

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.06.007

文章编号: 1005-8982(2017)06-0032-06

MicroRNA-203 抑制骨肉瘤细胞 增殖和迁移的机制研究

郭清皓, 蔡钧, 杨世疆, 蒋林涛

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院 急诊创伤外科, 湖北 武汉 430014)

摘要:目的 探讨 microRNA-203 (miR-203) 对骨肉瘤细胞增殖和迁移的影响及机制。**方法** 通过逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定 miR-203 在正常成骨细胞 hFOB 及骨肉瘤细胞系中的表达, 将 MG-63 细胞系分成 miR-203 组、Scramble 组、RAB22A 组、NC 组, Lipofectamine 2000 分别转染 miR-203 mimics, Scrambles, pcDNA3.1-RAB22A、空白对照质粒; 通过噻唑蓝 (MTT) 实验测定增殖能力, 细胞划痕实验测定迁移能力; 通过 Target Scan 和双荧光素酶实验预测及验证 miR-203 与 RAB22A 基因的靶向调节关系; RT-PCR 测定 RAB22A mRNA 表达水平; Western blot 测定 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平。**结果** miR-203 在骨肉瘤细胞系 SAOS-2、SOSP-9607、U2OS 及 MG-63 中较 hFOB 细胞系表达降低。MTT 显示, 在培养 48 和 72 h 后, miR-203 组相对细胞数少于 Scramble 组 ($P < 0.05$); 培养 24 h 后, Scramble 组细胞相对划痕面积小于 miR-203 组 ($P < 0.05$); 双荧光素酶实验示, miR-203 与 RAB22A 基因存在靶向调节关系。RAB22A 组相对划痕面积小于 NC 组 ($P < 0.05$); MTT 显示, 在培养 24、48 和 72 h 后, RAB22A 组相对细胞数多于 NC 组 ($P < 0.05$); RAB22A 组与 NC 组比较, E-cadherin 下调表达, N-cadherin 上调表达, Vimentin 上调表达。**结论** miR-203 通过下调 RAB22A 基因表达, 抑制上皮间质转化, 进而抑制骨肉瘤细胞增殖与迁移。

关键词: miR-203; RAB22A; 骨肉瘤; 增殖; 迁移

中图分类号: R738.1

文献标识码: A

Mechanism of microRNA-203 inhibiting proliferation and migration of osteosarcoma cells

Qing-hao Guo, Jun Cai, Shi-jiang Yang, Lin-tao Jiang

(Department of Emergency and Trauma Surgery, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430014, China)

Abstract: Objective To investigate the potential role of miR-203 in the regulation of the proliferation and migration of osteosarcoma cells, as well as the regulatory mechanism. **Methods** The expression levels of miR-203 in the osteosarcoma cells and the normal osteoblasts were measured by RT-PCR. The MG-63 cell line was divided into miR-203 group transfected with miR-203 mimics, scramble group transfected with scrambles, RAB22A group transfected with pcDNA3.1-RAB22A plasmid and NC group transfected with blank plasmid by Lipofectamine 2000. The cell migration ability was measured by wound healing assay. Cell number was examined by MTT assay. The target relationship between miR-203 and RAB22A gene was predicted and verified by Target Scan software and double luciferase assay. The expression level of RAB22A mRNA was measured by RT-PCR. The expression levels of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and RAB22A protein were measured by Western blot. **Results** Compared with the hFOB cells, the expression of miR-203 was significantly low in the osteosarcoma cell lines SAOS-2, SOSP-9607, U2OS and MG-63. MTT method showed that the number of MG-63 cells in the miR-203 group was significantly smaller than that in the scramble group after

收稿日期: 2016-09-27

[通信作者] 蒋林涛, E-mail: lintaojiang99@163.com

cultured for 48 and 72 h ($P < 0.05$). After cultured for 24 h, the relative scratch area of the scramble group was significantly smaller than that of the miR-203 group ($P < 0.05$). TargetScan software and double luciferase assay verified the target relationship between miR-203 and *RAB22A* gene. The relative scratch area in the *RAB22A* group was significantly smaller than that in the NC group ($P < 0.05$). MTT method showed that the number of the MG-63 cells was significantly increased in the *RAB22A* group compared with the NC group after cultured for 24, 48 and 72 h ($P < 0.05$). Compared with the NC group, E-cadherin expression was down-regulated, N-cadherin and Vimentin expressions were up-regulated in the *RAB22A* group. **Conclusions** MiR-203 inhibits proliferation and migration of osteosarcoma cells by inhibiting *RAB22A* gene expression and epithelial-mesenchymal transition.

Keywords: microRNA-203; *RAB22A*; osteosarcoma; proliferation; migration

骨肉瘤多发于儿童或青少年,其常转移部位是肺、胸膜^[1-2]。进一步明确骨肉瘤的发病机制对提高诊疗水平具有重要意义。MicroRNA(miRNAs)是一类内源性的非编码RNAs,其通过mRNA的3'非编码区结合而靶向下调基因表达^[3-4]。miRNAs调控着细胞周期、增值、凋亡等过程^[5]。研究报道,miR-203参与乳腺癌、前列腺癌、食道鳞癌等多种肿瘤的增殖、迁移及侵袭过程^[6-8]。然而,目前尚无miR-203对骨肉瘤增殖迁移影响的报道,本文研究microRNA-203(miR-203)对骨肉瘤细胞增殖和迁移的影响,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人成骨细胞系hFOB、SAOS-2、SOSP-9607、U2OS及MG-63骨肉瘤细胞系购自武汉大学医学院实验中心,无血清细胞冻存培养基(roswell park memorial institute 1640, RPMI 1640)、胎牛血清及胰蛋白酶购自美国Hyclone公司,Trizol购自美国Invitrogen公司,实验所需的一抗购自美国Santa Cruz公司,二抗购自武汉博士德生物科技有限公司,miR-203 mimics和Scrambles由上海吉玛基因化学技术有限公司定制合成,pcDNA3.1-RAB22A由美国Genscript公司定制,Lipofectamine 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司。

1.2 细胞培养、转染及分组

所有细胞系采用RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清和抗生素)培养于37℃、5%二氧化碳CO₂、饱和湿度的恒温细胞培养箱中。为探讨miR-203过表达对MG-63细胞系增殖和迁移的影响。将对数生长期的MG-63细胞系分成两组,分别为miR-203组和Scramble组,按Lipofectamine 2000说明书分别转染miR-203 mimics和Scrambles,终转染浓度为20 nmol。培养24 h后行噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-

2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]和细胞划痕实验。为探讨RAB22A过表达对MG-63细胞系增殖和迁移的影响及其机制,将MG-63细胞系分成两组,即RAB22A组和NC组。采用Lipofectamine 2000分别转染pcDNA3.1-RAB22A和空白对照质粒,培养24 h后行MTT及细胞划痕实验。

1.3 RNA提取和实时荧光定量聚合酶链反应

按Trizol reagent说明书,从培养细胞中提取总RNA,然后按照TaqMan RNA reverse transcription kit(美国ABI公司)说明书,5 ng总RNA逆转录合成cDNA。在ABI 7500实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪中,以 β -actin作为内参,量化miR-203的表达水平。使用SYBR Green PCR master mix试剂(美国Roche公司)在ABI 7500 qRT-PCR仪中进行qRT-PCR。miR-203正向引物:5'-GCTTTTGAGA ACGTGGATGAG-3';反向引物:5'-CGAAGATGGTGG CATAGAGAA-3';使用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}方法定量,以U6小核RNA作为内参,计算miR-203的相对表达量。

1.4 生物信息学分析及预测

通过Target Scan(<http://www.targetscan.org>)、mir DB(<http://mirdb.org>)及PicTar(<http://pictar.bio.nyu.edu>)3种生物信息学软件预测miR-203与RAB22A的靶向关系

1.5 荧光素酶实验

转染前24 h将MG-63细胞接种于24孔板中,分成3组,即突变型质粒组、野生型质粒组及阴性对照组,突变型质粒组共转染miR-203和突变型荧光素酶报告质粒pGL3-RAB22A 3'WT;野生型质粒组共转染miR-203和野生型荧光素酶报告质粒pGL3-RAB22A 3'UTR,阴性对照组共转染miR-203和对照荧光素酶质粒。24 h后使用双荧光素酶报告基因系统进行荧光活性检测。实验重复3次,6个复孔/次。以海肾荧光素光吸收值作为内参,数据计

算方法: 萤光素酶活性 = 萤火虫萤光素光吸收值 / 海肾萤光素光吸收值。

1.6 MTT 实验

MG-63 细胞以 1×10^4 个 / 孔接种于 12 孔板中, 培养 24 h 后行相应的转染实验, 在培养箱中分别培养 0、12、24、48 和 72 h 后添加 5 mg/ml MTT 溶液 $40 \mu\text{l}$, 孵育 4 h 后加入二甲基亚砜 $200 \mu\text{l}$ / 孔, 摇床上充分震荡。490 nm 波长测定吸光度值。相对细胞数 = 实验组数值 / 对照组数值 $\times 100\%$

1.7 细胞划痕实验

将 miR-203 组和 Scramble 组、RAB22A 组和 NC 组 MG-63 细胞用 RPMI 1640 (含 10% 胎牛血清) 培养在 6 孔板上, 待融合后, 用灭菌枪头划直线, 划痕后 0~24 h, 用反转的 Olympus IX50 显微镜通过 10 倍物镜和 Image-Pro Plus 软件捕获测量划痕面积, 实验重复 3 次, 划痕面积越大, 表示迁移能力越弱。

1.8 Western blot 检测

培养 24 h 后消化细胞, 提取细胞总蛋白, 蛋白变性、上样, 每泳道上样量为 $50 \mu\text{g}$ 蛋白。50 V、100 mA 电泳 2 h 结束后, 聚偏氟乙烯膜转印。脱脂奶粉液封闭 2 h。三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水清洗, 分别加入 RAB22A 一抗 (1:200)、E-cadherin 一抗 (1:200)、N-cadherin 一抗 (1:200)、Vimentin 一抗 (1:200)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗 (1:200), 二抗浓度 1:1000, 增强化学发光法显影。用软件 Image J 测量 Western blot 相关条带进行定量。目的蛋白的相对数值 = 目的 Western blot 定量数值 / GAPDH Western blot 数值。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 用 Graphpad 6.0 统计作图软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较用 *t* 检验, 多组间比较用方差分析, 若方差齐则两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

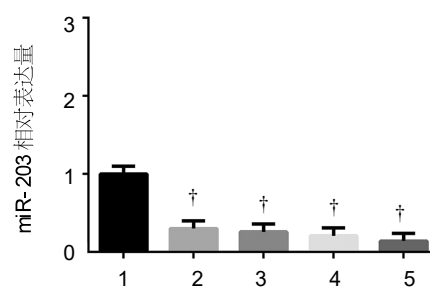
2 结果

2.1 miR-203 在骨肉瘤及正常成骨细胞系中的表达

qRT-PCR 结果显示, 正常人类成骨细胞系 hFOB 的 miR-203 相对表达量为 (1.0 ± 0.09), miR-203 在骨肉瘤细胞系 SAOS-2 的相对表达量为 (0.32 ± 0.07), miR-203 在 SOSP-9607 细胞系的表达量为 (0.30 ± 0.05), miR-203 在 U2OS 细胞系的表达量为 (0.26 ± 0.05), miR-203 在 MG-63 细胞系中表达量为 (0.15 ± 0.04), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 3.841, P = 0.037$); 进一步两两比较结果, 骨肉瘤细胞系 SAOS-2、SOSP-9607、U2OS 及 MG-63 细胞系中 miR-203 相对表达量低于人正常成骨细胞系 hFOB。见图 1。

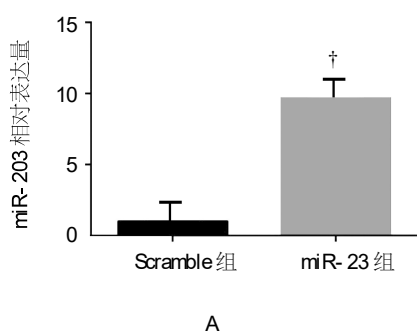
2.2 过表达 miR-203 抑制 MG-63 细胞的增殖和迁移

转染 miR-203 mimics 后, miR-203 组 miR-203 相对表达量为 (9.3 ± 0.3), Scramble 组 miR-203 相对表达量为 (1.5 ± 0.2), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 37.469, P = 0.021$), miR-203 组 miR-203 相对表达量高于 Scramble 组 (见图 2A)。MTT 结果示, 在培养 48 h 后, miR-203 组相对细胞数为 (1.2 ± 0.1), Scramble 组相对细胞数为 (2.5 ± 0.2), 经 *t* 检验, 差

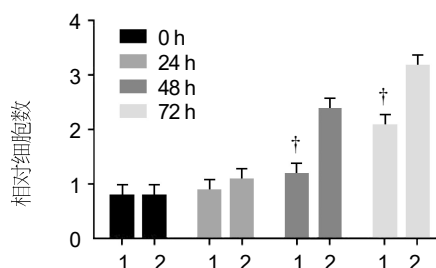


1:hFOB;2:SAOS-2;3:SOSP-9607;4:U2OS;5:MG-63。†与 hFOB 比较, $P < 0.05$

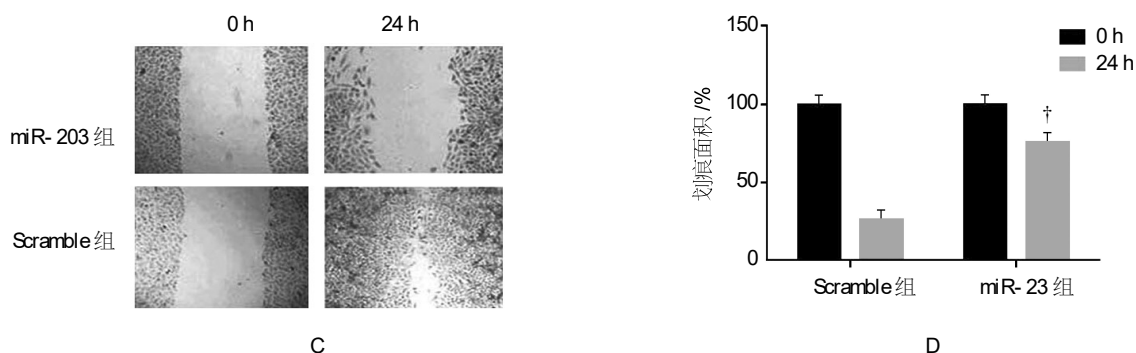
图 1 miR-203 在骨肉瘤和成骨细胞系中的表达



A



B



A: 两组 miR-203 相对表达量比较; B: 两组相对细胞数比较; C, D: 两组划痕面积比较。1: miR-203 组; 2: Scramble 组。† 与 Scramble 组比较, $P < 0.05$

图 2 过表达 miR-203 抑制 MG-63 细胞增殖和迁移

异有统计学意义 ($t = -10.069, P = 0.019$); 培养 72 h 后, miR-203 组相对细胞数为 (2.1 ± 0.2), Scramble 组相对细胞数为 (3.3 ± 0.2), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = -6.736, P = 0.001$), miR-203 组相对细胞数少于 Scramble 组 (见图 2B)。培养 24 h 后, Scramble 组细胞相对划痕面积为 (25.4 ± 4.3)%, miR-203 组细胞相对划痕面积为 (81.5 ± 6.3)%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = -12.739, P = 0.031$), Scramble 组细胞相对划痕面积少于 miR-203 组 (见图 2C, D)。

2.3 miR-203 靶向抑制 RAB22A 基因的表达

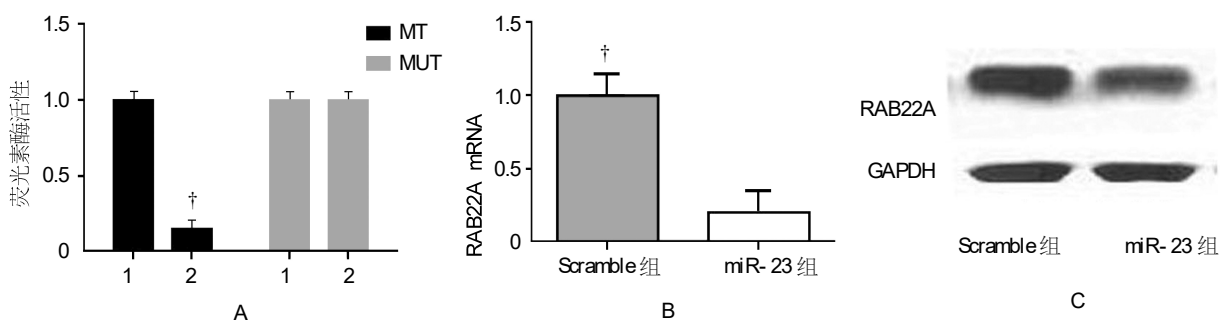
通过 TargetScan 预测 miR-203 和 RAB22A 基因 3' 端非翻译区的结合位点; 构建野生型 RAB22A 的 3' UTR 端、突变型的荧光素酶报告质粒及阴性对照荧光素酶质粒。野生型质粒组、突变型质粒组、阴性对照组的相对荧光素酶活性分别为 (0.19 ± 0.08)、(1.0 ± 0.13) (1.0 ± 0.15), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 4.753, P = 0.025$); 进一步两两比较, 野生型质粒组与突变型质粒组、阴性对照组比较, 经 LSD- t 检验, 差异有统计学意义 ($t = -8.252$ 和 $-9.191, P = 0.003$ 和 0.012), 野生型质粒组荧光素酶活性低于

突变型质粒组和阴性对照组 (见图 3A)。

qRT-PCR 结果显示, miR-203 组的 RAB22A mRNA 相对表达量为 (0.22 ± 0.09), Scramble 组相对表达量为 (1.00 ± 0.14), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = -8.117, P = 0.025$), miR-203 组 RAB22A mRNA 相对表达量低于 Scramble 组 (见图 3B), Western blot 检测显示, miR-203 组 RAB22A 蛋白表达量为 (1.38 ± 0.41), Scramble 组表达量为 (4.28 ± 0.49), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = -7.861, P = 0.012$), miR-203 组 RAB22A 蛋白表达量低于 Scramble 组 (见图 3C)。

2.4 过表达 RAB22A 促进 MG-63 细胞增殖和迁移

MG-63 细胞系转染 pcDNA3.1-RAB22A 后, RAB22A 组 RAB22A 蛋白表达量为 (8.20 ± 0.48), 阴性对照组为 (1.1 ± 0.18), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 23.988, P = 0.039$), RAB22A 组 RAB22A 蛋白表达量高于阴性对照组 (见图 4A, B)。培养 24 h 后, RAB22A 组细胞相对划痕面积为 (18.4 ± 2.3)%, 阴性对照组为 (41.5 ± 5.9)%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = -6.318, P = 0.001$), RAB22A 组细胞相对划痕面积少于阴性对照组 (见图 4C, D)。MTT 结果显

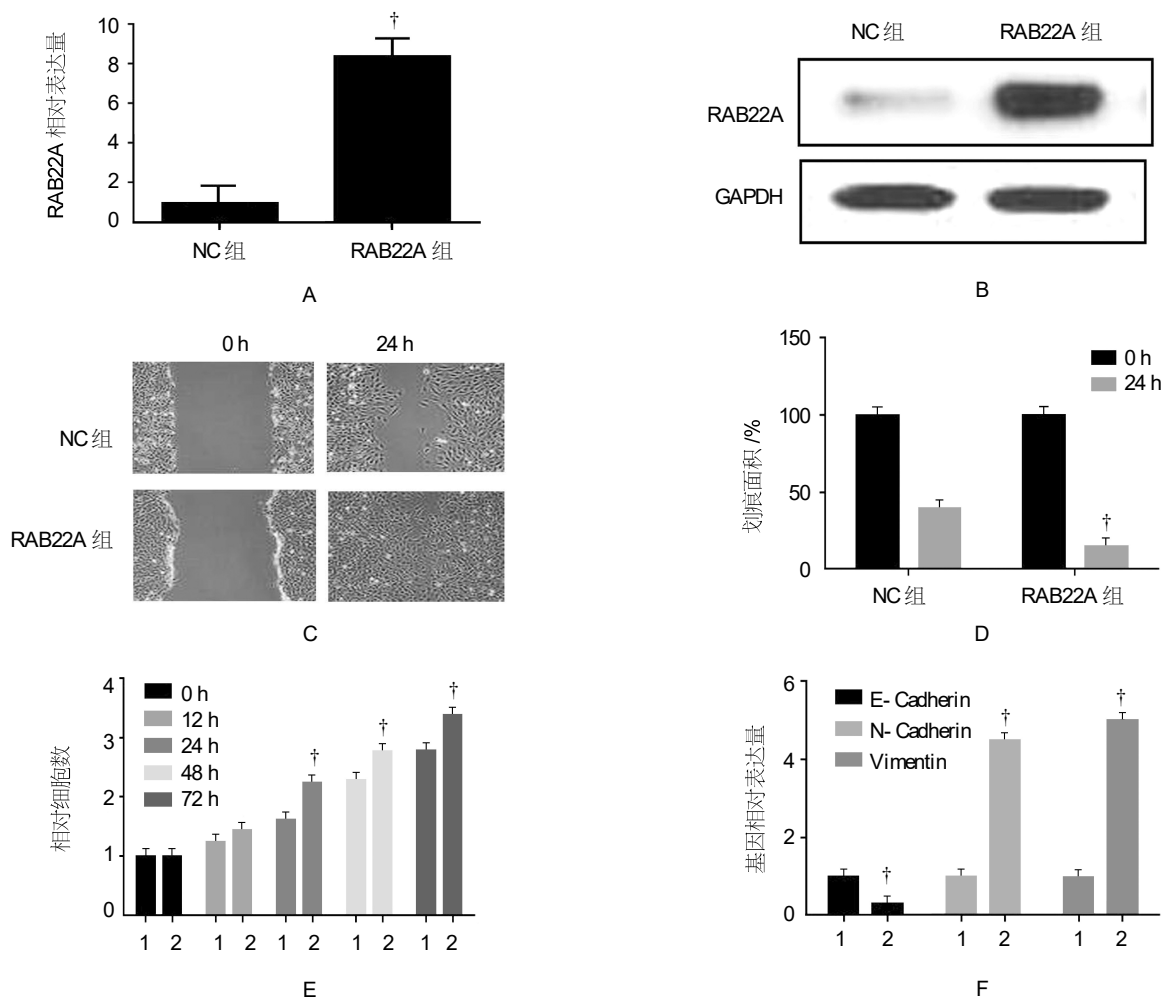


A: miR-203 抑制 RAB22A 3' UTR 介导的荧光素酶活性; B: miR-203 抑制 RAB22A mRNA 的表达; C: miR-203 抑制 RAB22A 蛋白表达。1: Scramble 组; 2: miR-203 组。† 与 Scramble 组比较, $P < 0.05$

图 3 miR-203 靶向抑制 RAB22A 的表达

示,在培养 24、48 和 72 h 后,RAB22A 组相对细胞数分别为 2.3 ± 0.16 (2.8 ± 0.23) 和 3.5 ± 0.31 ,阴性对照组相对细胞数分别为 1.6 ± 0.13 (2.3 ± 0.19) 和 (2.9 ± 0.23) ,两组 24、48 和 72 h 相对细胞数比较,经 t 检验,差异有统计学意义($t = 5.881$ 、 2.902 和 2.692 , $P = 0.002$ 、 0.021 和 0.027),RAB22A 组相对细

胞数多于阴性对照组(见图 4E)。RAB22A 组与 NC 比较,E-cadherin 下调表达 [0.18 ± 0.09] vs (1.1 ± 0.15)($t = -9.109$, $P = 0.000$),N-cadherin 上调表达 [4.6 ± 0.73] vs (1.13 ± 0.24)($t = 7.821$, $P = 0.000$),Vimentin 上调表达 [5.1 ± 0.73] vs (1.09 ± 0.19)($t = 9.207$, $P = 0.000$) (见图 4F)。



A、B: 转染 pcDNA3.1-RAB22A 后,RAB22A 蛋白表达量上调;C、D: RAB22A 组细胞划痕面积低于 NC 组;E: RAB22A 组的 MG-63 相对细胞数高于 NC 组;F: 过表达 RAB22A 下调 E-cadherin 表达,上调 N-cadherin 和 Vimentin 表达。1: NC 组;2: RAB22A 组。† 与 NC 组比较, $P < 0.05$

图 4 过表达 RAB22A 促进 MG-63 细胞的增殖和迁移

3 讨论

骨肉瘤是好发于长骨端的恶性肿瘤,诊断主要依靠病史、检验结果及影像学资料。局部肿痛、跛行为骨肉瘤的常见临床表现,软组织肿块和骨皮质增生及特征性的 Codmans 三角为常见的影像学特征^[9]。治疗方法包括手术、化疗、放疗及免疫治疗等。但骨肉瘤预后仍较差。据研究报道,年龄 <30 岁的骨肉瘤患者 5 年生存率达 60%,30~49 岁的 5 年生存率

达 50%,>50 岁的 5 年生存率仅为 30%^[10]。近年来,一系列的医学研究指出,miRNAs 在不同肿瘤组织中表达异常,并对肿瘤的发生有着重要的作用^[5-8]。因此 miRNAs 被认为是一种潜在的肿瘤诊断与治疗的新靶标。近期报道指出,miR-203 与乳腺癌、前列腺癌、食管鳞癌、膀胱癌,的增殖与迁移相关^[6-8,11-13]。WANG 等^[8]报道,沉默 miR-203 可通过靶向 BIRC5 和 LASP1 蛋白而抑制三阴乳腺癌增殖和迁移。miR-

203被报道在前列腺癌组织中低表达,是抑癌基因,过表达 miR-203 可抑制前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[7]。在食管鳞癌中,miR-203 可通过 Np63 信号通路抑制食管鳞癌细胞增殖^[8]。梁佳等^[12]报道,miR-203 在食管癌细胞及组织中呈低表达,呈高甲基化状态,且与 TNM 分期及组织分化程度相关。胡俊华等^[13]报道,miR-203 转染胃癌细胞系 SGC7901 后,侵袭能力减弱,凋亡增加,并通过靶向调控 SNAI 2 降低胃癌细胞侵袭能力,促进其凋亡。徐磊等^[14]报道,miR-203 可靶向调节 Bmi-1 基因,下调其表达,通过下调 Bmi-1 基因表达抑制 H1975 肺腺癌细胞株的侵袭转移,可作为一种潜在的抑制转移的分子。

本研究探讨 miR-203 对骨肉瘤细胞的增殖和迁移的影响及其调控机制,结果发现 miR-203 在骨肉瘤细胞系 SAOS-2、SOSP-9607、U2OS 及 MG-63 中呈显著低表达,说明 miR-203 在骨肉瘤细胞系中表达异常。这与 miR-203 在前列腺癌、乳腺癌等肿瘤中的表达情况相一致^[6-9]。通过在 MG-63 细胞过表达 miR-203,发现 miR-203 组的相对细胞数少于对照组,细胞划痕面积大于对照组,提示 miR-203 抑制 MG-63 的细胞增殖及迁移能力,与前列腺癌、食管鳞癌及乳腺癌中的报道相一致^[6-9]。

RAB22A 是 Ras GTP 酶超家族成员^[19]。有研究表明,RAB22A 是一个原癌基因,并与多种肿瘤关系密切^[16]。例如,RAB22A 促进胃癌的增殖及侵袭^[17]。本课题探讨 miR-203 对 RAB22A 基因的表达调控作用。实验发现,miR-203 抑制 RAB22A 3' UTR 介导的萤光素酶活性,并下调其基因和蛋白表达水平。因此,miR-203 能直接抑制 RAB22A 基因的表达,RAB22A 是 miR-203 的直接作用靶标。进一步实验发现,RAB22A 组 MG-63 细胞划痕面积低于对照组,相对细胞数高于对照组。因此,RAB22A 过表达能促进 MG-63 的细胞增殖及迁移,进一步发现,RAB22A 下调 E-cadherin,上调 N-cadherin 和 Vimentin 基因的表达。因此,RAB22A 能抑制 MG-63 细胞的上皮间充质转化。该结果与前述 RAB22A 在胃癌中的细胞调控功能相一致^[17]。

综上所述,miR-203 通过抑制 RAB22A 基因的表达,进而抑制上皮间质转化,而抑制骨肉瘤细胞的增殖及迁移。这是一种调控骨肉瘤细胞增殖与迁移的新机制,为骨肉瘤发病机制的研究提供新的线索。miR-203 可望成为骨肉瘤诊断的一种潜在的生物标志物,并可能成为治疗的新靶标。

参 考 文 献:

- [1] MIRABELLO L, TROISI R J, SAVAGE S A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons[J]. Int J Cancer, 2009, 125(1): 229-234.
- [2] HAWKINS D S, ARNDT C A. Pattern of disease recurrence and prognostic factors in patients with osteosarcoma treated with contemporary chemotherapy[J]. Cancer, 2003, 98(11): 2447-2456.
- [3] CALIN G A, CROCE C M. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale[J]. Cancer Res, 2006, 66(15): 7390-7394.
- [4] FARAZI T A, HOELL J I, MOROZOV P, et al. MicroRNAs in human cancer[J]. Springer Netherlands, 2013, 223(2): 102-115.
- [5] IORIO M V, CROCE C M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. Embo Mol Med, 2012, 4(3): 143-159.
- [6] WANG C, ZHENG X, SHEN C, et al. MicroRNA-203 suppresses cell proliferation and migration by targeting BIRC5 and LASP1 in human triple-negative breast cancer cells[J]. Int J Clin Exp Med, 2012, 31(1): 1.
- [7] VITICCHIÈ G, LENA A M, LATINA A, et al. MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines[J]. Cell Cycle, 2011, 10(7): 1121-1131.
- [8] YUAN Y, ZENG Z Y, LIU X H, et al. MicroRNA-203 inhibits cell proliferation by repressing Δ Np63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 1.
- [9] 任为端,程开明,蓝健君.磁共振成像诊断骨肉瘤的临床价值[J].山东医药,2004,2(44):23-24.
- [10] DAMRON T A, WARD W G, STEWART A. Osteosarcoma, chondrosarcoma, and ewing's sarcoma: national cancer data base report[J]. Clin Orthop Relat R, 2007, 459: 40-47.
- [11] ICHIMI T, ENOKIDA H, OKUNO Y, et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer[J]. INT J CANCER, 2009, 125(2): 345-352.
- [12] 梁佳,董稚明,李宏,等. MicroRNA-203 在人食管鳞癌组织和细胞中的表达及其基因的甲基化状态[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2014,21(4):376-382.
- [13] 胡俊华,王琦,杨艳果,等. miR-203 通过 SNAI2 的靶向作用对胃癌细胞 SGC7901 侵袭和凋亡的影响[J].武汉大学学报(医学版),2014,35(6):857-861.
- [14] 徐磊,蒋峰,杨欣,等. miR-203 下调 Bmi-1 基因对肺腺癌细胞侵袭转移的影响[J].临床肿瘤学杂志,2014,4:1.
- [15] COLICELLI J. Signal transduction: RABGEF1 fingers RAS for ubiquitination[J]. Curr Biol, 2010, 20(15): R630-R632.
- [16] KONSTANTINOPOULOS P A, KARAMOUZIS M V, PAPAVALSILIOU A G. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets[J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(7): 541-555.
- [17] ZHANG B, YIN Y, HU Y, et al. MicroRNA-204-5p inhibits gastric cancer cell proliferation by downregulating USP47 and RAB22A[J]. Med Oncol, 2015, 32(1): 1-8.

(童颖丹 编辑)