 模型组大鼠细胞凋亡率降低 ($P < 0.001$), 转染 miR-205-5p mimic 后细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 见图 3C。免疫组化结果显示, 模型组大鼠肛周组织中 ERBB3、VEGFR2 表达量升高, 转染 miR-205-5p mimic 后 ERBB3、VEGFR2 表达量均明显降低, 见图 3D。此外, Western blot 结果显示, 模型组中 ERBB3、VEGFR2、Cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达量升高, cleaved-caspase 3、Bax 蛋白表达量降低; 而转染 miR-205-5p mimic 后, 逆转了模型组大鼠肛周组织的蛋白表达情况 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 见图 3E。由此推测, miR-205-5p 能抑制

肛周组织血管生成, 改善痔疮的组织病理状况, 可能与抑制 ERBB3、VEGFR2 表达, 抑制细胞周期、促进凋亡相关。

2.4 miR-205-5p 通过 ERBB3 影响痔疮进展

qRT-PCR 结果显示, sh-ERBB3 成功转染至模型大鼠后, 与模型组相比, miR-205-5p 表达量无明显变化, 而转染 miR-205-5p inhibitor 后表达量降低 ($P < 0.001$), 见图 4A。HE 染色发现, 将 sh-ERBB3 转染至模型大鼠后, 肛周组织中增生血管及炎性细胞明显减少; 而转染 miR-205-5p inhibitor 后, 组织中炎性细胞增多, 伴微小脓腔形成, 见图 4B。TUNEL 染色结果显示, 转染 sh-ERBB3 后模型大鼠细胞凋亡率升高, 转染 miR-205-5p inhibitor 后, sh-ERBB3 对细胞凋亡率的影响被逆转 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 见图 4C。免疫组化染色显示, 转染 sh-ERBB3 后模型大鼠 ERBB3、VEGFR2 表达降低, 转染 miR-205-5p inhibitor 后明显升高, 见图 4D。Western blot 结果显示, 转染 sh-ERBB3 后, ERBB3、VEGFR2、Cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达量降低, cleaved-caspase 3、Bax 表达量升高 ($P < 0.001$), 而转染 miR-205-5p inhibitor 后, sh-ERBB3 对蛋白表达的影响被不同程度逆转 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 见图 4E。可见, 抑制 miR-205-5p 表达可以促进 ERBB3 在肛周组织中表达, 下调凋亡相关蛋白水平, 促进血管新生, 进而导致肛周组织病理恶化和痔疮的发生发展。

2.5 过表达 ERBB3 逆转 miR-205-5p 过表达对痔疮的影响

将 pcDNA、pcDNA-ERBB3 分别转染至 miR-205-5p mimic 组大鼠后, qRT-PCR 结果显示, miR-205-5p 表达量并无明显差异, 见图 5A。HE、TUNEL 和免疫组化染色结果发现, 转染 pcDNA-ERBB3 后逆转了 miR-205-5p mimic 可以改善大鼠肛周组织病理情况、促进细胞凋亡、抑制 ERBB3、VEGFR2 表达的作用, 见图 5B~5D。Western blot 结果显示, 转染 pcDNA-ERBB3 后, 大鼠 ERBB3、VEGFR2、Cyclin D1、Bcl-2、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白表达量升高, cleaved-caspase 3、Bax 表达量降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), pcDNA-ERBB3 逆转了 miR-205-5p mimic 对痔疮大鼠相关蛋白的影响, 见图 5E。这些结果提示, 过表达 ERBB3 能逆转 miR-205-5p 过表达诱导细胞凋亡、抑制血管生成、改善肛周组织病理的作用, 可能与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路异常激活相关。

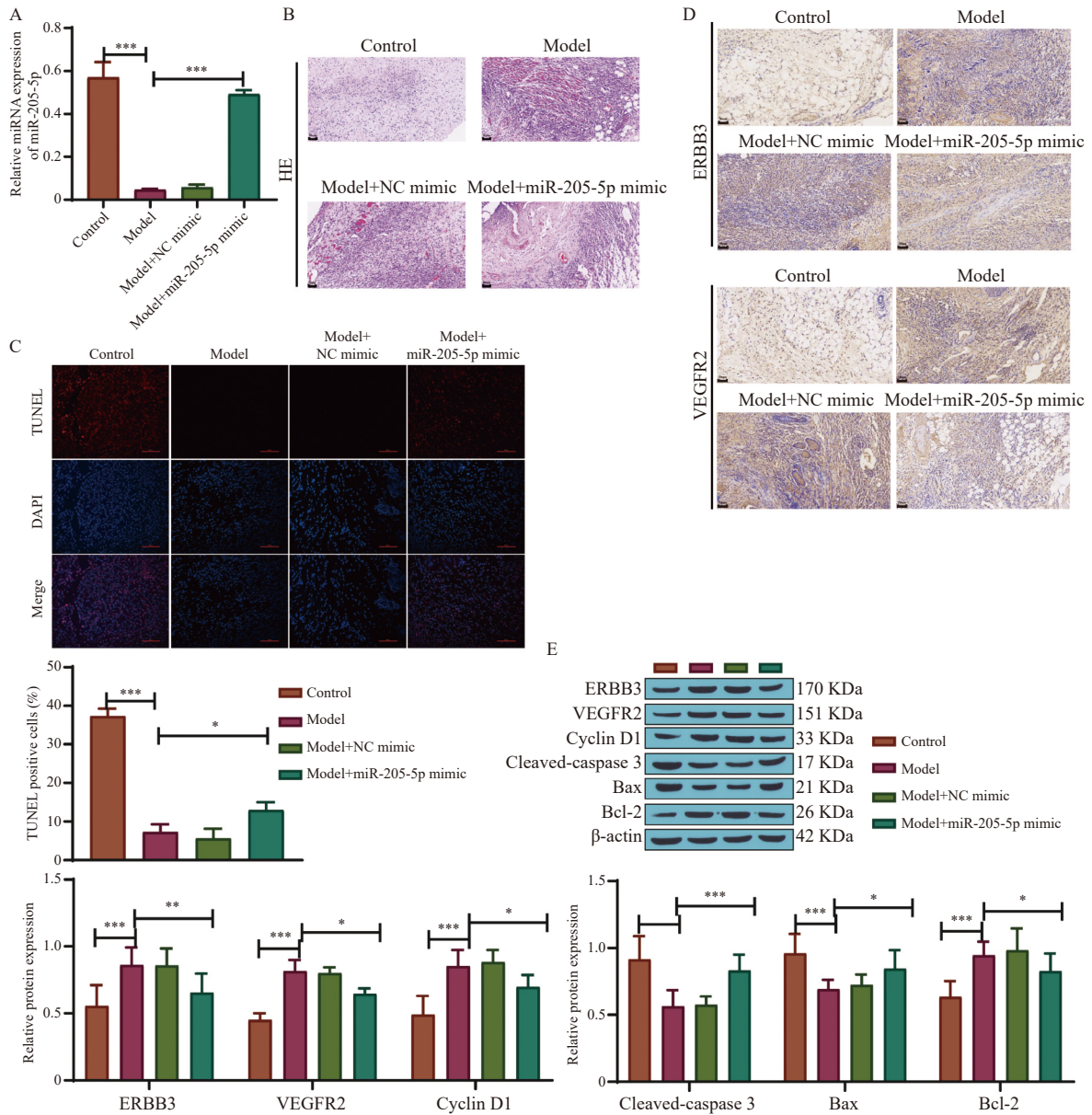


图 3 过表达 miR-205-5p 对痔疮大鼠的影响

Fig. 3 The effect of overexpression of miR-205-5p on hemorrhoidal rats

A: qRT-PCR 检测各组大鼠肛周组织中 miR-205-5p 的相对表达量; B: HE 染色观察各组大鼠肛周组织病理变化(200 ×, 标尺 50 μm), n=5; C: TUNEL 染色检测各组大鼠肛周组织细胞凋亡率和凋亡阳性细胞定量; D: 免疫组化检测 ERBB3 和 VEGFR2 蛋白表达情况(200 ×, 标尺 50 μm), n=5; E: Western blot 检测 ERBB3、VEGFR2、Cyclin D1、Cleaved-caspase 3、Bax 和 Bcl-2 蛋白水平, n=5; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

2.6 过表达 ERBB3 促进血管生成与 PI3K/AKT/mTOR 通路相关

免疫共沉淀检测结果显示, ERBB3 与 PI3K 发生结合, 提示 ERBB3 可能通过 PI3K 发挥下游作用, 见图 6A。qRT-PCR 检测 ERBB3 的转染效率, 结果显示, 与 NC 组相比, oe-ERBB3 组的 ERBB3 表达量显著升高, 而 sh-ERBB3 组表达量显著降低(P<0.01, P<0.001), 见图 6B。血管生成实验结果显示, 与 NC 组相比, oe-ERBB3 组血管生成量显著增加, 而 sh-ERBB3 组显著减少(P<

0.001), 见图 6C。Western blot 结果显示, 与 NC 组相比, oe-ERBB3 组 ERBB3、VEGFR2、Cyclin D1、Bcl-2、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 表达量升高, Cleaved-caspase 3、Bax 表达量降低, sh-ERBB3 组则相反(P<0.01, P<0.001), 见图 6D。此外, 通过分析 HUVEC 细胞生物学行为发现, 与 NC 组相比, oe-ERBB3 组 HUVEC 细胞的增殖、迁移、侵袭能力显著升高, sh-ERBB3 组则显著降低(P<0.01, P<0.001), 见图 6E~6H。流式细胞仪术结果显示, 与 NC 组

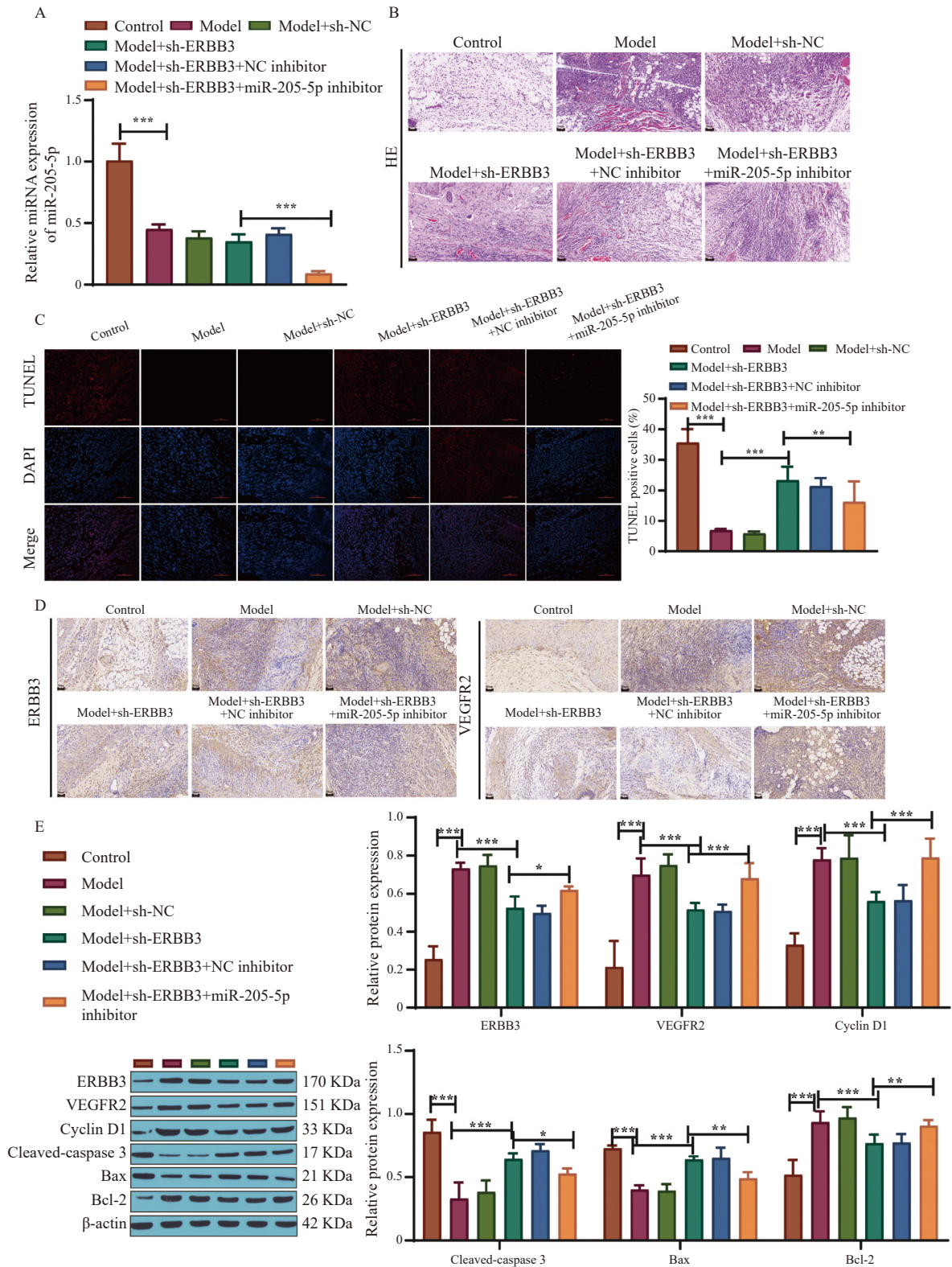


图 4 ERBB3 受 miR-205-5p 调控影响痔疮的进展

Fig. 4 ERBB3 is regulated by miR-205-5p to affect the progression of hemorrhoids

A: qRT-PCR 检测各组大鼠肛周组织中 miR-205-5p 的相对表达量; B: HE 染色观察肛周组织病理变化 (200 ×, 标尺 50 μm), n=5; C: TUNEL 染色检测细胞凋亡率和阳性细胞定量; D: 免疫组化检测 ERBB3 和 VEGFR2 蛋白表达情况 (200 ×, 标尺 50 μm), n=5; E: Western blot 检测 ERBB3、VEGFR2、Cyclin D1、Cleaved-caspase 3、Bax 和 Bcl-2 蛋白水平, n=5; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

相比, oe-ERBB3 组细胞凋亡率显著降低, HUVEC 细胞 G₀/G₁ 期、S 期比例显著升高, G₂/M 期细

胞比例显著降低, sh-ERBB3 组细胞凋亡率显著升高 (P<0.001), 见图 6I ~ 6J。由此推测, 过

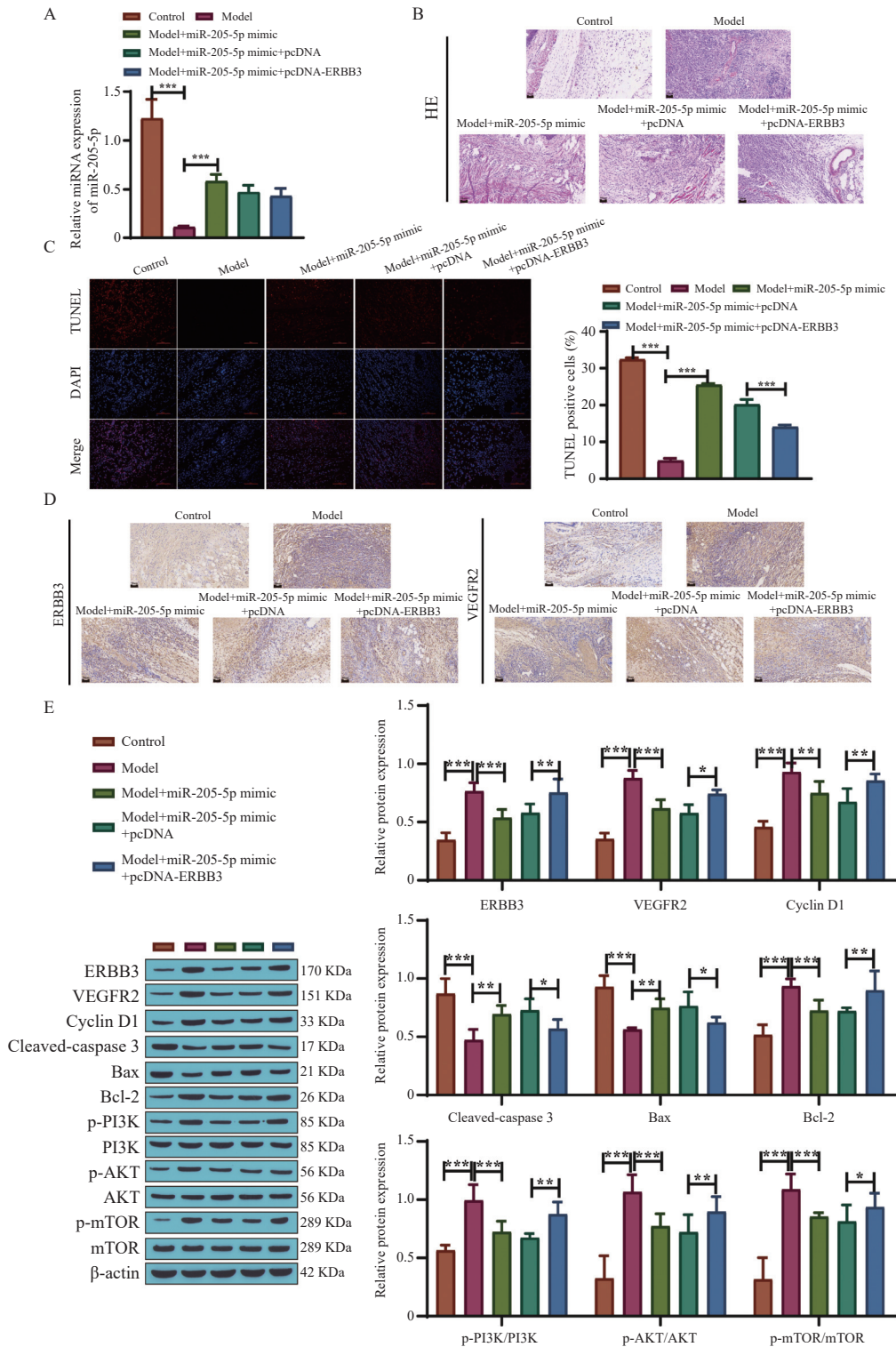


图 5 过表达 ERBB3 对痔疮大鼠的影响

Fig. 5 The effect of overexpression of ERBB3 on hemorrhoidal rats

A: qRT-PCR 检测各组大鼠肛周组织中 miR-205-5p 的相对表达量; B: HE 染色观察肛周组织病理变化 (200 ×, 标尺 50 μm), n=5; C: TUNEL 染色检测细胞凋亡率和阳性细胞定量; D: 免疫组化检测 ERBB3 和 VEGFR2 蛋白表达情况 (200 ×, 标尺 50 μm), n=5; E: Western blot 检测 ERBB3、VEGFR2、Cyclin D1、Cleaved-caspase 3、Bax、Bcl-2、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白水平, n=5; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

表达 ERBB3 可能激活 PI3K/AKT/mTOR 通路, 促进 HUVEC 细胞增殖迁移及侵袭, 抑制凋亡, 促使血管生成。

2.7 miR-205-5p 靶向 ERBB3 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制 HUVEC 细胞增殖、迁移和血管生成
qRT-PCR 检测各组细胞 miR-205-5p 的表达

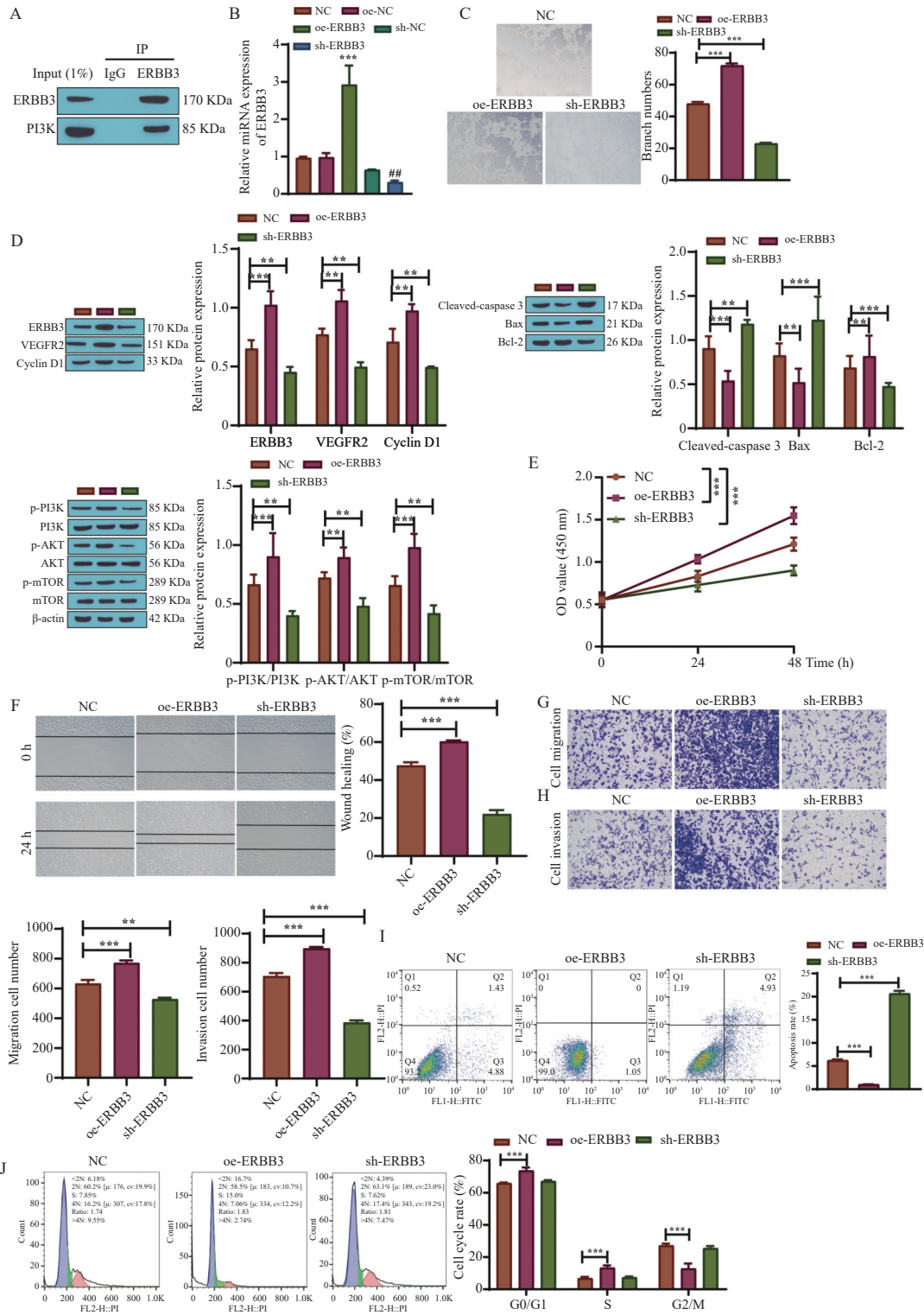


图 6 过表达 ERBB3 促进血管生成与 PI3K/AKT/mTOR 通路相关

Fig. 6 Overexpression of ERBB3 promotes angiogenesis through PI3K/AKT/mTOR pathway

A: 免疫共沉淀验证 ERBB3 与 PI3K 的相互作用, $n = 3$; B: qRT-PCR 检测转染效率; C: 血管生成实验; D: Western blot 检测相关蛋白水平, $n = 3$; E: MTT 法检测细胞增殖能力; F: 划痕愈合实验检测细胞迁移能力; G-H: Transwell 实验检测细胞迁移侵袭能力; I: AnnexinV-FITC/PI 检测细胞凋亡率; J: 流式细胞仪检测细胞周期; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 NC 组相比, ## $P < 0.01$ 。

量, 结果显示, miR-205-5p mimic 组表达量相比 NC mimic 组显著升高($P < 0.001$), 而转染 pcDNA-

ERBB3 及 pcDNA 后, miR-205-5p 表达量无明显变化, 见图 7A。Western blot 结果显示, 与 NC

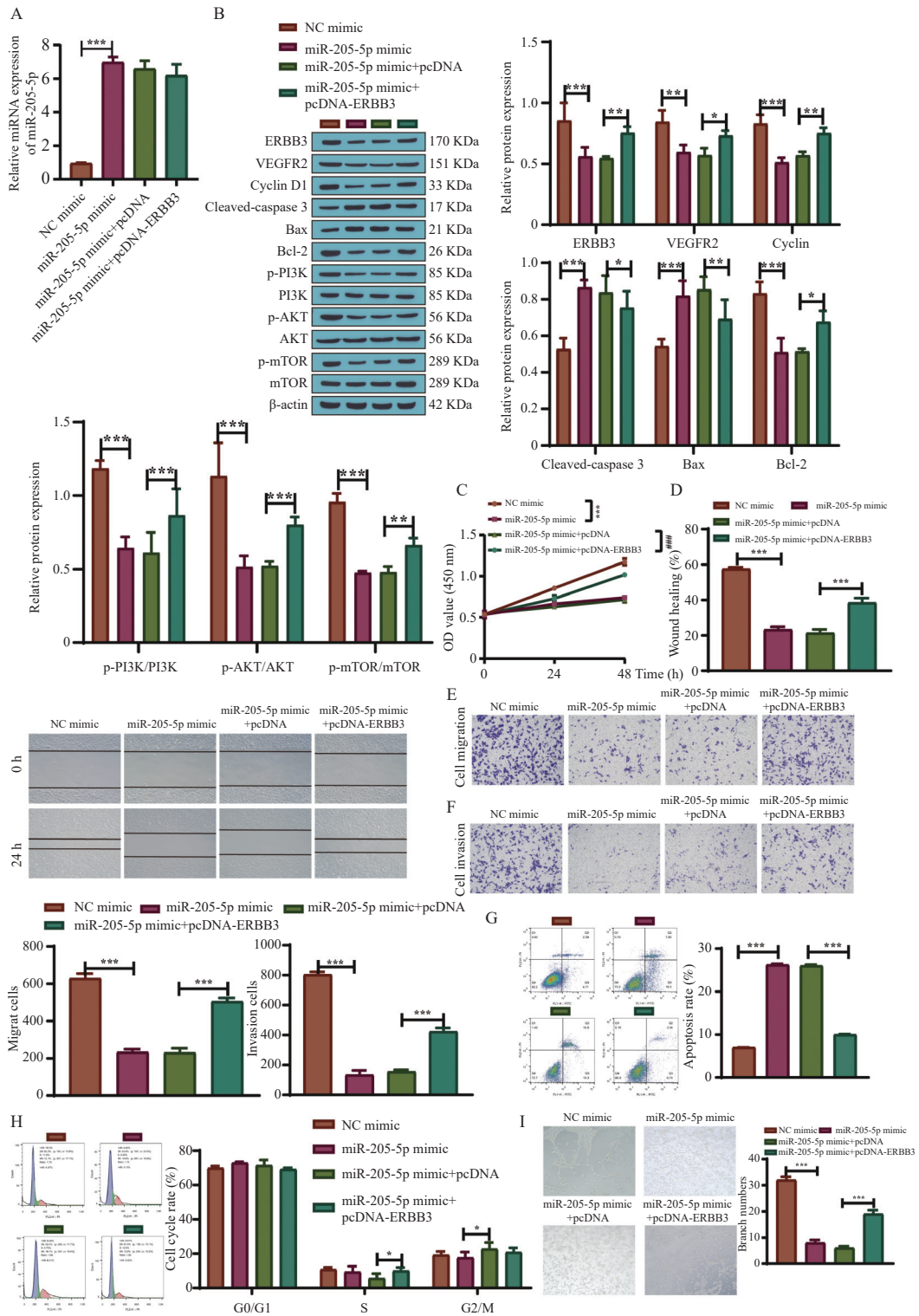


图 7 miR-205-5p 靶向 ERBB3 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路对 HUVEC 细胞的影响

Fig. 7 The effect of miR-205-5p targeting ERBB3 to regulate PI3K/AKT/mTOR pathway on HUVEC cells

A: qRT-PCR 检测各组 miR-205-5p 表达量; B: Western blot 检测相关蛋白表达水平, $n=3$; C: MTT 法检测 HUVEC 细胞增殖能力; D: 划痕愈合实验检测 HUVEC 细胞迁移能力; E ~ F: Transwell 实验检测 HUVEC 细胞迁移侵袭能力; G: AnnexinV-FITC/PI 检测 HUVEC 细胞凋亡率; H: 流式细胞仪检测 HUVEC 细胞周期; I: 血管生成实验; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

mimic 组相比, miR-205-5p mimic 组 ERBB3、VEGFR2、Cyclin D1、Bcl-2、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 表达量降低, Cleaved-

caspase 3、Bax 表达量升高($P < 0.01$, $P < 0.001$), 而转染 pcDNA-ERBB3 后则削弱了 miR-205-5p mimic 的作用($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 见

图 7B。MTT 法、划痕愈合、Transwell 实验和流式细胞术结果显示, 转染 pcDNA-ERBB3 后 HUVEC 细胞增殖、迁移、侵袭能力以及血管生成量均显著升高, 凋亡率显著降低 ($P < 0.001$), HUVEC 细胞 S 期和 G₂/M 期比例升高 ($P < 0.05$), 见图 7C ~ 7I。可见, 过表达 ERBB3 逆转了 miR-205-5p 过表达对 HUVEC 细胞的影响。证实了 miR-205-5p 能够靶向 ERBB3 抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路, 进而抑制 HUVEC 细胞增殖、迁移、侵袭及血管生成。

3 讨论

3.1 miR-205-5p 在痔疮血管生成中的作用

miRNAs 是一类非编码小 RNA 分子, 其通过抑制 mRNAs 翻译或促进 mRNAs 降解, 转录后调控靶基因的表达, 在细胞增殖、迁移、凋亡和血管生成等生物过程中发挥重要作用^[17-18]。其中 miR-205-5p 作为 miRNA205 家族成员, 广泛参与多种肿瘤的增殖、侵袭转移和血管生成等生物学行为。miR-205-5p 通过降低 VEGFA 和 FGF1 表达抑制胃癌中的血管生成^[19]。此外, miR-205-5p 可以调节 PTK7 的表达限制结肠癌细胞的增殖、迁移^[20]。Huang 等^[21]研究表明, miR-205-5p 可抑制 ox-LDL 诱导的 HAVSMC 细胞增殖和迁移。Oltra 等^[22]发现 miR-205-5p 受氧化应激调节, 靶向 VEGFA 调控血管生成。然而, miR-205-5p 在痔疮中的调节机制鲜有报道。笔者通过检测临床组织样本发现, miR-205-5p 在痔核组织中呈低表达, ERBB3 呈高表达, 并通过生物信息数据库预测了 miR-205-5p 与 ERBB3 的 3'UTR 靶向结合位点。同时, 双荧光素酶实验证实了 miR-205-5p 能直接靶向结合 ERBB3。体内外实验结果显示, 转染 miR-205-5p mimics 后, HUVEC 细胞增殖、迁移、侵袭能力均明显降低, 细胞凋亡率升高, 血管生成量明显减少, 痔疮大鼠的肛周组织病理情况也明显改善, 而转染 miR-205-5p inhibitor 后则相反。因此, 过表达 miR-205-5p 可抑制 HUVEC 细胞增殖和成管能力, 诱导细胞凋亡, 减缓痔疮进展, 可作为痔疮治疗的候选靶点。

3.2 miR-205-5p 调控 ERBB3 的表达

ERBB3 作为 ERBB 家族重要成员之一, 在多种良恶性疾病中呈高表达。有研究发现抑制 ERBB3 表达, 可以缓解肝细胞癌进展^[23]。ERBB3 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)

组织中高表达, 并且促进 NSCLC 细胞增殖迁移及血管生成^[24]。此外, EGFR/ERBB2 和 ERBB2/ERBB3 异源二聚体是血管内皮生长因子 VEGF mRNA 表达的最有效诱导因子, 具有强大的血管生成活性^[25]。通过免疫荧光染色和免疫组化检测我们发现, 临床病理组织和大鼠组织血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)在细胞质中呈黄褐色, 其表达量显著升高, 提示痔疮发生发展与血管生成密切相关。Tu 等^[26]研究发现, miR-497 过表达分别靶向 VEGFR2/PI3K/AKT 和 VEGFR2/Raf/MEK/ERK 信号通路诱导 HUVEC 凋亡和抑制细胞增殖, 发挥抗血管生成作用。有研究^[27]表明 ERBB3 受 miR-205-5p 直接靶向负调控, siERBB3 诱导前列腺癌 PCa 细胞 G₀/G₁ 期阻滞和凋亡。在本研究中, 过表达 ERBB3 后, HUVEC 细胞中 VEGFR2 表达量显著升高, 细胞周期蛋白 Cyclin D1 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 相对表达量显著升高, 凋亡分子 cleaved Caspase-3 和促凋亡蛋白 Bax 相对表达量显著降低, 细胞增殖、迁移、侵袭活性显著提高, 管腔数量及分支增多, 细胞凋亡率显著降低。过表达 miR-205-5p 可能通过抑制 VEGFR2 表达, 降低 Cyclin D1、Bcl-2 蛋白水平, 提高 cleaved Caspase-3、Bax 蛋白水平, 阻断 HUVEC 细胞从 G₀/G₁ 期到 S 期的转换, 从而抑制细胞增殖并诱导凋亡; 而过表达 ERBB3 能逆转 miR-205-5p 对 HUVEC 细胞的作用。体内外实验结果均表明, miR-205-5p 靶向抑制 ERBB3 表达在痔疮中调控细胞增殖、迁移、凋亡、血管生成等生物学行为, 且这一过程可能与 ERBB3 激活下游信号分子有关。笔者的研究证明了 miR-205-5p 可以靶向抑制 ERBB3 的表达, 进而缓解痔疮的形成。

3.3 PI3K/AKT/mTOR 通路在痔疮血管生成中的作用

有研究发现 miR-205 转录后沉默驱动 ERBB3 过表达并与 FGF 特异结合, 过度激活 PI3K/AKT/mTOR 通路维持胶质母细胞瘤恶性表型^[28]。ERBB2/ERBB3 异源二聚体通过其 C 端的 6 个磷酸化激活位点, 与 PI3K-p85 亚基结合, 激活 PI3K/AKT 信号级联^[29]。mTOR 作为 PI3K/AKT 最主要的下游分子, 受 p-AKT 诱导磷酸化而激活, 从而参与调控细胞周期和细胞自噬等过程^[30]。笔者通过免疫共沉淀证明了 ERBB3 和 PI3K 的相互作用。oe-ERBB3 组 HUVEC 细胞 ERBB3 表达显著升高, PI3K、AKT、mTOR 的磷酸化水平均升高, 管腔数量增多, HUVEC 细胞增殖迁移、侵

袭力升高, 细胞凋亡率降低; sh-ERBB3 组则相反。miR-205-5p mimic 组大鼠肛周组织和 HUVEC 细胞的 ERBB3 表达显著降低, PI3K、AKT、mTOR 的磷酸化水平降低, PI3K/AKT/mTOR 信号通路活性被抑制, 而过表达 ERBB3 逆转了 miR-205-5p mimic 诱导 PI3K/AKT/mTOR 通路活性降低的作用。说明 miR-205-5p 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路能有效抑制 HUVEC 细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成, 促进细胞凋亡。因此, 抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路激活可以抑制血管内皮细胞的生理活性和痔疮的形成。

综上所述, miR-205-5p 能够通过靶向抑制 ERBB3 表达, 下调 PI3K/AKT/mTOR 通路活性, 在体外阻滞 HUVEC 细胞周期, 诱导细胞凋亡, 抑制 HUVEC 细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成; 在体内可以有效抑制肛周组织血管新生, 改善肛周组织病理状况, 减缓痔疮发生发展。本研究为 miRNAs 在痔病中的临床相关性提供了新见解, 也为 miR-205-5p 作为痔疮的治疗靶点提供了新的理论基础。但本研究仅对 HUVEC 细胞株进行研究, 在其他细胞中, miR-205-5p 是否具有相似的调控机制, 还有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Wang C, Lu H, Luo C, et al. miR-412-5p targets Xpo1 to regulate angiogenesis in hemorrhoid tissue[J]. *Gene*, 2019, 705(26): 167-176.
- [2] Qureshi W A. Office management of hemorrhoids[J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113(6): 795-798.
- [3] Wang K, Zhang Y, Ma X, et al. Identification of the microRNA alterations in extracellular vesicles derived from human haemorrhoids[J]. *Exp Physiol*, 2023, 108(5): 752-761.
- [4] Song C, Zhou H, Lu H, et al. Aberrant expression for microRNA is potential crucial factors of haemorrhoid[J]. *Hereditas*, 2020, 157(1): 25.
- [5] 王辰. miR-412-5p 靶向 xpo1 调控痔核组织血管增生以及痔血宁合剂干预的机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [6] Liu T, Zhou H, Lu H, et al. MiR-4729 regulates TIE1 mRNA m6A modification and angiogenesis in hemorrhoids by targeting METTL14[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(3): 232.
- [7] Wang S, Aurora A B, Johnson B A, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2): 261-271.
- [8] Fish J E, Santoro M M, Morton S U, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2): 272-284.
- [9] Huang J, Wang X, Wen G, et al. miRNA-205-5p functions as a tumor suppressor by negatively regulating VEGFA and PI3K/Akt/mTOR signaling in renal carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(5): 1677-1688.
- [10] An G, Liang S, Sheng C, et al. Upregulation of microRNA-205 suppresses vascular endothelial growth factor expression-mediated PI3K/Akt signaling transduction in human keloid fibroblasts[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242(3): 275-285.
- [11] Yang X, Chen Y, Li M, et al. ERBB3 methylation and immune infiltration in tumor microenvironment of cervical cancer[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 8112.
- [12] Duan B, Zhu Z, You B, et al. Overexpression of ERBB3 promotes proliferation, migration, and angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(8): 2931-2940.
- [13] Russell K S, Stern D F, Polverini P J, et al. Neuregulin activation of ErbB receptors in vascular endothelium leads to angiogenesis[J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(6): H2205-2211.
- [14] Shi J, Lv H, Tang C, et al. Mangiferin inhibits cell migration and angiogenesis via PI3K/AKT/mTOR signaling in high glucose-and hypoxia-induced RRCECs [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 473.
- [15] Aigner F, Bodner G, Gruber H, et al. The vascular nature of hemorrhoids[J]. *J Gastrointest Surg*, 2006, 10(7): 1044-1050.
- [16] 谢逸轩, 王赛, 朱飞鹏, 等. 基于中西医临床病症特点的痔疮动物模型分析 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(7): 939-943.
- [17] Han S, Lin F, Ruan Y, et al. miR-132-3p promotes the cisplatin-induced apoptosis and inflammatory response of renal tubular epithelial cells by targeting SIRT1 via the NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99(10): 108022.
- [18] Kir D, Schnettler E, Modi S, et al. Regulation of angiogenesis by microRNAs in cardiovascular diseases[J]. *An-*

- [angiogenesis](#), 2018, 21(4): 699–710.
- [19] Zhang J, Zhang J, Pang X, et al. MiR-205-5p suppresses angiogenesis in gastric cancer by downregulating the expression of VEGFA and FGF1 [J]. [Exp Cell Res](#), 2021, 404(2): 112579.
- [20] Chen S, Wang Y, Su Y, et al. miR-205-5p/PTK7 axis is involved in the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells [J]. [Mol Med Rep](#), 2018, 17(5): 6253–6260.
- [21] Huang P, Zhang Y, Wang F, et al. MiRNA-205-5p regulates the ERBB4/AKT signaling pathway to inhibit the proliferation and migration of HAVSMCs induced by ox-LDL [J]. [Pathol Res Pract](#), 2022, 233(5): 153858.
- [22] Oltra M, Vidal-Gil L, Maisto R, et al. Oxidative stress-induced angiogenesis is mediated by miR-205-5p [J]. [J Cell Mol Med](#), 2020, 24(2): 1428–1436.
- [23] Sun J, Wu K, Chen S, et al. UHRF2 promotes Hepatocellular Carcinoma Progression by Upregulating ErbB3/Ras/Raf Signaling Pathway [J]. [Int J Med Sci](#), 2021, 18(14): 3097–3105.
- [24] Wu J, Liu C, Yu G. Downregulation of circ_PLXND1 inhibits tumorigenesis of non-small cell lung carcinoma via miR-1287-5p/ERBB3 axis [J]. [Thorac Cancer](#), 2023, 14(17): 1543–1555.
- [25] Yen L, Benlimame N, Nie Z R, et al. Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers [J]. [Mol Biol Cell](#), 2002, 13(11): 4029–4044.
- [26] Tu Y, Liu L, Zhao D, et al. Corrigendum: Overexpression of miRNA-497 inhibits tumor angiogenesis by targeting VEGFR2 [J]. [Sci Rep](#), 2016, 6(1): 21221.
- [27] Li J, Cao X, Chu T, et al. The circHMGCS1-miR-205-5p-ErBB3 axis mediated the Sanggenon C-induced anti-proliferation effects on human prostate cancer [J]. [Pharmacol Res](#), 2023, 187(1): 106584.
- [28] De Bacco F, Orzan F, Erriquez J, et al. ERBB3 overexpression due to miR-205 inactivation confers sensitivity to FGF, metabolic activation, and liability to ERBB3 targeting in glioblastoma [J]. [Cell Rep](#), 2021, 36(4): 109455.
- [29] Wang X, Liang Z, Xu X, et al. miR-148a-3p represses proliferation and EMT by establishing regulatory circuits between ERBB3/AKT2/c-myc and DNMT1 in bladder cancer [J]. [Cell Death Dis](#), 2016, 7(12): e2503.
- [30] 李娟, 师若迪, 陈雨婷, 等. 枸杞多糖通过 miRNA-21-5p 靶向 PTEN 调控 PI3K/Akt/mTOR 通路抗人视网膜色素上皮细胞光损伤机制 [J]. [中华中医药杂志](#), 2023, 38(8): 3588–3593.