

hsa-miR-655 靶向调控绝经后骨质疏松症肾阴虚证 关联基因 CLCF1 的实验研究

陈娟 谢丽华 李生强 许惠娟 陈赛楠 马海珍 葛继荣*

福建省中医药研究院骨质疏松证候基因组学重点实验室,福州 350003

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 08-0939-05

摘要: 目的 研究靶向调控绝经后骨质疏松症肾阴虚证关联基因 CLCF1 的 microRNAs。方法 通过生物信息学预测可能与 CLCF1 基因 3'非编码区(3'Non encoding area,3'UTR)作用的 miRNAs;将人工合成的野生型和突变型 CLCF1 基因 3'UTR 序列克隆至荧光素酶报告质粒;将重组荧光素酶报告载体和 miRNAs 表达载体共转染 293T 细胞,用双荧光素酶检测试剂盒测定荧光素酶活性,验证 miRNA 对 CLCF1 基因翻译水平的抑制作用。结果 生物信息学预测结果显示,CLCF1 基因 3'UTR 与 hsa-miR-655、hsa-miR-300、hsa-miR-381、hsa-miR-374c、hsa-miR-515 等 5 个 miRNAs 存在互补结合位点;双荧光素酶实验结果表明,与对照组比较,hsa-miR-655 组荧光活性下调至 33.09%,差异有显著性意义($P=0.001$),当使用突变型 CLCF1 基因 3'UTR,荧光活性上调至 67.22%,说明 hsa-miR-655 对 CLCF1 3'UTR 的基因表达水平有显著抑制作用;与对照组比较,hsa-miR-374c 和 hsa-miR-515 组荧光活性分别下调 27.27% ($P=0.000$) 和 27.74% ($P=0.006$),二者对 CLCF1 3'UTR 的基因表达水平有一定抑制作用;hsa-miR-300 和 hsa-miR-381 组与对照组相比,荧光活性分别下调 6.35% ($P=0.213$) 和 9.89% ($P=0.127$),二者对 CLCF1 3'UTR 的基因表达无明显抑制作用。结论 hsa-miR-655 通过靶向结合 CLCF1 mRNA 的 3'UTR 区,在转录后水平负性调控绝经后骨质疏松症肾阴虚证关联基因 CLCF1 的表达。

关键词: 中西医结合;肾阴虚证;绝经后骨质疏松症;CLCF1 基因;微小 RNA;3'非编码区;荧光素酶报告系统

Experimental study on the hsa-miR-655 targeted regulation of the CLCF1 gene in postmenopausal osteoporosis associated with Kidney Yin deficiency

CHEN Juan, XIE Lihua, LI Shengqiang, XU Huijuan, CHEN Sainan, MA Haizhen, GE Jirong*

Key Research Laboratory of Osteoporosis Syndrome Genomics, Fujian Institute of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

Corresponding author: GE Jirong, Email: gjrrjgcy@sohu.com

Abstract: Objective To investigate the microRNA regulation on the gene expression of CLCF1 in postmenopausal osteoporosis associated with Kidney Yin deficiency. **Methods** Bioinformatics were used to predict the possible miRNAs that target bind to CLCF1 gene 3'non coding region (3'UTR). Artificial synthesized wild type and mutation type of CLCF1 gene 3'UTR region sequences were cloned into the luciferase reporter plasmid; recombinant luciferase reporter vector and miRNAs expression vectors were transfected into 293T cells and dual luciferase assay kit was used for the determination of luciferase activity, and to verify the miRNA inhibition of candidate target genes at the level of translation. **Results** Bioinformatics prediction results showed that the CLCF1 gene 3'UTR and the hsa-miR-655, hsa-miR-515, hsa-miR-300, hsa-miR-381, hsa-miR-374c et al. miRNAs binding sites are complementary. Compared with the control group, the fluorescence activity of the hsa-miR-655 group reduced to 33.09%, which reached statistical significance ($P=0.001$). When using the mutant CLCF1 gene 3'UTR, fluorescence activity increased to 67.22%, indicating that hsa-miR-655 has a significant inhibitory effect on the CLCF1 3'UTR gene. Compared with the control group, the fluorescence activity of the hsa-miR-374c and hsa-miR-515 groups reduced by 27.27% ($P=0.000$) and 27.74% ($P=0.006$), respectively, confirming that these two microRNAs have inhibitory effect on the expression of CLCF1 gene. The fluorescence activity of hsa-miR-300 and hsa-miR-381 groups decreased by 6.35% ($P=0.213$) and 9.89% ($P=0.127$),

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81403420);福建省卫生厅青年科研课题(2013-2-73)

* 通讯作者: 葛继荣, Email: gjrrjgcy@sohu.com

respectively, compared with the control group, both had no obvious inhibitory effect on the gene expression of CLCF1 3'UTR.

Conclusion hsa-miR-655 can target bind to the 3'UTR of CLCF1 mRNA, and negatively regulates the gene expression of CLCF1 in postmenopausal osteoporosis associated with Kidney Yin deficiency at the post transcriptional level.

Key words: Integrative medicine; Kidney Yin deficiency; Postmenopausal osteoporosis; CLCF1 gene; microRNAs; 3' Non encoding area; Dual luciferase assay

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, POP) 是老年女性常见病多发病, 以骨量减少、骨的纤维结构退化为特征, 进而引发脆性增加和骨折^[1]。中医学认为骨质疏松症属于“骨痿”、“骨枯”范畴, 肾藏精, 主骨生精虚少, 不能营养骨骼而发生骨质疏松。临床肾虚常见肾阴虚和肾阳虚, 绝经后骨质疏松症以肾阴虚为主^[2]。课题组前期研究发现^[3,4]: 心肌营养蛋白样细胞因子 1 (cardiotrophin-like cytokine factor 1, CLCF1) 是 POP 肾阴虚证的关联基因, CLCF1 在 POP 肾阴虚组与健康对照组比较时表达明显下调。但 POP 肾阴虚证 CLCF1 表达失调的原因尚不清楚。

microRNAs (miRNAs) 是一类内源性、长度约 19~26 个核苷酸的非编码短小 RNA, 是由具有发夹结构的约 70~90 个碱基大小的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工后生成。miRNAs 通过和靶基因 mRNA 3'非编码区 (3'Non encoding area, 3'UTR) 配对, 降低 mRNA 的稳定性和抑制其翻译, 从而靶向调控基因表达^[5,6]。鉴于 miRNA 可以靶向抑制基因的表达, 是基因表达重要的调控分子。为了探讨 POP 肾阴虚证 CLCF1 表达下调的机制, 本研究通过 miRNA 靶基因预测软件筛选 CLCF1 的靶标 miRNA, 并运用双荧光素酶实验系统进行生物学验证, 深入探讨 CLCF1 表达调控的机制, 将有助于阐明 POP 肾虚证的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人肾胚 293T 细胞 (ATCC, Microbix 公司); 感受态大肠埃希菌 DH5 α (宝生物工程有限公司); 野生型和突变型 CLCF1 基因 3'UTR 载体 (上海生博医学生物工程有限公司); hsa-miR-655、hsa-miR-300、hsa-miR-381、hsa-miR-374c、hsa-miR-515 表达质粒 (深圳市华安平康生物科技有限公司); LipofectamineTM 2000 转染试剂 (Invitrogen 公司); 双荧光素酶报告基因检测系统 (Promega 公司); 限制性内切酶 Xho I 和 BamH I (宝生物工程有限公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); DMEM 培养基 (GIBCO 公司); 酶标仪 (Tecan

公司, Infinite M1000)。

1.2 方法

1.2.1 靶基因预测: miRNA 靶基因预测软件: microrna.org; <http://www.microrna.org/microrna/getDownloads>. domiRanda v5; <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>

TargetScan 5.1; <http://www.targetscan.org/>。采用 miRanda、TargetScan 和 microrna.org 3 个数据库检索人 CLCF1 基因, 预测可能靶向作用于 CLCF1 的 miRNA, 评分高者优先, 预测结果取交集。

1.2.2 CLCF1 基因荧光素酶报告载体的构建: 从基因库中获得 CLCF1 基因 3'UTR 序列 (NM 013246), 根据 CLCF1 基因 3'UTR 序列设计合成引物, 上下游引物分别引入限制性内切酶 Xho I 和 BamH I 识别位点, 引物序列为: 上游: 5'-CTTCTGACCTTCTC CTCTTC-3'; 下游: 5'-TGGGGCAAGCATTTTATTTG TTAAT-3'。PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖电泳检测, 切胶纯化回收, 回收产物及载体经限制性内切酶 Xho I 和 BamH I 双酶切, 酶切产物再次纯化回收, 二者经 T4 DNA 连接酶连接, 转化 DH5 α 感受态大肠杆菌。提取质粒, Xho I 和 BamH I 双酶切初步鉴定, 测序。重组质粒命名为 pLUC-CLCF1-3'UTR。

1.2.3 突变型荧光素酶报告载体的构建: 根据 CLCF1 基因 3'UTR 序列与 miR-655 结合位点设计合成突变体引物。第 1 个结合位点突变体引物序列为: 上游: 5'-AGCGGATCGCTCGAGCTTCTGAC CTTCTCCTCTTCG-3'; 下游: 5'-2. CCAAATAAAT AAATATACACACTTAGAGTCATGAGTGGG-3'。第 2 个结合位点突变体引物序列为: 上游: 5'-3. ATATTTATTTATTTGGAGATGTTATTT-3'; 下游: 5'-AGAATAGAAATTCTGCAATAAATATC-3'。以构建的 pLUC-CLCF1-3'UTR 为模板分别进行 PCR 扩增, 扩增产物切胶纯化回收, 回收产物及 pLUC-M 载体经限制性内切酶 Xho I 和 BamH I 双酶切, 酶切产物再次纯化回收, 二者经 T4 DNA 连接酶连接, 转化 DH5 α 感受态大肠杆菌。提取质粒, 酶切初步鉴定, 测序。重组质粒命名为 pLUC-CLCF1-3'-mutUTR。

1.2.4 细胞转染: 人肾胚 293T 细胞加入到含 10%

胎牛血清(FBS)的 DMEM,置于 37 ℃ 恒温、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。使用 24 孔培养板,于转染前 1 天接种适当数目的 293T 细胞至板中。实验共分 3 组,对照组(不含 miRNA 的空载体与含 CLCF1 基因野生型或突变型 3'UTR 片段的双荧光素酶报告基因共转染);miRNA + CLCF1-3'UTR WT 组(共转染 miRNA 表达质粒与 CLCF1 野生型 3'UTR 片段的双荧光素酶报告基因);miRNA + CLCF1-3'UTR Mut 组(共转染 miRNA 表达质粒与 CLCF1 突变型 3'UTR 片段的双荧光素酶报告基因)。每组设 3 个平行孔,转染 48h 后裂解细胞,检测荧光素酶活性。

1.2.5 荧光素酶活性测定:质粒转染 48 h 后,弃去培养基,用 PBS 洗 1 遍,吸干剩余的 PBS。配制 1 × PLB。使用前放到常温,孔加 100 μL 稀释好的 1 × PLB,摇床常温条件下摇 15 min,进行裂解。反复吹吸后将裂解好的细胞和 PLB 将孔板置于冰上操作。白色不透光的 96 孔板中每孔加 20 μL 预先混好的 LAR II,每孔加入细胞裂解液上清 1 μL,加入水 29 μL,2 s 后测数据。每孔马上添加 20 μL 预先混好的 Stop&Glo Reagent,静止 2 s 后,检测萤火虫荧光素酶的活性。向检测管中加入 100 μL Stop&Glo 试剂,检测海肾荧光素酶活性。对萤火虫荧光素酶荧光值与海肾荧光素酶荧光值的比值进行校正,作为各孔报告基因荧光强度值。

1.2.6 统计学处理:采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量资料采用 mean ± SD 描述,比较用单因素方差分析,双侧检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学预测 CLCF1 的靶标 miRNA

采用 miRanda、TargetScan 和 microrna. org 3 个数据库检索人 CLCF1 基因,预测可能靶向作用于 CLCF1 的 miRNA,评分高者优先,预测结果取交集。结果如图 1,TargetScan 预测到的 CLCF1 的靶标 miRNAs 有 44 个,miRanda 预测到 21 个靶标 miRNAs,microrna 预测到 27 个,3 个数据库预测结果交集共有 5 个,分别为 hsa-miR-655、hsa-miR-300、hsa-miR-381、hsa-miR-374 和 hsa-miR-515。

2.2 双荧光素酶活性实验验证靶向调控 CLCF1 基因的 miRNAs

为验证与 CLCF1 基因 3'UTR 序列作用的 miRNAs,笔者将 pLUC-CLCF1-3'UTR 与 miRNA 表达质粒共转染 293T 细胞,采用双荧光素酶报告系统

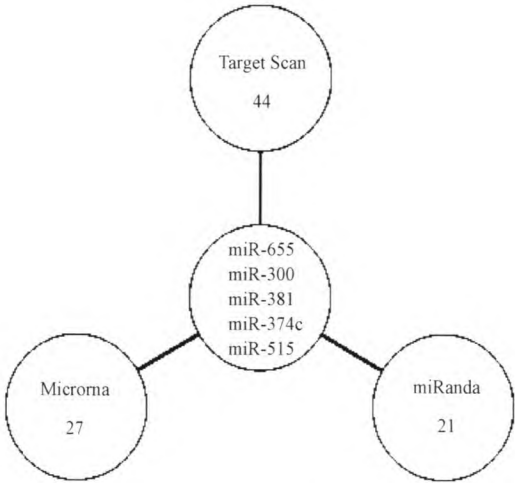


图 1 CLCF1 靶标 miRNAs 的预测结果

Fig. 1 Schematic diagram of the candidate miRNAs by prediction tools

检测荧光素酶活性,将不同 miRNA 表达质粒的荧光素酶活性与对照组进行比较。研究结果发现(见表 1):与对照组比较,hsa-miR-655 组荧光活性下调至 33.09%,两组差异有显著性意义($P = 0.001$),说明 hsa-miR-655 对 CLCF1 3'UTR 有显著抑制作用;与对照组比较,hsa-miR-374c 和 hsa-miR-515 组荧光活性分别下调 27.27% ($P = 0.000$) 和 27.74% ($P = 0.006$),二者对 CLCF1 3'UTR 的基因表达水平有一定抑制作用;hsa-miR-300 和 hsa-miR-381 两组与对照组相比,荧光活性分别下调 6.35% ($P = 0.213$) 和 9.89% ($P = 0.127$),提示二者对 CLCF1 3'UTR 无明显抑制作用。以上结果说明:hsa-miR-655、hsa-miR-374c 和 hsa-miR-515 是可能靶向调控 CLCF1 基因的 miRNAs,其中 hsa-miR-655 对 CLCF1 3'UTR 抑制作用最为显著,故后续对 hsa-miR-655 与 CLCF1 3'UTR 的调控关系进行进一步研究。

表 1 各组 microRNA 荧光素酶活性相对值($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of luciferase activity in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	标准化后的荧光素酶活性	P 值
Control	1.000 ± 0.037	—
miR-655	0.330 ± 0.011	0.001
miR-374c	0.727 ± 0.038	0.000
miR-515	0.742 ± 0.011	0.006
miR-300	0.936 ± 0.024	0.213
miR-381	0.901 ± 0.026	0.127

2.3 hsa-miR-655 特异性下调 CLCF1 基因表达

通过 miRanda 预测软件发现 CLCF1 3'UTR 有 2 处 miR-655 的潜在结合位点,分别位于 CLCF1 3'

UTR 序列第 669 和 857 碱基处(见图 2)。可以看出,miR-655 与 CLCF1 之间可能存在很好的靶向关系。为验证 hsa-miR-655 是否特异性与 CLCF1 基因 3'UTR 序列作用,笔者将 2 个预测的 miR-655 结合位点同时突变后,将突变质粒的荧光素酶活性与野生型质粒进行比较,发现当使用突变型 CLCF1 基因

3'UTR,荧光酶活性上调至 67.22%(图 3)。也就是说,hsa-miR-655 可以下调野生型 CLCF1 3'UTR 质粒的荧光素酶活性,但不影响突变型质粒的荧光素酶活性。荧光素酶报告实验证实 hsa-miR-655 可以特异性作用于 CLCF1 基因的 3'UTR,靶向抑制 CLCF1 的表达。



图 2 CLCF1 3'UTR 区与 hsa-miR-655 结合位点预测

Fig. 2 The prediction results of hsa-miR-655 binding sites in the CLCF1 gene 3'UTR

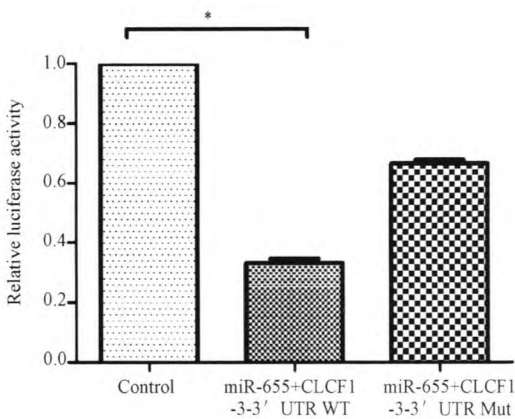


图 3 CLCF1 3'UTR 突变后荧光素酶活性的变化

Fig. 3 Relative luciferase activity of CLCF1 gene 3'UTR mutation

3 讨论

POP 是老年女性常见多发病。中医理论认为,肾藏精主骨生髓,肾虚是骨质疏松症的主要病机。课题组前期研究发现,CLCF1 在 POP 肾阴虚组与健康对照组比较时表达明显下调,是 POP 肾阴虚证的关联基因。鉴于 miRNA 可以靶向抑制基因的表达,是基因表达重要的调控分子。为了探讨 POP 肾阴虚证 CLCF1 表达下调的机制,本研究通过 miRNA 靶基因预测软件筛选 CLCF1 的靶标 miRNA,并运用 3'UTR 双荧光素酶实验系统进行生物学验证。3'UTR 双荧光素酶实验^[7]是目前对预测的 miRNA 靶标进行鉴定和功能确证常用方法。研究发现:生物信息学预测结果显示,CLCF1 基因 3'UTR 与 hsa-miR-655、hsa-miR-300、hsa-miR-381、hsa-miR-374c、

hsa-miR-515 等 5 个 miRNAs 存在互补结合位点;从双荧光素酶实验看出 miR-655 对 CLCF1 基因的表达抑制效率达到 66% 左右。当使用突变型 CLCF1 3'UTR,抑制作用有所恢复,说明 hsa-miR-655 对 CLCF1 3'UTR 的基因表达水平有显著抑制作用;hsa-miR-374c 和 hsa-miR-515 对 CLCF1 3'UTR 的基因表达水平有一定抑制作用,抑制率分别为 27.27% ($P = 0.000$) 和 27.74% ($P = 0.006$);hsa-miR-300 和 hsa-miR-381 对 CLCF1 3'UTR 的基因表达无明显抑制作用。

microRNAs (miRNAs) 是一类内源性、长度约 19~26 个核苷酸的非编码短小 RNA,miRNAs 通过和靶基因 mRNA 3'非翻译区(3'UTR)配对,降低 mRNA 的稳定性和抑制其翻译,从而靶向调控基因表达^[6]。miRNA 对骨代谢和骨的发育重建至关重要。miR-133 和 miR-135 通过抑制成骨分化中关键的转录因子 Runx2 和 Smad5,抑制干细胞向成骨细胞分化^[8-9]。Li 等^[10]发现了 miR-2861 它能够通过抑制 HDAC5 的表达,降低 Runx2 的降解作用,促进鼠原代成骨细胞的分化,并且他们发现 miR-2861 在原发性骨质疏松病人中表达异常。Wang^[11]研究发现循环单核细胞中的 miR-133 可以作为绝经后妇女骨质疏松的潜在生物学标记。说明 miRNA 在骨质疏松的发生和进展中发挥了重要的调控功能。

CLCF1 属白细胞介素 6 (IL-6) 细胞因子家族成员,IL-6 是一种生物活性多肽物质,是骨吸收的主要调节者^[12]。CLCF1 参与 JAK/STAT 信号通路中,下游基因 CBP 是一种对钙离子有高度亲和性的蛋白,

主要功能是参与钙的运载,与钙代谢关系密切^[13]。课题组前期研究发现,CLCF1 基因是 POP 肾阴虚证的联基因,可能参与 POP 的发生发展进程^[3-4]。本研究结果表明,hsa-miR-655 能通过靶向结合 CLCF1 mRNA 的 3'UTR 区,在转录后水平负性调控绝经后骨质疏松症肾阴虚证关联基因 CLCF1 的表达。

miR-655 基因定位于染色体 14q32.31 上,自 2005 年 miR-655 首次被发现以来,越来越多的研究对 miR-655 基因及其在各种生物学功能中发挥的作用进行了报道^[14]。如 miR-655 能够调控 APP 蛋白的表达,参与阿尔茨海默病发病的调节^[15]。Wang 等^[16]研究发现,miR-655 在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中表达下调,miR-655 过表达后抑制了肿瘤转化因子 1 (PTTG1)的表达,从而抑制 ESCC 的侵袭能力。本研究结果表明,hsa-miR-655 通过靶向结合 CLCF1 mRNA 的 3'UTR 区,在转录后水平负性调控绝经后骨质疏松症肾阴虚证关联基因 CLCF1 的表达。因此笔者推测:miR-655 靶向调控 CLCF1 可能参与 POP 肾阴虚证的发生发展进程,是 POP 肾阴虚证的分子机制之一。

microRNAs 目前已成为研究各种疾病发病机制的热点,通过研究 microRNAs 的生物学功能,有助于更全面理解疾病发生的机理,寻找疾病新的生物标志物和治疗靶点。本研究发现,hsa-miR-655 能靶向调控绝经后骨质疏松症肾阴虚证关联基因 CLCF1 的表达,后续笔者将深入探讨 hsa-miR-655 介导 CLCF1 基因参与 POP 肾阴虚证的具体机制,这对于将来发掘 POP 肾阴虚证患者的特异性诊断和预后标记具有指导意义,也为中医“证”内涵的研究从 microRNAs 角度提供了新的切入点。

【参 考 文 献】

- [1] Faienza MF, Ventura A, Marzano F, et al. Postmenopausal osteoporosis: the role of immune system cells. Clin Dev Immunol, 2013,2013(7):575936.
- [2] 谢雁鸣,宇文亚,董福慧,等.原发性骨质疏松症中医临床实践指南(摘录).中华中医药杂志,2012,27(7):1886-1890.
Xie YM, Yu WY, Dong FH. Clinical practice guideline of traditional Chinese medicine for primary osteoporosis (extract). China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2012,27(7):1886-1890. (in Chinese)
- [3] 谢丽华,陈娟,许惠娟,等.绝经后骨质疏松症肾阴虚证差异表达基因 CLCF1 蛋白表达研究.中国骨质疏松杂志,2015,21(12):1425-1428.
- [4] 陈娟,谢丽华,李生强,等.绝经后骨质疏松症肾阴虚证关联基因 CLCF1 mRNA 的表达研究.中国骨质疏松杂志,2014,20(6):618-622.
- [5] Chen J, Xie LH, Li SQ, et al. Analysis of CLCF1 gene mRNA expression in postmenopausal osteoporosis patients with Kidney Yin deficiency. Chinese Journal of Osteoporosis, 2014,20(6):618-622. (in Chinese)
- [6] Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. Annu Rev Biochem, 2010,79:351-379.
- [7] Tetreault N, De Guire V. miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action. Clin Biochem, 2013,46(10-11):842-845.
- [8] Clancy JL, Nusch M, Humphreys DT, et al. Methods to analyze microRNA-mediated control of mRNA translation. Methods Enzymol, 2007,431:83-111.
- [9] Li Z, Hassan MQ, Volinia S, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008,105(37):13906-13911.
- [10] Javed A, Bae JS, Afzal F, et al. Structural coupling of Smad and Runx2 for execution of the BMP2 osteogenic signal. J Biol Chem, 2008,283(13):8412-8422.
- [11] Li H, Xie H, Liu W, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. J Clin Invest, 2009,119(12):3666-3677.
- [12] Wang Y, Li L, Moore BT, et al. MiR-133a in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis. PLoS One, 2012,7(4):e34641.
- [13] Tsai CT, Ikematsu K, Sakai S, et al. Expression of Bcl2l1, Clcf1, IL-28ra and Pias1 in the mouse heart after single and repeated administration of chlorpromazine. Leg Med (Tokyo), 2011,13(5):221-225.
- [14] Demyanets S, Huber K, Wojta J. Vascular effects of glycoprotein130 ligands part II: biomarkers and therapeutic targets. Vascu Pharmacol, 2012,57(1):29-40.
- [15] Cummins JM, He Y, Leary RJ, et al. The colorectal microRNAome. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006,103(10):3687-3692.
- [16] Harazono Y, Muramatsu T, Endo H, et al. miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. PLoS One, 2013,8(5):e62757.
- [17] Wang Y, Zang W, Du Y, et al. Mir-655 up-regulation suppresses cell invasion by targeting pituitary tumor-transforming gene-1 in esophageal squamous cell carcinoma. J Transl Med, 2013,11(1):301.

(收稿日期:2016-02-20)