

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.22.006

外泌体 miR-512-3p 通过下调 Gas2 促进 TSCC 细胞增殖的研究*

张学武¹, 郑茜玲², 张 乐^{2△}

(1. 延安中医医院口腔科, 陕西延安 716000; 2. 延安大学附属医院口腔科, 陕西延安 716000)

[摘要] 目的 探讨舌鳞状细胞癌(TSCC)患者唾液外泌体对 TSCC 细胞增殖的影响及其相关分子机制。

方法 采用差速超速离心法收集舌癌患者和健康对照者唾液外泌体。用透射电镜和 Western blot 鉴定收集得到的沉淀。将唾液外泌体与 TSCC 细胞共培养, 检测细胞增殖、GAS2 和外泌体中微 RNA-512-3p(miR-512-3p)的表达变化, 并验证 GAS2 为 miR-512-3p 的靶基因。**结果** 透射电镜和 Western blot 检测结果显示, 提取的外泌体符合其结构特征和生物学特征。噻唑蓝(MTT)法检测结果显示, 相比于对照组, TSCC 组患者唾液外泌体明显促进 TSCC 细胞增殖($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, TSCC 组患者唾液外泌体中 cylinD1 和增殖细胞核抗原(PCNA)表达水平明显升高($P < 0.05$); qPCR 结果显示, TSCC 患者唾液外泌体中 miR-512-3p 水平较健康对照者明显升高($P < 0.001$), 并且 miR-512-3p 过表达组的外泌体可明显促进细胞增殖($P < 0.05$), 其细胞 p53 表达水平降低($P < 0.001$)。荧光素酶报告基因检测结果显示, GAS2 为 miR-512-3p 靶基因。**结论** TSCC 患者唾液外泌体可通过 miR-512-3p 促进癌细胞增殖, 其可能机制是通过靶向 GAS2 基因, 并促进 p53 的降解。

[关键词] 舌肿瘤; 肿瘤, 鳞状细胞; 外泌体; 微 RNAs; GAS2; 细胞增殖

[中图分类号] R739.86 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)22-3709-05

Study on the effect of exosome miR-512-3p on the proliferation of tongue squamous cell carcinoma cell lines by down-regulating Gas2*

ZHANG Xuewu¹, ZHEN Xiling², ZHANG Le^{2△}

(1. Department of Stomatology, Yan'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yan'an, Shaanxi 716000, China; 2. Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of salivary exosomes from patients with tongue squamous cell carcinoma (TSCC) on TSCC cell proliferation and its related molecular mechanisms. **Methods** The salivary exosomes of tongue cancer patients and healthy controls were collected by using differential ultracentrifugation. The collected precipitates were identified by transmission electron microscopy and Western blot. The salivary exosomes were co-cultured with TSCC cell lines to detect cell proliferation, the expression of GAS2 and miR-512-3p expression changes in exosomes, and verify whether GAS2 was the target gene of miR-512-3p. **Results** The results of transmission electron microscopy and Western blot showed that the extracted exosomes conformed to their structural and biological characteristics. The results of MTT assay showed that, compared with the control group, the salivary exosomes in the TSCC group significantly promoted the proliferation of TSCC cell ($P < 0.05$). Western blot results showed that the expression levels of cylinD1 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in salivary exosomes of the TSCC group were significantly increased ($P < 0.05$). The qPCR results showed that the levels of miR-512-3p in salivary exosomes of TSCC patients were significantly higher than those in healthy controls ($P < 0.001$), and exosomes in the miR-512-3p overexpression group significantly promoted cell proliferation ($P < 0.05$), and the p53 expression level in the miR-512-3p overexpression group was decreased ($P < 0.001$). The results of luciferase reporter gene assays showed that GAS2 was the miR-512-3p target gene. **Conclusion** The salivary exosomes of TSCC patients can promote the proliferation of cancer cells through miR-512-3p, and the possible mechanism might be to target the GAS2 gene and promote the degradation of p53.

[Key words] tongue neoplasms; neoplasms, squamous cell; exosomes; microRNAs; GAS2; cell proliferation

* 基金项目: 陕西省教育厅专线科学研究计划项目(16JK1852)。 作者简介: 张学武(1984-), 主治医师, 本科, 主要从事口腔疾病研究。

△ 通信作者, E-mail: zhanglezoe@163.com。

口腔舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是头颈部发病率最高的恶性肿瘤之一^[1-2],易发生颈部淋巴结转移且易术后复发。外泌体(Exosome)是一种可由几乎所有类型细胞分泌的,直径为 40~100 nm 的囊状小泡^[3]。外泌体分布广泛,存在于包括组织液、血液、唾液、尿液、脑脊液和母乳等几乎所有体液中^[4]。功能上,外泌体可作为一种运输工具,将其内携带的多种物质运输至受体细胞,从而实现细胞间的信息交流,其中微 RNA(microRNA, miRNA)是各种外泌体内含物中被研究得最广泛的一种^[5]。miRNA 是一类存在于真核生物中的非编码 RNA,长度为 20~25 个核苷酸,可通过互补结合到靶基因 miRNA 的 3'端非编码区,调控基因的表达^[6]。外泌体 miRNA 既可作为疾病标志物,又可作为抗癌药物的靶点加以开发利用^[7-8]。微 RNA-512-3p(miR-512-3p)在多种恶性肿瘤中都出现显著差异表达^[9-12]。并且,miR-512-3p 在舌癌中的高表达已得到明确^[9-10],但其具体作用机制尚不明确。本研究旨在探讨外泌体介导的 miR-512-3p 在舌癌发展中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

DMEM-高糖培养基, RPMI1640 培养基和胎牛血清(FBS)购自美国 Life Technologies 公司;双抗、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司, RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)系统(垂直电泳仪,电转仪)购自美国 Bio-Rad 公司;电化学发光(ECL)试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司;二喹啉酸(BCA)蛋白定量检测试剂盒购自美国 Sigma 公司。CD63、TSG101 和 p53 抗体购自美国 Abcam 公司;cyclin D1,增殖细胞核抗原(PCNA)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔抗体, HRP 标记的山羊抗小鼠抗体购自美国 Abcam 公司。双荧光素酶分析系统购自美国 Promega 公司; Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; 5× All-In-One MaterMix 购自加拿大 Applied Biological Materials 公司; SYBRGreen 实时定量 PCR (RT-PCR)试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司; Avanti J-26XP 离心机购自美国 Beckman 公司; H-7000FA 透射电镜购自日本 Hitachi 公司;蛋白凝胶成像系统(ChemiScope 4300 Pro 型)购自上海 Clinx 公司;实时荧光定量 PCR (RT-qPCR 7500)仪购自美国 ABI 公司。

1.1.2 唾液采集

本研究招募 2017 年 1 月 1 日至 2019 年 1 月 1 日就诊于延安中医医院口腔科经内镜检查和病理活检确诊的中晚期 TSCC 患者 10 例(TSCC 组)。纳入标准:(1)无认知障碍;(2)临床病例资料完整,未经手

术、放疗和化疗等辅助治疗;(3)无严重并发症与相关禁忌证。排除标准:(1)恶性 TSCC 继发或复发患者;(2)存在活动性出血及恶病质患者;(3)远处转移或伴有其他口腔疾病患者。另选取同期健康对照者 10 例(对照组)。所有受试者均签署知情同意书且自愿参与研究。分别收集 TSCC 患者和健康对照者唾液,所有受试者收集唾液前 1 h 禁食、禁饮,并清洁口腔,温水简单漱口,5 min 后指导受试者用 50 mL Falcon 离心管收集唾液。为收集非刺激状态下的外泌体,嘱受试者避免咳嗽和用力。

1.2 方法

1.2.1 外泌体提取和鉴定

采用差速超速离心法收集外泌体。用等体积磷酸盐缓冲液(PBS)稀释收集的唾液,4 ℃ 3 500 r/min 离心 15 min,沉淀唾液中的细胞、碎片及细菌等物质。滤菌处理后,将收集的上清液迅速转移至新的离心管进行外泌体分离提纯。100 000 r/min 离心 70 min,小心弃上清液,加 PBS 重悬;再次 100 000 r/min 离心 70 min,小心弃上清液,加适量 PBS 重悬沉淀,进行下一步实验或储存于-80 ℃ 备用。

1.2.2 细胞培养

人 TSCC 细胞系 CAL27 细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)细胞库。CAL27 细胞培养于 RPMI1640 培养基(含 10% FBS 及 100 U/mL 青霉素/链霉素)。293T 细胞培养于 DMEM 培养基(含 10% FBS 及 100 U/mL 青霉素/链霉素)。将细胞置于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱,每 23~48 小时根据细胞生长状况更换培养基。

1.2.3 质粒转染

miR-512-3p 表达载体由吉玛基因构建合成。细胞融合度达到 70%~80%,更换为无双抗培养基;用 Opti-MEM 培养基分别稀释质粒和 Lipofectamine 2000,室温放置 5 min;将稀释后的质粒 DNA 和 Lipofectamine 2000 混合,室温放置 20 min;细胞更换 Opti-MEM 培养基,然后将混合物加入培养皿中;继续 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,根据细胞状态于 8~12 h 后将 Opti-MEM 培养基更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养基,24 h 后更换为完全培养基。

1.2.4 无外泌体培养基配制

配制含 20%(v/v) FBS 的 RPMI1640 完全培养基,4 ℃ 100 000 r/min 离心过夜。收集上清液,除菌后用等体积的不含 FBS 的培养基稀释,制备含 10% FBS 的无外泌体培养基。

1.2.5 Western blot

使用 RIPA 裂解液进行细胞蛋白提取。以 4 ℃ 12 500 r/min 离心 15 min,收集上清液并使用 BCA 法测蛋白水平。配制 10% SDS-PAGE 分离胶,7.5% 浓缩胶。每孔加入 50 μg 样品,分别以浓缩胶 80 V,分离胶 100 V 进行电泳;0.3 A 转膜 2.5 h;转膜完成后,TBS 洗涤 10 min,3 次;用 5% 脱脂牛奶或 5%

BSA 封闭 1 h;随后一抗 4 °C 孵育过夜;次日, TBST 洗涤 10 min, 4 次;使用相应二抗室温孵育 1 h; TBST 洗涤 10 min, 4 次;使用化学发光成像仪进行分析。

1.2.6 透射电镜观察外泌体形态

用 PBS 重悬 100 000 r/min 离心得到的外泌体残渣, 吸取 5 μL 外泌体悬液加到铜网上, 在干燥环境中静置 20 min。PBS 清洗 3 次。1% 戊二醛固定 10 min。蒸馏水清洗 8 次。依次将铜网置于草酸双氧铈和甲基纤维素-UA 液滴上进行染色包埋。干燥 10 min, 将样品置于电镜下, 在 80 kV 下观察并拍摄电镜照片。

1.2.7 外泌体 miRNA 提取及 RT-qPCR

使用 miRcute miRNA Isolation Kit(北京 TIAN-GEN 公司)从外泌体样品中提取 miR。使用 Prime-Script™ reagent 试剂盒(北京 TAKARA 公司)进行逆转录。逆转录引物 miR-512-3p: 正向 5'-CGG CGG CAC TCA GCC TTG AGG G-3', 反向 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; U6: 正向 5'-CGC TTC GGC AGC ACA TAT ACT AA-3', 反向 5'-TAT GGA ACG CTT CAC GAA TTT GC-3'。对于 GAS 表达水平, TRIzol 法提取总 RNA, 使用 5×All-In-One RT MaterMix(Manufacturer), 根据说明书进行逆转录。逆转录引物: 正向 5'-GAC ACG CTG GAG CAT TAC CTG-3', 反向 5'-TGT GGA GAA AAG GTG CAG ACC-3'。使用 SYBRGreen RT-qPCR 试剂盒按照说明书进行试验。

1.2.8 噻唑蓝(MTT)试验

将 CAL27 细胞分为两组: 对照组和 TSCC 患者组, 分别加入来自健康对照者和 TSCC 患者的唾液外泌体, 共培养 0、24、48、72 h, 用培养基将细胞吹打成 5×10⁴/mL 的单细胞悬液, 接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μL。次日, 细胞贴壁后更换无外泌体培养基, 分别加入健康对照者和 TSCC 患者唾液外泌体, 共培养 72 h, 每种处理设置 5 个复孔。处理完成后, 每孔加 MTT 溶液 20 μL, 继续孵育 4 h。吸去孔内液体, 每孔加 150 μL 二甲基亚砷(DMSO), 脱色摇床振荡 10 min。选择 570 nm 波长, 在酶联免疫监测仪上测定各孔吸光度值(A 值), 记录结果, 以时间为横坐标, A 值为纵坐标。

1.2.9 荧光素酶报告基因分析

使用生物信息学方法 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 和 miRDB (<http://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>) 预测 miR-512-3p 的靶基因, 将二者预测的靶基因取交集并筛选出与细胞增殖相关的基因。将 GAS2 miRNA 的 3'-UTR 进行突变。构建报告基因质粒, 将野生型(Wt)或突变型(Mut)3'-UTR 插入 pmirGLO 载体(Promega)。设置 6 组, 即分别将 pmirGLO 空载体, pmirGLO-GAS2-3'-UTR Wt 或 pmirGLO-GAS2-3'-UTR Mut 与 miR-512-3p 或阴性对照(NC)使用脂质体 Lipo2000 进行共转染,

每组设置 6 个复孔。转染 24 h 后, 收集细胞, 使用双荧光素酶报告分析系统进行分析(E2920, 美国 Promega 公司)。

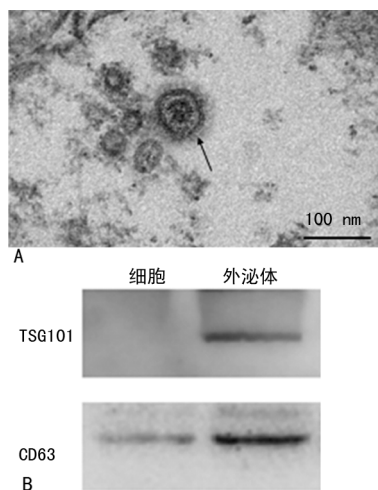
1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较使用方差分析, 两组间比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 外泌体鉴定

采用差速超速离心法进行外泌体提纯后, 使用透射电镜对所得沉淀物质进行形态鉴定。电镜下观察到典型的双凹状囊性小泡, 直径以 50~80 nm 为主, 见图 1A。使用 Western blot 进行外泌体标志物检测, 收集到的外泌体高表达 CD63 和 TSG101, 见图 1B。本研究中差速超速离心法获得的沉淀为外泌体。

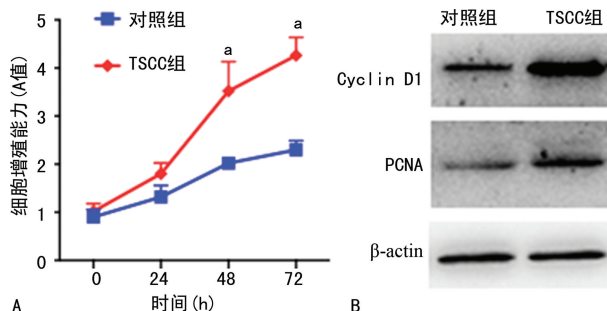


A: 透射电镜下外泌体形态观察(箭头所指为外泌体); B: Western blot 检测外泌体标志物。

图 1 外泌体鉴定

2.2 TSCC 患者唾液外泌体促进 CAL27 细胞增殖

使用 MTT 法检测不同来源的唾液外泌体对 CAL27 细胞增殖能力的影响。TSCC 唾液外泌体可明显刺激细胞增殖, 培养 48、72 h 时与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2A。另外, Western blot 结果显示, TSCC 唾液外泌体处理组, 调控细胞增殖的细胞周期蛋白 cyclinD1 和 PCNA 表达水平明显升高 ($P < 0.001$), 见图 2B。

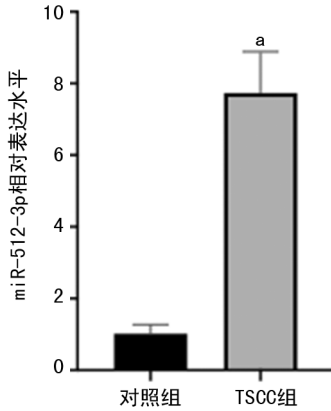


A: CAL27 细胞生长曲线; B: 增殖标志物表达情况; ^a: $P < 0.05$ 。

图 2 TSCC 患者外泌体促进 CAL27 细胞增殖

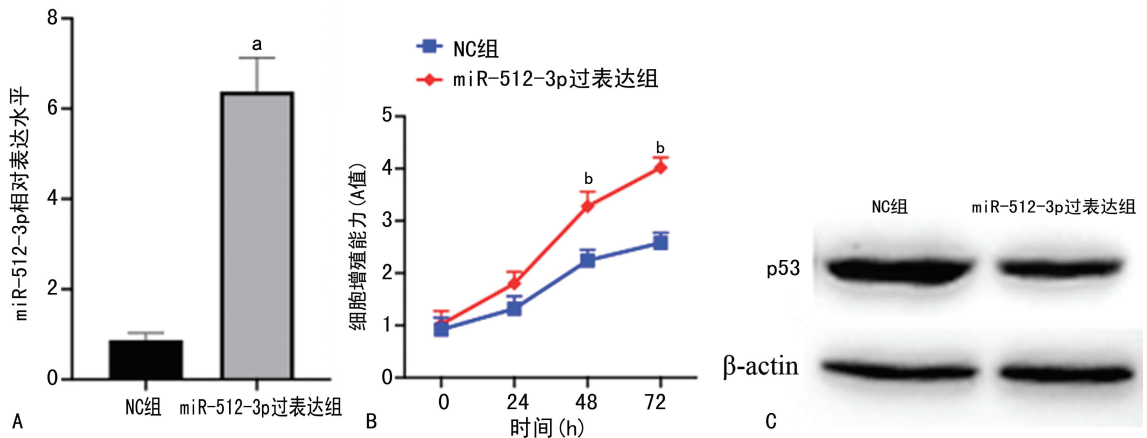
2.3 TSCC 患者唾液外泌体 miR-512-3p 高表达

使用 RT-qPCR 检测 TSCC 患者和健康对照者唾液外泌体中 miR-512-3p 的表达情况。结果显示, TSCC 患者唾液外泌体 miR-512-3p 表达水平较健康者明显升高, 见图 3。



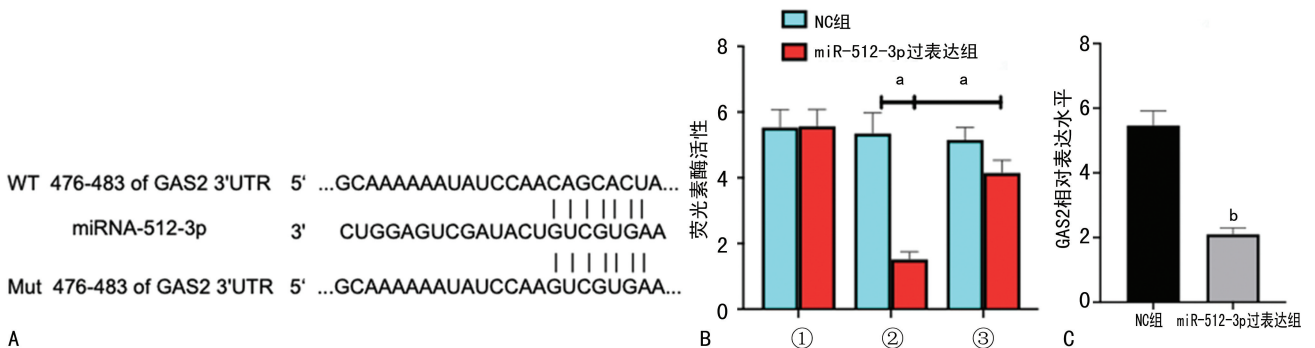
^a: $P < 0.0001$ 。

图 3 TSCC 患者和健康对照者唾液外泌体 miR-512-3p 的表达情况对比



A: NC 组与 miR-512-3p 过表达组中外泌体 miR-512-3p 表达柱状图; B: CAL27 细胞生长曲线; C: Western blot 检测 p53 表达情况; ^a: $P < 0.0001$; ^b: $P < 0.05$ 。

图 4 外泌体中 miR-512-3p 可促进细胞增殖并降低 p53 蛋白水平



A: miR-512-3p 及其在预测靶基因 GAS2 3' UTR 的结合部位野生型和突变型序列; B: 双荧光素酶报告分析系统证实 miR-512-3p 可与 GAS2 基因 3' UTR 互作; C: NC 组与 miR-512-3p 过表达组 GAS2 基因表达柱状图; ①: pmirGLD 载体; ②: pmirGLD-GAS2-Wn; ③: pmirGLD-GAS2-Mut; ^a: $P < 0.05$; ^b: $P < 0.01$ 。

图 5 miR-512-3p 靶向调控 GAS2 基因表达

3 讨论

外泌体是一类由多种活细胞分泌的纳米级囊泡, 可携带母细胞的各种遗传物质, 并转移至靶组织和靶

2.4 外泌体通过 miR-512-3p 促进 CAL27 细胞增殖

使用差速超速离心法分别收集转染了 miR-512-3p 和阴性对照 (NC) 质粒的培养基中的外泌体。RT-qPCR 检测两组外泌体中 miR-512-3p 的表达情况, miR-512-3p 过表达组较 NC 组外泌体内 miR-512-3p 水平明显升高, 见图 4A。随后将收集提纯的外泌体加入生长于无外泌体培养基, 融合度 70% 的 CAL27 细胞中。采用 MTT 法检测细胞增殖能力, 结果显示, 来自 miR-512-3p 过表达组的外泌体可明显增强细胞的增殖能力 ($P < 0.05$), 见图 4B。同时使用 Western blot 检测两组细胞中 p53 蛋白表达水平, 结果显示, 用过表达 miR-512-3p 的外泌体处理细胞后, p53 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 见图 4C。

2.5 GAS2 为 miR-512-3p 靶基因

只有当野生型与 miR-512-3p 共转染时, 荧光素酶活性抑制程度最大, 见图 5A、B。同时使用 RT-qPCR 检测过表达 miR-512-3p 后 GAS2 基因表达水平, 结果显示具有明显的抑制效果, 见图 5C。

器官发挥细胞间的信息交流作用。外泌体内含物质丰富, 包括长链非编码 RNA (lncRNA)、miRNA、蛋白、脂质等, 其中 miRNA 的研究最为广泛, 并且具有

应用潜力^[13]。近年来,越来越多的研究发现,肿瘤患者体液中的外泌体能够参与肿瘤发生、发展的各个病理进程,包括肿瘤的生长、转移、耐药等^[14],但是外泌体在 TSCC 中的研究并不明确,所以本研究探究了 TSCC 患者唾液外泌体对 TSCC 细胞增殖的影响。为了探究 TSCC 患者外泌体的功能,首先收集了 TSCC 患者的唾液样品,差速离心法提取外泌体,将唾液外泌体与 CAL27 细胞共培养,发现癌细胞增殖能力显著增强,证明外泌体具有调控 TSCC 细胞增殖的能力。

miR-512-3p 是一种在肿瘤发生、发展中起重要作用的非编码 RNA。以往研究表明,miR-512-3p 在多种恶性肿瘤中表达上调,如转移性前列腺癌和 TSCC^[9-10,15]。另有研究报道,在非小细胞肺癌和肝细胞癌中,miR-512-3p 表现出抗肿瘤活性^[11-12]。本研究通过对确诊的 TSCC 患者唾液外泌体进行分析,发现 miR-512-3p 在唾液外泌体中高表达,提示 TSCC 患者唾液外泌体或可通过高表达 miR-512-3p 调控 TSCC 细胞的增殖。为进一步分析,本研究在 CAL27 中分别转染了 miR-512-3p 和阴性对照质粒,并收集提取培养基的外泌体。结果发现,过表达 miR-512-3p 的 CAL27 细胞产生的外泌体与 NC 组相比,细胞增殖能力显著增强,并且抑癌基因 p53 蛋白表达水平下降。并且通过数据库预测和双荧光素酶报告基因实验验证了 GAS2 为 miR-512-3p 的靶基因。p53 是一种经典的抑癌基因,p53 的降解依赖钙蛋白酶 calpain。GAS2 可通过抑制钙蛋白酶 calpain 活性抑制 p53 的降解^[16]。本研究表明,miR-512-3p 可下调 GAS2 的表达,提示 miR-512-3p 能够通过下调 GAS2 的表达而促进 TSCC 细胞增殖。

本研究证实了 TSCC 患者唾液外泌体可促进癌细胞增殖,并且参与这一促进作用的重要成分之一是 miR-512-3p。由于未对所有预测到的 miR-512-3p 靶基因进行检测,因此,推测 miR-512-3p 可能是通过抑制 GAS2 的表达进而促进癌细胞增殖,但外泌体 miR-512-3p 的临床应用价值还需进一步研究。

参考文献

[1] SHRESTHA A D, VEDSTED P, KALLESTRUP P, et al. Prevalence and incidence of oral cancer in low- and middle-income countries: a scoping review[J]. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 2019, 29(2): e13207.

[2] OHTA K, YOSHIMURA H. Squamous cell carcinoma of the dorsal tongue [J]. *CMAJ*, 2019, 191(47): E1310.

[3] 李双双, 杜春阳, 袁媛, 等. 不同细胞来源的外泌体的特点和功能[J]. *国际药理学研究杂志*, 2019, 46(6): 411-417.

[4] CHUNG I M, RAJAKUMAR G, VENKIDASAMY B, et al. Exosomes: current use and fu-

ture applications [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 500: 226-232.

- [5] 金佳佳, 吴生荣, 陆笑颜, 等. 外泌体非编码 RNA 在肿瘤中的研究进展 [C]. 上海来溪会务服务有限公司. 2019 第四届公共健康与医学科学国际会议论文集. 上海: 上海来溪会务服务有限公司, 2019: 16-20.
- [6] 杨珊珊, 王欣宇, 孙菡笛, 等. miRNA 进化的研究进展 [J]. *农家参谋*, 2019, 37(9): 87-88.
- [7] 郑梦月. 基于外泌体 miRNA 的宫颈癌诊断标志物筛查 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [8] 闫书山. MiR-6869-5p 靶向 TLR4/NF- κ B 信号抑制结直肠癌的功能及机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
- [9] GAI C, CAMUSSI F, BROCCOLETTI R, et al. Salivary extracellular vesicle-associated miRNAs as potential biomarkers in oral squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 439.
- [10] RABINOWITS G, BOWDEN M, FLORES L M, et al. Comparative analysis of microRNA expression among benign and malignant tongue tissue and plasma of patients with tongue cancer [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 191.
- [11] ZHANG G, CHEN H X, YANG S N, et al. MAGI1-IT1 stimulates proliferation in non-small cell lung cancer by upregulating AKT1 as a ceRNA [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(2): 691-698.
- [12] ZHU X, GAO G, CHU K, et al. Inhibition of RAC1-GEF DOCK3 by miR-512-3p contributes to suppression of metastasis in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 61: 103-114.
- [13] 王璘, 陈建英. 细胞外囊泡研究新进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(4): 621-626.
- [14] 王萌萌, 孔凡虹, 宗曾艳, 等. 外泌体在肿瘤中的作用及前景 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(19): 2397-2402.
- [15] SADEGHI M, RANJBAR B, GANJALIKHANY M R, et al. MicroRNA and Transcription factor gene regulatory network analysis reveals key regulatory elements associated with prostate cancer progression [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168760.
- [16] BENETTI R, DEL SAL G, MONTE M, et al. The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis [J]. *EMBO J*, 2001, 20(11): 2702-2714.