doi:10.11659/jjssx.05E018039

·基础研究·

miRNA-10b 靶向调控 Twist 促进骨肉瘤细胞增殖与侵袭的研究

梁秀伟[1],孙 超[2],文坤树[1],蔡勇平[1],高劲松[1],李晓江[1] (1.重庆市梁平区人民医院骨科二病区,重庆 梁平 405200;2.陆军军医大学第二附属医院骨科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 探讨 microRNA-10b 对骨肉瘤细胞 MG-63 增殖与侵袭能力的影响及潜在作用机制。**方法** 应用实时荧光定量 PCR 检测人骨肉瘤组织和癌旁正常骨组织中 miR-10b 的表达差异。将 miR-10b mimic 和 Twist 特异性的 siRNA (Twist siRNA)分别通过脂质体转染法转染入骨肉瘤细胞系 MG-63,应用 RT-PCR 检测细胞中 miR-10b 和 Twist mRNA 的表达,采用蛋白质印迹法(Western blot)检测 Twist 及内参 β-actin 蛋白表达水平,采用 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] 法检测 miR-10b mimic 及 Twist siRNA 对人骨肉瘤细胞系 MG-63 增殖能力的影响;采用 Transwell 侵袭实验检测 miR-10b mimic 及 Twist siRNA 对人骨肉瘤细胞系 MG-63 侵袭能力的影响。**结果** 与正常癌旁骨组织相比,miR-10b 在骨肉瘤组织中呈现明显高表达,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$);miR-10b mimic 可使 Twist mRNA 和蛋白表达水平升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),同时可显著增强 MG-63 细胞的增殖与侵袭能力($P<0.05$),而转染 miR-10b mimic 和 Twist siRNA 的 MG-63 细胞的增殖与侵袭能力较仅转染 miR-10b mimic 的 MG-63 细胞显著减弱($P<0.05$)。**结论** 人骨肉瘤细胞系 MG-63 中 miR-10b 的表达上调,可能通过靶向激活 Twist 信号通路促进骨肉瘤细胞的异常增殖与远处侵袭。

[关键词] 骨肉瘤;微小 RNA-10b;Twist;细胞增殖;侵袭;细胞培养;细胞转染

[中图分类号] R361+.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-05-08

MicroRNA-10b promotes the proliferation and invasion of osteosarcoma cell lines by targeting twist gene

LIANG Xiu-wei[1], SUN Chao[2], WEN Kun-shu[1], CAI Yong-ping[1], GAO Jing-song[1], LI Xiao-jiang[1] (1. Department of Orthopedics, People's Hospital of Liangping District, Liangping Chongqing 405200, China; 2. Department of Orthopaedics, Second Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 405200, China)

Abstract: Objective To investigate the role of microRNA-10b (miR-10b) in the proliferation and invasion potential of osteosarcoma cell lines MG-63 and the exact underlying mechanism. **Methods** The expression level of miR-10b in human osteosarcoma tissue samples and adjacent normal bone tissues were detected by relative quantitative real-time PCR (qRT-PCR). miR-10b mimic and siRNA against Twist (Twist siRNA) were transfected into human osteosarcoma cell lines MG-63 respectively using lipofactamine 2000, and RT-PCR was used to detect the mRNA expression levels of miR-10b and Twist, and Twist protein expression level was detected by Western blot. The effect of miR-10b mimic and Twist siRNA on proliferation of MG-63 were detected by MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]. The in-vitro cell invasion ability was determined by Transwell invasion assays after up-regulating miR-10b or knocking down of Twist. **Results** The expression levels of miR-10b was higher in human osteosarcoma tissue samples compared with adjacent normal bone tissues, the differences were extremely statistical significance ($P<0.01$). miR-10b directly up regulated the mRNA and protein expression levels of Twist, the differences were significant ($P<0.05$). In addition, miR-10b had enhanced the cell invasion and the proliferation ($P<0.05$), whereas the proliferation and invasion ability of MG-63 which transfected by both miR-10b mimic and Twist siRNA were significantly reduced than that transfected by miR-10b mimic ($P<0.05$). **Conclusion** miR-10b in MG-63 promotes the proliferation and invasion potential of human osteosarcoma cell lines MG-63, at least partly through the upregulation of Twist gene.

Keywords: osteosarcoma; micro RNA-10b; Twist; cell proliferation; invasion; cell culture; cell transfection

骨肉瘤是临床上最常见的原发恶性骨肿瘤,青少年发病率较高,多发生于长骨干骺端,具有高度恶性、进展快、易发生早期肺转移、复发率高等特点,因此治疗效果与预后均较差[1-3]。在当前治疗效果不佳的情况下,骨肉瘤基因水平的治疗一直是临床与基础研究的热点,但目前尚无有效的分子靶向药物能够应用在临床治疗中。因此本研究通过探寻能够有效阻断骨肉瘤细胞迁移和侵袭的小分子,为临床上骨肉瘤的防治提供新靶点。微小 RNA (microRNA, miRNA)是一类长度为 18~25个核苷酸的小分子内源性非编码 RNA,通过结合 mRNA 3′-UTR 调节 mRNA 翻译或降解来影响多种基因表达,参与多种细胞生物学事件的调控,如细胞增殖、分化、侵袭及凋亡等[4-5]。研究表明,microRNA-10b (miR-

[通信作者] 梁秀伟,E-mail:1242944195@qq.com

10b)的异常激活在肺癌、乳腺癌、肝癌、结肠癌以及骨肉瘤等恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用[6-7]。有学者发现骨肉瘤组织和骨肉瘤细胞中均存在 miR-10b 的显著高表达,但其在骨肉瘤细胞中的作用机制尚不清楚[8]。因此,本研究将进一步探索 miR-10b 在骨肉瘤细胞系中的功能及生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨肉瘤细胞系 MG-63 由北京航天航空大学生命科学院肿瘤实验室馈赠;DMEM 细胞培养液购自美国 Hyclone 公司;特优级胎牛血清购自天津皓洋生物有限公司;miR-10b mimic 序列(5′-UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG-3′, 3′-CAAAUUCGGUUCUACAGGGUAUU-5′),阴性对照序列(5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′,3′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-5′);miR-10b qPCR Quantitation Kit、U6 snRNA qRNA qPCR Normalization Kit 均由广州瑞博生物技术有限公司化学合成;Twist 靶向 siRNA 委托上海吉凯基因化学技术有限公司化学合成; Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;PCR 引物和核酸分子质量标准购自大连 Takara 宝生物有限公司;多克隆兔抗人 Twist 购自美国 Cell Signaling Technology (CST)有限公司;β-actin 多克隆兔抗人抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;中分子量 Protein marker 购自 Thermo Fisher 公司;ECL 发光试剂盒购自 Millipore 公司;细胞及蛋白 IP 裂解液(RIPA)及 BCA 蛋白定量试剂盒均购自美国 Thermo Fisher 公司;MTT 试剂(CellTiter 96® AQueous one solution cell proliferation assay)购自日本同仁生物公司;24 孔 Transwell 小室(孔径 8 μm)购自 Corning Costar 公司;人工基质胶 matrigel 购自美国 Hyclone 公司;细胞恒温培养箱购自日本三洋 SANYO 科学仪器有限公司,PCR 扩增仪以及 Western blot 电泳仪均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 临床标本收集与细胞培养 本研究所收集的人骨肉瘤组织(n = 21)和对应癌旁正常骨组织(n = 21)均取自河北医科大学第一附属医院骨外科就诊骨肉瘤患者手术切除标本。纳入本研究的所有临床标本取材均通过所在医院伦理委员会审批许可,仅用于实验研究。所有患者在手术前均填写知情同意书。新鲜标本经液氮冻存用于组织 RNA 的提取。人骨肉瘤细胞系 MG-63 采用 DMDM 培养基加 10% 胎牛血清于 37 ℃,5% CO_2 恒温培养箱培养。

1.2.2 细胞转染 取 5×10^4 个处于对数生长期的 MG-63 细胞,接种于 6 孔板中,培养 24 h 待细胞密度达到 70% ~80% 贴壁后,按照 Lipofectamine® 2000 说明书操作步骤将 miR-10b mimic 及其阴性对照或 miR-10b inhibitor 及其阴性对照分别转染入人骨肉瘤细胞系 MG-63。在细胞培养箱中培养 6 ~8 h 后更换新鲜含血清的完全培养基,转染完成并继续培养 24 h。

1.2.3 荧光定量 PCR Twist 和 β-actin 的引物由北京天一辉远生物技术公司合成,引物序列分别为 Twist:上游 5′-CTCAAGCCTTCCAACCTC-3′,下游 5′-TTCCACGGCACCTTATTT-3′;β-actin:上游 5′-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3′,下游 5′- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′。miR-10b 检测试剂盒购于广州锐博生物公司(miRQ0000056-1-2),靶向序列为 5′-GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA-3′。分别用 miR-10b 和 U6 引物于荧光定量 PCR 仪(Lightcycler480)进行 Real-time PCR 扩增,以 U6 作参照。PCR 反应条件:95 ℃预变性 3 min,92 ℃变性12 s,60 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 30 s,共进行 40 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min,扩增产物 4 ℃保存。完成 Real-time PCR 后对其熔解曲线进行分析,并分析 PCR 产物是否特异。按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式对实时定量 PCR 结果进行统计分析。

1.2.4 Western blot 检测 将已处理好的贴壁细胞用预热的 PBS 洗涤后转移到 EP 管,12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,将收集到的细胞加入细胞裂解液裂解后,取上清液于 -20 ℃储存。上样,80 V 电泳积聚蛋白,100 V 电压使蛋白分离并转膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h。用多克隆兔抗人的 Twist(1∶750)、多克隆兔抗人 β-actin(1∶2 000)分别与膜接触 4 ℃孵育过夜后,用 TBST 在脱色摇床下洗膜 5 min ×3 次,在加辣根酶标记羊抗兔 IgG,室温下孵育 1 h 后,用 TBST 洗膜 5 min ×3 次,加入 ECL 化学发光显示剂在室温下反应 1 min 后,用 X 射线光片曝光,然后定影、显影。

1.2.5 Transwell 细胞侵袭实验 提前在 4 ℃融解 Matrigel 基质胶,每个聚碳酸酯微孔膜表面铺以 40 μL 稀释的 matrigel 胶(matrigel 与无血清培养基之比为 1∶3),放入培养箱中 4 h 凝固备用。将处于对数生长期 MG-63 细胞在无血清 IMDM 培养液饥饿培养 24 h 后,使用 0.25% EDTA 胰蛋白酶消化,接着无血清 IMDM 培养基悬浮成单细胞悬液,将细胞密度调整至 4×10^5/mL。每个小室上室中加入无血清细胞悬液 200 μL,同时按实验分组进行处理,每组设 3 个复孔,在侵袭小室的下室加入含 10% 胎牛血清的细胞培养液 DMEM,每孔 600 μL,培养箱中培养 24 h。取出小室,用 PBS 洗涤 2 次去除培养基,湿棉签擦去小室上

层未穿过细胞,甲醇固定20 min之后,置于室温晾干。进一步使用结晶紫染色20 min。染色完后在倒置显微镜下观察穿过膜的细胞数,计数中间及四周5个高倍(400倍)镜下视野细胞数,计算平均数。

1.2.6 MTT细胞增殖实验 将处于对数生长期的MG-63细胞消化、重悬后按照1 000/100 μL的密度接种于96孔板,每组间设置6个复孔,96孔板周围一圈加入200 μL体积的PBS,防止实验组孔内培养基蒸发。将96孔板放置于培养箱中常规培养,随后于接种后12、24、48 h于每孔加入50 μL MTT试剂,继续孵箱孵育2~4 h。孵育完毕后除去培养基,加入100 μL DMSO,震荡10 min。在波长570 nm测定样品OD值。

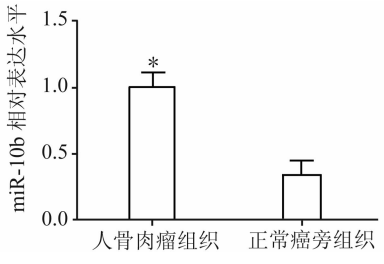
1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件进行t检验及方差分析,所有数值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,$P<0.05$为差异有统计学意义;$P<0.01$为差异有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 miR-10b在骨肉瘤组织中高表达

实时定量PCR检测miR-10b在人骨肉瘤组织和正常癌旁组织中表达,发现miR-10b在骨肉瘤组织中表达显著高于正常癌旁组织,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),见图1。说明该miR-10b的异常高表达可能与骨肉瘤生物学功能相关。

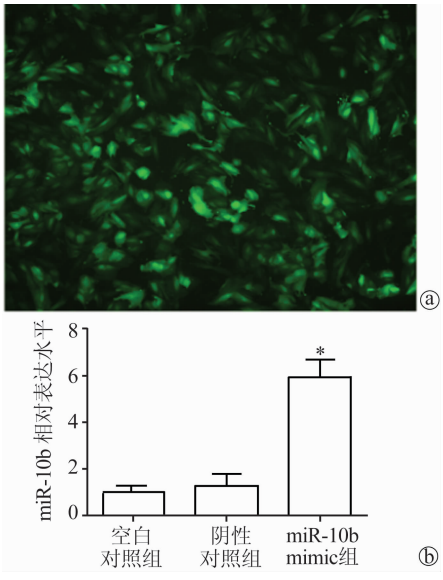


*:与正常癌旁组织比较,$P<0.01$

图1 miR-10b在骨肉瘤组织和癌旁正常骨组织中的表达比较

2.2 miR-10b mimic转染MG-63细胞上调miR-10b的表达

在miR-10b mimic转染MG-63细胞24 h后,荧光检测结果显示转染了miR-10b mimic的细胞中可见携带GFP绿色荧光蛋白,表明转染成功(图2a)。提取细胞总miRNA进行RT-PCR验证,结果显示与空白组和阴性对照组相比,转染miR-10b mimic后的MG-63细胞的miR-10b表达水平显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见图2b。

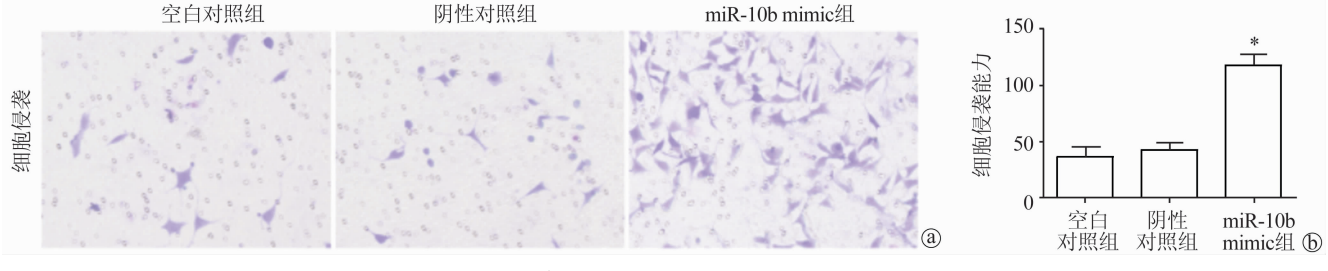


a:miR-10b mimic转染(×400);b:RT-PCR检测miR-10b表达水平 *:与其他两组比较,$P<0.05$

图2 转染miR-10b mimic后MG-63细胞miR-10b的表达

2.3 过表达miR-10b促进骨肉瘤细胞系侵袭

采用Transwell细胞侵袭实验检测miR-10b过表达对MG-63细胞侵袭能力的影响。结果显示:转染miR-10b mimic并培养MG-63细胞48 h后,穿过侵袭小室微孔膜的细胞数明显高于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图3。



a:细胞侵袭实验检测MG-63细胞侵袭能力(结晶紫染色 ×200);b:侵袭实验结果统计分析 *:与其他两组比较,$P<0.05$

图3 转染miR-10b mimic对MG-63细胞侵袭能力的影响

2.4 过表达 miR-10b 促进骨肉瘤细胞系增殖

采用 MTT 法检测过表达 miR-10b 对 MG-63 细胞增殖能力的影响。结果显示:阴性对照组和空白对照组 MG-63 细胞增殖无明显差异。与阴性对照组相比,miR-10b 过表达组的增殖能力显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.5 过表达 miR-10b 促进 Twist 基因表达

转染 miR-10b mimic 后 48 h 提取细胞总蛋白,采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 miR-10b 过表达对 Twist mRNA 和蛋白表达的影响。结果显示,与空白对照组和阴性对照组相比,转染 miR-10b mimic 后的 MG-63 细胞的 Twist mRNA 和蛋白表达水平均显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

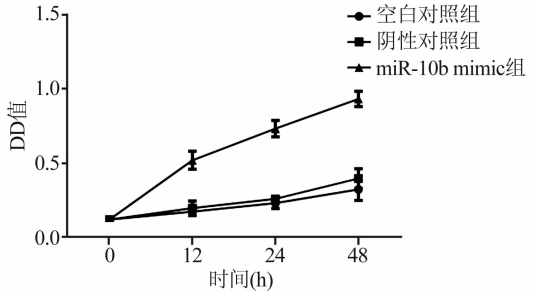
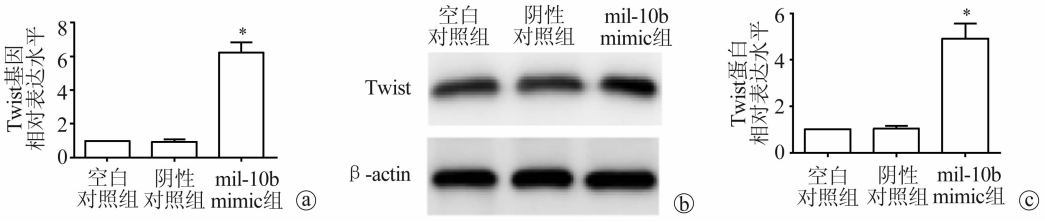


图 4 转染 miR-10b mimic 对 MG-63 细胞增殖能力的影响



a:RT-PCR 检测 Twist mRNA 表达;b:Western blot 检测 Twist 蛋白表达;c:Western blot 结果定量分析 *:与其他两组比较,$P<0.05$

图 5 转染 miR-10b mimic 对 MG-63 细胞 Twist mRNA 和蛋白表达的影响

2.6 靶向沉默 Twist 对 miR-10b 调节的 MG-63 细胞增殖与侵袭能力的影响

在转染 miR-10b mimic 的 MG-63 细胞中同时转染 Twist siRNA。MTT 实验结果显示:Twist siRNA 和 miR-10b mimic 同时转染 MG-63 细胞 48 h 后,其细胞增殖能力明显低于 miR-10b mimic 和 siRNA-NC 转染的 MG-63 细胞,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 6。Transwell 侵袭实验结果显示:Twist siRNA 和 miR-10b mimic 同时转染 MG-63 细胞 48 h 后,穿过侵袭小室微孔膜的细胞数明显低于 miR-10b mimic 和 siRNA-NC 转染的 MG-63 细胞,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 7。

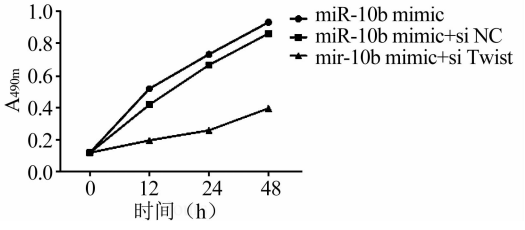
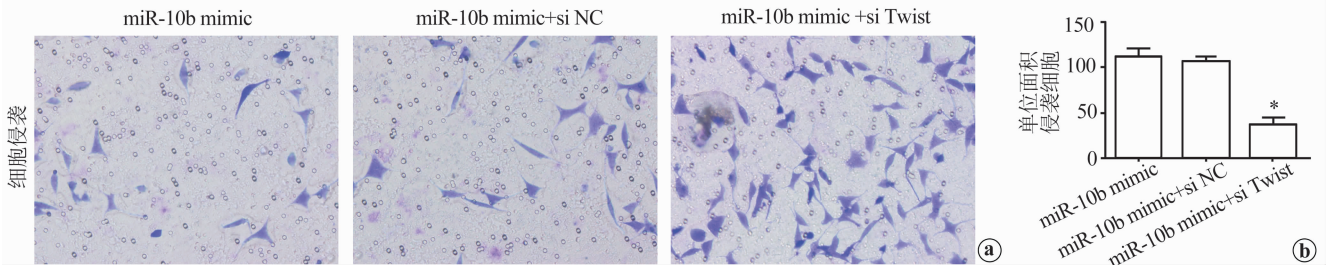


图 6 MTT 实验检测细胞增殖能力



a:细胞侵袭实验检测 MG-63 细胞侵袭能力(×400);b:侵袭实验结果统计分析 *:与其他两组比较,$P<0.01$

图 7 Twist siRNA 对 miR-10b mimic 调节的 MG-63 细胞侵袭与增殖能力的影响

3 讨论

骨肉瘤恶性程度高,预后差且容易发生肺部转移,临床上常采用手术联合放化疗的个体化综合治疗方案,但患者的治疗效果与预后情况仍旧差强人意[9-10]。因此,有学者提出骨肉瘤的治疗应从基因水平着手,寻求骨肉瘤具有高度特异性的治疗靶点是研究的核心[2, 11]。近年来研究表明 miRNA 具有广泛的基因调节功能,能够从多个层面对下游靶基因进行调控,进而对一系列生物学进程产生影响,如胚胎早期发育、细胞增殖、凋亡以及侵袭转移等。miRNA 是一类内源性生成、长度大概为 20 ~ 24 个核苷酸的小 RNA,是发夹结

构的 70～90 个碱基大小的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工后生成[12-13]。日益增多的研究表明 miR-10b 的异常表达可能参与了包括骨肉瘤在内的人类多种恶性肿瘤疾病的发病过程[14-19]。有学者研究 miRNA 在骨肉瘤的发生、发展中的作用,认为骨肉瘤的生物学行为和一些 miRNA 家族成员有密切的关系。Ma 等[14]发现过表达 miR-10b 能够促进 TGF-β1 介导的胶质母细胞瘤增殖、侵袭和上皮间质转化发生。在乳腺癌中淋巴结阳性组和 Ki-67 高评分组中 miR-10b 均呈现高表达,其可作为乳腺癌临床诊断标记物和新型治疗靶点[15-16]。在髓母细胞瘤中,miR-10b 表达异常升高且能促进细胞增殖与存活[17]。在非小细胞肺癌和子宫内膜癌中 miR-10b 能够促进肿瘤细胞增殖与侵袭,从而促进恶性肿瘤的进展[18-19]。在本研究中,我们首先收集骨肉瘤临床标本组织和相应的癌旁正常组织,在组织水平检测骨肉瘤发病过程中是否存在 miR-10b 的异常表达,结果显示与邻近癌旁组织相比,骨肉瘤组织中的 miR-10b 表达显著升高。然而目前对于 miR-10b 在骨肉瘤中的表达变化尚存在争议。Roberto 等[20]发现 miR-10b 在骨肉瘤组织中是下调的,作为一个肿瘤抑制因子参与骨肉瘤发病过程的调控。因此,为了解目前存在的争议,我们在以后的研究中将进一步扩大骨肉瘤组织标本的样本量进行验证。

Twist 基因的核苷酸和氨基酸序列高度保守,属于碱性螺旋－环－螺旋(basic helix-loop-helix,bHLH)转录因子家族,人 Twist 基因位于染色体的 7p21.2,含有 2 个外显子和 1 个内含子,mRNA 全长 1 669 bp。既往研究显示 Twist 在胚胎发育中具有重要作用,Twist 也参与了多种恶性肿瘤发病的全过程,与恶性肿瘤侵袭、转移关系密切[21-22]。近年来研究者发现 Twist 与多种肿瘤的发生发展密切相关,如前列腺癌、肝细胞癌、非小细胞肺癌以及骨肉瘤等,Twist 在这些肿瘤组织中均呈现异常高表达[23-28]。有研究表明 Twist 作为多种 microRNA 的下游调控靶基因,能够通过进一步调控下游靶基因对一系列诸如细胞增殖、分化、凋亡、侵袭等生物学事件进行干预,最终影响多种肿瘤的发生发展。在卵巢上皮癌中 miR-219-5p 通过靶向调控 Twist/Wnt/β-catenin 信号通路来抑制细胞增殖、迁移和侵袭[29]。在乳腺癌中 miR-373 通过激活 HIF-1α-Twist 轴来促进乳腺癌细胞上皮间质转化和远处侵袭转移[30]。但是在骨肉瘤中,miR-10b 是否参与发病及其在骨肉瘤细胞的侵袭中的作用及分子机制目前尚未见报道。因此,我们进一步检测了 miR-10b mimic 对 Twist 表达的影响。本研究显示,与空白对照组和转染阴性对照质粒组相比,转染 miR-10b 的骨肉瘤 MG-63 细胞 Twist mRNA 和蛋白表达均显著增高,同时伴随着细胞增殖、侵袭能力均明显增强,提示 miR-10b 可能通过上调 Twist 基因的表达进而影响骨肉瘤的进展。我们进一步采用 Twist siRNA 干预,结果显示 Twist siRNA 能够显著减弱 miR-10b mimic 上调介导的骨肉瘤 MG-63 细胞增殖与侵袭,表明 Twist 在 miR-10b 介导的骨肉瘤 MG-63 细胞增殖与侵袭中发挥重要作用。既往研究发现 Twist 基因可作为多种不同 miRNA 的下游靶基因并受上游 miRNA 的调控,从而参与多种类型肿瘤的发病[31-32]。而 Twist 作为 miR-10b 的下游调控基因参与骨肉瘤细胞增殖与侵袭的调控目前是首次发现。因此,基于以上研究我们推测 miR-10b 可能通过激活 Twist 信号通路调控下游靶基因转录激活,从而促进骨肉瘤细胞 MG-63 的异常增殖和远处侵袭转移,最终导致骨肉瘤的发生发展。

综上所述,本研究发现骨肉瘤组织中 miR-10b 的表达上调,可能通过激活 Twist 基因促进骨肉瘤细胞的远处侵袭转移和异常增殖。因此,深入研究 miR-10b 和 Twist 基因在人类骨肉瘤发生、发展中的作用及其调节机制,通过靶向拮抗 miR-10b 和 Twist 基因相关分子,从而抑制肿瘤细胞的侵袭转移和增殖,这将为骨肉瘤的特异性治疗提供新的思路和依据。

[参考文献]

[1] Harrison DJ, Geller DS, Gill JD, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2018, 18(1): 39－50. doi: 10.1080/14737140.2018.1413939.

[2] Gianferante DM, Mirabello L, Savage SA. Germline and somatic genetics of osteosarcoma-connecting aetiology, biology and therapy[J]. Nat Rev Endocrinol, 2017, 13(8): 480－491. doi: 10.1038/nrendo.2017.16.

[3] Lin YH, Jewell BE, GIngold J, et al. Osteosarcoma: molecular pathogenesis and iPSC modeling[J]. Trends Mol Med, 2017, 23(8): 737－755. doi: 10.1016/j.molmed.2017.06.004.

[4] Koshizuka K, Hanazawa T, Fukumoto I, et al. The microRNA signatures: aberrantly expressed microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma [J]. J Hum Genet, 2017, 62(1): 3－13. doi: 10.1038/jhg.2016.105.

[5] Witwer KW, Halushka MK. Toward the promise of microRNAs-Enhancing reproducibility and rigor in microRNA research[J]. RNA Biol, 2016, 13(11): 1103－1116. doi: 10.1080/15476286.2016.1236172.

[6] Biagioni F, Bossel Ben-Moshe N, Fontemaggi G, et al. The locus of microRNA-10b: a critical target for breast cancer insurgence and dissemination[J]. Cell Cycle, 2013, 12(15): 2371－2375. doi: 10.4161/cc.25380.

[7] Huang Q, Song Q, Zhong W, et al. MicroRNA-10b and the clinical outcomes of various cancers: a systematic review and meta-analysis[J].

Clin Chim Acta, 2017, 474:14 - 22. doi: 10.1016/j.cca.2017.08.034.

[8] Wang J, Wang B, Chen LQ, et al. miR-10b promotes invasion by targeting KLF4 in osteosarcoma cells[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84:947 - 953. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.108.

[9] Bishop MW, Janeway KA, Gorlick R. Future directions in the treatment of osteosarcoma[J]. Curr Opin Pediatr, 2016, 28(1): 26 - 33. doi: 10.1097/MOP.0000000000000298.

[10] Ferrari S, Serra M. An update on chemotherapy for osteosarcoma[J]. Expert Opin Pharmacother, 2015, 16(18): 2727 - 2736. doi: 10.1517/14656566.2015.1102226.

[11] Dass CR, Choong PF. Gene therapy for osteosarcoma: steps towards clinical studies [J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(4): 405 - 413. doi: 10.1211/jpp.60.4.0001.

[12] Piletic K,Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease[J]. Arch Toxicol,2016,90(10):2405 - 2419. doi:10.1007/s00204 - 016 - 1815 - 7.

[13] Zou Q, Li J, Song L, et al. Similarity computation strategies in the microRNA-disease network: a survey [J]. Brief Funct Genomics, 2016, 15(1): 55 - 64. doi: 10.1093/bfgp/elv024.

[14] Ma C, Wei F, Xia H, et al. MicroRNA-10b mediates TGF-beta1-regulated glioblastoma proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition [J]. Int J Oncol, 2017, 50(5):1739 - 1748. doi: 10.1016/j.cppeds.2016.04.002.

[15] Wang N, Chen P, Huang LP, et al. Prognostic significance of microRNA-10b overexpression in breast cancer: a meta-analysis [J]. Genet Mol Res, 2016, 15(2):7350. doi: 10.4238/gmr.15027350.

[16] Zhang J, Yang J, Zhang X, et al. MicroRNA-10b expression in breast cancer and its clinical association[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0192509. doi: 10.1371/journal.pone.0192509.

[17] Pal R, Greene S. microRNA-10b is overexpressed and critical for cell survival and proliferation in medulloblastoma[J]. PLoS One, 2015, 10(9):e0137845. doi: 10.1371/journal.pone.0137845.

[18] Chen H, Fan Y, Xu W, et al. miR-10b inhibits apoptosis and promotes proliferation and invasion of endometrial cancer cells via targeting HOXB3[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2016, 31(6): 225 - 231. doi: 10.1089/cbr.2016.1998.

[19] Liu Y, Li M, Zhang G, et al. MicroRNA-10b overexpression promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion [J]. Eur J Med Res, 2013, 18:41. doi: 10.1186/2047 - 783X - 18 - 41.

[20] Roberto GM, Engel EE, Scrideli CA, et al. Downregulation of miR-10B is correlated with altered expression of mitotic kinases in osteosarcoma[J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(2): 213 - 216. doi: 10.1016/j.prp.2017.11.020.

[21] Barnes RM, Firulli AB. A twist of insight-the role of Twist-family bHLH factors in development[J]. Int J Dev Biol,2009,53(7):909 - 924. doi: 10.1387/ijdb.082747rb.

[22] Wushou A, Hou J, Zhao YJ, et al. Twist-1 up-regulation in carcinoma correlates to poor survival[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(12): 21621 - 21630. doi: 10.3390/ijms151221621.

[23] Gajula RP, Chettiar ST, Williams RD, et al. The twist box domain is required for Twist1-induced prostate cancer metastasis[J]. Mol Cancer Res, 2013, 11(11):1387 - 1400. doi: 10.1158/1541 - 7786.MCR - 13 - 0218 - T.

[24] Raatikainen S, Aaltomaa S, Palvimo JJ, et al. TWIST overexpression predicts biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients treated with radical prostatectomy [J]. Scand J Urol, 2015, 49(1):51 - 57. doi: 10.3109/21681805.2014.909529.

[25] Wang LT, Chiou SS, Chai CY, et al. Transcription factor SPZ1 promotes TWIST-mediated epithelial-mesenchymal transition and oncogenesis in human liver cancer[J]. Oncogene, 2017, 36(31):4405 - 4414. doi: 10.1038/onc.2017.69.

[26] Wei L, Sun JJ, Cui YC, et al. Twist may be associated with invasion and metastasis of hypoxic NSCLC cells [J]. Tumour Biol, 2016, 37(7):9979 - 9987. doi: 10.1007/s13277 - 016 - 4896 - 2.

[27] Yin K, Liao Q, HE H, et al. Prognostic value of twist and E-cadherin in patients with osteosarcoma[J]. Med Oncol, 2012, 29(5):3449 - 3455. doi: 10.1007/s12032 - 012 - 0317 - 6.

[28] Wu J, Liao Q, He H, et al. TWIST interacts with beta-catenin signaling on osteosarcoma cell survival against cisplatin[J]. Mol Carcinog, 2014, 53(6):440 - 446. doi: 10.1016/j.mc.2013.07.012.

[29] Wei C, Zhang X, He S, et al. MicroRNA-219-5p inhibits the proliferation, migration, and invasion of epithelial ovarian cancer cells by targeting the Twist/Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Gene, 2017, 637:25 - 32. doi: 10.1016/j.gene.2017.09.012.

[30] Chen D, Dang BL, Huang JZ, et al. MiR-373 drives the epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via the miR-373-TXNIP-HIF1alpha-TWIST signaling axis in breast cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(32): 32701 - 32712. doi: 10.18632/oncotarget.4702.

[31] Liu X, Tian XD, Liu Y, et al. Regulation of Twist in the metastasis of non-small cell lung cancer by miR-92b[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(19): 4003 - 4010.

[32] Zhao N, Sun BC, Zhao XL, et al. Changes in microRNAs associated with Twist-1 and Bcl-2 overexpression identify signaling pathways [J]. Exp Mol Pathol, 2015, 99(3):524 - 532. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.08.018.

(编辑:陈庆利)