

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.20.027

siRNA 沉默 EZH2 表达对人膀胱癌细胞迁移和凋亡的影响*

王海峰¹, 杨宏^{2△}, 胡礼炳², 雷永虹², 秦扬², 李俊², 毕城伟², 霍倩¹

(1. 昆明医科大学第二附属医院泌尿外科, 昆明 650101; 2. 昆明医科大学第三附属医院泌尿外科, 昆明 650101)

摘要:目的 探讨小干扰 RNA(siRNA)沉默 EZH2 表达对人膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移能力,以及对凋亡的影响。方法 构建靶向 EZH2 基因的 siRNA 质粒并转染至人膀胱癌细胞中(干扰组),采用 RT-PCR 法检测 EZH2 mRNA 的表达情况,利用噻唑蓝(MTT)、Transwell 细胞小室及划痕实验检测转染后细胞增殖、侵袭和转移能力的变化,通过流式细胞术实验观察转染后细胞的凋亡情况。结果 转染 EZH2 基因的 siRNA 质粒后(分干扰 1 组,干扰 2 组,干扰 3 组),干扰各组 EZH2 mRNA 表达较阴性对照组有明显抑制($P<0.05$),且干扰 2 组效果最好,因此选干扰 2 组作后期实验;在转染 48 h 后,干扰 2 组生长抑制率达 37.9%,较阴性对照组受到明显抑制($P<0.05$);划痕实验处理 24 h 后,干扰 2 组细胞的迁移距离较阴性对照组明显降低($P<0.01$);干扰 2 组细胞侵袭能力较阴性对照组下降了 67%,差异有统计学意义($P<0.01$);转染 48 h 后,干扰 2 组早、晚期凋亡率分别为 22.80%和 3.60%,较阴性对照组增加,且以早期明显,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 EZH2 基因沉默能有效抑制人膀胱癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力,并促进其凋亡,为深入研究膀胱癌的基因治疗提供理论依据。

关键词:膀胱肿瘤;RNA,小分子干扰;EZH2 基因;迁移;凋亡

中图分类号:R737.14

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)20-2620-04

The effect of cell activation and apoptosis by siRNA interference EZH2 expression in human bladder cancer cells*

Wang Haifeng¹, Yang Hong^{2△}, Hu Libing², Lei Yonghong², Qin Yang², Li Jun², Bi Chengwei², Huo Qian¹

(1. Department of Urinary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China;

2. Department of Urinary Surgery, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of EZH2 knockdown on cell proliferation, invasion, migration and apoptosis in human bladder cancer cell line by small interfering RNAs(siRNA). **Methods** The siRNA-expressing plasmid targeting EZH2 gene was constructed and transfected into T24 cells. RT-PCR was used to detect the EZH2 gene's expression at the level of mRNA; proliferation, invasion and migration of T24 cells were examined in vivo by MTT, wound healing assay and Transwell chamber migration assay. Finally, Annexin V-FITC/PI flow cytometric analysis was performed for cell apoptosis. **Results** The siRNA-expressing plasmid targeting EZH2 gene successfully inhibited EZH2 gene's expression in T24 cells. The expression of mRNA was significantly inhibited compared with negative control groups($P<0.05$). After the transfection of the plasmid 48 hours, the growth inhibition rate was 37.9%, which was higher than the negative control group($P<0.05$). 24 hours after wound healing, the migration distance of transfected group cell was(1.37±0.12), which was lower than the negative control group($P<0.01$). Compared with the negative control group, invasion capability of EZH2-siRNA group was dropped by 67%($P<0.01$). 48 hours after transfection, the early and secondary apoptosis rate of T24 cells were 22.80% and 3.60% respectively, which were higher than the negative control group($P<0.01$). **Conclusion** The siRNA interference EZH2 can significantly inhibit cell proliferation, invasion and migration of T24 cells, meanwhile promote its apoptosis. It provides a theoretical basis for further study of bladder cancer gene therapy.

Key words: bladder neoplasms; RNA, small interfering; EZH2; migration; apoptosis

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,在国内其发病率和病死率均占泌尿系肿瘤的首位,且近年有增加趋势,男性发病率约为女性的 4 倍,易发生浸润和转移,且术后复发率高^[1]。近年来随着人们对肿瘤发病机制研究和分子生物学技术发展的深入,基因靶向治疗在临床中受到越来越多的关注,因此寻找治疗膀胱癌的分子靶点具有十分重要的意义。果蝇的 Enhancer of Zeste 基因增强子人类同源物 2(ebgabcer of zest homolog, EZH2)是多梳基因家族(polycomb group, PcG)的主要成员,是组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸特异性的甲基化转移酶,通过沉默与细胞分化、抑制增殖相关基因而导致肿瘤的发生^[2]。多项研究显示其过量表达与非小细胞肺癌^[3]、结肠癌^[4]、急性淋巴细胞白血病^[5]、前列腺癌^[6]、卵巢癌^[7]等多种肿瘤发生、发展和预后相关。本研究以 EZH2 基因为靶点,设计构建其小干扰 RNA(siRNA)的表达载体并转染膀胱癌 T24 细

胞,观察 EZH2 基因对膀胱癌细胞增殖、侵袭、迁移能力及凋亡的影响,旨在为膀胱癌的基因治疗寻找新的靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 膀胱癌 T24 细胞株由昆明医科大学重点实验室保存, RPMI 1640 培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶二胺四乙酸(EDTA)、磷酸盐缓冲液(PBS)、Lipofectamine™ 2000 转染试剂、ECL 化学发光检测试剂购自美国 Invitrogen 公司,二甲亚砜(DMSO)购自美国 Amersco 公司, EZH2 抗体购自美国 Abcam 公司, EZH2 siRNA 套装购于广州锐博生物公司,聚氟乙烯(PVDF)膜购于美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 膀胱癌细胞株 T24 分别在含 10%胎牛血清的 90% RPMI 1640 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 饱和湿

* 基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学联合专项(2011FB202)。

作者简介:王海峰(1982—),讲师,博士,主要从事膀胱肿瘤研究。

△ 通讯作者, E-mail: yangh0871@126.com。

度培养箱中培养。

1.2.2 重组质粒构建及转染 根据 GeneBank 提供的 EZH2 基因序列,使用在线设计软件,通过基因序列比对,合成 EZH2 特异性 siRNAs 序列 5'-GGG AAA GUG UAU GAU AAU TT-3',阴性对照 siRNAs 序列为 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'。将其合成序列插入到 PGenesil-1.1 质粒构建重组体,并转化至大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞中。分别挑取菌落接种于含 4 mg/mL 新霉素的 RPMI 1640 培养基培养,再使用碱裂解法抽提质粒,并行酶切鉴定和测序分析。转染按照 LipofectamineTM2000 脂质体转染试剂盒说明书的要求进行,每孔 siRNA 为 4 μ g,LipofectamineTM2000 的用量为 10 μ L,转染后置入 CO₂ 培养箱,6 h 后换液,继续培养 48~72 h 后收集细胞。实验分为空白对照组(不经任何处理)、阴性对照组和干扰组(分干扰 1 组、干扰 2 组、干扰 3 组)。

1.2.3 转染后 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 以 NCBI 数据库中 NM_004456 和 NM_152998 为参考,设计 EZH2 的 siRNA 各 3 条(广州锐博生物合成)。收集转染 48 h 后的 T24 细胞,按天根 DP431 试剂使用说明书提取细胞的总 RNA,经检测浓度和完整性后,按反转录试剂盒使用说明操作。先逆转录生成 cDNA,再以各组 cDNA 为模板对 EZH2 基因和内参 β -actin 进行实时荧光定量 PCR 反应。每一个样品均做 3 个重复反应。同时设无模板对照。在荧光定量 PCR 仪上进行检测。反应条件:95 $^{\circ}$ C 15 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,30 个循环;扩增完毕后进行熔解曲线分析:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s。对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析特异性。实时定量分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法。 β -actin 上游引物 5'-GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA-3',下游引物 5'-GAG GGT CTC TCT CTT CCT-3';EZH2 上游引物 5'-GCG CGG GAC GAA GAAT AAT CAT-3';下游引物 5'-TAC ACG CTT CCG CCA ACA AAC T-3'。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖情况 将传 4~6 代的 T24 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后计数,按 2 \times 10³/孔的浓度接种 96 孔板,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养 18 h。更新鲜培养基后培养 2 h,转染 EZH2-siRNA 进细胞。24 h 后开始检测,设置调零孔、对照孔,每组 3 复孔。置 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养 30 min。离心弃去上清,加入含 500 μ g/mL MTT 的 DMEM/F12 培养基。继续培养 4 h。离心弃上清,加 150 μ L DMSO 待充分溶解后,用酶标仪检测各孔 490 nm 吸光度。每组细胞测 3 个孔,取平均值,每隔 12 h 检测 1 次,连续检测 72 h,绘制细胞生长曲线。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{干扰组 OD 值}}{\text{阴性对照组 OD 值}}\right) \times 100\%$$

1.2.5 划痕实验检测细胞迁移能力 用笔在 6 孔板背后,用直尺比着,均匀地划横线,大约每隔 0.5~1.0 cm 1 道,横穿过孔。每孔至少穿过 5 条线。每个实验组均设 3 个平行样本。T24 细胞以 3 \times 10⁶/孔接种于 6 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱内培养 24 h,用 EZH2-siRNA 转染细胞,再进行培养,24 h 后更换为无血清培养基培养。当细胞贴壁率为 100%时,用比着直尺,垂直画线。用 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基放入 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱继续培养 24 h。在光学显微镜下观察划痕修复过程,取 12,24 h 为时间点拍照记录。

1.2.6 Transwell 细胞小室检测细胞侵袭能力 收集阴性对照组和干扰 2 组细胞,用 0.25% 胰酶消化并制成单细胞悬液。用无血清 MEM 培养基将 Matrigel 配制成为 10 μ g/250 μ L(1:300)的人工基底膜胶备用。24 孔板每孔中铺 Matrigel 3 μ g/80 μ L,放于超净台中风干过夜。24 孔板每孔加入适量无血清

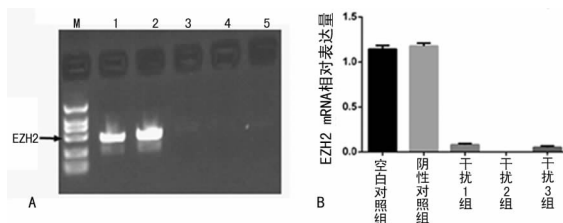
MEM 细胞培养液,放置 60~90 min,洗去多余的胶;取两组细胞以 2 \times 10⁵/孔重悬加入上室内,设 3 个重复孔,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。细胞小室,弃去培养液,用 PBS 洗 3 遍,洗去未黏附细胞。常规固定染色后光学显微镜下计数膜背面侵袭的细胞数量,计数中间和四周共 5 个视野,每组细胞计数 3 份,取平均值。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况 用不含 EDTA 的胰酶消化收集培养及转染 24 h 后的 T24 细胞,离心、洗涤后加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞,接着先加入 5 μ L 荧光标记的膜连蛋白 V(Annexin V-FITC)混匀后,加入 5 μ L 碘化化丙啶(PI),混匀,室温避光反应 5~15 min 后进行流式细胞仪的检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,组间比较采用 S-N-K 法(q 检验),检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P>0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EZH2-siRNA 对 EZH2 mRNA 表达的影响 转染 siRNA 下调 T24 细胞内 EZH2 mRNA 表达,药物筛选后建立的细胞系经实时荧光定量 PCR 检测 EZH2 的 mRNA 相对表达量,RT-PCR 结果显示:空白对照组 1.187 \pm 0.052、阴性对照组 1.192 \pm 0.025、干扰 1 组 0.185 \pm 0.012、干扰 2 组 0.027 \pm 0.009、干扰 3 组 0.157 \pm 0.017;3 个干扰组细胞 EZH2 mRNA 相对表达均低于空白、阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。阴性对照组与空白对照组相比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。其中,半定量 PCR 显示干扰 2 组效果最好,表达最低,用于后续实验,由于阴性对照组与空白对照组之间比较差异无统计学意义,所以后续试验均采用干扰 2 组与阴性对照组之间比较。见图 1。



A:PCR 凝胶电泳图,其中 M 为 DNA 分子标记物,1 为空白对照组,2 为阴性对照组,3~5 为干扰 1~3 组;B:PCR 分析图。

图 1 半定量 PCR 检测 EZH2-siRNA 对 EZH2 mRNA 表达的影响

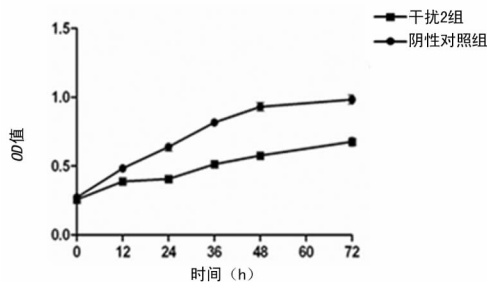
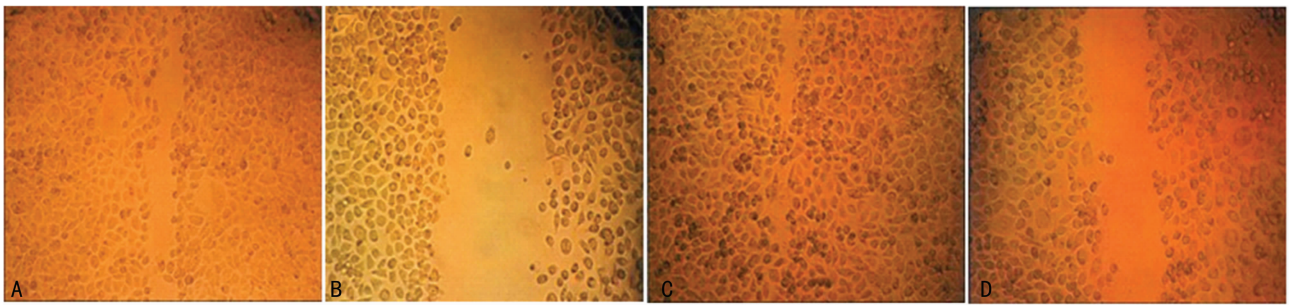


图 2 MTT 检测 EZH2-siRNA 对 T24 细胞增殖能力的影响

2.2 EZH2 表达沉默对 T24 细胞增殖活性的影响 MTT 检测法结果显示:干扰 2 组细胞从转染后 24 h 起,细胞增殖速度开始变得缓慢,其明显慢于阴性对照组,其抑制率分别为 36.2%、37.1%、37.9% 和 30.8%、38.2%,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图 2。



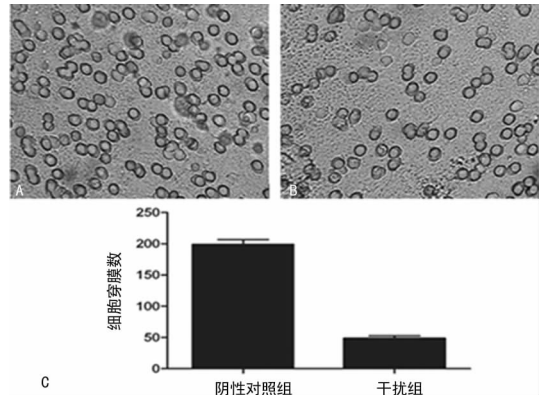
A: 阴性对照组 24 h; B: 阴性对照组 12 h; C: 干扰 2 组 24 h; D: 干扰 2 组 12 h。

图 3 划痕实验检测 EZH2-siRNA 对 T24 细胞迁移能力的影响 (×200)

2.3 划痕实验检测细胞迁移能力 划痕实验结果显示,划痕处理 24 h 后,阴性对照组和转染 2 组细胞的迁移距离分别为 $(1.98 \pm 0.07) \mu\text{m}$ 和 $(1.37 \pm 0.12) \mu\text{m}$ 。与阴性对照组比较,干扰 2 组细胞水平运动距离明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 3。

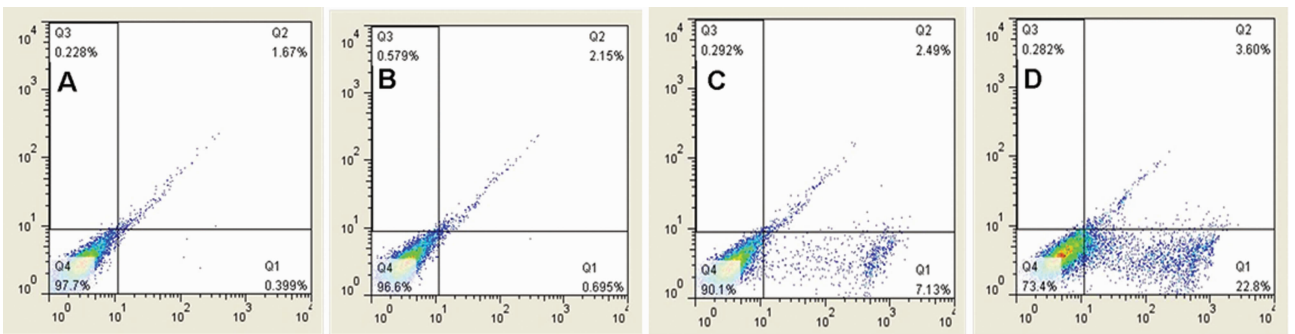
2.4 EZH2 表达沉默对 T24 细胞凋亡的影响 Annexin-v/PI 双染,转染 48 h 后阴性对照组早、晚期 T24 细胞凋亡率分别为 7.31% 和 2.49%,而干扰 2 组为 22.8% 和 3.60%,与阴性对照组比较,干扰 2 组早期凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.01$),提示 EZH2 基因的沉默增加了 T24 细胞早期凋亡,见图 4。

2.5 EZH2 表达沉默对 T24 细胞侵袭能力的影响 Transwell 细胞小室检测细胞侵袭能力结果显示:光学显微镜下观察计数膜背面干扰 2 组较阴性对照组侵入细胞数量明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 5。



A: 阴性对照组; B: 干扰 2 组; C: Transwell 实验分析图。

图 4 采用 Transwell 细胞小室法检测 EZH2-siRNA 对 T24 细胞侵袭能力的影响 (×200)



A: 阴性对照组 0 h; B: 干扰 2 组 0 h; C: 阴性对照组 48 h; D: 干扰 2 组 48 h。

图 5 流式细胞术检测 EZH2-siRNA 沉默对 T24 细胞凋亡的影响

3 讨论

多梳蛋白抑制性复合物 2 (polycomb repressor complex 2, PRC2) 是组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸特异性的甲基化转移酶,通过沉默与细胞分化、抑制增殖在内的基因而导致肿瘤的发生,而 EZH2 是 PRC2 中起催化作用的核心蛋白,它参与染色质结构的形成、基因表达调节及生长控制,因而具有多潜能性^[8-9]。EZH2 在 PcG 和 TrxG 蛋白复合物的形成、造血细胞发育分化、X 染色体灭活、甚至恶性肿瘤形成等过程均具有重要作用。

目前,关于 EZH2 作为癌基因与恶性肿瘤的发生发展、转移侵袭能力及预后的相关性已逐渐成为研究的热点^[10]。Wan 等^[11]定量分析 EZH2 表达与肺癌的相关性,发现随着肺癌的发展,EZH2 的阳性单位值 (PU) 逐渐升高,提示在肺癌的发展和转移过程中,EZH2 可能发挥了重要的作用。Hang 等^[12]发

现,EZH2 在膀胱上皮癌中普遍高表达,并与其恶性程度呈正相关,表明 EZH2 基因在膀胱上皮癌的发生、发展中可能起重要作用,据此推测 EZH2 可作为膀胱癌的一个有效的生物标志物,并可能成为其潜在的治疗靶点。

近年来,siRNA 沉默基因表达在功能基因组学研究领域中受到越来越多的重视,已被广泛应用于肿瘤相关基因的功能研究。研究发现在膀胱移行细胞癌中,microRNA-101 能直接抑制 EZH2 的表达而改变染色质的结构,进而减弱肿瘤细胞的增殖能力^[13]。Bo 等^[14]研究认为,microRNA-203 能抑制 Bcl-w 的表达而促进膀胱癌细胞的凋亡,从而减弱细胞的增殖。Guo 等^[15]发现在膀胱癌细胞中 microRNA-144 的表达降低,microRNA-144 通过 EZH2/Nkd1 通路调节 Wnt 信号从而抑制 EZH2 的表达。

本研究通过 RNA 干扰技术沉默 EZH2 基因,探讨其对膀

膀胱 T24 细胞活性和凋亡的影响。为了明确 EZH2 表达在 T24 细胞生物活性过程中的作用,本研究利用基因工程的手段在体外构建人 EZH2 基因的 siRNA 的质粒表达载体,并将其转入 T24 细胞,实时荧光定量 PCR 实验检测其对 T24 细胞 EZH2 基因表达的沉默效果。检测结果显示,3 个干扰组细胞 EZH2 的 mRNA 表达均低于其他对照组,EZH2 表达水平基本被沉默,可构建 EZH2 基因功能分析的体外实验细胞模型。

肿瘤细胞的持续分裂与无限增殖能力是肿瘤恶性程度的重要标志。本研究通过细胞增殖实验分析阻断 EZH2 表达后 T24 细胞增殖能力的变化,MTT 检测结果显示从转染后 24 h 起,其抑制率分别为 36.2%、37.1%、37.9%、30.8%、38.2%。干扰 2 组细胞增殖速度明显慢于阴性对照组,提示 EZH2 沉默能抑制 T24 细胞的增殖活性。

肿瘤细胞侵袭力是影响患者预后及生存率的关键因素。本研究通过 Transwell 细胞小室检测 T24 细胞侵袭能力的改变。光学显微镜下观察计数膜背面细胞侵入 T24 细胞的数量,干扰 2 组较对照组侵入细胞数量明显减少。提示转染入 EZH2-siRNA 的 T24 细胞的侵袭能力明显减弱。

迁移在肿瘤细胞转移过程中也必不可少。肿瘤细胞与母体瘤分离,穿过血管壁、侵袭正常组织,需要一定的运动能力。本法借鉴体外细胞致伤愈合实验模型测定肿瘤细胞在细胞外基质上的运动特性,结果显示:划痕处理 24 h 后,阴性对照组和干扰 2 组细胞的迁移距离分别为 $(1.98 \pm 0.07) \mu\text{m}$ 和 $(1.37 \pm 0.12) \mu\text{m}$ 。与阴性对照组相比,干扰 2 组细胞水平运动距离明显降低。提示转染入 EZH2-siRNA 的 T24 细胞的迁移能力明显减弱。

为了检测 EZH2 基因沉默对 T24 细胞凋亡的影响,本研究进行了 Annexin-v/PI 双染,结果显示:转染 48 h 后干扰 2 组早、晚期 T24 细胞凋亡率分别为 22.8% 和 3.60%,较阴性对照组均增加,以早期尤为明显,表明 EZH2 基因沉默能够增加 T24 细胞凋亡,提示 EZH2 可能对于膀胱癌 T24 细胞存在直接的治疗作用新靶点。

综上所述,EZH2 与 T24 膀胱癌细胞的活性及凋亡密切相关,靶向抑制 T24 膀胱癌细胞内 EZH2 表达可抑制 T24 膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移能力,并促进其凋亡。本研究为深入了解 EZH2 在 T24 膀胱癌细胞侵袭和转移过程中的分子调控机制研究及为 EZH2 成为 T24 膀胱癌细胞的潜在分子标志物和靶向治疗的新靶点鉴定了基础。

参考文献:

[1] Ploeg M, Aben KK, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world[J]. *World J Urol*, 2009, 27(3): 289-293.

[2] Chang CJ, Hung MC. The role of EZH2 in tumour progression[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(2): 243-247.

[3] Zhang H, Zhao M, Lv Z, et al. MiR-138 Inhibits Tumor Growth Through Repression of EZH2 in Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(1): 56-

65.

[4] Ferraro A, Mourtzoukou D, Kosmidou V, et al. EZH2 is regulated by ERK/AKT and targets integrin alpha2 gene to control Epithelial-Mesenchymal Transition and anoikis in colon cancer cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(2): 243-254.

[5] Ntziachristos P, Tsirigos A, Van Vlierberghe P, et al. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Nat Med*, 2012, 18(2): 298-301.

[6] Shin YJ, Kim JH. The role of EZH2 in the regulation of the activity of matrix metalloproteinases in prostate cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30393.

[7] Garipov A, Li H, Bitler BG, et al. NF-YA underlies EZH2 upregulation and is essential for proliferation of human epithelial ovarian cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 20(4): 513-520.

[8] Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(3): 299-313.

[9] Xiao Y. Enhancer of zeste homolog 2: a potential target for tumor therapy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(4): 474-477.

[10] Takawa M, Masuda K, Kunizaki M, et al. Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(7): 1298-1305.

[11] Wan L, Li X, Shen H, et al. Quantitative analysis of EZH2 expression and its correlations with lung cancer patients' clinical pathological characteristics[J]. *Clin Transl Oncol*, 2013, 15(2): 132-138.

[12] Wang H, Albadine R, Magheli A, et al. Increased EZH2 protein expression is associated with invasive urothelial carcinoma of the bladder[J]. *Urol Oncol*, 2012, 30(4): 428-433.

[13] Friedman JM, Liang G, Liu CC, et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2 [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(6): 2623-2629.

[14] Bo J, Yang G, Huo K, et al. microRNA-203 suppresses bladder cancer development by repressing bcl-w expression[J]. *FEBS J*, 2011, 278(5): 786-792.

[15] Guo Y, Ying L, Tian Y, et al. miR-144 downregulation increases bladder cancer cell proliferation by targeting EZH2 and regulating Wnt signaling[J]. *FEBS J*, 2013, 280(18): 4531-4538.