

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002279

miR-505对骨肉瘤细胞增殖、侵袭的影响及相关机制研究

杨 晋,瓦庆德,余 浩,杨继滨,桑 鹏

(遵义医学院附属医院骨一科,遵义 563003)

【摘要】目的:探讨 miR-505 对骨肉瘤细胞增殖、侵袭的影响及相关机制。**方法:**采用 q-PCR 测定人成骨细胞 hFOB1.19 及骨肉瘤细胞 MG63 中的 miR-505 水平。分别设置 miR-505 mimics 组与阴性对照 (miR-NC) 组,采用 Lipofectamine™ 2000 将 miR-505 mimics 及 miR-NC 转染至 MG63 细胞中,比较 2 组细胞增殖速率及侵袭细胞数,进一步采用 Western blot 及 q-PCR 考察转染 miR-505 的 MG63 细胞中 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1、HMGB-1 及 β -联蛋白(β -catenin)、磷酸糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 的蛋白及 mRNA 水平。**结果:**骨肉瘤细胞 MG63 中 miR-505 水平为 0.57 ± 0.06 ,明显低于人成骨细胞 hFOB1.19 的 1.03 ± 0.12 ($P < 0.01$)。转染 miR-505 后,miR-505 mimics 组的表达量为 3.59 ± 0.37 ,明显高于 miR-NC 组的 1.09 ± 0.12 ($P < 0.01$)。miR-505 mimics 组转染 48 h 和 72 h 后的 $OD_{450\text{nm}}$ 值分别为 0.84 ± 0.09 和 1.29 ± 0.13 ,均明显低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。miR-505 mimics 组侵袭细胞数为 (42.84 ± 4.35) 个,明显低于 miR-NC 组的 (66.84 ± 6.85) 个 ($P < 0.05$)。miR-505 mimics 组 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 蛋白水平均低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。miR-505 mimics 组 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 mRNA 水平均低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。同时,miR-505 mimics 组 Wnt 信号通路中关键靶点 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白与基因表达均明显低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。**结论:**miR-505 可通过抑制 Wnt 信号通路,下调 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 表达,从而抑制骨肉瘤细胞的增殖与侵袭。

【关键词】miR-505;骨肉瘤;细胞增殖;细胞侵袭;Wnt 信号通路**【中图分类号】**R738.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-04-10

Effect of miR-505 on proliferation and metastasis of osteosarcoma cells and its related mechanisms

Yang Jin, Wa Qingde, Yu Hao, Yang Jibin, Sang Peng

(Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of miR-505 on proliferation and metastasis of osteosarcoma cells and its mechanisms. **Methods:** The miR-505 level in human osteoblast of hFOB1.19 and osteosarcoma of cell MG63 was determined by q-PCR. The miR-505 mimics group and the negative control group (miR-NC) were set. Both miR-505 mimics and miR-NC were transfected into MG63 cells with Lipofectamine TM 2000 and cell proliferation rate and invasive cells were compared between two groups. Proteins and mRNA levels of MMP-9, CDK4, Cyclin-D1, HMGB-1, β -catenin and GSK-3 β in MG63 cells transfected with miR-505 was further detected via Western blot and q-PCR technologies. **Results:** The expression level of miR-505 in osteosarcoma cell of MG63 was 0.57 ± 0.06 , which was significantly lower than that of 1.03 ± 0.12 in human osteoblast of hFOB1.19 ($P < 0.01$). After transfecting miR-505, expression level in the miR-505 mimics group was 3.59 ± 0.37 , which was significantly higher than that of 1.09 ± 0.12 in the miR-NC group ($P < 0.01$). After transfecting 48 h and 72 h, $A_{450\text{nm}}$ values in the miR-505 mimics group were 0.84 ± 0.09 and 1.29 ± 0.13 , respectively, which were significantly lower than those in the miR-NC group ($P < 0.05$). Invasive cells in the miR-505 mimics group was (42.84 ± 4.35) , which was significantly lower than that of (66.84 ± 6.85) in miR-NC group ($P < 0.05$). Protein levels of MMP-9, CDK4, Cyclin-D1 and HMGB-1 in the miR-505 mimics group were lower than those in the miR-NC group ($P < 0.05$). The mRNA levels of MMP-9, CDK4, Cyclin-D1 and HMGB-1 in the miR-505 mimics group were lower than those in the miR-NC group ($P < 0.05$). Meanwhile, protein and gene expressions of β -catenin and GSK-3 β in Wnt signaling pathway in the miR-505 mimics group were significantly lower than those in the miR-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The miR-505 can down-regulate the expres-

sion of MMP-9, CDK4, Cyclin-D1 and HMGB-1 by inhibiting Wnt signaling pathway, so as to inhibit the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells.

【Key words】miR-505; osteosarcoma; proliferation; metastasis; Wnt signaling pathway

作者介绍:杨 晋,Email:yangjin_2004@163.com,
研究方向:四肢骨病、创伤。

基金项目:贵州省科技合作计划资助项目(编号:黔科合 LH[2015] 7496)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190917.1045.022.html>
(2019-09-18)

骨肉瘤是一种好发于男性青年的骨原发性恶性肿瘤,预后较差^[1]。临床报道发现,骨肉瘤早期阶段症状不明显,患者只有出现疼痛和肿胀症状后才就医,耽误了最佳治疗时间^[2]。骨肉瘤最主要的治疗方式包括手术与化疗。骨肉瘤患者术后或化疗后 5 年生存率较低,发生侵袭或复发的可能性较高^[3]。因此,研究复发或侵袭骨肉瘤的治疗方法至关重要。miRNA 是近些年来研究的热点,且与肿瘤发生与进展有关。据报道,miR-505 是一种非编码微小分子 RNA,其异常表达与肿瘤发生发展有关。有学者证实,miR-505 水平与肺癌患者病理类型相关^[4],但在骨肉瘤的功能尚未明确,因此本研究主要探讨 miR-505 对骨肉瘤细胞增殖、侵袭的影响,并进一步研究其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 骨肉瘤细胞 MG63、人成骨细胞 hFOB1.19 均购自上海生物细胞研究所,由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Trizol™ Reagent 购自成都东胜科创科技有限公司;SYBR Green qPCR Mix 购自上海泽叶生物科技有限公司;4×Reverse Transcription Master Mix 购自上海海方生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒购自上海钰博生物科技有限公司;Transwell 小室购自上海子起生物科技有限公司;Lipofectamine™ 2000 试剂购自上海冰晴生物科技有限公司;miR-505 模拟物(miR-505 mimics)、阴性对照(mimics-NC)购自上海英潍捷基有限公司;胎牛血清购自上海江林生物科技有限公司;Gibco 高糖 DMEM 培养基购自上海酶研生物科技有限公司;引物由上海生工生物工程公司设计合成(miR-505 引物序列:TaqMan:GTCGTATCCAGTGGTGTCTGGAGTCGG-CAATTGCACTGGATACGACAGGAAA;Forward:5'-CGTCAA-CACTTGCTGG-3';Reverse:5'-TGCTGTCGTGGAGTCG-3';U6:Forward:5'-GCTCGCTTCGGCAGCACA-3';Reverse:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3');MMP-9、CDK4、Cyclin-D1、HMGB-1、β-联蛋白(β-catenin)及磷酸糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)单克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗均购自日本 Takara 公司。

1.1.3 仪器 小型蛋白垂直电泳转印系统 1658033(武汉科昊佳生物科技有限公司);CG-05 荧光定量 PCR 仪(武汉益普生物科技有限公司);TG-16 台式高速离心机(四川蜀科仪器有限公司);Life ProFlex™3×32 梯度 PCR 仪(北京安麦格贸易有限公司);美国 SHELLAB 2406-2 CO₂ 培养箱(广州聚能

纳米生物科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 q-PCR 检测细胞 miR-505 的表达 收集细胞后,PBS 洗涤 2 遍,离心取细胞沉淀,按照 Trizol™ Reagent 说明书提取骨肉瘤细胞 MG63、人成骨细胞 hFOB1.19 的总 RNA,依据 4×Reverse Transcription Master Mix 试剂盒说明书将组织总 RNA 逆转录为总 cDNA,按照 SYBR Green qPCR Mix 试剂盒说明书操作,以 cDNA 为模板,进行荧光定量 PCR 反应。反应条件:94 ℃ 2 min,94 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s,共 40 个循环。以 U6 为内参,进行数据统计学分析。miR-505 基因相对表达量以 2^{-ΔΔCt} 表示。

1.2.2 细胞培养 使用 10%FBS+2%双抗的高糖 DMEM 培养基培养 MG63 细胞及人成骨细胞 hFOB1.19,并置于 37 ℃、5%CO₂ 的 SHELLAB 2406-2 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.3 细胞转染 分别设置 miR-505 mimics 组与阴性对照(miR-NC)组,待 MG63 细胞生长至对数期时,使用胰酶消化细胞后,洗涤 2 遍后应用完全培养基将细胞调至 3.0 × 10⁶ 个/mL,取 200 μL 细胞液接种至 Corning 6 孔板中培养 24 h。分别向 3 个 EP 管中加入 5 μL Lipofectamine™ 2000,5 μL Lipofectamine™ 2000+阴性质粒 miR-NC,5 μL Lipofectamine™ 2000+5 μL miR-505 mimics,室温静置 5 min 后混合,加入不含血清的 DMEM 培养基调整终体积至 2 mL,置于 37 ℃、5%CO₂、饱和湿度下培养 6 h 后,更换完全培养基继续培养,完成 MG63 细胞转染。

1.2.4 q-PCR 检测转染后细胞内 miR-505 的表达 细胞转染成功后,采用 q-PCR 技术检测细胞内 miR-505 的表达,具体步骤参照“1.2.1”。

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖水平 待转染后的 MG63 细胞生长至对数期,使用胰酶消化细胞,洗涤 2 遍后应用完全培养基将细胞调至 3.0 × 10³ 个/mL,每孔(96 孔板)接种 100 μL 细胞液。分别培养 24、48、72 h,加入配置好的 CCK-8 试剂(10 μL CCK-8 试剂+90 μL 完全培养基)孵育 2 h,采用 CLARIOstar 多功能酶标仪检测 450 nm 处光密度(optical density,OD)值,记为 OD_{450nm}。OD 值=实验孔 OD 值-空白对照孔 OD 值。

1.2.6 Transwell 小室检测细胞侵袭能力 消化 MG63 细胞后使用含血清 DMEM 培养基将细胞浓度调至 3 × 10⁵ 个/mL,取 100 μL 细胞液接种于 Transwell 小室的上室中,下室中加入 500 μL 20%FBS 的 DMEM 培养基,然后将 Transwell 小室置于培养箱 24 h。从 CO₂ 培养箱取出 Transwell 培养板,弃去 Transwell 小室上层中的液体,使用棉签轻轻擦拭小室上层,倒扣小室,室温放置 3~5 min。弃去孔中的液体,采用无钙 PBS 清洗 2 遍,4%甲醛固定 30 min,使用 1%结晶紫进行染色,染色时间 10 min。将 Transwell 培养板置于显微镜下,随机取 5 个视野拍照并计数。

1.2.7 Western blot 检测转染后 MG63 细胞相关蛋白水平

按照 1:10(g/mL)的比例加入 RIPA 裂解液,按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书方法测定所提取的各组细胞的总蛋白含量,以确保每组样本之间的上样量相同。裂解、提取各组蛋白后,经 SDS-PAGE 电泳分离,转至硝酸纤维素(PVDF)膜,将转好的 PVDF 膜于 5%脱脂奶粉溶液中室温封闭 2 h, TBST 洗涤液漂洗 3、4 次。加入一抗,4℃孵育过夜。再漂洗 3、4 次,加入 HRP 标记的二抗体,室温孵育 2 h,漂洗 3、4 次。化学发光检测底物 ECL 工作液显色,采用 Image J 图像分析系统对蛋白显影图进行灰度分析,以 GAPDH 为内参,测定 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 蛋白水平。

1.2.8 miR-505 对细胞 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 mRNA 的影响 收集细胞,洗涤 2 遍,离心取细胞沉淀,按照 Trizol™ Reagent 说明书提取 miR-505 mimics 组与 miR-NC 组骨肉瘤细胞 MG63 的总 RNA,PCR 扩增步骤参照“1.2.1”项下方法进行,以 GAPDH 为内参。

1.2.9 miR-505 对细胞 Wnt 信号通路的调控作用 按“1.2.7”项下方法检测 MG63 细胞 Wnt 信号通路中关键靶点 β -联蛋白(β -catenin)、磷酸糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)蛋白水平。并收集细胞后,PBS 洗涤 2 次,离心取细胞沉淀,按照 Trizol™ Reagent 说明书提取 miR-505 mimics 组与 miR-NC 组骨肉瘤细胞 MG63 的总 RNA,按“1.2.1”项下方法进行 PCR 扩增,均以 GAPDH 为内参,分别检测 β -catenin、GSK-3 β 的 mRNA 水平。引物由上海生工生物工程公司设计提供,引物见表 1。

表 1 Wnt 信号通路关键基因引物序列

基因	引物序列	产物长度 (bp)
β -catenin	上游 5'-CTTACGGCAATCAGGAAAGC-3'	134
	下游 5'-GACAGACAGCACCTTCAGCA-3'	
GSK-3 β	上游 5'-AGGCTGTGTGTGTGGCTGAAT-3'	113
	下游 5'-TTT GCTCCCTGTTGGTGT-3'	
GAPDH	上游 5'-GACATGCCCGCTGGAGAAAC-3'	92
	下游 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTA GT-3'	

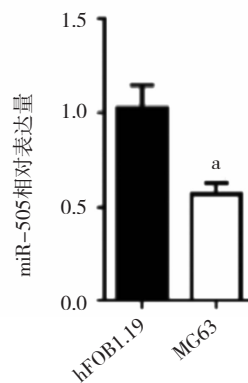
1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间各指标水平比较均采用独立 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 骨肉瘤细胞 MG63 中 miR-505 的表达水平

骨肉瘤细胞 MG63 的表达水平为 0.57 ± 0.06 ,正常人成骨细胞 hFOB1.19 为 1.03 ± 0.12 ,骨肉瘤细胞 MG63 miR-505 表达量(0.57 ± 0.06)明显低于人成骨细胞 hFOB1.19(1.03 ± 0.12)($t=16.587, P=0.005; t=14.551, P=0.009$),如图 1 所示。

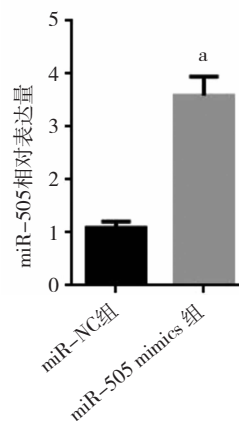


注:a,与正常人成骨细胞 hFOB1.19 比较, $P < 0.01$

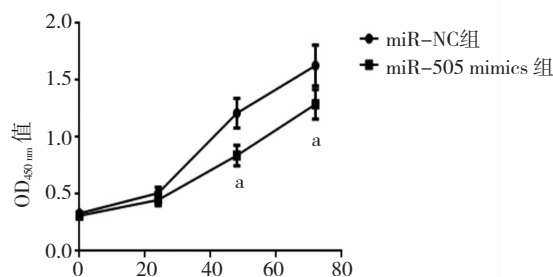
图 1 骨肉瘤细胞 MG63 中 miR-505 的表达水平

2.2 转染后 miR-505 的表达及其对细胞增殖的影响

MG63 细胞转染 miR-505 模拟物后,miR-505 的表达量为 3.59 ± 0.37 ,明显高于 miR-NC 的 1.09 ± 0.12 ($t=27.946, P=0.006$),转染 miR-505 mimics 24、48 和 72 h 后,miR-505 mimics 组细胞的 OD_{450 nm} 值分别为 0.46 ± 0.03 、 0.84 ± 0.09 和 1.29 ± 0.13 ;其中,转染 48 h 和 72 h 后,miR-505 mimics 组(1.21 ± 0.13)明显低于 miR-NC 组(1.63 ± 0.18)($t=9.928, P=0.008; t=6.497, P=0.005$),如图 2 所示。说明转染 miR-505 后,骨肉瘤细胞 MG63 的增殖能力降低。



A. 转染后 miR-505 的相对表达量



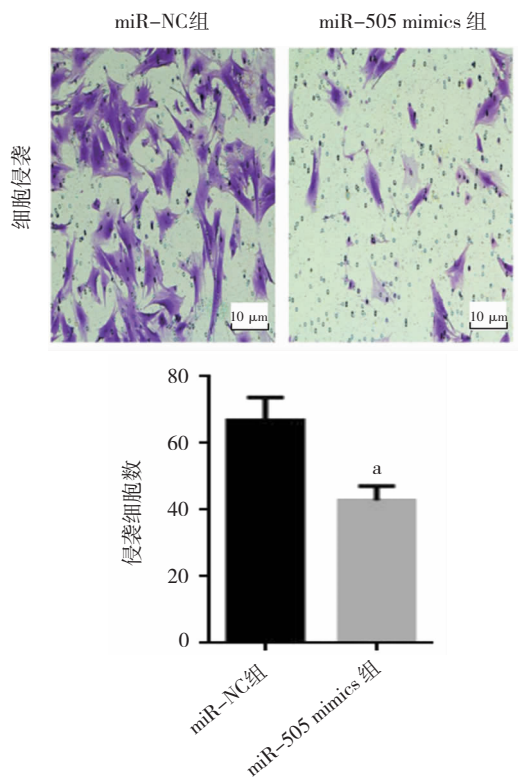
B. 转染 miR-505 对 MG63 细胞增殖的影响

注:a,与阴性对照 miR-NC 组比较, $P < 0.05$

图 2 miR-505 对 MG63 细胞增殖的影响

2.3 miR-505 对 MG63 细胞侵袭的影响

细胞转染后,miR-505 mimics 组侵袭细胞数为 (42.84 ± 4.35) 个,明显低于 miR-NC 组侵袭细胞数量的 (66.84 ± 6.85) 个,2 组间比较,差异有统计学意义($t=12.546, P=0.017$),如图 3 所示。提示 MG63 转染 miR-505 后细胞侵袭能力降低。

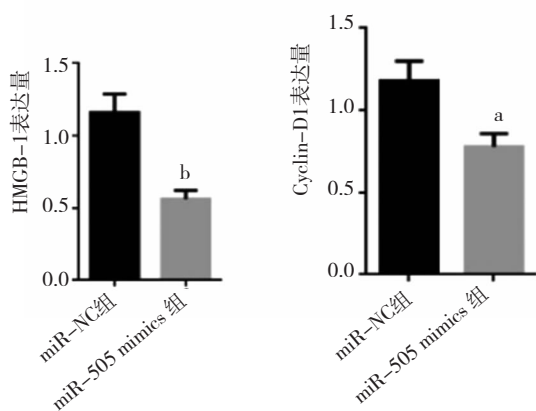


注:a,与阴性对照 miR-NC 组比较, $P < 0.05$

图 3 miR-505 对细胞侵袭的影响

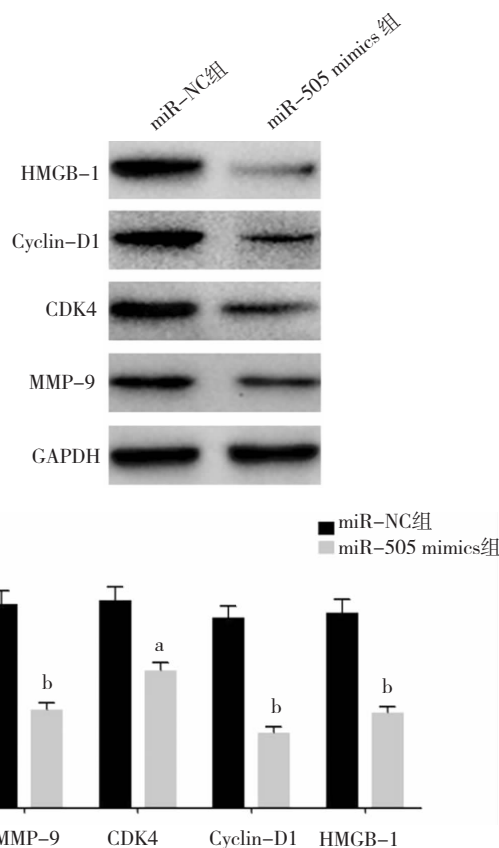
2.4 miR-505 对 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 蛋白的影响

细胞转染后,miR-505 mimics 组 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 蛋白水平均明显低于 miR-NC 组($t=13.245, P=0.021; t=11.751, P=0.034; t=18.193, P=0.028; t=8.359, P=0.019$),如图 4 所示。



注:与阴性对照 miR-NC 组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.05$

图 5 miR-505 对 MMP-9、Cyclin-D1 及 HMGB-1 mRNA 的影响



注:与阴性对照 miR-NC 组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.05$

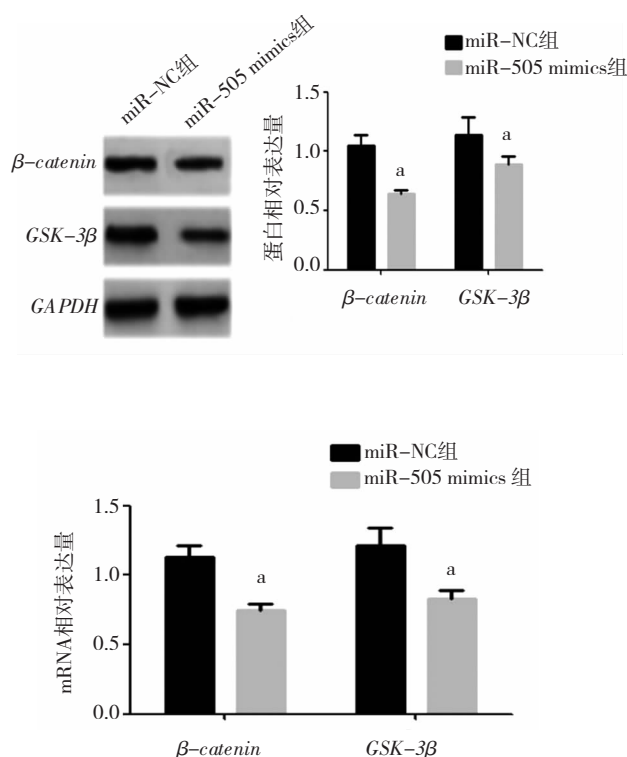
图 4 miR-505 对 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 蛋白的影响

2.5 miR-505 对 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 mRNA 的影响

细胞转染后,miR-505 mimics 组 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 mRNA 水平分别为 $0.56 \pm 0.06, 0.78 \pm 0.08, 0.43 \pm 0.05, 0.54 \pm 0.06$,均明显低于 miR-NC 组的 $1.16 \pm 0.13, 1.18 \pm 0.13, 1.08 \pm 0.12, 1.11 \pm 0.13$ ($t=17.775, P=0.024; t=11.769, P=0.009; t=21.211, P=0.017; t=16.886, P=0.036$),如图 5 所示。

2.6 miR-505 对 MG63 细胞 Wnt 信号通路的影响

细胞转染后,miR-505 mimics 组 Wnt 信号通路中关键靶点 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白相对表达分别为 0.64 ± 0.03 和 0.89 ± 0.07 ,均明显低于 miR-NC 组的 1.05 ± 0.09 和 1.14 ± 0.15 ($t=14.632, P=0.043; t=17.127, P=0.028$)。同时,miR-505 mimics 组 Wnt 信号通路中 β -catenin、GSK-3 β 基因相对表达分别为 0.75 ± 0.04 和 0.83 ± 0.06 ,均明显低于 miR-NC 组的 1.13 ± 0.08 和 1.21 ± 0.13 ($t=11.456, P=0.032; t=18.247, P=0.025$)。提示 miR-505 可抑制骨肉瘤细胞 MG63 的 Wnt 信号通路。结果如图 6 所示。



注:a,与阴性对照 miR-NC 组比较, $P < 0.05$

图 6 miR-505 对 MG63 细胞 Wnt 信号通路的影响

3 讨论

临床研究显示,侵袭与复发是导致癌症患者死亡的重要原因^[6]。临床上采用化疗治疗虽取得了一定的治疗效果,但是此类患者长期存活率仍处于较低水平。研究发现,miRNA 具有促进或抑制细胞增殖、凋亡、侵袭的功能,与肿瘤的发生发展密切相关^[7]。有学者提出,某些 miRNA 在骨肉瘤的发生发展过程表达失调,例如 MicroRNA-134 在骨肉瘤中低表达,可抑制细胞增殖与侵袭。而 miR-27b 在骨肉

瘤患者中高表达,是影响预后的危险因素之一^[8-9]。近来有研究报道,miR-505 在结肠癌细胞中异常表达,且可预测食管癌患者化疗后的效果^[10-11]。因此,研究参与骨肉瘤发生的 miRNA 及相关机制,旨在为骨肉瘤的诊断与治疗提供有效的靶点。

miR-505 是一种重要的自噬调节因子,与肿瘤发生发展有密切关系。近来有研究报道,miR-505 的表达水平升高可抑制子宫内膜癌细胞增殖,降低其致瘤性;miR-505 可通过调节 WNT7B/Wnt/ β -catenin 信号通路影响胶质母细胞瘤的增殖^[12-13]。但目前国内关于 miR-505 与骨肉瘤关系的研究报道较少。hFOB1.19 是一种人胚永生化成骨细胞系,且无恶性肿瘤细胞特征,体外长期培养条件下核型改变较小。本研究考察骨肉瘤 MG63 细胞中 miR-505 的表达水平,发现人成骨细胞 hFOB1.19 中 miR-505 水平明显高于骨肉瘤细胞 MG63,表明 miR-505 在骨肉瘤细胞中低表达,进一步实验将 miR-505 mimics 转染入骨肉瘤细胞 MG63 中,采用 q-PCR 检测转染后细胞的 miR-505 水平,发现转染 miR-505 mimics 后,miR-505 表达水平明显升高,验证了成功将模拟物导入 MG63 细胞中。CCK-8 实验结果也表明,上调 miRNA-505 的表达可明显抑制 MG63 细胞的增殖。细胞侵袭实验表明,上调 miR-505 水平,侵袭细胞数量明显减少,表明 miR-505 表达上调可抑制 MG63 细胞增殖与侵袭。

为了进一步探讨 miR-505 对 MG63 细胞的作用机制,本研究采用 Western blot 和 q-PCR 测定 Wnt 信号通路关键靶点(β -catenin 和 GSK-3 β)及其下游靶点(MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 和 HMGB1)蛋白和 mRNA 水平。有学者发现,MMP-9 的阳性表达率与骨肉瘤患者临床分期、侵袭有关^[14]。CDK4 与 Cyclin-D1 为周期蛋白,下调细胞周期 G₁ 期进展相关的蛋白 Cyclin D1、CDK4 的表达,可抑制骨肉瘤等细胞生长^[15]。而本研究发现,细胞转染模拟物后,Cyclin D1、CDK4 蛋白与 mRNA 表达水平降低,说明上调 miRNA-505 表达水平后可抑制 MMP-9、CDK4 及 Cyclin-D1 蛋白表达,进而抑制细胞增殖与侵袭。HMGB1 是一种非组蛋白染色体结合蛋白,在修复 DNA 损伤与细胞凋亡中发挥重要作用。有学者提出,miR-505 在肝癌细胞中低表达,可靶向调控

HMGB1 影响细胞的增殖^[6],并认为其可作为潜在的肝癌标志物。本研究发现,细胞转染模拟物后, HMGB1 蛋白与 mRNA 表达水平均降低,因此推测 HMGB1 可作为 miRNA-505 的靶基因,但仍需进一步研究证实。此外据文献报道, Wnt 信号通路可调控 MMP-9^[17]、CDK4^[18]、Cyclin-D1^[19]和 HMGB1^[20],影响细胞的增殖、侵袭与凋亡。本研究显示,转染 miR-505 后,骨肉瘤 MG63 细胞中 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白与基因明显降低,说明 miR-505 可抑制 Wnt 信号通路,降低 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 和 HMGB1 表达。

综上所述,miR-505 可减弱骨肉瘤细胞 MG63 的增殖与侵袭能力,其可能机制与抑制 Wnt 信号通路下调其下游靶点 MMP-9、CDK4、Cyclin-D1 及 HMGB-1 的表达有关。本研究可为骨肉瘤的诊断与基因治疗提供参考。

参 考 文 献

- [1] Chen F, Mo J, Zhang L. Long noncoding RNA BCAR4 promotes osteosarcoma progression through activating GLI2-dependent gene transcription[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(10): 13403-13412.
- [2] 徐 峰,高 平,李 光,等. 骨肉瘤 46 例误诊讨论[J]. *临床误诊误治*, 2014, 27(5): 49-51.
- [3] Ferrari S, Meazza C, Palmerini E, et al. Nonmetastatic osteosarcoma of the extremity. Neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, doxorubicin and ifosfamide. An Italian Sarcoma Group study (ISG/OS-Oss)[J]. *Tumori*, 2014, 100(6): 612-619.
- [4] 宋秀军,江其生,高 俊,等. miR-505、miR-505* 在非小细胞肺癌患者组织及血清中的表达及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(24): 3978-3981.
- [5] 杨勇昆,牛晓辉. 骨肉瘤诊断、治疗、随访的 ESMO 临床指南[J]. *中国骨与关节杂志*, 2010, 9(2): 110-111.
- [6] 郭 燕,刘文超. 肝癌发生侵袭与转移分子机制的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(4): 932-936.
- [7] 张玉虹,李 皓,刘阳晨. miRNA 在肿瘤放疗敏感性中的作用及机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(2): 314-318.
- [8] 阿布都艾尼·热吾提,孙俊刚,瓦热斯江·尼亚孜,等. MicroRNA-134 在骨肉瘤中的表达及生物学作用研究[J]. *实用骨科杂志*, 2016, 22(4): 331-335.
- [9] 张其川,王素芳,王云峰,等. miRNA-27b 在骨肉瘤中的表达及其临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(12): 2633-2638.
- [10] Lin XJ, Chong Y, Guo ZW, et al. A serum microRNA classifier for early detection of hepatocellular carcinoma: a multicentre, retrospective, longitudinal biomarker identification study with a nested case-control study[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(7): 804-815.
- [11] Skinner HD, Lee JH, Bhutani MS, et al. A validated miRNA profile predicts response to therapy in esophageal adenocarcinoma[J]. *Cancer*, 2015, 120(23): 3635-3641.
- [12] Chen S, Sun KX, Liu BL, et al. MicroRNA-505 functions as a tumor suppressor in endometrial cancer by targeting TGF- α [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 11.
- [13] Zhang C, Yang X, Fu C, et al. Combination with TMZ and miR-505 inhibits the development of glioblastoma by regulating the WNT7B/ β -catenin signaling pathway[J]. *Gene*, 2018, 672(25): 172-179.
- [14] 王建澍,移志刚,蒲彦川,等. ERK5 和 MMP-9 在骨肉瘤中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(14): 689-694.
- [15] 刘立峰,潘玉涛,陈 涤,等. 褪黑素通过下调细胞周期蛋白及其激酶的表达抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖[J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(2): 131-135.
- [16] Lu L, Qiu C, Li D, et al. MicroRNA-505 suppresses proliferation and invasion in hepatoma cells by directly targeting high-mobility group box 1[J]. *Life Sci*, 2016, 157: 12-18.
- [17] 刘儒彪,刘 义,于 岚,等. 靶向 siRNA 阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路对子宫内膜异位症患者在位子宫内膜基质细胞 VEGF、MMP-9 表达的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2016, 45(1): 6-11, 26.
- [18] Myant K, Sansom O. Efficient Wnt mediated intestinal hyperproliferation requires the cyclin D2-CDK4/6 complex[J]. *Cell Div*, 2011, 6(1): 3.
- [19] 陈婉珍,严展鹏,刘宇旻,等. 胃癌前病变大鼠胃组织 GSK-3 β 、 β -catenin 及 Cyclin D1 的表达及意义[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(6): 1278-1281, 1343.
- [20] Reed KR, Song F, Young MA, et al. Secreted HMGB1 from Wnt activated intestinal cells is required to maintain a crypt progenitor phenotype[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51665-51673.

(责任编辑:冉明会)