

# miR-19a-3p 靶向调控 CCND1 基因介导 FrA-1 /IL-6/Stat3 信号通路对乳腺癌侵袭转移的作用机制

陈秀迎<sup>1</sup>, 王洪远<sup>2</sup>

**【摘要】** 目的 探究 miR-19a-3p 靶向 CCND1 基因介导 FrA-1 /IL-6/Stat3 通路对乳腺癌侵袭转移的作用机制。方法 癌细胞分组转染(空白组、阴性对照组、miR-19a-3p mimic 组、siRNA-CCND1 组、miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 组)。分别应用 qRT-PCR、Western blot、MTT、划痕实验和 Transwell 侵袭实验检测相关基因 mRNA 和蛋白表达及细胞生物学行为变化趋势。结果 人乳腺癌组织和细胞中 CCND1 和 FrA-1 的表达明显上升,而 miR-19a-3p 明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与空白组和阴性对照组相比,另外 3 组的 miR-19a-3p、CCND1、FrA-1 表达水平均上调( $P < 0.05$ ),miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 组中上调更为明显( $P < 0.05$ )。各组细胞在 24 h 时无明显差异。48 h 和 96 h 各组细胞增殖能力均提高。空白组与阴性对照组细胞增殖能力相比无明显差异。另外 3 组的细胞增殖能力均明显增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但 miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 组中细胞增殖变化趋势较弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与空白组和阴性对照组相比,另外 3 组细胞迁移、侵袭能力均减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且 miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 组迁移、侵袭能力最弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 miR-19a-3p 在乳腺癌中呈下降趋势,上调 miR-19a-3p 可有效抑制 CCND1 基因表达和 FrA-1 /IL-6/Stat3 通路激活,从而降低乳腺癌细胞侵袭转移。

**【关键词】** miR-19a-3p; CCND1; FrA-1 /IL-6/Stat3 信号通路; 乳腺癌; 侵袭转移

**【中国图书分类号】** R339.2

DOI:10.14010/j.cnki.wjyx.2019.08.004

## Effect of targeting regulation of CCND1 gene-mediated FrA-1 /IL-6/Stat3 signaling pathway by MiR-19a-3p on invasion and metastasis of breast cancer

CHEN Xiuying<sup>1</sup> and WANG Hongyuan<sup>2</sup>. 1. Department of Mammary Glands, 2. Department of Pathology, Maternal and Child Health Hospital, Rizhao, 276800, China

**【Abstract】 Objective** To explore the potential mechanism by which regulation of FrA-1 /IL-6/Stat3 signaling pathway by miR-19a-3p targeting CCND1 genes affects the invasion and metastasis of breast cancer. **Methods** Tumor cells were grouped and transfected (blank group, negative control group, miR-19a-3p mimic group, miR-19a-3p inhibitor group, siRNA-CCND1 group, and miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 group). Quantitative RT-PCR, Western blot, MTT, scratch test and Transwell invasion test were used to detect the expressions of related genes and proteins, as well as the changes of biological behavior of cells. **Results** The expressions of CCND1 and FrA-1 in human breast cancer tissues and cells increased, while the expression of miR-19a-3p decreased significantly, and there was significant difference between these groups (All  $P < 0.05$ ). Compared with the blank group and negative control group, the expression level of miR-19a-3p in the miR-19a-3p mimic group and siRNA-CCND1 group increased significantly, while CCND1 and FrA-1 decreased significantly, and cell proliferation, migration, invasion and metastasis decreased (All  $P < 0.05$ ). The expression levels of CCND1 and FrA-1 in the miR-19a-3p inhibitor group increased, but the level of miR-19a-3p decreased, and the ability of proliferation, migration, invasion and metastasis increased significantly (All  $P < 0.05$ ). In addition, the above-mentioned changes were more significant in the miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 group than in the miR-19a-3p mimic group and siRNA-CCND1 group, and there was significant difference between these groups (All  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Down-regulation of miR-19a-3p is detected in breast cancer and up-regulation of miR-19a-3p can effectively contain the invasion and metastasis of breast cancer cells by inhibiting the expression of CCND1 genes and activating FrA-1 /IL-6/Stat3 pathway.

**【Key words】** miR-19a-3p; CCND1; FrA-1 /IL-6/Stat3 signaling pathway; breast cancer; invasion and metastasis

乳腺癌主要诱发因素为恶变内皮细胞增殖失控

和癌细胞转移<sup>[1]</sup>。既往研究已对 microRNA 展开深入研究,证实其既可发挥促癌作用亦存在抑癌作用<sup>[2]</sup>,且部分 microRNA 可同时兼具以上两种作用<sup>[3]</sup>。在调节癌细胞生物学特性上具有显著影响,因而在临床诊断和肿瘤预测以及靶向治疗方向作用

作者简介:陈秀迎 本科学历 副主任医师。

作者单位:1. 276800 山东省日照市妇幼保健院乳腺科;

2. 262330 山东省日照市中医医院病理科

通讯作者:王洪远 E-mail: 18763315089@163.com

明显。大量研究已报道 microRNA 参与诸如头颈部、消化道、泌尿生殖系统肿瘤等<sup>[4-6]</sup>,但其分子机制仍未全可知。miR-19a-3p 作为抑癌基因,在前列腺癌、胃癌等中有相关报道<sup>[7-8]</sup>。同时,细胞周期蛋白 CCND1 在非小细胞肺癌、乳腺癌中为阳性表达<sup>[9,10]</sup>。鉴于此,本研究通过采集组织样本和培养细胞系,基于与乳腺癌相关靶基因和信号通路的预测,探究 miR-19a-3p 靶向 CCND1 基因介导 FrA-1/IL-6/Stat3 通路对乳腺癌上皮间质转化的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集日照市妇幼保健院病理科 2017-01 至 2018-07 女性乳腺癌标本 60 例。年龄 28~76 岁,中位年龄 56.2 岁。所有样本经医院伦理委员会批准通过。标本离体后,一部分立即放入液氮冷冻,−80℃超低温冰箱贮存备用;另一部分固定于 1% 中性甲醛溶液中,常规石蜡包埋,4 μm 厚切片,保存备用。采用苏木精伊红染色法(HE 染色)观察乳腺癌组织及癌旁组织的病理学变化。

1.1.2 细胞及培养 选取人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 和乳腺癌细胞株 MCF7,均购自上海中科院细胞所。人乳腺上皮细胞 MCF-10A 和乳腺癌细胞株 MCF7 均用含 10% 小牛血清、10 μg/ml 链霉素和 100 U/ml 青霉素的 DMEM 培养液(Gibco 公司,USA)培养。常规培养过程中观察细胞生长状态,并依据实际情况进行换液操作。

1.1.3 人乳腺癌细胞转染及分组 细胞处于对数期时,采用胰蛋白酶消化细胞常规培养,按转染物不同分为:空白组(空白处理)、阴性对照组(阴性质粒)、siRNA-CCND1 组(siRNA)、miR-19a-3p mimic 组(mimic 质粒)、miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 组(共转染)。转染物 miR-19a-3p mimic, siRNA-CCND1 质粒均购自上海吉玛公司。

### 1.2 方法

1.2.1 生物学数据库检索乳腺癌相关基因及信号通路 通过生物学数据库检索得到乳腺癌相关基因及相关代谢通路,分别确定为 CCND1 基因和 FrA-1/IL-6/Stat3 通路。在 TargetScan 数据库检索 CCND1 的调控 miRNA 为 miR-19a-3p。

1.2.2 qRT-PCR 检测 取乳腺癌组织和癌旁组织,加 TRIzol(Invitrogen 公司,USA)经 3000 r/min,离心 10 min 取上清,提取总 RNA;采用紫外光检测 RNA 纯度后将抽提的 RNA 进行反转录;反转录所

得 cDNA 为 PCR 实验模板,对目的基因进行定量 PCR 扩增;实时荧光定量 PCR 应用 AB7300 型实时定量 PCR 仪器(购于上海艾研生物科技有限公司,上海,中国)。本实验以 GAPDH 作为内参照基因。PCR 扩增完成后,通过比较 Ct 法统计实验结果,此方法同样适用于细胞实验。

1.2.3 Western Blot 检测 待测组织加入冰上预冷的组织裂解液,置于冰上进行裂解;Bradford 法测定蛋白浓度;实验采用一抗为兔多克隆抗体 CCND1、β-catenin、FrA-1;已标记二抗。Western blot 所用抗体均购于 abcam 公司(剑桥,英国)。采用增强化学发光法检测蛋白表达(ECL 试剂盒;购于武汉博士德生物技术公司)。此方法同样适用细胞蛋白表达水平检测。

1.2.4 MTT 实验 按 MTT 常规操作程序,取对数生长期的细胞进行转染和培养(培养观察时间点为 24、48、96 h),并依次加入各培养液继续培养;并在培养结束前加入 20 μl MTT 溶液(Sigma 公司,USA),继续培养 4 h 后弃上清并加入 160 μl DMSO(Sigma 公司,USA)。应用全自动酶标仪(济南正荣医疗器械有限公司)测定各孔波长 490 nm 处的吸光值(OD 值)。

1.2.5 细胞迁移和侵袭实验 按划痕实验常规操作程序,取合适细胞株制备单细胞悬液,接种操作置于 CO2 培养箱(扬州恒都电子科技有限公司)常规培养 24 h。之后应用高压灭菌枪头在贴壁细胞培养板孔板中心轴处划痕。继续培养,采用倒置显微镜(重庆光学仪器厂)观察细胞情况并计算细胞相对迁移率。按 Transwell 侵袭实验常规操作程序,分别于小室加入相应实验液,37℃下培养 24 h、离心及结晶紫染色,显微镜下观察并在实验后期进行贴壁细胞的计数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析。计数资料采用 % 表示,采用  $\chi^2$  检验进行分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 乳腺癌组织及癌旁组织 HE 染色结果 乳腺癌癌旁正常结缔组织较多,成纤维细胞增生,纤维间质稍有增生,但细胞无明显异型性,分化较好;乳腺癌组织细胞排列混乱,癌细胞大量增生,癌巢中央可见大小各异的坏死、淋巴细胞浸润,细胞发生分化,

核深染,核分裂象增多,有明显核仁(图1)。

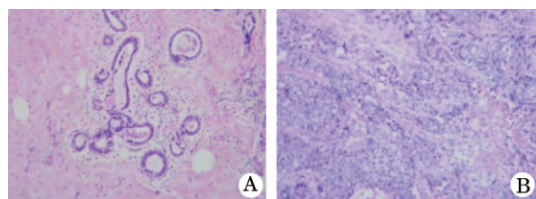


图1 乳腺癌组织及癌旁组织病理结果(HE,  $\times 100$ )

A. 乳腺癌癌旁组织; B. 乳腺癌组织

2.2 人乳腺癌组织和癌旁组织中 FrA-1/IL-6/Stat3 通路相关基因 mRNA 和蛋白表达水平 qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,人乳腺癌组织中 CCND1、FrA-1 的 mRNA 和蛋白表达均呈高表达,其表达水平明显高于癌旁组织( $P < 0.05$ );而 qRT-PCR 提示人乳腺癌组织中 miR-19a-3p 表达水平显著低于癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$  表 1)。

表1 人乳腺癌组织和癌旁组织中相关基因 mRNA

和蛋白表达水平差异 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	癌组织	癌旁组织
miR-19a-3p mRNA	$0.23 \pm 0.11^{①}$	$0.98 \pm 0.34$
CCND1		
mRNA	$1.43 \pm 0.33^{①}$	$0.62 \pm 0.29$
蛋白	$1.82 \pm 0.45^{①}$	$0.47 \pm 0.36$
FrA-1		
mRNA	$1.11 \pm 0.32^{①}$	$0.58 \pm 0.21$
蛋白	$0.81 \pm 0.27^{①}$	$0.22 \pm 0.09$

注:与癌旁组织比较 ① $P < 0.05$

2.3 各组细胞转染后相关基因的 mRNA 和蛋白表达水平 qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,空白组与阴性对照组差异无统计学意义。与空白组和阴性对照组相比,另外 3 组的 miR-19a-3p、CCND1、FrA-1 表达水平均上调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 组中上调更为明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$  表 2)。

表2 乳腺癌各组细胞转染后相关基因的 mRNA 和蛋白表达水平差异

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-19a-3p	CCND1		FrA-1	
	mRNA	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
空白组	$0.33 \pm 0.10$	$0.45 \pm 0.13$	$0.38 \pm 0.21$	$0.37 \pm 0.11$	$0.41 \pm 0.20$
阴性对照组	$0.39 \pm 0.12$	$0.48 \pm 0.16$	$0.40 \pm 0.20$	$0.38 \pm 0.10$	$0.43 \pm 0.19$
miR-19a-3p mimic 组	$0.87 \pm 0.30^{①}$	$0.88 \pm 0.32^{①}$	$1.01 \pm 0.52^{①}$	$0.92 \pm 0.31^{①}$	$1.22 \pm 0.35^{①}$
siRNA-CCND1 组	$0.90 \pm 0.32^{①}$	$0.83 \pm 0.40^{①}$	$1.10 \pm 0.47^{①}$	$0.89 \pm 0.33^{①}$	$1.26 \pm 0.29^{①}$
miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 组	$1.89 \pm 0.45^{①②}$	$2.00 \pm 0.57^{①②}$	$1.95 \pm 0.38^{①②}$	$1.79 \pm 0.34^{①②}$	$2.12 \pm 0.43^{①②}$

注:与空白组和阴性对照组比较 ① $P < 0.05$ ;与 miR-19a-3p mimic 组和 siRNA-CCND1 组比较 ② $P < 0.05$

2.4 miR-19a-3p 靶向 CCND1 对乳腺癌细胞增殖的影响 MTT 法观察结果显示,各组细胞在 24 h 时无明显差异。48 h 和 96 h 各组细胞增殖能力均提高。空白组与阴性对照组细胞增殖能力相比无明显差异。另外三组的细胞增殖能力均明显增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但 miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 组中细胞增殖变化趋势较弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$  表 3)。

2.5 miR-19a-3p 靶向 CCND1 对乳腺癌细胞迁移和侵袭的影响 空白组与阴性对照组细胞迁移、侵袭能力差异无统计学意义。与空白组和阴性对照组相比,另外三组细胞迁移、侵袭能力均减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且 miR-19a-3p mimic +

siRNA-CCND1 组迁移、侵袭能力最弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$  表 4)。

表3 miR-19a-3p 靶向 CCND1 对乳腺癌各组细胞

增殖能力变化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	96 h
空白组	$0.43 \pm 0.12$	$0.50 \pm 0.17$	$0.56 \pm 0.18$
阴性对照组	$0.40 \pm 0.18$	$0.53 \pm 0.14$	$0.61 \pm 0.20$
miR-19a-3p mimic 组	$0.37 \pm 0.14$	$0.78 \pm 0.24^{①}$	$0.81 \pm 0.23^{①}$
siRNA-CCND1 组	$0.38 \pm 0.15$	$0.81 \pm 0.22^{①}$	$0.84 \pm 0.19^{①}$
miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 组	$0.41 \pm 0.14$	$0.63 \pm 0.22^{①②}$	$0.70 \pm 0.17^{①②}$

注:与空白组和阴性对照组比较 ① $P < 0.05$ ;与 miR-19a-3p mimic 组和 siRNA-CCND1 组比较 ② $P < 0.05$

表 4 miR-19a-3p 靶向 CCND1 对乳腺癌各组细胞迁移和侵袭能力变化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ; %)

组别	迁移	侵袭
空白组	72.24 ± 22.00	68.19 ± 23.12
阴性对照组	74.80 ± 21.45	66.43 ± 24.90
miR-19a-3p mimic 组	50.16 ± 18.18 <sup>①</sup>	51.25 ± 20.14 <sup>①</sup>
siRNA-CCND1 组	54.35 ± 20.65 <sup>①</sup>	48.76 ± 19.27 <sup>①</sup>
miR-19a-3p mimic + siRNA-CCND1 组	41.41 ± 17.43 <sup>①②</sup>	36.72 ± 18.16 <sup>①②</sup>

注:与空白组和阴性对照组比较 ① $P < 0.05$ ;与 miR-19a-3p mimic 组和 siRNA-CCND1 组比较 ② $P < 0.05$

### 3 讨 论

Kong 等<sup>[11]</sup>发现,miR-27a 可通过负向调控 SFRP1 基因,激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,促进乳腺癌细胞增殖迁移等。Imani S 等<sup>[12]</sup>亦报道 miR-34a 靶向 EMT-TFs,抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭。本研究选取高度保守 microRNA,miR-19a-3p 首先推断其可能具有抑制癌细胞转移的功能。根据前期临床标本的 PCR 和 Western blot 证明了我们的初步假设;同时,CCND1 基因是近年来已确认的癌基因,与人类肿瘤关系密切<sup>[13,14]</sup>,且已证实在乳腺癌中异常表达<sup>[15]</sup>。为进一步确认其上下游作用机制,本研究通过人体组织样本和细胞系培养实验,发现 miR-19a-3p 乳腺癌中表达下降,CCND1 和 Fra-1 表达则呈上升趋势;进一步细胞实验验证上升 miR-19a-3p 可有效抑制 CCND1 表达和 Fra-1 表达,抑制乳腺癌细胞侵袭转移。本研究结果这一关联机制的发现,提示 miR-19a-3p 可能通过靶向抑制 CCND1,调控 Fra-1/IL-6/Stat3 信号通路,抑制 Fra-1/IL-6/Stat3 通路激活,伴随体外乳腺癌细胞实验中侵袭转移能力的下降,从肿瘤微环境上影响癌细胞发展进程。文献<sup>[16]</sup>发现下调 miR-19a-3p 有助于通过激活 TGF- $\beta$  信号促进前列腺癌细胞的侵袭、迁移和骨转移;张智勇等<sup>[8]</sup>发现 miR-19a-3p 可下降 SEMA4C 表达从而抑制胃癌细胞的增殖、侵袭。类似研究进一步支持本文假设推理,有助于通过癌细胞转染探究乳腺癌侵袭转移分子机制,为乳腺癌分子靶向治疗提供潜在实验依据。

Fra-1/IL-6/Stat3 信号通路是影响肿瘤相关巨噬细胞表型的主要通路之一,后者在肿瘤微环境中具有巨大的潜能<sup>[17,18]</sup>。巨噬细胞具有极强的异质性和可塑性。在恶性竞争的肿瘤微环境中,巨噬细胞可形成其独特表型,从而发挥促癌作用。本研究通

过质粒转染,以 miR-19a-3p 表达上升,抑制 Fra-1 表达。Fra-1 已证实是一类原癌基因,在包括乳腺癌在内的众多癌症中异常表达<sup>[19]</sup>。提示其可作为乳腺癌靶向治疗的重要靶点。我们推测 Fra-1 表达沉默可能进一步抑制巨噬细胞表型,干扰血管新生的形成,抑制下有信号通路,从而逆转肿瘤细胞增殖等行为的改变。

总之,本研究创新之处在于通过借助生物信息学技术和分子生物学方法,寻找潜在癌症相关靶点,确认 miR-19a-3p 可抑制 CCND1 基因表达和 Fra-1/IL-6/Stat3 通路激活,降低乳腺癌细胞侵袭转移。下一步研究可借助生物信息学技术,系统筛选其他与乳腺癌相关的信号通路和靶基因,并通过体内外研究及动物实验探究靶基因相关众多 microRNAs 的作用和功能,从而为乳腺癌靶向治疗提供全面的分子生物学证据。

### 【参考文献】

- [1] 姚文莲,徐 薪. 原子力显微镜对结合 HER-2 后乳腺癌细胞膜的观察[J]. 武警医学,2017,28(8):799-803.
- [2] Rupaimoole R, Slack F J. Micro RNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nat Rev Drug Discov,2017,16(3):203.
- [3] Fisher J N, Terao M, Fratelli M, et al. MicroRNA networks regulated by all-trans retinoic acid and Lapatinib control the growth, survival and motility of breast cancer cells[J]. Oncotarget,2015,6(15):13176-13200.
- [4] Salazar C, Nagadia R, Pandit P, et al. A novel saliva-based micro RNA biomarker panel to detect head and neck cancers[J]. Cell Oncol,2014,37(5):331-338.
- [5] Cao Q, Liu F, Ji K, et al. Micro RNA-381 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting TMEM16A expression[J]. J Exp Clin Cancer Res,2017,36(1):29.
- [6] Luo H, Yang R, Li C, et al. Micro RNA-139-5p inhibits bladder cancer proliferation and self-renewal by targeting the Bmi1 oncogene[J]. Tumour Biol,2017,39(7):1014.
- [7] Wa Q, Li L, Lin H, et al. Downregulation of miR-19a-3p promotes invasion, migration and bone metastasis via activating TGF- $\beta$  signaling in prostate cancer[J]. Oncol Rep,2018,39(1):81-90.
- [8] 张智勇,常虎林,郑 伟,等. hsa-miR-19a-3p 下降靶基因 SEMA4C 抑制胃癌细胞增殖、侵袭能力[J]. 现代肿瘤医学,2017,25(16):90-96.

- [9] Baykara O, Dalay N, Bakir B, *et al.* The EMSY gene collaborates with CCND1 in non-small cell lung carcinogenesis [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(7): 675-679.
- [10] Long J, Ou C, Xia H, *et al.* MiR-503 inhibited cell proliferation of human breast cancer cells by suppressing CCND1 expression. [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(11): 8697-8702.
- [11] Kong L Y, Xue M, Zhang Q C, *et al.* In vivo and in vitro effects of micro RNA-27a on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through targeting of SFRP1 gene via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 15507-15519.
- [12] Imani S, Wei C, Cheng J, *et al.* Micro RNA-34a targets epithelial to mesenchymal transition-inducing transcription factors (EMT-TFs) and inhibits breast cancer cell migration and invasion [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 21362-21379.
- [13] Petkevicius V, Salteniene V, Juzenas S, *et al.* Polymorphisms of micro RNA target genes IL12B, INSR, CCND1 and IL10 in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(19): 3480-3487.
- [14] 姜靖雯, 陈学武, 方唯意 等. miR-340 通过下降 CCND1 表达增加结肠癌细胞对 5-Fu 的耐药 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(5): 467-471.
- [15] 孙昌瑞, 邓 君, 江咏梅. 联合检测乳腺癌易感基因 1 与 Ccnd1 mRNA 在乳腺癌诊断中的应用研究 [J]. 实用医院临床杂志, 2014, 11(6): 67-69.
- [16] Wa Q, Li L, Lin H, *et al.* Downregulation of miR-19a-3p promotes invasion, migration and bone metastasis via activating TGF- $\beta$  signaling in prostate cancer [J]. *Oncology Reports*, 2018, 39(1): 81-90.
- [17] Chen X, Wang W, Man H, *et al.* Increased B7-H4 expression during esophageal squamous cell carcinogenesis is associated with IL-6/STAT3 signaling pathway activation in mice [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2207-2215.
- [18] 王 磊, 孟庆杰, 负 军 等. 乳腺癌中 Kif2a、HPK1 表达量与癌基因、耐药性基因表达的相关性 [J]. 海南医学院学报, 2018, 24(19): 56-59 64.
- [19] Zerbini L F, Wang Y, Cho J Y, *et al.* Constitutive activation of nuclear factor kappaB p50/p65 and Fra-1 and JunD is essential for deregulated interleukin 6 expression in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 22(1): 84-88.
- (2019-01-10 收稿 2019-05-20 修回)  
(责任编辑 刘冬妍)

(上接 656 页)

- [8] Lee K. Revealing power in truth: Comment on "Knowledge, moral claims and the exercise of power in global health" [J]. *Int J Health Policy Manag*, 2015, 4(4): 257-259.
- [9] 李范玲, 张惠佳, 李 欣 等. 生长痛患儿小腿肌肉表面肌电图研究 [J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(3): 311-314.
- [10] 白 磊. 儿童生长痛临床研究 [J]. 云南医药, 2016, 16(5): 489-491.
- [11] 陈小香, 谭 新, 邓伟民. 骨质疏松症患者骨密度与血清 25 羟维生素 D 的相关性研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(7): 851-855.
- [12] 田 越, 吴海霞, TianYue 等. 极低出生体重早产儿血清磷、骨碱性磷酸酶、25-羟基维生素 D 水平动态变化分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(11): 1288-1290.
- [13] 夏 黎, 崔县伟, 王 玉 等. 南京地区 0~5 岁儿童 25-羟基维生素 D 水平及其与季节的关系 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(19): 1470-1472.
- [14] 王 强, 周 翔, 李慧丽. 龙岗区 1~12 岁儿童血清 25-羟维生素 D 检测结果分析 [J]. 临床儿科杂志, 2015, 12(6): 570.
- [15] 田 谧, 李 远, 王 燕 等. 重庆市永川区 3~6 岁留守儿童 25-羟维生素 D 水平及其与维生素 D 受体基因 FOK I 位点多态性的相关性研究 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(5): 493-498.
- [16] 李毅中, 庄华烽, 郭良瑞 等. 骨密度和 25 羟维生素 D 在骨质疏松性髋部骨折的作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(12): 1457-1459.
- [17] 上官莉莉, 赵亚茹. 注意缺陷多动障碍患儿血清 25 羟基维生素 D 水平的检测 [J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(8): 837-840.
- [18] 武建文, 夏 经. 常见儿童肢体疼痛疾病的诊断与鉴别诊断 [J]. 中国实用儿科杂志, 2002, 19(12): 761-762.
- (2018-11-14 收稿 2019-04-20 修回)  
(责任编辑 武建虎)