

MiR-483-3P 下调 RIOK3 蛋白表达促进神经母细胞瘤的增殖和迁移



李 晓 鹿洪亭 董 蓓 郝希伟 赵 静 刘 铭

【摘要】 目的 探讨 microRNA-483-3P (miR-483-3P) 对神经母细胞瘤细胞的增殖、侵袭及迁移能力的影响,预测并验证 miR-483-3P 的靶基因及其对靶基因的影响。**方法** miRNA 微阵列芯片结果发现 miR-483-3P 在神经母细胞瘤中表达上调,差异倍数显著,并居于差异表达 miRNA 的首位。利用阳离子脂质体 LipofectamineTM2000 将化学合成的 miR-483-3P inhibitor、miR-483-3P inhibitor 的阴性对照序列分别瞬时转染入人神经母细胞瘤 SH-SY-5Y 细胞株中,RT-qPCR 技术检测各组中 miR-483-3P 的表达水平,CCK-8 法检测各组癌细胞的增殖情况,Transwell 小室实验检测各组癌细胞的体外侵袭和迁移能力。利用生物信息学软件预测 miR-483-3P 的靶基因并用荧光素酶报告基因检测实验、Western blot 实验加以验证。**结果** 与癌旁正常组织相比,miR-483-3P 在神经母细胞瘤中高表达 ($P < 0.01$);与阴性对照组相比,癌细胞转染 miR-483-3P inhibitor 后,miR-483-3P 表达显著下调 ($P < 0.01$),细胞的增殖情况和体外迁移能力均降低 ($P < 0.05$)。生物信息学软件预测出 RIOK3 是 miR-483-3P 的靶基因之一,当细胞转染了 miR-483-3P inhibitor 后荧光酶活性升高 ($P < 0.01$)。与阴性对照组相比,当细胞转染了 miR-483-3P inhibitor 后在蛋白质水平 RIOK3 表达升高 ($P < 0.01$)。**结论** RIOK3 是 miR-483-3P 的靶基因之一,miR-483-3P 能下调 RIOK3 的表达并显著促进神经母细胞瘤细胞的增殖和体外迁移。

【关键词】 神经母细胞瘤; miR-483-3P; 细胞增殖; 侵袭; 靶基因

MiR-483-3P down regulate RIOK3 expression and promote the proliferation and migration ability of human neuroblastoma cells. LI Xiao, LU Hong-ting, DONG Qian, et al. The Affiliated Hospital of Qingdao University. Qingdao 266003 China.

【Abstract】 Objective To explore the influence of microRNA-483-3P (miR-483-3P) on neuroblastoma cells' proliferation, invasion and migration abilities, and predict target genes for miR-483-3P, and also to discuss its impact on the target gene. **Methods** miRNA array results showed that miR-483-3P, which has the most significant difference in the changed miRNAs, was upregulated in neuroblastoma. Under the use of cationic liposomes LipofectamineTM2000, chemically synthesized miR-483-3P inhibitor or a negative control sequence of miR-483-3P inhibitor were transiently transfected into human neuroblastoma SH-SY-5Y cell lines. The expression of miR-483-3P was detected by using quantitative Real-time PCR technique. The proliferation and migration of neuroblastoma cells were examined in vitro by CCK-8 and transwell experiment assay. The bioinformatics software was used to predict target genes of miR-483-3P and luciferase reporter gene detection experiments, Western blot experiments were performed to validate the target gene. **Results** Compared with adjacent none-tumor tissues, miR-483-3P was upregulated in neuroblastoma tissues ($P < 0.01$). Compared with negative control, the miR-483-3P expression was decreased after miRNA inhibitor transfection ($P < 0.01$), the proliferation and migration of cells in vitro are all decreased ($P < 0.05$). Bioinformatics software predicted RIOK3 is one of the target genes of miR-483-3P, when cells transfected with miR-483-3P inhibitor the luciferase ac-

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2016.02.014

基金项目: 1, 国家自然科学基金资助项目(项目号:81272986); 2, 山东省高等学校科技计划资助项目(项目号:J11LF58); 3, 青岛市科技计划基础研究资助项目(项目号:10-3-4-3-R-jch)。

作者单位: 青岛大学附属医院小儿外科(山东省青岛市, 266003), E-mail:lixiao1604@163.com

tivity would increased($P < 0.01$). Compared with the negative control group, when cells transfected with miR-483-3P inhibitor at the protein level R1OK3 would increased($P < 0.01$). **Conclusion** R1OK3 is one of the target genes of miR-483-3P, also miR-483-3P can down regulate the expression of R1OK3 and promote the proliferation and migration abilities of neuroblastoma cell.

【Key words】 Neuroblastoma; miR-483-3P; proliferation; invasion; target gene

神经母细胞瘤(Neuroblastoma; NB)是小儿最常见的恶性肿瘤,恶性程度高,易早期转移,死亡率高。因此,寻找与神经母细胞瘤发生发展相关的分子标志物,探索肿瘤发生的分子机制,在其治疗和预后中起着关键作用。微小RNA(miRNA)是一种由18~25个核苷酸构成的内源性非编码小分子单链RNA,在转录后水平调控基因表达。近年来,研究发现miRNA参与许多生理过程的调节,包括细胞增殖、分化、和细胞凋亡,与肿瘤的发生发展密切相关。本课题组前期miRNA微阵列芯片筛查出54个可能与NB侵袭转移相关的miRNA,其中有35个表达上调,19个表达下调。其中miR-483-3P表达上调明显,差异显著,并居于差异表达miRNA的首位。而且已有研究证明miR-483与胰腺癌、胃癌关系密切,并与肿瘤的恶性程度有一定的相关性。本实验旨在通过RT-PCR验证miR-483-3P在神经母细胞瘤中高表达,并研究miR-483-3P调控的靶基因及对神经母细胞瘤生物学行为的影响,以期对神经母细胞瘤的治疗提供新的靶点及理论基础。

材料与方法

一、材料

9对神经母细胞瘤和癌旁正常组织由我院病理科提供,并已经病理科医生作出病理诊断,所有标本均通过了青大附院伦理委员会的审核,并取得了患儿家长的同意;人神经母细胞瘤细胞体外细胞株(SH-SY5Y)由本课题组建立并长期保留;胎牛血清;DMEM培养基;PBS缓冲液;胰蛋白酶;LipofectamineTM2000(购买于美国的Invitrogen公司);miR-483-3P inhibitor, miR-483-3P inhibitor的阴性对照序列购买于广州市锐博生物科技有限公司;Trizol裂解液;RT-PCR试剂盒购于北京天根生化科技有限公司;CCK-8试剂盒(购于日本同仁化学研究所);Transwell小室,流式细胞术试剂盒,含有miR-483-3P结合位点的R1OK3的3'UTR(野生型;pmirGLO-R1OK3 WT)和含有突变位点的3'UTR(突变型;pmirGLO-R1OK3MUT)载体由上海桑尼生物技

术公司完成。

二、方法

(一) 细胞培养

冻存的SH-SY5Y人神经母细胞瘤细胞株复苏后,用含10%胎牛血清及100 μ /mL青霉素/链霉素的DMEM培养基,在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 饱和湿度的培养箱内培养。每36h更换一次培养液,融合度达到90%左右(2~3 d)进行传代,传代后第二天换液。取培养过程中对数生长期的细胞冻存6~8管,后续实验备用。

(二) 基因转染

取对数生长期的细胞,转染前一天,用胰蛋白酶消化贴壁生长的细胞,调整细胞悬液的浓度以每孔 1×10^6 个细胞接种于6孔培养板,置37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 饱和湿度的培养箱内培养。待细胞融合度达到40%左右时,弃原培养基,按照Lipofectamine TM 2000的说明书进行转染,转染6h后更换为含10%胎牛血清的DMEM培养基继续培养。

(三) 总RNA的提取及实时荧光定量PCR测定转染效果

分别于转染后24 h、48 h、72 h按照Trizol试剂的说明书提取总的RNA。RNA提取完毕后,用蛋白核酸测定仪测定RNA的浓度及纯度,保证OD260/OD280在1.8~2.2之间。可放于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。

对于miRNA的逆转录聚合酶链反应,内参照选择snRNAU6,用特异的miR-483-3P的PCR上游引物。实时定量PCR反应遵循以下条件,反应第一步(逆转录为cDNA):①miRNA 3'末端进行Ploy(A)处理,37 $^{\circ}$ C 60min;②Ploy(A)修饰的miRNA进行逆转录反应37 $^{\circ}$ C 60 min。反应第二步(PCR扩增阶段):94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s;然后重复40个循环。

(四) CCK-8 检测肿瘤细胞的增殖情况

转染前一天铺板,将贴壁生长的神经母细胞瘤细胞消化离心后重悬,调整细胞密度为 5×10^5 /L,以每孔100 μ L的量接种到96孔培养板,每组设置5个复孔。过夜培养后进行miR-483-3P转染,6h后换成100 μ L含10%胎牛血清的DMEM培养基继

续培养。分别于 0h、48h、72h 加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中孵育 2h 后在酶联免疫检测仪下测定 450 nm 处的 OD 值。

(五) Transwell 检测肿瘤细胞的侵袭和迁移能力

转染前一天以每孔 5×10^4 细胞的量,将细胞种在 24 孔培养板中,第二日当细胞融合度达到 40% 左右时,按照 Lipofectamine TM2000 的说明书进行基因转染。转染后 6 h 换成含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养,1 天后,将各组细胞消化成细胞悬液,调整细胞密度为 3×10^5 个/mL,取 100 μL 细胞悬液加到 transwell 小室中,小室内的细胞是重悬在无血清的培养基中,将小室置于 24 孔培养板中,向 24 孔板中加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。吸去 transwell 上室内的液体,并用棉签擦去上室底部表面的细胞,用 95% 的乙醇固定 10 min,1 \times PBS 清洗,然后用 0.1% 的结晶紫染色 15 min,染色后用 1 \times PBS 冲洗,在倒置显微镜下对发生侵袭和迁移的细胞计数(每个培养孔选择上下左右中 5 个视野拍照计数,取每个视野的平均细胞数)。每组设置两个平行复孔。

(六) 荧光素酶报告基因检测实验

第一天将细胞种在 24 孔培养板中(5×10^4 /孔),第二天当细胞密度达 40% 时,参照 Lipofectamine TM2000 说明书进行转染,分别将 pmirGLO-RIOK3 WT 或 pmirGLO-RIOK3MUT 与 miR-483-3P inhibitor 共转染 SH-SY5Y 细胞,报告基因质粒为 200ng/孔,核酸浓度为 150 nmol/L。转染 48 h 后,进行细胞裂解,Promega 荧光测定仪测定荧光素酶活性。

(七) Western blot 检测 miR-483-3P 对细胞 RIOK3 表达的影响

细胞培养于 6 孔板,转染方法同前,于转染后 48 h 加入 RIPA 裂解液,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,最后将 100ug 总蛋白上样,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭,加入一抗兔抗人的多克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入二抗羊抗兔的单克隆抗体,室温孵育 1 h,ECL 显影,定影,凝胶成像系统拍照分析。

三、统计学处理

计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据之间的比较采用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著的统计学意义,所有分析均由 SPSS17.0 统计学软件完成。

结果

一、神经母细胞瘤与癌旁正常组织中 miR-483-3P 的差异表达

实时荧光定量 PCR 结果显示:神经母细胞瘤中 miR-483-3P 的含量明显高于癌旁正常组织($P < 0.01$)如下图 1。

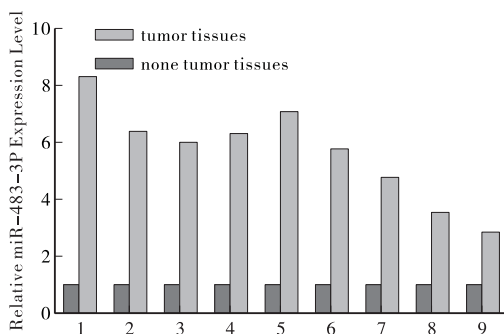


图 1 癌旁正常组织相比 miR-483-3P 在神经母细胞瘤中表达水平升高

二、基因转染后 miR-483-3P 表达的变化

将 miR-483-3P inhibitor 及 miR-483-3P inhibitor NC 转染入细胞后,在转染后 24 h、48 h、72 h 提取总 RNA,使用 RT-PCR 检测 miR-483-3P 相对表达水平。结果显示:与对照组相比转染 miR-483-3P inhibitor 后 24 h、48 h、72 h miR-483-3P 水平逐渐下降;在 48 h 时下降幅度最大,抑制效果尤为明显,如图 2。

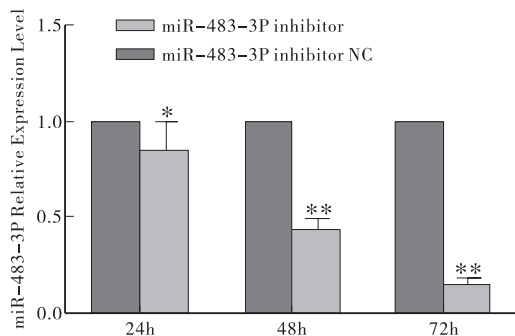


图 2 脂质体转染后 miR-483-3P 表达水平下降
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

三、miR-483-3P 对神经母细胞瘤细胞增殖的影响

CCK-8 实验结果显示:与对照组相比,转染 miR-483-3P inhibitor 组在 0 h 和 24 h 450 nm 处的 OD 值无明显差异,48 h 和 72 h 450 nm 处 OD 值明显下降($P < 0.05$)。这表明 miR-483-3P inhibitor 会抑

制神经母细胞瘤细胞的增殖,如图 3。

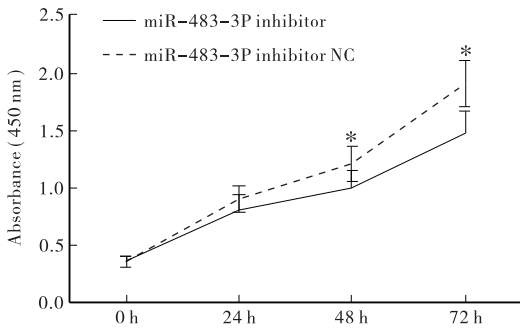


图 3 转染了 miR-483-3P inhibitor 后 SH-SY5Y 细胞的增殖能力降低 * $P < 0.05$

四、miR-483-3P 对神经母细胞瘤细胞侵袭迁移能力的影响

Transwell 小室实验显示:转染 miR-483-3P inhibitor 组穿过 Matrigel 膜的细胞数为 (25.3 ± 3.2) 而对照组穿过 Matrigel 膜的细胞数为 (35.4 ± 4.2) 。与对照组相比下降了 (28.5%) , $P < 0.05$,有统计学意义。这表明 miR-483-3P 会促进神经母细胞瘤细胞的迁移。

五、miR-483-3P 靶向调控 RIOK3 的表达

利用 targetscan 和 miRanda 数据库查找得到, RIOK3 的 3'UTR 含有 miR-483-3P 的结合位点,因此将 RIOK3 作为本研究的候选靶基因。荧光素酶报告基因检测结果显示:pmirGLO-RIOK3 WT 与 miR-483-3P inhibitor 共转染细胞后荧光素酶活性较 pmirGLO-RIOK3 MUT 与 miR-483-3P inhibitor 共转染显著升高 ($P < 0.01$),如图 4。

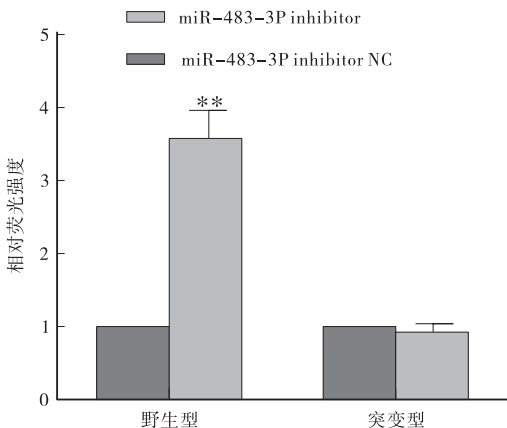


图 4 miR-483-3P inhibitor 可增强 RIOK3 荧光素酶的活性 * * $P < 0.01$

六、miR-483-3P 对蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示:下调 miR-483-3P 后,细胞中 RIOK3 表达水平升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),如图 5。

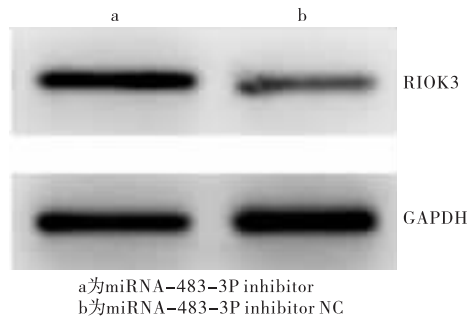


图 5 miR-483-3P 下调 RIOK3 蛋白的表达

讨 论

神经母细胞瘤 (Neuroblastoma NB) 是儿童常见的一种交感神经系统的恶性胚源性肿瘤,是儿童和婴儿最常见的实体瘤之一,其发病率 1/10 万,恶性程度高,容易早期转移,死亡率高;因此阐明肿瘤的转移分子机制及寻找新的治疗方法显得尤为重要。微小核糖核酸 (miRNA) 近年来因其与肿瘤密切相关而成为研究热点,它是一种由 18-25 个核苷酸构成的内源性的非编码小分子单链 RNA,在转录后水平调控基因表达。miRNA 特异性的通过碱基互补配对的方式部分或完全结合目标 mRNA 的 3' 非翻译区从而抑制 mRNA 翻译或降解靶 mRNA^[1]。近年研究发现 miRNA 在肿瘤的发生、发展过程中可通过调控细胞代谢发挥作用,如细胞增殖、迁移、分化、凋亡和血管生成等^[2-3]。miRNA 既可作为癌基因又可作为抑癌基因,参与人类肿瘤形成的多条信号通路^[4]。因此,特定 miRNA 功能的研究为肿瘤诊断和治疗提供了新的方向^[5]。近年来,大量研究发现 miRNA 参与多种肿瘤的发生和发展^[6-7],但参与神经母细胞瘤侵袭和转移的报道很少。而影响神经母细胞瘤预后的主要因素就是神经母细胞瘤的侵袭、转移情况^[8],因此研究与神经母细胞瘤侵袭及转移密切相关的特定 miRNA 具有重要意义。

本课题组前期将 miRNA 微阵列芯片分析技术应用用于 NB 转移机制研究中,筛选出 NB 转移瘤的异常 miRNA 表达谱,发现 miR-483-3p、miR-99b、miR-145、miR-602、miR-26b、miR-125a-3p、let-7f 的表达在 NB 转移瘤和 NB 原发瘤中有显著的差异,这些 miRNA 可能在 NB 的侵袭和转移中发挥着重要作用^[9]。目前为止已做了部分相关研究,其中对 miR-7、miR-338、miR-338-3P、miR-92、miR-92b、miR-34a、miR-15a 等作了相关研究,我们发现,当改变肿

瘤细胞中 miRNAs 的表达水平时,细胞的增殖、侵袭迁移能力会发生改变^[10-13]。影响肿瘤细胞生物学行为的机制与 miRNAs 的水平变化所导致的下游调控的靶 mRNAs 翻译后水平的变化有关,这些靶 mRNA 所翻译出来的蛋白通常是一些细胞因子、信号蛋白;当细胞的信号通路发生改变时,肿瘤发生。已有研究证明 miR-483 与胰腺癌、胃癌关系密切,并与恶性程度有一定的相关性,miR-483-3p 在胰腺癌中起促癌作用,DPC4/SMAD4 是与胰腺癌密切相关的抑癌基因,是 TGF- β 和 BMP 信号通路下游共同的关键蛋白。miR-483-3p 通过靶向抑制 mRNA 转录后翻译,DPC4/SMAD4 水平下降,从而阻止了 TGF- β 和 BMP 信号通路的下续传递,这些信号通路与细胞的生长、分化、凋亡等功能相关,从而促进肿瘤的发生^[14]。也有文献报道 miR-483 位于 IGF2 (胰岛素样生长因子 2) 基因的第 7 号内含子中,与宿主基因 IGF2 共表达。miR-483 在结直肠癌中表达水平明显高于癌旁组织,并 IGF2 基因表达水平在结直肠癌患者中呈倍数增高,两者有望成为结直肠癌诊断的分子标记物^[15]。DCL1 (肝癌缺失基因 1) 是一种重要的抑癌基因,目前发现其还在肝癌、肺癌、前列腺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中表达水平降低或缺失;miR-483-3P 通过靶向抑制 DCL1 转录后翻译促进结直肠癌的发生、发展^[16]。综上,miR-483-3P 在多种肿瘤细胞中表达水平升高,这与前期基因芯片的结果相同,故在神经母细胞瘤中对 miR-483-3P 的研究显得尤为重要。

通过生物信息学技术发现 miR-483-3P 与 RIOK3 关系密切。蛋白激酶是负责催化磷酸基团向丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的转移,在细胞内信号传导过程中发挥重要作用,在对体内各种生理活动调控中扮演重要角色。RIOK3 为非典型激酶 RIO 家族的成员之一,RIOK3 含有一个 RIO 结构域,但是其结构与其他 RIO 家族成员有较大差别。有研究证明,人类蛋白激酶 RIOK3 是一种很重要的信号分子,能够抑制细胞增殖并促进凋亡^[17]。RIOK3 定位于细胞质中,与 RIOK3 相互作用的蛋白有:CASP10 (caspase-10), BIM (Bcl-2 interacting mediator), PAK2 (p21-activated kinase 2) 和 CDC42 (cell division cycle 42),而这些与之作用的蛋白与细胞的凋亡、侵袭转移活性密切相关。RIOK3 作为一个 NF κ B 通路的成员可以抑制 TNF α 诱导的 NF κ B 的活化。RIOK3 与 CASP10 相互作用后可抑制 NF κ B 通路的激活;RIOK3 能够在蛋白水平上降低 PAK2

的表达,在 PAK2 的酶解激活途径中发挥重要作用^[18]。通过对 RIOK3 的功能研究,发现了 RIOK3 在 NF κ B 信号传导过程中的作用,推测 RIOK3 与肿瘤细胞发生和肿瘤细胞迁移关系密切^[19]。

本研究先通过逆转录聚合酶链式反应来验证 miR-483-3P 在神经母细胞瘤及癌旁正常组织的差异表达,证实 miR-483-3P 在神经母细胞瘤中高表达。进一步利用脂质体 Lipofectamine2000 将化学合成的 miR-483-3P inhibitor 瞬时转入高表达 miR-483-3P 的 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞系中,以此干预 miR-483-3P 的表达,结果显示 miR-483-3P inhibitor 使得 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞系中 miR-483-3P 的表达水平下降,并且 CCK-8 实验结果显示:转染 miR-483-3P inhibitor 后神经母细胞瘤的增殖能力显著下降,Transwell 结果显示:转染 miR-483-3P inhibitor 后神经母细胞瘤的侵袭迁移能力显著下降,下一步我们利用多种生物信息学软件预测 miR-483-3P 的靶基因,发现 RIOK3 的 3'UTR 含有 miR-483-3P 的潜在结合位点,因此将 RIOK3 作为本研究得候选靶基因,并加以验证,确定 RIOK3 是 miR-483-3P 调控的靶蛋白。本研究创新点在于通过 miR-483-3P 对下游靶基因 RIOK3 转录后翻译的影响,来研究神经母细胞瘤的增殖侵袭迁移等生物学行为的变化;并将 miRNA 与信号通路联系在一起,为今后 miRNA 参与神经母细胞瘤发生发展的分子机制研究及介导神经母细胞瘤的靶向生物治疗提供理论基础。

参考文献

- 1 Djuranovic S, Nahvi A, Green R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs [J]. Science. 2011, 331 (6017):550-563.
- 2 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. Proc. Natl Acad sci USA, 2004, 101 (9):2999-3004.
- 3 Xin Chen, Min Pan, Lulu Han, et al. miR-338-3p suppresses neuroblastoma proliferation, invasion and migration through targeting PREX2a [J]. FEBS Letters, 2013, 587: 3729-3737.
- 4 Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. Genome Res, 2009, 19 (1):92-105.
- 5 Waldman SA, Terzic A. MicroRNA signatures as diagnostic

- and therapeutic targets[J]. Clin Chem, 2008; 54 (6): 943-944.
- 6 Jigang Guo, Qian Dong, Zhixiang Fang, et al. Identification of miRNAs that are associated with tumor metastasis in neuroblastoma[J]. Cancer Biology & Therapy, 2010; 9(6): 1-7.
- 7 Weiwei Liao, Hao Zhang, Chen Feng, et al. Downregulation of TrkA protein expression by miRNA-92a promotes the proliferation and migration of human neuroblastoma cells[J]. Molecular medicine reports. 2014. 10(2): 778-784.
- 8 Chen Xin, Bao Buhe, Lu Hongting, et al. MicroRNA-15a promotes neuroblastoma migration by targeting reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) and regulating matrix metalloproteinase-9 expression[J]. FEBS Letters, 2013, 280(3): 855-866.
- 9 Jigang Guo, Qian Dong, Zhixiang Fang, et al. Identification of miRNAs that are associated with tumor metastasis in neuroblastoma[J]. Cancer Biology & Therapy, 2010; 9(6): 1-7.
- 10 张桓瑜, 鹿洪亭, 董蓓, 等. 微小 RNA-7 对人神经母细胞瘤侵袭和转移能力的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(6): 1265-1265.
- 11 顾涛, 鹿洪亭, 董蓓, 等. Kai1/CD82 表达水平与神经母细胞瘤转移的关系探讨[J]. 临床小儿外科杂志. 2013, 12(2): 100-102.
- 12 鹿洪亭, 董蓓, 陈鑫, 等. miR-338-3P 对神经母细胞瘤增殖和侵袭的抑制作用[J]. 中华小儿外科杂志. 2013, 34(7): 524-528.
- 13 张蛟, 刘秋亮, 高敬尧, 等. DKK-1 在儿童神经母细胞瘤组织中的表达及临床意义[J]. 临床小儿外科杂志. 2015, 14(5): 388-390.
- 14 郝俊, 吴先贵. microRNA 对胰腺癌 DPC4/Smad4 基因转录后调控及功能机制研究[D]. 2011 年 第二军医大学学位论文.
- 15 刘媛, 蒋青蕊, 吴少亘, 等. miR-483 与结直肠癌关系的研究[J]. 胃肠病学, 2014; 19(3): 151-155.
- 16 蒋青蕊, 刘媛, 吴少亘, 等. miR-483-3p 对结直肠癌 DLC1 基因表达的影响[J]. Chin J Gastroenterol. 2014; 19(7): 394-398.
- 17 林颖, 李璞, 单敬轩, 等. RIOK3 促进了 caspase-10 对 PAK2 的酶解激活[J]. 中国生物工程杂志, 2012; 32: 1-8.
- 18 Shan J, Wang P, Zhou J. RIOK3 interacts with caspase-10 and negatively regulates the NF-kappaB signaling pathway [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2009, (1-2): 113-120
- 19 Feng, JDe Jesus, PDSu, et al. RIOK3 Is an Adaptor Protein Required for IRF3-Mediated Antiviral Type I Interferon Production R[J]. Journal of Virology, SCI 2014; 14: 7987-7997.

(收稿日期: 2016-01-21)

(上接第 143 页)

- 1994, 15: 97.
- 2 Jordan PH Jr, Goss JA Jr, Rosenberg WR, et al. Some considerations for management of choledochal cysts [J]. Am J Surg, 2004, 187: 790-795.
- 3 Kamisawa T, Kuruma S, Tabata T, et al. Pancreaticobiliary maljunction and biliary cancer[J]. J Gastroenterol, 2015, 50(3): 273-279.
- 4 董蓓, 陈永健, 卢云, 等. 数字医学与计算机辅助手术的发展及临床应用[J]. 中国信息界医疗, 2013, (9): 58-61.
- 5 董蓓, 王宝磊. 小儿肝脏肿瘤的诊治挑战和计算机辅助肝切除手术[J]. 临床外科杂志, 2013, 21(8): 585-587.
- 6 Dong Q. Congenital biliary dilatation. Pediatric hepatobiliary surgery[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005, 265-314.
- 7 方驰华, 刘文瑛, 钟世镇. 3D 胆道外科的现状与发展[J]. 中华消化外科杂志, 2014, 13(6): 489-492.
- 8 Jhamb S, Decker C, Romero R, et al. Intrahepatic stones from congenital biliary dilatation[J]. Ochsner J, 2015, 15(1): 102-105.
- 9 李龙, 张金山, 刁美. 小儿先天性胆管扩张症研究进展[J]. 中国实用外科杂志, 2012, 32(3): 214-217.
- 10 董蓓, 江布先, 张虹, 等. 先天性胆管扩张症合并肝内胆管扩张及复杂胆道畸形的诊断与治疗对策[J]. 中华小儿外科杂志, 2005, 26(6): 285-288.

(收稿日期: 2016-01-19)