

· 实验研究 ·

lncRNA ADPGK-AS1 对视网膜母细胞瘤细胞生物学行为的抑制作用及其调控机制

张俊¹ 刘彩林² 卜战云³

¹驻马店市中心医院检验科 463000; ²郑州大学第一附属医院检验科 450052; ³郑州大学第一附属医院眼科 450052

通信作者: 卜战云, Email: buzhangyun123@163.com

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA 二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1 (lncRNA ADPGK-AS1) 对人视网膜母细胞瘤 (RB) 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其调控机制。方法 收集 2017 年 2 月至 2018 年 11 月在驻马店市中心医院和郑州大学第一附属医院接受 RB 手术治疗的 RB 患者 39 例 39 眼的术中瘤旁组织和瘤体组织标本, 采用实时荧光定量 PCR 法检测 ADPGK-AS1 和 miR-623 在标本组织中的相对表达量。体外培养人 RB 细胞 Y-79, 将培养细胞分为小干扰 RNA 正常对照组 (siRNA-NC 组)、siRNA-ADPGK-AS1 组、微小 RNA 正常对照组 (miR-NC 组)、miR-623 组、siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-NC 组和 siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-623 组, 采用 MTT 法检测各组细胞增殖率; 采用 Transwell 小室实验检测各组细胞迁移及侵袭数; 采用双荧光素酶报告实验检测 Y-79 细胞中 ADPGK-AS1 和 miR-623 的靶向关系; 采用 Western blot 法检测不同干预组细胞中 Ki-67、基质金属蛋白酶 (MMP)-2 和 MMP-9 蛋白表达量。结果 与瘤旁组织比较, RB 组织中 ADPGK-AS1 相对表达量升高, miR-623 相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 40.522, 48.497$, 均 $P < 0.01$); 与 siRNA-NC 组比较, siRNA-ADPGK-AS1 组细胞中 Ki-67 蛋白相对表达量明显下降, Y-79 细胞增殖 A 值显著降低, 差异均有统计学意义 ($t = 26.833, 18.522$, 均 $P < 0.01$); siRNA-ADPGK-AS1 组细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达量明显低于 siRNA-NC 组, 差异均有统计学意义 ($t = 22.123, 26.183$, 均 $P < 0.01$); siRNA-ADPGK-AS1 组迁移细胞数和侵袭细胞数均明显少于 siRNA-NC 组, 差异均有统计学意义 ($t = 12.385, 19.201$, 均 $P < 0.01$); 双荧光素酶报告实验证实 ADPGK-AS1 可靶向结合 miR-623; miR-623 组细胞中 Ki-67、MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量明显低于 miR-NC 组, 差异均有统计学意义 ($t = 22.137, 22.200, 21.094$, 均 $P < 0.01$); 与 miR-NC 组比较, miR-623 组 Y-79 细胞增殖 A 值显著降低且迁移细胞数和侵袭细胞数均明显减少, 差异均有统计学意义 ($t = 16.398, 11.400, 17.846$, 均 $P < 0.01$); siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-623 组细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达量均明显高于 siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-NC 组, 差异均有统计学意义 ($t = 20.795, 17.493, 23.479$, 均 $P < 0.01$); 与 siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-NC 组比较, siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-623 组增殖 A 值明显升高且迁移细胞数及侵袭细胞数明显增多, 差异均有统计学意义 ($t = 15.600, 14.495, 17.855$, 均 $P < 0.01$)。结论 敲低 ADPGK-AS1 基因可抑制 RB 细胞增殖、迁移和侵袭, 其作用机制与 miR-623 的表达上调有关。

【关键词】 长链非编码 RNA; 二磷酸腺苷依赖性葡萄糖激酶反义 RNA 1; 微小 RNA; 视网膜母细胞瘤

基金项目: 河南省科学技术计划项目 (2017225037)

DOI: 10.3760/j.issn.115989-20200819-00599

Inhibitory effects of lncRNA ADPGK-AS1 on the biological behaviours of human retinoblastoma cells and its regulating mechanism

Zhang Jun¹, Liu Cailin², Bu Zhanyun³

¹Department of Laboratory, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China; ²Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; ³Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Bu Zhanyun, Email: buzhangyun123@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of long noncoding RNA adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1 (ADPGK-AS1) on the proliferation, migration and invasion of human retinoblastoma (RB) Y-79 cells and its regulatory effect on microRNA-623 (miR-623). **Methods** The peritumoral tissue and

RB specimens were collected from 39 eyes of 39 patients with RB during surgery in The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University and Zhumadian Central Hospital from February 2017 to November 2018. Real-time fluorescence quantitative PCR was employed to detect the expression of ADPGK-AS1 and miR-623 in the specimens. Human RB line Y-79 cells were cultured *in vitro* and divided into small interfering RNA-normal control (siRNA-NC) group, siRNA-ADPGK-AS1 group, microRNA (miR)-NC group, miR-623 group, siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-NC group and siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-623 group. The cell proliferation rate was detected by MTT method. Transwell cell experiment was performed to detect the number of migrating and invading cells. The dual luciferase reporter experiment was used to evaluate the targeting relationship between ADPGK-AS1 and miR-623. The expression of Ki-67, matrix metalloproteinases (MMP)-2, and MMP-9 in the cells was detected by Western blot assay. Written informed consent was obtained from each patient prior to any medical examination and treatment. This study protocol adhered to the Declaration of Helsinki. The use of the human specimens was approved by an Ethics Committee of The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University (No. 2017-KY-73).

Results Compared with the peritumoral tissue, the relative expression level of ADPGK-AS1 in the RB tissue was significantly increased, and the relative expression level of miR-623 was significantly reduced ($t = 40.522, 48.497$; both at $P < 0.01$). Compared with the siRNA-NC group, both the relative expression level of Ki-67 protein and the proliferation *A* value of RB Y-79 cells were significantly reduced in the siRNA-ADPGK-AS1 group ($t = 26.833, 18.522$; both at $P < 0.01$). The relative expression levels of MMP-2 and MMP-9 proteins in the siRNA-ADPGK-AS1 group were significantly lower than those in the siRNA-NC group ($t = 22.123, 26.183$; both at $P < 0.01$). The number of migrating and invading cells in the siRNA-ADPGK-AS1 group was significantly less than that in the siRNA-NC group ($t = 12.385, 19.201$; both at $P < 0.01$). The dual luciferase report experiment confirmed that ADPGK-AS1 targeted miR-623. The protein expression levels of the Ki-67, MMP-2 and MMP-9 in the miR-623 group were significantly lower than those in the miR-NC group ($t = 22.137, 22.200, 21.094$; all at $P < 0.01$). Compared with the miR-NC group, the proliferation *A* value of Y-79 cells in the miR-623 group was significantly lower, and the number of migrating and invading cells was significantly less ($t = 16.398, 11.400, 17.846$; all at $P < 0.01$). The relative expressions levels of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 proteins in the siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-623 group were significantly higher than those in the siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-NC group ($t = 20.795, 17.493, 23.479$; all at $P < 0.01$). Compared with the siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-NC group, the proliferation *A* value of Y-79 cells in the siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-623 group was significantly increased ($t = 15.600, P < 0.01$), and the number of migrating and invading cells was obviously elevated ($t = 14.495, 17.855$; both at $P < 0.01$).

Conclusions Knockdown of *ADPGK-AS1* gene can inhibit the proliferation, migration and invasion of Y-79 cells by up-regulating the expression of miR-623.

[Key words] Long noncoding RNA; Adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1; MicroRNA; Retinoblastoma

Fund program: Science and Technology Program of Henan Province (2017225037)

DOI: 10.3760./cma.j.cn115989-20200819-00599

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是临床上常见的眼内原发性恶性肿瘤, 严重威胁患者生命, 早期发现并及时治疗可提高患者生存率。RB 的发病机制尚未完全阐明, 但研究发现长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA) 表达变化与 RB 的发生和发展密切相关, 如 miR-25-3p 和 miR-494 通过调控 PI3K/AKT 信号通路促进 RB 的进展^[1-2], miR-144 可作为 RB 诊断的标志物^[3], miR-129-5p、miR-936 和 miR-598 通过减弱 PI3K/Akt 通路的作用来抑制 RB 细胞的生物学行为^[4-6], 沉默 lncRNA ANRIL 可通过调控 miR-99a 来抑制 RB 细胞增生^[7], miR-184 可增强 RB 对化学疗法的敏感性^[8], miR-214-3p 通过靶向 ABCB1 和 XIAP 来调

控 RB 细胞凋亡^[9], 此外 miR-188-5p、miR-218-5p 和 miR-218-5p 也参与 RB 细胞的凋亡过程^[10-12]。lncRNA 在 RB 中表达异常, 可能参与细胞增生、迁移等生物学行为变化过程。研究表明, 在 RB 中 lnc00152、lncRNA MALAT1 和 lncRNA TP73-AS1 表达上调, 可促进细胞增生、迁移及侵袭^[13-15]。lncRNA ADPGK-AS1 在胰腺癌组织中的表达水平升高, 并通过激活锌指 E-盒结合同源异形盒-1 促进胰腺癌进展^[16]。靶基因预测显示, 二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1 (adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1, ADPGK-AS1) 与 miR-623 存在结合位点, miR-623 在胰腺癌中表达水平降低, 并可通过抑制基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1, MMP1)

的表达而抑制胰腺癌细胞的转移^[17],推测 ADPGK-AS1 与 miR-623 的结合对 RB 也可发挥类似的作用,但其具体分子机制尚未阐明。本研究探讨 ADPGK-AS1 对 RB 细胞生物学行为的调控作用及其机制,以期对 RB 的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 RB 组织标本收集及 Y-79 细胞来源 收集 2017 年 2 月至 2018 年 11 月在驻马店市中心医院和郑州大学第一附属医院接受 RB 手术的 39 例眼患者的术中瘤体组织及瘤旁组织标本,其中男 20 例,女 19 例;年龄 3~10 岁,平均(6.35±2.35)岁。所有患者术中切除的眼内肿瘤组织标本经组织病理学检查证实为 RB,将标本置于液氮中迅速冷冻,并转入-80℃超低温冰箱内保存。本研究经郑州大学第一附属医院医学伦理委员会审批(批文号:2017-KY-73)并遵循《赫尔辛基宣言》,所有患者监护人了解本研究方法及其标本再使用目的并自愿签署知情同意书。人 RB 细胞株 Y-79 细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养液(杭州吉诺生物医药技术有限公司);Lipofectamine2000(北京赛因百奥生物技术有限公司);小干扰 RNA 正常对照(small interfering RNA-normal control, siRNA-NC)、siRNA-ADPGK-AS1、微小 RNA 正常对照(microRNA-normal control, miR-NC)、miR-623 拟似物(miR-623 mimics)、anti-miR-NC、anti-miR-623(广州锐博生物科技有限公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);cDNA 合成与实时荧光定量 PCR 试剂(美国 Thermo Fisher 公司);MTT 试剂(上海歌凡生物科技有限公司);兔抗人 Ki-67 一抗(9449)、兔抗人 MMP-2 一抗(40994)、兔抗人 MMP-9 一抗(13667)(美国 CST 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(ab172730)(美国 Abcam 公司)。Transwell 小室(南京迅贝生物科技有限公司);Matrigel 基质胶(上海伟进生物科技有限公司);ABI 7500 型荧光定量 RCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将 Y-79 细胞接种于 96 孔板,细胞密度为 2.5×10^5 个/ml,100 μ l/孔,细胞培养 24 h。待细胞培养至 80% 融合,按照实验目的分别将细胞分为 siRNA-NC 组、siRNA-ADPGK-AS1 组、miR-NC 组、miR-623 组、siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-NC 组和 siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-623 组,依据分组方

法分别将相应质粒各 10 μ l 加入培养基以转染 Y-79 细胞,将培养基更换为含体积分数 10% 胎牛血清的正常培养液,继续培养 48 h。

1.2.2 qRT-PCR 法测定细胞中 ADPGK-AS1 和 miR-623 相对表达量 分别提取瘤旁组织、RB 组织及各组 Y-79 细胞总 RNA,检测 RNA 浓度,将总 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应。ADPGK-AS1 正向引物为 5'-GCCGATGTCGACACAAGCG-3',反向引物为 5'-AGCAAATGTGTTCCCATCCCT-3';miR-623 正向引物为 5'-GCCGAGTGGGTTGTGGGGACG-3',反向引物为 5'-CAGTGCCTGTCTCGTGGACT-3';U6 正向引物为 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3',反向引物为 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3';磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)正向引物为 5'-AACGGATTTGGTCGTATTG-3',反向引物为 5'-GGAAGATGCTGATGGGATT-3'。反应体系:10 倍 PCR 缓冲液 2.5 μ l, MgSO₄ 2.5 μ l, dNTPs 2.5 μ l, 正反向引物各 0.5 μ l, cDNA 2.0 μ l, RNase-Free ddH₂O 补足体系至 25.0 μ l。反应条件:95℃ 预反应 2 min;95℃ 反应 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 36 次循环。ADPGK-AS1 测定以 GAPDH 为内参,miR-623 测定以 U6 为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测 ADPGK-AS1 和 miR-623 相对表达量。

1.2.3 MTT 法评估各组细胞活力 将各组 Y-79 细胞接种于 96 孔板,细胞密度为 2.5×10^5 个/ml,100 μ l/孔,细胞培养 24 h。待细胞培养至 80% 融合,将 MTT 溶液加入培养液,20 μ l/孔,继续培养 4 h。离心半径 6 cm,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入二甲基亚砜,150 μ l/孔,避光振荡孵育 5 min,采用酶标仪检测波长为 490 nm 处各孔吸光度(A)值。

1.2.4 Transwell 小室实验检测各组迁移和侵袭的细胞数 取各组 Y-79 细胞,细胞密度为 2.5×10^5 个/ml,加入 Transwell 小室上室,200 μ l/孔,下室加入含有 10% 胎牛血清的培养液,600 μ l/孔,培养 24 h。培养液中滴加质量分数 10% 多聚甲醛溶液固定 20 min,滴加结晶紫染液,作用 10 min,光学显微镜下观察迁移细胞数。将 Matrigel 基质胶稀释液加入上室,40 μ l/孔,继续培养细胞 4 h,后续实验同细胞迁移实验,光学显微镜下观察侵袭细胞数。

1.2.5 双荧光素酶报告实验测定 WT-ADPGK-AS1 和 MUT-ADPGK-AS1 酶活性 LncBase Predicted v.2 预测显示 ADPGK-AS1 与 miR-623 存在结合位点(图 1),分别构建野生型载体 WT-ADPGK-AS1 与突变型载体 MUT-ADPGK-AS1,分别将 miR-NC、miR-623 mimics 与

WT-ADPGK-AS1、MUT-ADPGK-AS1 加入培养液共转染 Y-79 细胞,继续培养 24 h。采用双荧光素酶报告基因检测系统检测,按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明书,应用酶标仪检测萤火虫与海肾荧光值,以海肾荧光值作为内参,测定 WT-ADPGK-AS1 和 MUT-ADPGK-AS1 酶活性。分别将 pcDNA、pcDNA-ADPGK-AS1、siRNA-NC、siRNA-ADPGK-AS1 转染至 Y-79 细胞中继续培养 24 h,并采用荧光定量 PCR 法测定细胞中 miR-623 表达。

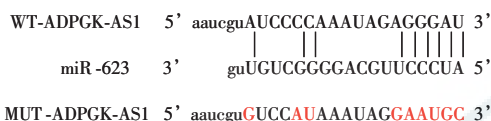


图 1 ADPGK-AS1 的序列中含有与 miR-623 互补的核苷酸序列
WT:野生型;miR:微小 RNA;MUT:突变型;ADPGK-AS1:二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1

Figure 1 The sequence of ADPGK-AS1 contained a nucleotide sequence complementary to miR-623 WT: wild type; miR: microRNA; MUT: mutant type; ADPGK-AS1: adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1

1.2.6 Western blot 法测定细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达 取各组 Y-79 细胞,加入 400 μl RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,取 30 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳反应,转膜,封闭,分别滴加 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 与内参 GAPDH 一抗稀释液(均 1:1 000),4 °C 孵育 24 h,TBS 洗涤,滴加相应二抗稀释液(1:2 000),室温下孵育 1 h,TBST 洗涤,ECL 显色,暗室内曝光显影,用 Image J 软件分析各条带灰度值。目的蛋白相对表达量=目的蛋白表达灰度值/GAPDH 灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析。计量资料的数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 mean±SD 表达。采用均衡分组单因素干预研究设计,瘤旁组织与 RB 组织中 lncRNA ADPGK-AS1 和 miR-623 mRNA 相对表达量差异比较采用配对 t 检验,不同干预的 2 个组间各检测指标差异比较采用独立样本 t 检验,多组间评估指标差异比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 SNK-q 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADPGK-AS1 和 miR-623 在人 RB 组织中的表达

与瘤旁组织比较,RB 组织中 ADPGK-AS1 相对表达量明显升高,miR-623 相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(t=40.522,P<0.01;t=48.497,P<0.01)(表 1)。

表 1 RB 组织与瘤旁组织中 ADPGK-AS1 和 miR-623 相对表达量比较(mean±SD)
Table 1 Comparison of relative expression levels of ADPGK-AS1 and miR-623 between RB tissue and adjacent tissue (mean±SD)

组别	样本量	ADPGK-AS1 相对表达量	miR-623 相对表达量
瘤旁组织	39	1.00±0.07	1.00±0.06
RB 组织	39	2.56±0.23	0.44±0.04
t 值		40.522	48.497
P 值		<0.01	<0.01

注:(配对 t 检验) RB:视网膜母细胞瘤;ADPGK-AS1:二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1;miR:微小 RNA
Note:(Paired t test) RB:retinoblastoma;ADPGK-AS1:adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1;miR:microRNA

2.2 不同 siRNA 转染组 Y-79 细胞增殖相关指标变化

Western blot 检测发现,siRNA-ADPGK-AS1 组细胞中 Ki-67 蛋白表达条带强度较 siRNA-NC 组减弱(图 2),Ki-67 蛋白相对表达量明显低于 siRNA-NC 组,差异有统计学意义(t=26.833,P<0.01);与 siRNA-NC 组比较,siRNA-ADPGK-AS1 组 Y-79 细胞增殖 A 值明显降低,差异有统计学意义(t=18.522,P<0.01)(表 2)。

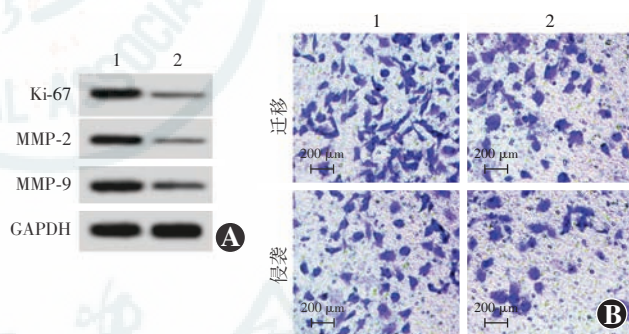


图 2 不同 siRNA 转染组 Y-79 细胞增殖及生物学行为相关指标比较 A:Western blot 检测显示 siRNA-ADPGK-AS1 组细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP9 蛋白表达条带明显弱于 siRNA-NC 组 B:不同质粒转染组迁移和侵袭情况(结晶紫×200,标尺=200 μm) siRNA-ADPGK-AS1 组迁移和侵袭细胞数少于 siRNA-NC 组 1:siRNA-NC 组;2:siRNA-ADPGK-AS1 组 MMP:基质金属蛋白酶;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶;siRNA:小干扰 RNA;NC:正常对照;ADPGK-AS1:二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1

Figure 2 Comparison of Y-79 cells proliferation and biological behavior-related indicators in different siRNA transfection groups

A:Ki-67, MMP-2 and MMP9 protein expression bands in the siRNA-ADPGK-AS1 group were significantly weaker than those in the siRNA-NC group B:The migration and invasion of different plasmid transfection groups (crystal violet×200,scale bar=200 μm) The number of migrating and invading cells in the siRNA-ADPGK-AS1 group was less than that in the siRNA-NC group 1:siRNA-NC group 2:siRNA-ADPGK-AS1 group MMP: matrix metalloproteinase; GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; siRNA: small interfering RNA; NC: normal control; ADPGK-AS1:adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1

表 2 不同 siRNA 转染组细胞增殖相关指标比较 (mean±SD)
Table 2 Comparison of cell proliferation-related indexes in different siRNA transfection groups (mean±SD)

组别	样本量	ADPGK-AS1 相对表达量	细胞增殖值 (A)	Ki-67 蛋白相对表达量
siRNA-NC 组	9	1.00±0.05	0.71±0.05	0.57±0.04
siRNA-ADPGK-AS1 组	9	0.37±0.03	0.35±0.03	0.17±0.02
<i>t</i> 值		32.413	18.522	26.833
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: (独立样本 *t* 检验) siRNA: 小干扰 RNA; NC: 正常对照; ADPGK-AS1: 二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1

Note: (Independent sample *t* test) siRNA: small interfering RNA; NC: normal control; ADPGK-AS1: adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1

2.3 不同 siRNA 转染组 Y-79 细胞生物学行为相关指标比较

Western blot 检测结果显示, siRNA-ADPGK-AS1 组细胞中 MMP-2 和 MMP9 蛋白表达条带强度均明显弱于 siRNA-NC 组, siRNA-ADPGK-AS1 组 Y-79 细胞迁移数目和侵袭数目均少于 siRNA-NC 组 (图 2)。siRNA-ADPGK-AS1 组细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达量均明显低于 siRNA-NC 组, 差异均有统计学意义 ($t=22.123, P<0.01; t=26.183, P<0.01$); Transwell 小室实验结果显示, siRNA-ADPGK-AS1 组迁移细胞数和侵袭细胞数均明显少于 siRNA-NC 组, 差异均有统计学意义 ($t=12.385, P<0.01; t=19.201, P<0.01$) (表 3)。

表 3 不同 siRNA 转染组细胞生物学行为相关指标比较 (mean±SD)

Table 3 Comparison of biological behavior-related indexes of cells in different siRNA transfection groups (mean±SD)

组别	样本量	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	MMP-2 蛋白相对表达量	MMP-9 蛋白相对表达量
siRNA-NC 组	9	95.93±7.87	80.06±5.64	0.69±0.05	0.81±0.05
siRNA-ADPGK-AS1 组	9	57.37±5.03	38.93±3.08	0.26±0.03	0.34±0.02
<i>t</i> 值		12.385	19.201	22.123	26.183
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: (独立样本 *t* 检验) siRNA: 小干扰 RNA; NC: 正常对照; MMP: 基质金属蛋白酶; ADPGK-AS1: 二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1

Note: (Independent sample *t* test) siRNA: small interfering RNA; NC: normal control; MMP: matrix metalloproteinase; ADPGK-AS1: adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1

2.4 ADPGK-AS1 靶向调控 miR-623 的表达

与 miR-NC 组比较, miR-623 组细胞中 WT-ADPGK-AS1 荧光素酶活性明显下降, 差异有统计学意

义 ($t=14.926, P<0.01$), 2 个组间细胞中 MUT-ADPGK-AS1 荧光素酶活性比较差异无统计学意义 ($t=0.651, P=0.524$) (表 4)。与 pcDNA 组比较, pcDNA-ADPGK-AS1 组 miR-623 的相对表达量降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 siRNA-NC 组比较, siRNA-ADPGK-AS1 组 miR-623 相对表达量升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表 5)。

表 4 2 个组 WT-ADPGK-AS1 和 MUT-ADPGK-AS1 荧光素酶活性比较 (mean±SD)

Table 4 Comparison of luciferase activity of WT-ADPGK-AS1 and MUT-ADPGK-AS1 between the two groups (mean±SD)

组别	样本量	WT-ADPGK-AS1 酶活性	MUT-ADPGK-AS1 酶活性
miR-NC 组	9	1.03±0.09	1.01±0.07
miR-623 组	9	0.54±0.04	0.99±0.06
<i>t</i> 值		14.926	0.651
<i>P</i> 值		<0.01	0.524

注: (独立样本 *t* 检验) WT: 野生型; ADPGK-AS1: 二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1; MUT: 突变型; miR: 微小 RNA; NC: 正常对照

Note: (Independent sample *t* test) WT: wild type; ADPGK-AS1: adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1; MUT: mutant type; miR: microRNA; NC: normal control

表 5 各组细胞中 miR-623 相对表达量比较 (mean±SD)

Table 5 Comparison of relative expression levels of miR-623 among various groups (mean±SD)

分组	样本量	miR-623 相对表达量
pcDNA 组	9	1.00±0.05
pcDNA-ADPGK-AS1 组	9	0.51±0.04 ^a
siRNA-NC 组	9	0.99±0.06
siRNA-ADPGK-AS1 组	9	2.97±0.25 ^b
<i>F</i> 值		612.115
<i>P</i> 值		<0.01

注: 与 pcDNA 组比较, ^a $P<0.05$; 与 siRNA-NC 组比较, ^b $P<0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验) miR: 微小 RNA; pcDNA: 质粒载体 DNA; ADPGK-AS1: 二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1; siRNA: 小干扰 RNA; NC: 正常对照

Note: Compared with pcDNA group, ^a $P<0.05$; compared with siRNA-NC group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) miR: microRNA; pcDNA: plasmid carrier DNA; ADPGK-AS1: adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1; siRNA: small interfering RNA; NC: normal control

2.5 不同 miRNA 转染组 Y-79 细胞活力比较

Western blot 检测结果显示, miR-623 组细胞中 Ki-

67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达条带明显弱于 miR-NC 组,miR-623 组 Ki-67、MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量明显低于 miR-NC 组,差异均有统计学意义 ($t = 22.137, 22.200, 21.094$, 均 $P < 0.01$); 与 miR-NC 组比较,miR-623 组细胞增生 A 值降低,差异有统计学意义 ($t = 16.398, P < 0.01$)。Transwell 小室实验结果显示,miR-623 组迁移细胞数和侵袭细胞数均明显少于 miR-NC 组,差异均有统计学意义 ($t = 11.400, 17.846$, 均 $P < 0.01$) (图 3, 表 6)。

2.6 miR-623 与 ADPGK-AS1 联合作用下 Y-79 细胞生物学行为变化

Western blot 检测显示, siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-623 组细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达量均明显高于 siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-NC 组,差异均有统计学意义 ($t = 20.795, 17.493, 23.479$, 均 $P < 0.01$)。与 siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-NC 组比较, siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-623 组 A 值明显升高,差异有统计学意义 ($t = 15.600, P < 0.01$); siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-623 组迁移细胞数及侵袭细胞数明显增多,差异均有统计学意义 ($t = 14.495, 17.855$, 均 $P < 0.01$) (图 4, 表 7)。

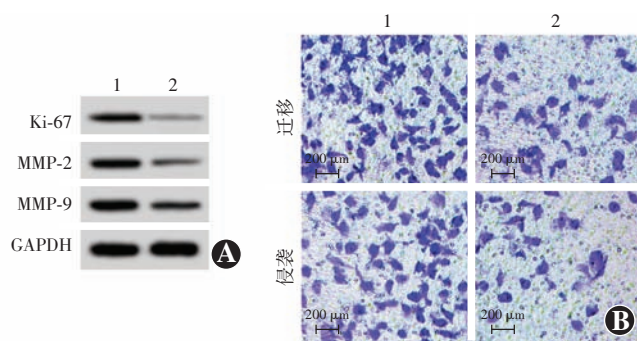


图 3 不同 miRNA 转染组 Y-79 细胞增生和移行相关指标比较 A: Western blot 检测显示,miR-NC 组细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP9 蛋白表达条带弱于 miR-NC 组 B: 不同微小 RNA 转染组 Y-79 细胞迁移和侵袭情况(结晶紫 $\times 200$, 标尺 = $200 \mu\text{m}$) miR-623 组迁移和侵袭细胞数少于 miR-NC 组 1: miR-NC 组; 2: miR-623 组 MMP: 基质金属蛋白酶; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; miR: 微小 RNA; NC: 正常对照

Figure 3 Comparison of Y-79 cell proliferation and migration related indicators between the two different miRNA transfection groups A: Western blot assay showed that the protein expression bands of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 in the miR-NC group were weaker than those in the miR-NC group B: Comparison of Y-79 cell migration and invasion status between miR-623 group and miR-NC group (crystal violet $\times 200$, scale bar = $200 \mu\text{m}$) The number of the migrating and invading cells was less in the miR-623 group compared with miR-NC group 1: miR-NC group; 2: miR-623 group MMP: matrix metalloproteinase; GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; miR: micro RNA; NC: normal control

表 6 不同 miRNA 转染组 Y-79 细胞增生和移行相关指标比较 (mean \pm SD)
Table 6 Comparison of Y-79 cell proliferation and migration related indicators between the two different miRNA transfection groups (mean \pm SD)

组别	样本量	miR-623 相对表达量	细胞增生值(A)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	Ki-67 蛋白相对表达量	MMP-2 蛋白相对表达量	MMP-9 蛋白相对表达量
miR-NC 组	9	1.00 \pm 0.06	0.74 \pm 0.05	99.92 \pm 8.64	86.41 \pm 5.25	0.58 \pm 0.04	0.68 \pm 0.04	0.83 \pm 0.05
miR-623 组	9	2.69 \pm 0.22	0.39 \pm 0.04	62.92 \pm 4.49	44.77 \pm 4.63	0.25 \pm 0.02	0.31 \pm 0.03	0.42 \pm 0.03
t 值		22.233	16.398	11.400	17.846	22.137	22.200	21.094
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:(独立样本 t 检验) miR:微小 RNA;NC:正常对照;MMP:基质金属蛋白酶
Note:(Independent sample t test) miR: micro RNA;NC: normal control;MMP: matrix metalloproteinase

表 7 2 个组 Y-79 细胞增生和生物学行为相关指标比较 (mean \pm SD)
Table 7 Comparison of Y-79 cell proliferation and biological behavior-related indexes between the two groups (mean \pm SD)

组别	样本量	miR-623 相对表达量	细胞增生值(A)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	Ki-67 蛋白相对表达量	MMP-2 蛋白相对表达量	MMP-9 蛋白相对表达量
siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-NC 组	9	1.00 \pm 0.05	0.34 \pm 0.03	56.34 \pm 4.44	35.89 \pm 3.33	0.15 \pm 0.02	0.25 \pm 0.03	0.33 \pm 0.02
siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-623 组	9	0.59 \pm 0.05	0.60 \pm 0.04	86.44 \pm 4.37	70.66 \pm 4.80	0.46 \pm 0.04	0.59 \pm 0.05	0.68 \pm 0.04
t 值		17.395	15.600	14.495	17.855	20.795	17.493	23.479
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:(独立样本 t 检验) siRNA:小干扰 RNA;miR:微小 RNA;NC:正常对照;MMP:基质金属蛋白酶;ADPGK-AS1:二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1
Note:(Independent sample t test) siRNA: small interfering RNA;miR: micro RNA;NC: normal control;MMP: matrix metalloproteinase; ADPGK-AS1: adenosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1

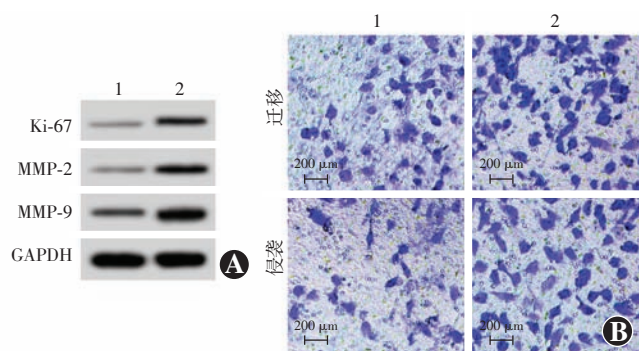


图 4 2 个组 Y-79 细胞增生和生物学行为相关指标比较 A: Western blot 检测结果显示, siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-623 组细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达条带明显强于 siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-NC 组 B: 各组 Y-79 细胞迁移和侵袭情况比较(结晶紫, 标尺 = 200 μm) 1: siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-NC 组; 2: siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-623 组 siRNA: 小干扰 RNA; miR: 微小 RNA; NC: 正常对照; MMP: 基质金属蛋白酶; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; ADPGK-AS1: 二磷酸腺苷依赖的葡萄糖激酶反义 RNA1

Figure 4 Comparison of Y-79 cell proliferation and biological behavior-related indicators between the two groups A: Western blot assay showed that the protein expression bands of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 in the siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-623 group were significantly stronger than those in the siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-NC group B: Y-79 cell migration and invasion between two groups (crystal violet $\times 200$, scale bar = 200 μm) The number of migrating and invading cells in the siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-623 group was more than that in siRNA-ADPGK-AS1+anti-miR-NC group 1: siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-NC group; 2: siRNA-ADPGK-AS1 + anti-miR-623 group siRNA: small interfering RNA; miR: micro RNA; NC: normal control; MMP: matrix metalloproteinase; GAPDH: glyceraldehyde phosphatase dehydrogenase; ADPGK-AS1: denosine diphosphate-dependent glucokinase antisense RNA 1

3 讨论

lncRNA 在 RB 细胞增生、迁移及侵袭等生物学过程中发挥重要的调控作用, 敲低 *lncRNA PVT1* 基因可充当 miR-488-3p 的海绵分子而抑制 RB 的进展^[18], lncRNA LINC00202 通过充当 miR-3619-5p 的海绵分子而促进 RB 的进展^[19]。沉默 *lncRNA ANRIL* 基因可通过调节 miR-99a/c-Myc 而抑制 RB 细胞的生长并促进其凋亡^[20]。LncRNA AFAP1-AS1 是一种预后生物标志物, 在 RB 的发生过程中起致癌作用^[21]。LncRNA 在 RB 发生及转移过程中的分子机制尚未完全阐明。

研究发现, ADPGK-AS1 在骨肉瘤组织中的表达水平升高, 并可通过靶向 miR-542-3p 而促进细胞的增生、侵袭和迁移并抑制其凋亡^[22]。此外, ADPGK-AS1 在乳腺癌组织中表达水平升高, 并可通过调节 miR-3196/OTX1 分子轴而促进细胞增生、迁移及间质-上皮转化过程^[23]。ADPGK-AS1 通过充当 miR-525 的海绵分子而促进结直肠癌的进展^[24]。本研究结果显示

RB 组织中 ADPGK-AS1 的表达水平明显高于瘤旁组织, 进一步研究显示干扰 ADPGK-AS1 的表达可明显降低细胞活力及 Ki-67 蛋白水平, 提示 ADPGK-AS1 在 RB 发生和发展过程中发挥重要调控作用。研究表明, Ki-67 在肿瘤组织或细胞中表达水平升高可促进细胞增生^[25-28], 提示干扰 ADPGK-AS1 的表达可抑制 RB 细胞增生。肿瘤细胞迁移及侵袭与细胞外基质沉积有关, MMP-2 和 MMP-9 可降解细胞外基质从而促进细胞迁移及侵袭^[29-32]。本研究结果显示, 干扰 ADPGK-AS1 表达后 RB 细胞迁移及侵袭细胞数明显减少, 并可抑制 MMP-2、MMP-9 的表达, 提示干扰 ADPGK-AS1 表达可抑制 RB 细胞迁移及侵袭。

本研究证实 ADPGK-AS1 可竞争性结合 miR-623, 并可负向调控 miR-623 的表达。miR-623 可抑制肺癌的进展^[33]; 其还可抑制乳腺癌细胞增生、迁移及侵袭^[34]; miR-623 靶向细胞周期蛋白 D1 抑制胃癌中的细胞增生^[35]。本研究结果显示, RB 组织中 miR-623 的表达水平降低, miR-623 过表达可抑制 RB 细胞增生、迁移及侵袭, 提示 miR-623 在 RB 发生和发展过程中发挥重要调控作用。本研究将 siRNA-ADPGK-AS1 与 anti-miR-623 共转染至 RB 细胞, 结果显示细胞活力增强, 迁移及侵袭细胞数增多, 并可促进 Ki-67、MMP-2、MMP-9 表达, 提示抑制 miR-623 表达可明显逆转干扰 ADPGK-AS1 表达对 RB 细胞生物学行为的作用。

综上所述, ADPGK-AS1 在 RB 组织中表达水平升高, 而 miR-623 的表达水平降低, 敲低 *ADPGK-AS1* 基因可通过靶向上调 miR-623 的表达而抑制 Y-79 细胞增生、迁移及侵袭, 可能成为 RB 分子治疗的潜在靶点, 还可为进一步揭示 RB 发生及发展的分子机制提供实验基础。但是, ADPGK-AS1-miR-623 的靶基因以及详细调控机制仍需深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 张俊参与研究实施、资料收集、论文写作和修改; 刘彩林参与研究实施、文章撰写和修改; 卜战云提供课题支持, 参与研究选题、研究设计、研究过程指导和论文主要内容的修改和定稿

参考文献

- [1] Wan W, Wan W, Long Y, et al. MiR-25-3p promotes malignant phenotypes of retinoblastoma by regulating PTEN/Akt pathway [J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118 (1): 109111 - 109121 [2020-06-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31336343/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109111.
- [2] Xu F, Liu G, Wang L, et al. MiR-494 promotes progression of retinoblastoma via PTEN through PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20 (2): 1952-1960. DOI: 10.3892/ol.2020.11749.
- [3] Zheng Q, Zhu Q, Li C, et al. microRNA-144 functions as a diagnostic and prognostic marker for retinoblastoma [J/OL]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2020, 75 (1): e1804-e1814 [2020-06-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31336343/>.

- nlm.nih.gov/32844953/. DOI:10.6061/clinics/2020/e1804.
- [4] Liu Y, Liang G, Wang H, et al. MicroRNA-129-5p suppresses proliferation, migration and invasion of retinoblastoma cells through PI3K/AKT signaling pathway by targeting PAX6[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(12): 152641 [2020-06-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31727502>. DOI:10.1016/j.prp.2019.152641.
- [5] Xu L, Li W, Shi Q, et al. MicroRNA-936 inhibits the malignant phenotype of retinoblastoma by directly targeting HDAC9 and deactivating the PI3K/AKT pathway[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(2): 635-645. DOI:10.3892/or.2020.7456.
- [6] Liu F, Zhang Q, Liang Y. MicroRNA-598 acts as an inhibitor in retinoblastoma through targeting E2F1 and regulating AKT pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(3): 2294-2302. DOI:10.1002/jcb.29453.
- [7] Wang X, Zhang X, Han Y, et al. Silence of lncRNA ANRIL represses cell growth and promotes apoptosis in retinoblastoma cells through regulating miR-99a and c-Myc[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2265-2273. DOI:10.1080/21691401.2019.1623229.
- [8] He TG, Xiao ZY, Xing YQ, et al. Tumor suppressor miR-184 enhances chemosensitivity by directly inhibiting SLC7A5 in retinoblastoma[J/OL]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1163 [2020-06-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31803607/>. DOI:10.3389/fonc.2019.01163.
- [9] Yang L, Zhang L, Lu L, et al. miR-214-3p regulates multi-drug resistance and apoptosis in retinoblastoma cells by targeting ABCB1 and XIAP[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 803-811. DOI:10.2147/OTT.S235862.
- [10] Yang M, Li Y, Wei W. MicroRNA-188-5p promotes epithelial-mesenchymal transition by targeting ID4 through Wnt/ β -catenin signaling in retinoblastoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 10251-10262. DOI:10.2147/OTT.S229739.
- [11] Li L, Yu H, Ren Q. MiR-218-5p suppresses the progression of retinoblastoma through targeting NACC1 and inhibiting the AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 6959-6967. DOI:10.2147/CMAR.S246142.
- [12] Zhang C, Wu S. microRNA-378a-3p restrains the proliferation of retinoblastoma cells but promotes apoptosis of retinoblastoma cells via inhibition of FOXG1[J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(5): 31 [2020-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32428232/>. DOI:10.1167/iovs.61.5.31.
- [13] Gao YL, Luo XL, Zhang J. Sp1-mediated up-regulation of lnc00152 promotes invasion and metastasis of retinoblastoma cells via the miR-30d/SOX9/ZEB2 pathway[J/OL]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020 [2020-06-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32488851>. DOI:10.1007/s13402-020-00522-8.
- [14] Liu S, Yan G, Zhang J, et al. Knockdown of long noncoding RNA (lncRNA) metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) inhibits proliferation, migration, and invasion and promotes apoptosis by targeting miR-124 in retinoblastoma[J]. *Oncol Res*, 2018, 26(4): 581-591. DOI:10.3727/096504017X14953948675403.
- [15] Xia Z, Yang X, Wu S, et al. LncRNA TP73-AS1 down-regulates miR-139-3p to promote retinoblastoma cell proliferation[J/OL]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): BSR20190475 [2020-05-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31015368/>. DOI:10.1042/BSR20190475.
- [16] Song S, Yu W, Lin S, et al. LncRNA ADPGK-AS1 promotes pancreatic cancer progression through activating ZEB1-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(7): 573-583. DOI:10.1080/15384047.2018.1423912.
- [17] Chen Y, Peng S, Cen H, et al. MicroRNA hsa-miR-623 directly suppresses MMP1 and attenuates IL-8-induced metastasis in pancreatic cancer[J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(1): 142-156. DOI:10.3892/ijo.2019.4803.
- [18] Wu XZ, Cui HP, Lv HJ, et al. Knockdown of lncRNA PVT1 inhibits retinoblastoma progression by sponging miR-488-3p[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108627 [2020-06-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30797143>. DOI:10.1016/j.biopha.2019.108627.
- [19] Yan G, Su Y, Ma Z, et al. Long noncoding RNA LINC00202 promotes tumor progression by sponging miR-3619-5p in retinoblastoma[J]. *Cell Struct Funct*, 2019, 44(1): 51-60. DOI:10.1247/csf.18033.
- [20] Wang X, Zhang X, Han Y, et al. Silence of lncRNA ANRIL represses cell growth and promotes apoptosis in retinoblastoma cells through regulating miR-99a and c-Myc[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2265-2273. DOI:10.1080/21691401.2019.1623229.
- [21] Hao F, Mou Y, Zhang L, et al. LncRNA AFAP1-AS1 is a prognostic biomarker and serves as oncogenic role in retinoblastoma[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(3): BSR20180384 [2020-05-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29654169/>. DOI:10.1042/BSR20180384.
- [22] Luo XF, Wu XJ, Wei X, et al. LncRNA ADPGK-AS1 regulated cell proliferation, invasion, migration and apoptosis via targeting miR-542-3p in osteosarcoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(20): 8751-8760. DOI:10.26355/eurrev_201910_19269.
- [23] Yang J, Wu W, Wu M, et al. Long noncoding RNA ADPGK-AS1 promotes cell proliferation, migration, and EMT process through regulating miR-3196/OTX1 axis in breast cancer[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2019, 55(7): 522-532. DOI:10.1007/s11626-019-00372-1.
- [24] Jiang HY, Wang ZJ. ADPGK-AS1 promotes the progression of colorectal cancer via sponging miR-525 to upregulate FUT1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(5): 2380-2386. DOI:10.26355/eurrev_202003_20505.
- [25] 丛智荣, 刘红, 徐小红, 等. Ki-67 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达及意义[J]. *实用临床医药杂志*, 2014, (17): 56-58, 62. DOI:10.7619/jcmp.201417016.
- Cong ZR, Liu H, Xu XH, et al. Clinical expression and significance of Ki-67 in diffuse large B cell lymphoma[J]. *Clin Med Pract*, 2014, (17): 56-58, 62. DOI:10.7619/jcmp.201417016.
- [26] Tian Y, Shen L, Li F, et al. Silencing of RHEB inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in colorectal cancer cells via inhibition of the mTOR signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 442-453. DOI:10.1002/jcp.28984.
- [27] Xiong LF, Lou YM, Wang L. Expressions of Kif2c and Ki-67 in non-small cell lung cancer and their relationship with invasion and metastasis[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(2): 541-546. DOI:10.23812/19-513-L-8.
- [28] Zhang Z, Xu T, Qin W, et al. Upregulated PTPN2 induced by inflammatory response or oxidative stress stimulates the progression of thyroid cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 522(1): 21-25. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.11.047.
- [29] 蒋雪梅, 权毅. 上调 miRNA-27a-3p 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2019, 54(2): 279-283. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2018.08.121.
- Jiang XM, Quan Y. Effects of up-regulation of miRNA-27a-3p on proliferation, invasion and migration of breast cancer MCF-7 cells[J]. *J Zhengzhou Univ: Med Sci*, 2019, 54(2): 279-283. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2018.08.121.
- [30] Karmakar D, Maity J, Mondal P, et al. E2F5 promotes prostate cancer cell migration and invasion through regulation of TFPI2, MMP-2 and MMP-9[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(12): 1767-1780. DOI:10.1093/carcin/bgaa043.
- [31] Jung CH, Han AR, Chung HJ, et al. LincRNA inhibits radiation-induced cancer invasion by downregulating MMP-9 expression via the suppression of NF- κ B activation in human non-small-cell lung cancer A549[J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(24): 3582-3586. DOI:10.1080/14786419.2018.1484460.
- [32] Pagliara V, Nasso R, Di Donato P, et al. Lemon peel polyphenol extract reduces interleukin-6-induced cell migration, invasiveness, and matrix metalloproteinase-9/2 expression in human gastric adenocarcinoma MKN-28 and AGS cell lines[J/OL]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 833 [2020-06-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31817563/>. DOI:10.3390/biom9120833.

[33] Wei S, Zhang ZY, Fu SL, et al. Hsa-miR-623 suppresses tumor progression in human lung adenocarcinoma [J/OL]. Cell Death Dis, 2016, 7(9): e2388 [2020-07-17]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27685632>. DOI: 10. 1038/cddis. 2016. 260.

[34] Li Q, Liu J, Jia Y, et al. miR-623 suppresses cell proliferation, migration and invasion through direct inhibition of XRCC5 in breast cancer [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(11): 10246-10258. DOI: 10. 18632/aging. 103182.

[35] Jiang L, Yang W, Bian W, et al. MicroRNA-623 targets cyclin D1 to inhibit cell proliferation and enhance the chemosensitivity of cells to 5-fluorouracil in gastric cancer [J]. Oncol Res, 2018, 27(1): 19-27. DOI: 10. 3727/096504018X15193469240508.

(收稿日期: 2020-08-19 修回日期: 2021-01-25)

(本文编辑: 尹卫靖)

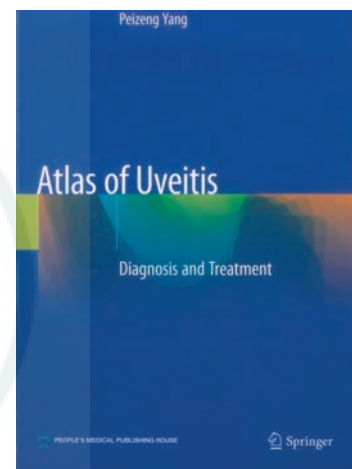
消 息

《Atlas of Uveitis: Diagnosis and Treatment》出版发行

由杨培增教授撰写的英文葡萄膜炎专著《Atlas of Uveitis: Diagnosis and Treatment》于 2020 年 12 月由 Springer 出版社和人民卫生出版社联合出版, 此书是目前国际上首个单人完成的大型葡萄膜炎专著。

该书共分为 Overview、Diagnosis of Uveitis、Treatment of Uveitis、Uveitis entities、Scleritis and Episcleritis 四大部分, 书中详细介绍了葡萄膜炎的疾病谱, 常见疾病类型的临床特征、进展规律、致盲规律以及疾病治疗的思想、原则及策略, 并用大量精美的图片展现了常见葡萄膜炎类型的表现谱, 即从发病到疾病后期, 从最细微的异常到最严重的病变, 从罕见的表现到典型的特征。这也是中国眼科医生第一次向世界系统介绍葡萄膜炎的中国标准、中国方案、中国经验和中国智慧, 对各级临床医生进行葡萄膜炎诊断及研究有指导价值, 对全身性自身免疫性疾病专科医生及研究者也有借鉴作用。

全书(海外版) 860 页, 包含 3000 多张图片。本书现在线上销售, 网址为 <https://www.springer.com/gp/book/9789811537257>, 电子书定价 214 欧元(约 261 美元), 精装印刷本定价 260 欧元(约 317 美元), 可点击网页中“Buy ebook”或“Buy Hardcover”购买。



(本刊编辑部)

读者 · 作者 · 编者

本刊对论文中统计学方法描述的要求

研究论文如有量化测试指标时须有统计学分析的内容, 并在方法部分提供统计学方法的描述, 反应变量为单变量时请提供测量指标数据资料的性质(如计量数据资料及计数数据资料的表达方式)、多个样本计量数据资料正态分布检验方法的名称及方差齐性检验方法的名称、实(试)验设计方法及与之相匹配的统计学设计(如配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等)、与统计设计相应的统计方法名称(如 t 检验、方差分析)以及检验水准。选择方差分析统计设计时应根据单因素或多因素设计选择正确的方法, 不宜简单套用单因素方差分析。反应变量为双变量时, 应根据实(试)验设计正确选择简单直线相关分析、回归分析或其他方法, 不宜简单套用直线相关分析。统计学的检验水准请提供为双侧检验或单侧检验。论文结果部分的统计学分析内容可用相应的图表表达。

统计学符号的著录执行 GB/T 3358.1—2009/ISO 3534-1:2006《统计学词汇及符号》的有关规定, 统计学符号一律采用斜体, 如样本量用 n ; 样本的算术平均数用英文小写 mean; 中位数用英文斜体大写 M , 标准差用英文大写 SD, 样本均数的标准误用英文小写 $\sigma_{\bar{x}}$, t 检验用英文小写 t , F 检验用英文大写 F , 卡方检验用希腊文小写 χ^2 , 相关系数用英文小写 r , 秩相关分析相关系数用 r_s , 确定系数用 R^2 , 自由度用希腊文小写 ν ; 概率用英文大写 P ; 检验水准用 α 。统计结果的解释和表达采用对比组或比较对象之间差异有统计学意义的描述方法, 而不用对比组之间差异具有显著性(或非常显著性)的描述。论文的统计学分析结果提倡提供统计学检验量值和 P 值的具体数据, 如不能提供 P 值的具体数据时, 必须提供统计学检验量值如 χ^2 值、 t 值、 F 值等。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 请给出 95% 可信区间(CI)。

(本刊编辑部)