

DOI:10.13350/j.cjpb.220707

· 论著 ·

miRNA 及细胞周期调节因子在垂体腺瘤侵袭性和非侵袭性组织中的表达差异性研究

田郡, 韩中保, 杨留才, 滕飞翔, 张虎*

(江苏医药职业学院, 江苏盐城 224000)

【摘要】 目的 验证几种敏感微小核糖核酸(miRNA137、miRNA199a)及细胞周期因子在垂体腺瘤的侵袭性和非侵袭性组织中的表达差异。方法 选取2016年1月-2021年12月入住的垂体瘤病患者85例,其中侵袭性垂体瘤38例,非侵袭性垂体瘤47例。qRT-PCR验证两组患者的垂体瘤组织miRNA含量的表达差异性,通过免疫组化和qRT-PCR等技术检测两组患者瘤体组织相关指标的差异表达。结果 侵袭性垂体瘤组织和非侵袭性垂体瘤组织中miRNA137相对表达量为分别为 2.95 ± 0.11 和 1.30 ± 0.08 ,差异具有统计学意义($F=7.838, P<0.05$);miRNA199a相对表达量分别为 0.45 ± 0.03 和 0.96 ± 0.09 ,差异具有统计学意义($F=41.031, P<0.05$)。转染48h后,过载组、空载组和抑制组miRNA137相对表达量分别为 4.92 ± 0.18 、 2.74 ± 0.09 和 0.85 ± 0.04 ,miRNA199相对表达量分别为 3.79 ± 0.14 、 1.93 ± 0.08 和 0.72 ± 0.06 ,组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。侵袭性垂体瘤组织中P21和P27阳性率分别为31.58%和36.84%,非侵袭性垂体瘤组织中P21和P27阳性率分别为36.17%和40.43%,组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 不同组垂体腺瘤(侵袭或非侵袭)组织中miRNA137、199和P21、P27的表达存在差异,可作为临床检测生物标志物,对识别侵袭性垂体瘤,增加药物治疗敏感性及作为治疗垂体瘤的新型靶向药物提供了参考依据。

【关键词】 微小核糖核酸;细胞周期调节因子;垂体腺瘤

【中图分类号】 R37

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0774-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jul. ;17(7):774-778.]

The study of differential expression of miRNA and cell cycle regulators in invasive and non-invasive tissues of pituitary adenomas

TIAN Jun, HAN Zhong-bao, YANG Liu-cai, TENG Fei-xiang, ZHANG Hu (*Jiangsu Vocational College of Medicine, Yancheng 224000, Jiangsu, China*)

【Abstract】 **Objective** To verify the expression differences of several sensitive miRNAs (137, 199a) and cell cycle factors in invasive and non-invasive groups of pituitary adenomas. **Methods** 85 patients with pituitary adenoma were selected from January 2016 to December 2021, including 38 invasive pituitary adenomas and 47 non-invasive pituitary adenomas. qRT-PCR was used to verify the expression difference of miRNA content among different groups, and the differential expression of tumor tissue related indexes between the two groups was detected by immunohistochemistry and qRT-PCR. **Results** The relative expression of miRNA137 in invasive and non-invasive pituitary tumors was (2.95 ± 0.11) and (1.30 ± 0.08), and the difference between the two groups was statistically significant ($F=7.838, P<0.05$); The relative expression of miRNA199a in invasive and non-invasive pituitary tumors were (0.45 ± 0.03) and (0.96 ± 0.09), the difference between the two groups was statistically significant ($F=41.031, P<0.05$). After 48 hours of transfection, the relative expression of miRNA137 in overload group, no load group and inhibition group was (4.92 ± 0.18), (2.74 ± 0.09) and (0.85 ± 0.04). The relative expression of miRNA199 in overload group, no-load group and inhibition group was (3.79 ± 0.14), (1.93 ± 0.08) and (0.72 ± 0.06), There was significant difference between the two groups ($P<0.05$). The positive rates of P21 and P27 were 31.58% and 36.84%, respectively. The positive rates of P21 and P27 were 36.17% and 40.43%, There was no significant difference between groups ($P>0.05$). **Conclusion** The expression of miRNA137, 199a and P21, P27 were different in different groups of pituitary adenomas (invasive or non-invasive). Using these sensitive indicators as biomarkers for clinical detection can provide a strong basis for identifying invasive pituitary tumors, increasing drug sensitivity and being a new targeted drug for the treatment of pituitary tumors.

【Key words】 miRNA; cell cycle regulators; pituitary adenoma

* **【通讯作者】** 张虎, E-mail: yctj2008@163.com

【作者简介】 田郡(1983-), 女, 江苏盐城人, 学士, 讲师, 主要从事人体解剖与组织胚胎学研究。E-mail: tmrl7055@21cn.com

垂体瘤是常见的颅内肿瘤,是由于占位效应和(或)垂体激素分泌异常引起的严重疾病,占诊断性脑瘤的10%~15%^[1]。大约三分之二的垂体瘤为功能性垂体腺瘤(与之对应的是无功能腺瘤),腺瘤细胞分泌垂体激素,导致各种内分泌综合征^[2]。总体而言,泌乳素瘤约占垂体瘤的50%。泌乳素瘤会引发高催乳素血症及血液中催乳素增加导致的相关症状(如女性中的雌激素过少或闭经,男性不育)^[3]。生长激素(GH)生成腺瘤通常与肢端肥大症和(或)巨人症有关。促肾上腺皮质激素(ACTH)生成腺瘤与库欣氏或纳尔逊综合征有关^[4]。促甲状腺激素(TSH)生成肿瘤会引起甲状腺毒症、心脏性心律失常、震颤和体重减轻^[5]。罕见的性腺腺瘤和主要非功能或非分泌性腺瘤会导致性腺机能减退,视力缺陷和头痛。

垂体瘤的发生会涉及到多种遗传和表观遗传学改变。一些典型的癌基因如 RAS 或 MYC 在上述内分泌肿瘤形成中都有体现。除了以上典型的癌症基因之外,垂体瘤中的大量遗传或表观遗传学改变靶向若干细胞周期调节因子,有研究估计细胞周期 G1/S 转换的调节因子中超过 80% 的垂体瘤至少会有 1 种调节因子发生改变^[6]。而细胞周期是由细胞周期依赖性激酶调控的,细胞周期蛋白与之结合后激活该酶的活性,细胞周期依赖性激酶抑制剂(CDKIs)则是通过抑制该酶的活性起到抑制作用^[7]。细胞周期依赖性激酶抑制剂包括 INK 和 Cip/Kip 两个家族成员。在人类肿瘤中已发现各种 miRNA 表达的改变,并发现其在癌变过程中起着重要的作用且与肿瘤耐药性有关。miRNA 通过干预细胞周期的调节因子也会参与到垂体瘤的发生、发展过程。表明细胞周期调节因子和 miRNA 在垂体瘤的侵袭性及发病机制中扮演重要角色。

本研究的目的是验证几种敏感 miRNA (137、199a) 及细胞周期因子在功能性垂体腺瘤的侵袭性和非侵袭性组中的表达差异,并分析其对激素水平的影响以及对一些常规治疗药物相关性的研究。通过免疫组化(TMA)和 qRT-PCR 等技术检测不同组垂体腺瘤(侵袭或非侵袭)的相关指标的差异表达。

对象与方法

1 病例

选取 2016 年 1 月—2021 年 12 月收入院的垂体瘤病患者 85 例,其中男 45 例,女 40 例;年龄 27~77 岁,平均年龄(56.00±11.75)岁。侵袭性垂体瘤 38 例,非侵袭性垂体瘤 47 例。纳入标准:患者经内镜或显微手术,根据影像、临床症状、病理结果能够搜集并区分不同类别的垂体腺瘤标本。排除标准:①心、

肝、肾等功能障碍或有严重疾病者;②有其他免疫类疾病者;③档案资料不齐全者。本研究经医院伦理委员会批准,患者知情同意。

2 主要仪器与试剂

LEICA 旋转式切片机 RM2145 型,德国 LEICA 公司生产;超低温离心机, SIGMA(德国)公司生产; NanoDrop2000 微量核酸蛋白检测仪,美国 NanoDrop 公司生产;ABI-7500 型荧光定量 PCR 分析仪及配套设备,美国 ABI 公司生产;低温冰箱,日本 SANYO 公司生产;24 孔板,美国 CORNING 公司生产。miRNA137、miRNA199a (reverse-transcription) 和 U6 Taqman 探针,美国 ABI 公司产品;TRIzol RNA 提取试剂,美国 Invitrogen 公司产品。

3 方法

3.1 标本采集 收集垂体瘤组织标本,组织大小 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm,每例患者取材 2 块。手术切除后将部分组织立即放入液氮并转存于低温冰箱,另一部分制成蜡块标本。

3.2 qRT-PCR 检测 mRNA 相对表达水平

3.2.1 RNA 提取 组织标本采用液氮研磨,研磨后放入 EP 管中,加入 500 μl TRIzol RNA 提取试剂,25 °C 振荡混匀 10 min,10 000 r/min(离心半径 8.7 cm)离心 8 min,弃沉淀;加入 100 μl 氯仿,振荡混匀后 4 °C、12 000 r/min(离心半径 8.7 cm)离心 15 min;取上清置入新 EP 管,加入 200 μl 异丙醇,放置 10 min,4 °C 10 000 r/min(离心半径 8.7 cm)离心 15 min,弃上清液;加入 500 μl 75%乙醇,振荡混匀,4 °C 8 000 r/min(离心半径 8.7 cm)离心 5 min,弃上清液,沉淀置 25 °C 晾干 10 min。用 TE buffer 稀释溶解样品,采用微量核酸蛋白检测仪测定 260 nm/280 nm 的吸光度比值, A₂₆₀/A₂₈₀ 值应在 1.8~2.0,否则重新提取 RNA。样品放入低温冰箱待用。

3.2.2 cDNA 合成 取 RNA 样品冰上溶解,加去离子水稀释至 2 ng/μl。冰上分别配置各组配置反应液:100 mmol/L dNTPs 0.5 μl,10×RT buffer 2 μl,20 U/μl RNase Inhibitor 0.2 μl,50 U/μl MultiScribe™ Reverse Transcriptase 1 μl,ddH₂O 补足 8 μl。将上述试剂颠倒混匀,4 °C、3 000 r/min(离心半径 8.7 cm)离心 5 min。取 96 孔板,将 1.5 ml EP 管放入孔中,再将上述混合液置入 EP 管。EP 管中加入 5 μl RNA,每 EP 管分别加入 3 μl miRNA137 和 miRNA199a Taqman,4 °C、3 000 r/min(离心半径 8.7 cm)离心 5 min,4 °C 孵育 3 min,然后放入 PCR 仪进行反应。反应条件:15 °C 30 min,45 °C 30 min,85 °C 5 min,4 °C 20 min。反应产物-20 °C 保存。

3.2.3 qRT-PCR 反应 反应体系:Small RNA As-

say 2 μ l, PrimeScript RT Enzyme Mix 2 μ l, 5 \times PrimeScript Buffer 4 μ l, cDNA 4 μ l, 5 \times PrimeScript Buffer 2 μ l, ddH₂O 补足 25 μ l。反应液振荡混匀后放入 PCR 仪。反应条件:45 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 8 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 共 35 个循环。分别记录垂体瘤组织 miRNA137、miRNA199a 和 U6 实验数据并以 U6 作为内参通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

3.3 细胞转染 取 1.5 ml EP 管, 加入 500 μ l 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基。将垂体瘤细胞加入培养基中, 于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 12 h。按照细胞浓度 3×10^5 /ml 接种于 24 孔板, 每孔加入 100 μ l 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养, 周围未种入细胞孔加入 200 μ l PBS 以避免水分蒸发丢失。当细胞融合度为 60%~80% 时, 在脂质体 Lipofectine 2000 介导下将 NC、miRNA137、miRNA199a、miRNA137 inhibitor、miRNA199a inhibitor 分别转染至垂体瘤细胞中, 分别作为空载组、过载组和抑制组。八字摇晃 24 孔板, 然后置 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养, 12 h 后换液, 48 h 后采用 RT-PCR 检测 miRNA137、miRNA199a 相对表达量。

3.4 细胞迁徙和侵袭试验 细胞饥饿 12 h 后消化, 终止消化后 5 000 r/min (离心半径 8.7 cm) 离心 5 min, 弃培养液, 用 PBS 洗涤细胞 2 次。加入含 BSA 的培养液重悬细胞并调整细胞密度至 3×10^5 /ml。

将 BD Matrigel 基质胶解冻并稀释, 包被 Transwell 小室底部膜上室面, 置 37 $^{\circ}$ C 30 min 使 Matrigel 聚合成凝胶。取细胞悬液 100 μ l 加入到 Transwell 小室中, 小室下层孔中加入 600 μ l 含 20% FBS RPMI 1640 培养基, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。擦除未穿膜细胞, 采用 0.1% 的结晶紫对通过小室滤膜的细胞进行染色, 然后进行漂洗和固定, 显微镜下随机选取 5 个视野进行观察并计数, 评价 miRNA 转染对细胞迁徙和侵袭力的影响。

3.5 免疫组化染色检查 将组织蜡块切片, 厚度 3~5 μ m。将切片置于载玻片上烤片 1 h, 脱蜡后置入 30 ml/L 双氧水密闭孵育 10 min, 0.1 mol/L PBS 连续冲洗 5 min。将切片置入 pH6.0 枸橼酸盐抗原修复液的修复盒中, 然后将修复盒放入微波炉, 微波修复抗原 10 min。冷却至室温, PBS 冲洗, 每次 3 min, 重复 3 次; 加入山羊血清工作液封闭, 37 $^{\circ}$ C 温箱内静置 30 min 后取出湿盒, 弃去封闭液; 在每个切片中加入 p21、p27 抗体, 放入湿盒中, 湿盒置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 再置 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 60 min; 滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 加入显色剂并充分混匀, 显色 5 min, 充分冲洗; 用苏木素复染,

脱水透明后中性树脂胶封片后镜检。先在低倍视野下找到着色密集区, 然后在 200 倍视野下进行观察并计数。评分标准如表 1 所示: 0 分为阴性, 其余为阳性。

表 1 免疫组化结果判定评分标准
Table 1 The evaluation standards of immunohistochemistry

项目 Item	标准 Standards	分值 Score
细胞数计分	着色细胞数 < 10%	0
	着色细胞数 10%~25%	1
	着色细胞数 26%~50%	2
	着色细胞数 51%~75%	3
	着色细胞 > 76%	4
着色计分	无色	0
	浅黄色	1
	橘黄色	2
	棕褐色	3

3.6 统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 不同垂体瘤组织 miRNA137 和 miRNA199a 相对表达量比较

qRT-PCR 检测侵袭性垂体瘤组织 miRNA137 相对表达量为 2.95 ± 0.11 , 非侵袭性垂体瘤组织 miRNA137 相对表达量为 1.30 ± 0.08 , 差异具有统计学意义 ($F = 7.838, P < 0.05$); 侵袭性垂体瘤组织 miRNA199a 相对表达量为 0.45 ± 0.03 , 非侵袭性垂体瘤组织 miRNA199a 相对表达量为 0.96 ± 0.09 , 差异具有统计学意义 ($F = 41.031, P < 0.05$)。

2 转染细胞 miRNA137 及 miRNA199 相对表达量比较

过载组、空载组和抑制组垂体细胞转染 48 h 后采用 qRT-PCR 检测 miRNA137 相对表达量, 过载组为 4.92 ± 0.18 , 空载组为 2.74 ± 0.09 , 抑制组为 0.85 ± 0.04 , 过载组与抑制组两组数据比较, 数据差异有统计学意义 ($F = 16.739, P < 0.05$); miRNA199a 相对表达量过载组为 3.79 ± 0.14 , 空载组为 1.93 ± 0.08 , 抑制组为 0.72 ± 0.06 , 过载组与抑制组两组数据比较, 差异有统计学意义 ($F = 7.938, P < 0.05$)。

3 miRNA 转染对细胞迁徙和侵袭力的影响

细胞迁徙和侵袭试验结果显示, miRNA137 过载组、空载组和抑制组穿膜细胞数分别为 (193 ± 13) 个、(124 ± 9) 个和 (95 ± 6) 个, 过载组与抑制组两组数据比较, 数据差异有统计学意义 ($F = 6.948, P < 0.05$)。miRNA199a 过载组、空载组和抑制组穿膜细胞数分别为 (98 ± 6) 个、(138 ± 7) 个和 (263 ± 17) 个, 过载组与抑制组两组数据比较, 数据差异有统计学意义 ($F = 16.543, P < 0.05$)。miRNA137 过载组、空载组和抑

制组发生迁移的细胞数分别为(267±11)个、(183±13)个和(154±8)个,过载组与抑制组两组数据比较,数据差异有统计学意义($F=5.814, P<0.05$)。miRNA199a 过载组、空载组和抑制组发生迁移的细胞数分别为(120±9)个、(184±11)个和(304±23)个。过载组与抑制组两组数据比较,数据差异有统计学意义($F=18.162, P<0.05$)。

4 P21 和 P27 在垂体瘤中表达相对水平比较

侵袭性垂体瘤组织中 12 例 P21 表达阳性,阳性率 31.58%;非侵袭性垂体瘤组织中 17 例 P21 阳性,阳性率 36.17%,P21 在侵袭性垂体瘤组织中与非侵袭性垂体瘤组织中的阳性率($\chi^2=0.197, P>0.05$)。侵袭性垂体瘤组织中 14 例 P27 蛋白阳性,阳性率 36.84%;非侵袭性垂体瘤组织中 19 例 P27 表达阳性,阳性率 40.43%($\chi^2=0.1136, P>0.736$)。

讨 论

垂体瘤是常见颅内肿瘤,其发病仅次于脑膜瘤和胶质瘤。垂体瘤的发生会涉及到多种遗传和表观遗传学改变。miRNAs 通过干预细胞周期的调节因子也会参与到垂体瘤的发生和发展过程,并在垂体瘤的侵袭性及发病机制中扮演重要角色。miRNAs 在肿瘤组织和正常组织中的表达差异较大,因而可为肿瘤诊断提供依据。

miRNA137 最早发现于恶性胶质瘤、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、肺癌、直肠癌和膀胱癌组织,并证明其在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用。赵明^[8]报道 miRNA137 在肺癌组织中相对于正常组织处于高表达状态,并认为 miRNA137 表达与年龄、性别以及吸烟史等无明显相关性。Shimizu 等^[9]的研究显示 miRNA137 在膀胱癌中多以甲基化形式存在,呈异位表达。本研究显示 miRNA137 在侵袭性垂体瘤组织中的相对表达量显著高于非侵袭性垂体瘤组织($P<0.05$)。Transwell 小室试验显示 miRNA137 过载组迁徙细胞数和侵袭细胞数均多于空白组和抑制组。表明垂体瘤中 miRNA137 表达上调可能有助于垂体瘤细胞的侵袭和迁徙能力。miRNA199a 是位于人发动蛋白 2 基因的 16 号内含子,早期研究多集中在睾丸癌、肝癌和子宫异位症等疾病,其可以通过下调 IKKb 表达抑制 NF- κ B 表达^[10]。马大昌等^[11]研究显示相对于癌旁组织,miRNA199a 乳腺癌组织中表达下调,miRNA199a 能够抑制乳腺癌细胞增殖促进其凋亡。齐海亮等^[12]的研究显示,与癌旁组织相比,miRNA199a 在食道癌组织中表达下调,其可能作为抑癌基因参与食道癌的发生和发展。本研究中 miRNA199a 在侵袭性垂体瘤组织中的相对表达量显著低

于非侵袭性垂体瘤组织($P<0.05$)。Transwell 小室试验显示 miRNA199a 过载组迁徙细胞数和侵袭的细胞数均低于空白组和抑制组。表明垂体瘤中 miRNA199a 表达上调可能有助于抑制垂体瘤细胞的侵袭和迁徙。细胞周期、细胞凋亡与细胞基因的稳定性之间互相作用,使得细胞有序增殖。 G_1/S 和 G_2/M 转换期在细胞周期中发挥至关重要的作用。一旦 G_1/S 和 G_2/M 中任何一个转换期失控,就会导致本该终止增殖或凋亡的细胞再次进入下一个细胞分裂过程,从而导致细胞恶性增殖^[13]。P21 和 P27 作为广谱的细胞周期依赖性激酶抑制剂,能够负调控细胞周期从 G_1 到 S 期,阻碍细胞周期 G_1/S 的转化,从而抑制损伤细胞的增殖或错误的复制 DNA^[14]。目前关于 P21 和 P27 在不同肿瘤中表达情况的研究结果并不一致。罗雪慧等^[15]对外阴癌的研究、Baddour 等^[16]对肝癌的研究和杨娟^[17]对卵巢上皮癌的研究中 P21 蛋白均随着肿瘤恶性程度的增加而表达降低。但在膀胱癌^[18]、乳腺癌^[19]及宫颈鳞状细胞癌^[20]的研究中发现 P21 表达水平均显著高于正常组织。本次研究中 P21 和 P27 阳性率在侵袭性垂体瘤组织中略低于非侵袭性垂体瘤组织中,但不具有统计学意义。miRNA137 在侵袭性垂体瘤中表达显著高于非侵袭性垂体瘤组织,同时 Transwell 小室显示 miRNA137 过载组迁徙细胞数和侵袭细胞数均多于空白组和抑制组,因而 miRNA137 表达上调可能有助于垂体瘤细胞的侵袭和迁徙能力,抑制 miRNA137 表达可能降低垂体瘤细胞的侵袭和迁徙能力。相反,miRNA199a 上调可能有助于抑制垂体瘤细胞的侵袭和迁徙。上述对 miRNA 和细胞调节因子研究以期待为肿瘤预测和新药研发提供依据。

【参考文献】

- [1] Ogando-Rivas E, Alalade AF, Boatey J, et al. Double pituitary adenomas are most commonly associated with GH- and ACTH-secreting tumors: systematic review of the literature[J]. Pituitary, 2017, 20(6): 112-119.
- [2] Garbicz F, Mehlich D, Rak B, et al. Increased expression of the microRNA 106b-25 cluster and its host gene MCM7 in corticotroph pituitary adenomas is associated with tumor invasion and Crooke's cell morphology[J]. Pituitary, 2017, 20(4): 254-267.
- [3] Valiulyte I, Steponaitis G, Skiriute D, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) promoter methylation and expression in pituitary adenoma[J]. BMC Medical Genetics, 2017, 18(1): 72.
- [4] Lee YJ, Cho JM, Moon JH, et al. Increased miR-338-3p expression correlates with invasiveness of GH-producing pituitary adenomas[J]. Endocrine, 2017, 58(1): 184-189.
- [5] Horiguchi K, Yamada M, Umezawa R, et al. Somatostatin receptor subtypes mRNA in TSH-secreting pituitary adenomas: a case showing a dramatic reduction in tumor size during short octreotide

- treatment. [J]. *Endocr J*, 2007, 54(3):371-378.
- [6] Caetano C, Limbo O, Farmer S, et al. Tolerance of deregulated G1/S transcription depends on critical G1/S regulon genes to prevent catastrophic genome instability[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(6):2279-2289.
- [7] Virtudazo EV, Suganami A, Tamura Y, et al. Towards understanding cell cycle control in *Cryptococcus neoformans*: Structure function relationship of G1 and G1/S cyclins homologue CnCl1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 416(1-2):217-221.
- [8] 赵明. MiRNA137 和 miRNA29a 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[D]. 南京: 南京大学, 2012.
- [9] Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, et al. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer[J]. *Eur Urol*, 2013, 63(6):1091-1100.
- [10] Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer [J]. *Theranostics*, 2015, 5(10):1122-1143.
- [11] 马大昌, 陈诚, 吴多明, 等. miR-199a-3p 在乳腺癌中的表达及其作用[J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(06):481-486.
- [12] 齐海亮, 宋鑫亮, 齐科雷, 等. 食管鳞癌组织中 miR-199a 的表达变化及临床意义[J]. *山东医药*, 2016, 56(38):45-47.
- [13] Novak B, Csikasz-Nagy A, Gyorfy B, et al. Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions [J]. *Biophys Chem*, 1998, 72(1):185-200.
- [14] 翟健, 胡万宁, 李军, 等. P21 基因过表达对甲状腺癌细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制[J]. *癌症进展*, 2019, 17(3):280-283.
- [15] 罗雪慧, 范余娟, 杨开选, 等. FHIT 蛋白和 p21 蛋白在外阴癌和外阴尖锐湿疣中表达的研究[J]. *广西医科大学学报*, 2010, 27(1):29-31.
- [16] Baddour N, Farrag E, Zeid A, et al. Decreased apoptosis in advanced stage /high-grade hepatocellular carcinoma complicating chronic hepatitis C is mediated through the downregulation of p21 ras[J]. *Chin J Cancer Res*, 2013, 25(3):281-288.
- [17] 杨娟. 卵巢上皮癌中 HDAC2、p21、p53 的相关性[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(2):34-35.
- [18] Oncel S, Cosgul T, Calli A, et al. Evaluation of P53, P63, P21, P27, Ki-67 in paranasal sinus squamous cell carcinoma and inverted papilloma [J]. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2011, 63(2):172-127.
- [19] Grapsa D, Dokou A, Tsokanou-Kouli VA, et al. Immunohistochemical expression of p53, p63, c-myc, p21 (WAF1/cip1) and p27 (kiP1) proteins in urothelial bladder carcinoma: correlation with clinicopathological parameters [J]. *J BUON*, 2014, 19(4):1121-1124.
- [20] 宋文庆, 黄婷婷, 俞岚, 等. 子宫颈鳞状细胞癌中 Δ Np63 α 、DPC4/Smad4 和 P21 的表达及其临床意义[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(7):850-855.

【收稿日期】 2022-04-13 【修回日期】 2022-06-22

(上接 773 页)

【参考文献】

- [1] Dutkiewicz J, Zajac V, Sroka J, et al. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part I - Epidemiology [J]. *Ann Agric Environ Med*, 2018, 25(1):186-203.
- [2] Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, et al. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide [J]. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88(3):513-525.
- [3] Wu Z, Wu C, Shao J, et al. The *Streptococcus suis* transcriptional landscape reveals adaptation mechanisms in pig blood and cerebrospinal fluid [J]. *RNA*, 2014, 20(6):882-898.
- [4] 刘冉, 黄萌萌, 陈平, 等. 猪链球菌 2 型 05ZYH33 菌株启动子的筛选和鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*. 2019, 41(6):584-589.
- [5] Chen C, Tang J, Wei D, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates [J]. *Plos One*, 2007, 2(3):e315.
- [6] Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors [J]. *Plasmid*, 2001, 45(2):101-113.
- [7] Grangeasse C, Terreux R, Nessler S. Bacterial tyrosine-kinases: Structure-function analysis and therapeutic potential [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2010, 1804(3):628-634.
- [8] Nourikyan J, Kjos M, Mercy C, et al. Autophosphorylation of the bacterial tyrosine-kinase CpsD connects capsule synthesis with the cell cycle in *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Plos Genetics*, 2015, 11(9):e1005518.
- [9] Olivares-Illana V, Meyer P, Bechet E, et al. Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus* [J]. *Plos Biology*, 2008, 6(6):1321-1331.
- [10] Wugeditsch T, Paiment A, Hocking J, et al. Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(4):2361-2371.
- [11] Ferreira AS, Silva IN, Fernandes F, et al. The tyrosine kinase beef and the phosphotyrosine phosphatase BeeD of *Burkholderia contaminans* are required for efficient invasion and epithelial disruption of a cystic fibrosis lung epithelial cell line [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(2):812-821.
- [12] 吴倩倩. 猪链球菌酪氨酸磷酸化系统相关蛋白的制备及功能研究 [D]. 温州: 温州医科大学, 2018:15-45.
- [13] 王悄悄. 2 型猪链球菌酪氨酸磷酸酶基因 *cps2C* 对荚膜合成及细菌毒力的调控研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2021:25-33.
- [14] Pan X, Ge J, Li M, et al. The orphan response regulator CovR: a globally negative modulator of virulence in *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(8):2601-2612.
- [15] Ni H, Fan W, Li C, et al. *Streptococcus suis* DivIVA protein is a substrate of Ser/Thr kinase stk and involved in cell division regulation [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018(8):85.
- [16] Ni H, Li M, Wang Q, et al. Inactivation of the *htpsA* gene affects capsule development and pathogenicity of *Streptococcus suis* [J]. *Virulence*, 2020, 11(1):927-940.

【收稿日期】 2022-03-10 【修回日期】 2022-05-26