

miR-34c 在口腔鳞状细胞癌的表达及对 Tca8113 细胞生物学行为的影响

常 凯¹,高继萍¹,宋晓娜²,续国强¹,卫佳宁¹,田晓琳¹,宋国华^{1*}

(1. 山西医科大学实验动物中心,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001;
2. 晋中学院生物科学与技术学院,山西 晋中 030600)

【摘要】 目的 探讨 miR-34c 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)组织及细胞中的表达及其对口腔癌细胞生物学行为的影响。**方法** qPCR 检测中国地鼠口腔癌组织中 miR-34c 的表达水平,脂质体 RNAiMAX 介导 miR-34c 模拟物组(miRNA-34c mimics)和 miR-34c 抑制物组(miRNA-34c inhibitor)转染 Tca8113 细胞,并通过 CCK-8 和划痕实验检测调控 miRNA-34c 表达对 Tca8113 细胞活力及迁移能力的影响。**结果** 与正常组相比,中国地鼠口腔癌组 miRNA-34c 表达水平显著升高。miR-34c 模拟物组 Tca8113 细胞增殖能力显著减弱($P < 0.01$),迁移能力降低不明显。miRNA-34c 抑制组 miRNA-34c 的表达显著下调,细胞的增殖能力和迁移能力显著增强($P < 0.05$)。**结论** 上调 miRNA-34c 表达能有效抑制口腔癌细胞增殖,迁移能力降低不显著,但有降低迁移能力的趋势,下调 miRNA-34c 表达可促进口腔癌细胞的增殖,提高细胞迁移能力。

【关键词】 miR-34c;口腔鳞状细胞癌;细胞增殖;细胞迁移

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0015-06

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 11. 003

Expression of miR-34c in oral squamous cell carcinoma and its influence on biological behaviors of Tca8113 cells

CHANG Kai¹, GAO Jiping¹, SONG Xiaona², XU Guoqiang¹, WEI Jianing¹, TIAN Xiaolin¹, SONG Guohua^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University; Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China. 2. Department of Biology & Technology, Jinzhong College, Jinzhong 030600)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of miR-34c in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its effect on the biological behaviors of OSCC cells. **Methods** MiR-34c was detected in the Chinese hamster oral cancer tissue by quantitative real-time PCR. MiR-34c mimics and inhibitor were transfected into Tca8113 cells by Lipofectamine RNAiMAX. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Cell migration was determined by a scratch test. **Results** Compared with the normal group, miRNA-34c expression in the Chinese hamster oral carcinoma group was increased significantly. Upregulation of the miR-34c inhibited the viability of Tca8113 cells ($P < 0.01$), but there was no significant change in migration of the Tca8113 cells. Downregulation of miR-34c promoted the viability and migration of Tca8113 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** Upregulation of miR-34c effectively suppresses oral cancer cell growth, while non-significantly

【基金项目】 国家自然科学基金(31772551);山西省自然科学基金(201701D121087)。

【作者简介】 常凯(1993—),女,硕士研究生,主要研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: 932719380@qq.com

【通信作者】 宋国华(1973—),女,教授,主要研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: ykdsgh@163.com

inhibits the cancer cell migration. Downregulation of miRNA-34c expression promotes proliferation and migration of oral cancer cells.

【Keywords】 miR-34c; oral squamous cell carcinoma(OSCC); proliferation; migration

口腔癌是常见的恶性肿瘤,在全球常见癌症中居第 6 位,其中 90% 属口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma,OSCC),口腔癌发病率高且预后生存率低。microRNA(miRNA)的异常表达与口腔癌的发生、转移和预后密切相关^[1]。miR-34 是一类在进化上非常保守的 miRNA,miR-34 家族(miR-34s)包括三个同源基因:miR-34a、miR-34b 及 miR-34c。研究发现:miR-34c 参与肺癌、结直肠癌、胃癌、鼻咽癌、前列腺癌、乳腺癌等常见癌症的发生,主要通过促进肿瘤细胞凋亡;抑制肿瘤细胞增殖与分化;抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移等生物学效应发挥抑制肿瘤的作用。但是并没有关于 miR-34c 在口腔癌的功能的报道,我们课题组进行 miRNA 测序,结果发现 miR-34c 在口腔黏膜癌组织特异性表达,提示我们 miR-34c 对于口腔黏膜癌的临床价值,为进一步明确 miR-34c 在口腔癌中的作用,我们利用脂质体转染调节 miR-34c 在口腔癌中的表达,探讨 miR-34c 对口腔癌细胞生物学行为的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

实验选用清洁级雄性 8~10 周龄的中国地鼠 60 只,体重 25~35 g,由山西医科大学实验动物中心提供[SCXK(晋)2015-0001]。屏障环境[SYXK(晋)2015-0001]中饲养,温度为 25℃ 左右,相对湿度 40%~70%。动物实验严格按照山西医科大学实验动物管理委员会制定的操作规程(IACUC 号:2015011),符合 3R 原则。

1.1.2 细胞株

体外实验选用人舌鳞癌细胞株 Tca8113 购自 Boster(博士德)。

1.2 主要试剂与仪器

TriPure Isolation Reagent 试剂购于 Roche;All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit,All-in-One™ qPCR Mix 和 All-in-One™ qPCR Primer 均购于 GeneCopoeia;脂质体 RNAiMAX 试剂购于 Invitrogen;Opti-MEM 培养基购于 Gibco;miRNA-34c mimics 和 miRNA-34c inhibitor 均由 Gene Pharma 合成;Express miRNA Extraction 试剂盒,HG Taq Man

miRNA cDNA Synthesis 试剂盒和 HG Taq Man miRNA qPCR 试剂盒均购自 Hai Gene;RPMI 1640 培养基购自 Hyclone;胰酶、胎牛血清和 Cell-Counting Kit-8 试剂盒购自 Boster;100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素购自 Solarbio。普通 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Step one plus 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);CO₂ 细胞培养箱(Sanyo 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 组织 miR-34c 表达水平的检测

0.5% DMBA 丙酮液涂擦中国地鼠双侧颊囊制备口腔黏膜癌模型。本实验选取中国地鼠口腔癌组织和正常组织(保存于 -80℃ 冰箱)进行 qPCR 验证实验。用 TriPure 提取中国地鼠口腔癌和正常组织总 RNA(各取 3 只中国地鼠),用分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,A260/A280 均在 2.0 左右。然后按照 miRNA qRT-PCR Detection Kit 试剂盒说明书逆转录成 cDNA,以大鼠 5s RNA 作参照进行相对定量分析,根据 All-in-One™ qPCR Mix 说明书进行。qRT-PCR 采用 3 步法:Stage 1(预变性):95℃,10 min,1 个循环;Stage 2(PCR 反应)95℃,10 s,60℃,20 s,然后 72℃,10 s,40 个循环;Stage 3(溶解曲线分析)72℃~95℃,温度间隔 0.5℃,10 s/each。结果以 2^{-ΔΔCt} 法表示 miRNA-34c 的相对表达量。

1.3.2 细胞的培养

Tca8113 于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基,37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.3.3 细胞的转染

将细胞接种于培养板,待细胞融和度达到 60%~80% 按照 Lipofectamine RNAiMAX Reagent 说明书进行脂质体转染,实验分为 miR-34c 模拟物组(miR-34c mimics,终浓度为 50 nmol/L)、miR-34c 抑制物组(miR-34c inhibitor,终浓度为 50 nmol/L)和空白对照组(control)。hsa-miR-34c mimics 序列为:AAUCACUAACCACACGGCCAGG,UGGCCGUGUGGUUAGUGAUUU;hsa-miR-34c inhibitor 序列为:CCUGGCCGUGGUUAGUGAUU。

1.3.4 细胞中 miR-34c 表达水平的检测

按照 Express miRNA Extraction 试剂盒说明书提取转染 48 h 处于生长对数期细胞的 miRNA,使用酶标仪测定提取的浓度及纯度(A260/A280)。按照 HG Taq Man miRNA cDNA Synthesis 试剂盒说明书逆转录成 cDNA,采用加 A 法进行反转录。qRT-PCR 按照 HG Taq Man miRNA qPCR 试剂盒说明书配制反应体系(20 μ L 体系)。以 RNU6B 作为内参,采用 2 步法: Stage 1 (Holding stage) 95 $^{\circ}$ C, 10 s, 1 个循环; Stage 2 (Cycling stage) 95 $^{\circ}$ C, 10 s, 然后 60 $^{\circ}$ C, 60 s, 40 个循环。结果以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法表示 miRNA-34c 的相对表达量。

1.3.5 细胞增殖能力的检测

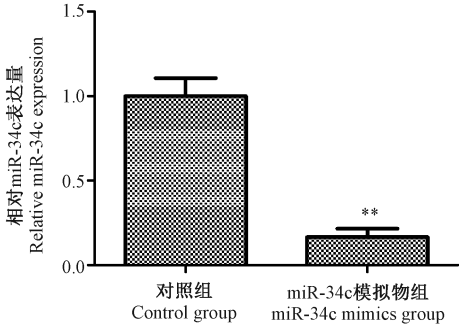
按每孔 1.0 $\times$ 10³ 的密度将细胞接种于 96 孔培养板上,每孔加含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 100 μ L,待细胞贴壁融和度达到 60% ~ 80% 后,加入转染试剂,按照 CCK-8 试剂说明书,于加入转染试剂之前和加入转染试剂 24 h、48 h、72 h 后在酶标仪 450 nm 波长处检测每孔吸光度 (optical density, OD) 值,以 OD 值反映细胞增殖情况。

1.3.6 细胞迁移能力的检测

将生长状态良好的细胞接种于六孔板,待细胞贴壁后加入转染试剂,待细胞生长密度达到 90% 以上,用 200 μ L 无菌枪头在 6 孔板内以“1”字形划痕,然后立即用 PBS 漂洗悬浮细胞,加入 RPMI 1640 培养基继续培养,分别于划痕后 0 h、24 h、48 h 和 72 h 在荧光倒置显微镜下观察细胞愈合情况,用 Image Pro Plus 6.0 处理图片并记录相对迁移距离。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性。



注:与对照组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01。

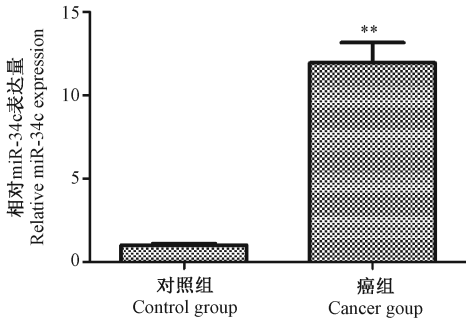
图2 miR-34c 在口腔癌细胞中的表达

Note. Compared with the control group, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01.

2 结果

2.1 口腔癌中 miR-34c 的表达

课题组在前期已成功构建中国地鼠口腔颊囊黏膜癌和鳞癌模型,并对口腔黏膜癌组织和正常组织进行高通量测序技术测序及生物信息分析,发现 miR-34c 在中国地鼠口腔黏膜癌组织中表达显著上调,对其进行 qPCR 验证,结果表明:与正常组织相比,口腔癌组织中 miR-34c 表达明显升高,其表达量是正常组的 11.95 倍。结果见图 1 所示。



注:与对照组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01。

图1 口腔癌组织中 miR-34c 表达量

Note. Compared with the control group, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01.

Figure 1 Expression of miR-34c in the oral squamous cell carcinoma tissues

2.2 miR-34c 转染效率的检测

转染 miR-34c inhibitor 后,miR-34c 表达量是对照组的 0.166 倍,miR-34c 表达量明显下调,差异有显著性(*P* < 0.01)。转染 miR-34c mimics 后,miR-34c 表达量是对照组的 280.917 倍,miR-34c 表达量明显上调,差异有显著性(*P* < 0.01)。结果见图 2。

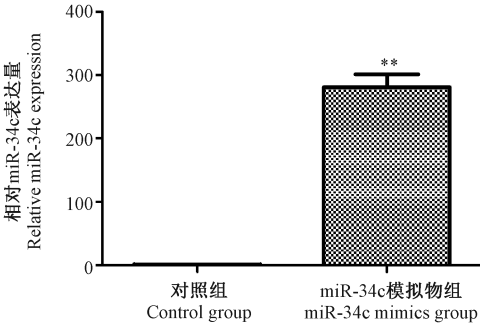
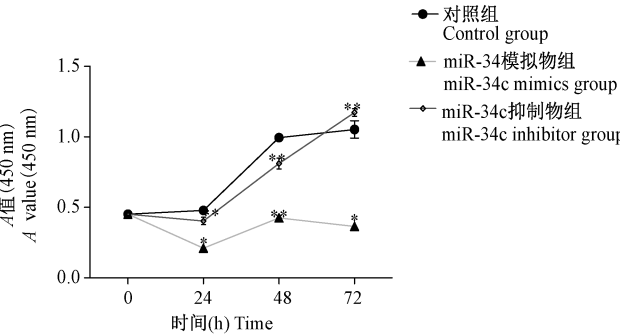


Figure 2 Expression of miR-34c in the Tca8113 cells

2.3 miR-34c 对 Tca8113 细胞增殖能力的影响

72 h 的 CCK-8 实验结果显示,与对照组相比,miR-34c mimics 组的增殖能力显著减弱 ($P < 0.01$),miR-34c inhibitor 组的增殖能力显著增强 ($P < 0.05$),说明上调 miR-34c 表达可抑制细胞增殖,降低细胞活力。结果见图 3。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图3 调节 miR-34c 表达水平对 Tca8113 细胞活力的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Effect of miR-34c on the proliferation of tongue cancer cell line Tca8113 cells

2.4 miR-34c 对 Tca8113 细胞迁移能力的影响

划痕实验显示,随着时间的推移,各组迁移距离都逐渐增加。与对照组 72 h 迁移扩张距离相比,miR-34c mimics 组的迁移能力与对照组差异无显著性,miR-34c inhibitor 组的迁移能力显著增强,说明下调 miR-34c 表达可促进细胞迁移。结果如表 1 和图 4 所示。

3 讨论

多种 miRNA 在口腔癌中异常表达,其与口腔鳞状细胞癌(OSCC)的发生、诊断及预后密切相关^[2]。miRNA 可作为癌基因或抑癌基因,对肿瘤的生物学

行为有重要的调控作用^[3-5]。miR-34a/375/195/26a/29b 等 miRNA 可通过多种转录因子和靶基因来调控舌鳞癌细胞的增殖、周期、迁移、侵袭和凋亡,并与肿瘤大小、转移、复发以及预后等临床病理特点相关,为舌鳞癌患者的预后判断以及手术和靶向治疗方案提供了参考^[6]。

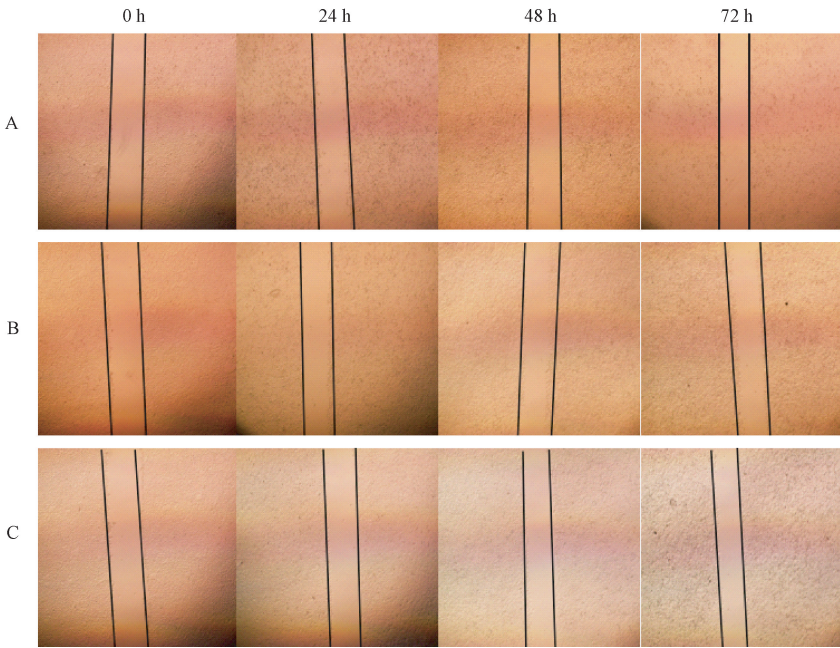
本课题组前期利用高通量测序成功构建中国地鼠口腔癌组织和正常组织差异表达的 miRNA 表达谱,发现 11 个表达差异有显著性的 miRNA。我们挑选了与肿瘤密切相关的 miR-34c,对其进行 qPCR 验证,结果表明 miR-34c 在口腔癌组织中表达显著上调^[7]。人类 miR-34 家族包括 miR-34a、miR-34b 和 miR-34c。在正常细胞中 miR-34a 发挥促进细胞衰老、使细胞周期阻滞在 G1 期和诱导细胞凋亡等作用^[8]。miR-34a 也参与乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、恶性胶质瘤、胰腺癌和肺癌等多种疾病的发生^[9-10],Jia 等^[11]的研究表明 miR-34a 靶向调控 MMP-9 和 MMP-14,从而抑制舌鳞状癌细胞的转移和侵袭。miR-34a 在 TSCC 淋巴结转移患者的预后和基因治疗中也具有潜在的应用价值。miR-34b 和 miR-34c 也具有潜在的抑癌作用^[12]。miR-34c 在乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、结肠癌、脑胶质瘤、鼻咽癌、喉癌、胃癌和肺癌等多种肿瘤中表达下调^[13]。武震东^[14]转染 miR-34c-3p mimics 和 miR-34c-5p mimics 于胶质瘤细胞,结果表明 miR-34c 可抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭,使细胞周期停滞在 S 期及 G2/M 期的,诱导细胞凋亡。miR-34 家族与 p53 形成抗肿瘤正反馈环路:p53 由于 DNA 损伤被激活,活化的 p53 促使 miR-34s 表达,从而抑制 c-myc、E2F3、Cyclin E2、CDK6、MET、BCL-2 等相关蛋白,导致细胞凋亡。同样 miR-34s 也可通过抑制组蛋白去乙酰酶 SIRT1,从而促进 p53 因乙酰化而活化^[15]。

为了进一步研究 miR-34c 在口腔癌中的作用机

表 1 调节 miR-34c 表达水平对 Tca8113 细胞迁移的影响			
Table 1 Effect of miR-34c on the migration of tongue cancer cell line Tca8113 cells			
组别 Groups	24 h 迁移扩张距离 24-h migration expansion distance	48 h 迁移扩张距离 48-h migration expansion distance	72 h 迁移扩张距离 72-h migration expansion distance
对照组 Control group	13.789 ± 1.212	30.991 ± 3.012	37.215 ± 3.531
miR-34c 模拟物组 miR-34c mimics group	16.669 ± 1.362	37.746 ± 3.693	39.958 ± 3.706
miR-34c 抑制物组 miR-34c inhibitor group	19.889 ± 1.509	41.684 ± 3.156	67.136 ± 2.923 **

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



注:A:对照组;B:miR-34c 模拟物组;C:miR-34c 抑制物组。

图 4 调节 miR-34c 表达水平对 Tca8113 细胞迁移的影响(× 40)

Note. A: Control group; B: miR-34c mimics group; C: miR-34c inhibitor group.

Figure 4 Effect of miR-34c on the migration of tongue cancer cell line Tca8113 cells

制,本研究通过体外转染 miR-34c mimics 和 miR-34c inhibitor,探讨 miR-34c 对口腔癌 Tca8113 细胞中的生物学行为的影响。于转染 48 h 后利用 qPCR 检测转染效率,miR-34c 模拟物组和抑制物组 miR-34c 的表达量较对照组都差异有显著性,提示转染成功。脂质体转染的转染效率高,但也存在会对细胞产生毒性的问题,于转染 24 h 后 CCK-8 和划痕实验结果表明,细胞活力和迁移距离都有降低的趋势,转染条件还需进一步优化。我们的实验结果表明,细胞转染 72 h 后 miR-34c 对细胞具有抑制增殖和迁移的作用,在高宁^[16]、王萌^[17]、李甫钊^[18]和张金霞^[19]的实验中都得到了类似的结论,高表达 miR-34c 可抑制细胞增殖和迁移,促进细胞凋亡。转染 miR-34c 在不同细胞中发挥作用的时间不同,武震东^[14]的实验结果表明:上调 miR-34c 48 h 后,可抑制胶质瘤的增殖、迁移和侵袭能力,这可能是由于肿瘤异质性造成的。miR-34c 在多种肿瘤中表达下调,提示 miR-34c 有潜在的抑癌作用,这与我们的实验结果一致,但我们的高通量测序结果表明 miR-34c 在癌组较正常组高表达,这需要我们进一步明确其机制来作出判断。肿瘤的发生是多基因协同作用的结果^[20],miRNA 存在个体差异^[15],口腔癌的组织学表型和染色体分析的结果表明口腔癌

中存在不同表型的肿瘤细胞^[21-22]。miR-34c 作为口腔癌的标志物投入临床使用仍需进一步的探究和验证。

介于 miRNA 的特性,通过调控其表达抑制肿瘤是目前肿瘤治疗的新策略。以 miRNA 为基础的基因治疗进入了一个新的阶段,有很大的应用前景^[23]。在 miR-34 的表达受到抑制或下调的情况下,可通过合成 miR-34 类似物,增加 miR-34 的表达;或在 miR-34 异常表达导致病变时,可利用反义寡核苷酸直接结合 miR-34 阻断其活性,从而发挥治疗作用^[24]。

注:中国地鼠(*Cricetulus barabensis griseus*)是仓鼠科仓鼠亚科动物,在公开出版物中使用仓鼠作为名称更为科学。但鉴于目前我国实验动物国家标准中提到的动物的种类都是地鼠,作为专业人员能够清楚该物种在动物分类中地位,并不妨碍科学研究的成果和使用。中文名称后面的拉丁文不会对该研究的主体产生歧义,故本文在发表时仍沿用“中国地鼠”,待国标修订后再统一命名为“仓鼠”。

参考文献:

[1] Cervigne NK, Reis PP, Machado J, et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18 (24): 4818-4829.

- [2] 高岭, 任文豪, 鄧克谦, 等. microRNA 与口腔鳞状细胞癌的研究进展 [J]. 口腔医学研究, 2013, 29(6): 586–589.
- [3] Tian X, Chen Z, Shi S, et al. Clinical diagnostic implications of body fluid miRNA in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(37): e1324.
- [4] Hou B, Ishinaga H, Midorikawa K, et al. Circulating microRNAs as novel prognosis biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(7): 1042–1046.
- [5] Huang Y, Shen XJ, Zou Q, et al. Biological functions of microRNAs: a review [J]. J Physiol Biochem, 2011, 67(1): 129–139.
- [6] 贾凌飞, 甘业华, 俞光岩. MicroRNA 表达与舌鳞癌患者预后的关系及其调控舌鳞癌生物学行为的机制 [J]. 北京大学学报(医学版), 2016, 48(1): 5–9.
- [7] 李莉红, 庞文彪, 常凯, 等. 中国地鼠口腔颊黏膜癌中 miRNA 与 mRNA 表达谱的关联分析 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2): 158–164.
- [8] 娄文加, 陈青, 刘立, 等. miR-34 家族——肿瘤抑制蛋白 p53 高度相关的 microRNA [J]. 遗传, 2010, 32(5): 423–430.
- [9] Li XJ, Ren ZJ, Tang JH. MicroRNA-34a: a potential therapeutic target in human cancer [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(7): e1327.
- [10] Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, et al. Mir-34: a new weapon against cancer? [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3(9): e194.
- [11] Jia L, Wei S, Mitchelson K, et al. miR-34a inhibits migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma via targeting MMP9 and MMP14 [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108435.
- [12] Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4123–4132.
- [13] 苏菊. MiR-34c-3p 和 Notch2 在肺腺癌中的表达及其临床意义 [D]. 南华大学, 2016.
- [14] 武震东. MicroRNA-34c 在人脑胶质瘤中的表达及其对胶质瘤细胞生物学特性的影响和机制研究 [D]. 河北医科大学, 2013.
- [15] Hermeking H. p53 enters the microRNA world [J]. Cancer Cell, 2007, 12(5): 414–418.
- [16] 高宁, 夏鹰, 金虎, 等. miR-34c-3p 调控脑胶质瘤细胞增殖、分化、凋亡的机制研究 [J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(12): 1386–1387.
- [17] 王萌. miR-34c 通过 YY1 调控骨骼肌细胞增殖及分化的机制研究 [D]. 中国农业大学, 2017.
- [18] 李甫钊, 薛纪森, 黄亦波, 等. miR-34c 对 II 型子宫内膜癌 HEC-1-B 细胞生长和凋亡的影响 [J]. 温州医科大学学报, 2014, 44(2): 86–90.
- [19] 张金霞, 林明燕, 林亚. miR-34c 抑制人子宫内膜癌的机制分析 [J]. 中华全科医学, 2016, 14(8): 1282–1285.
- [20] 李莉红, 皇甫冰, 高继萍, 等. EGFR, PDCD4, TGF- β 1, Smad3, Smad7 在中国地鼠口腔颊黏膜癌变过程中的表达研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 64–70.
- [21] Tremmel SC, Götte K, Popp S, et al. Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2003, 144(2): 165–174.
- [22] Mackenzie IC. Growth of malignant oral epithelial stem cells after seeding into organotypical cultures of normal mucosa [J]. J Oral Pathol Med, 2004, 33(2): 71–78.
- [23] 马东青, 崔红. miRNA 体内转染的研究进展 [J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(21): 1825–1829.
- [24] 陈晨, 王欣, 沈兴家. miR-34 家族抑制肿瘤作用的研究进展 [J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(3): 231–234.

[收稿日期]2018-04-02