

· 基础研究 ·

miR-17-92 基因簇对骨肉瘤细胞增殖侵袭的影响

吴岳, 要星辰, 史湘君, 徐子彧, 任杰, 时铭, 黎萌, 刘俊鹏, 杜心如*

(首都医科大学附属北京朝阳医院骨科, 北京 100020)

摘要: [目的] 探究 miR-17-92 基因簇对骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 细胞增殖、侵袭的影响及可能机制。[方法] qRT-PCR 检测 OS 细胞 MG-63 转染前 (MG-63 细胞)、人成骨细胞 hFOB1.19 (hFOB 细胞) 中的 miR-17-92 基因簇水平。分别对 MG-63 细胞行 miR-17-92 基因簇模拟物组转染 (miR-17-92 组) 与阴性对照转染 (miR-NC 组), 比较两组 miR-17-92 基因簇水平、细胞增殖水平及侵袭能力, 及转染后 MG-63 细胞转化生长因子- β 1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β 1)、Smad3、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9 蛋白水平。[结果] MG-63 细胞的 miR-17 [(4.1 \pm 1.0) vs (1.2 \pm 0.3), P <0.05]、miR-18a [(2.3 \pm 0.5) vs (1.4 \pm 0.5), P <0.05]、miR-19a [(2.0 \pm 0.4) vs (1.3 \pm 0.4), P <0.05]、miR-19b [(2.1 \pm 0.4) vs (1.2 \pm 0.3), P <0.05]、miR-20 [(6.2 \pm 2.2) vs (1.4 \pm 0.4), P <0.05] 和 miR-92 [(5.1 \pm 1.9) vs (1.7 \pm 0.5), P <0.05] 相对表达量均显著高于 hFOB 细胞。miR-17-92 组的 miR-17 [(7.1 \pm 2.2) vs 4.1 \pm 1.3), P <0.05]、miR-18a [(3.6 \pm 0.6) vs (2.3 \pm 0.7), P <0.05]、miR-19a [(4.4 \pm 1.0) vs (2.1 \pm 0.5), P <0.05]、miR-19b [(4.6 \pm 1.0) vs (2.2 \pm 0.5), P <0.05]、miR-20 [(9.3 \pm 2.1) vs (6.2 \pm 2.0), P <0.05] 和 miR-92 [(8.7 \pm 2.3) vs (5.0 \pm 1.4), P <0.05] 相对表达量均显著高于 miR-NC 组; miR-17-92 组 OD450 值及侵袭细胞数均显著多于 miR-NC 组 (P <0.05); miR-17-92 组 TGF- β 1、Smad3、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平均显著高于 miR-NC 组 (P <0.05)。[结论] 骨肉瘤 MG-63 细胞中 miR-17-92 基因簇异常高表达, 可增强细胞增殖及侵袭能力, 其机制可能与其激活 TGF- β 1/Smad3/MMP-9 信号通路有关。

关键词: 骨肉瘤, miR-17-92 基因簇, 细胞增殖, 侵袭

中图分类号: R738.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2023) 17-1599-05

Effects of miR-17-92 gene cluster on proliferation and invasion of osteosarcoma cells // WU Yue, YAO Xing-chen, SHI Xiang-jun, XU Zi-yu, REN Jie, SHI Ming, LI Meng, LIU Jun-peng, DU Xin-ru. Department of Orthopedics, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China

Abstract: [Objective] To explore the effects of miR-17-92 gene cluster on proliferation and invasion of osteosarcoma (OS) cells and its possible mechanism. **[Methods]** The level of miR-17-92 gene cluster in OS MG-63 cells before transfection and human osteoblasts hFOB1.19 (hFOB cells) was detected by qRT-PCR. MG-63 cells were transfected with miR-17-92 gene cluster mimics (miR-17-92 group) and negative control transfection (miR-NC group), respectively. The levels of miR-17-92 gene cluster, cell proliferation and invasion ability of the two groups were compared. In addition, the transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), Smad3, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 protein levels were also measured and compared. **[Results]** The MG-63 cells had significantly higher relative expression level of miR-17 [(4.1 \pm 1.0) vs (1.2 \pm 0.3), P <0.05], miR-18a [(2.3 \pm 0.5) vs (1.4 \pm 0.5), P <0.05], miR-19a [(2.0 \pm 0.4) vs (1.3 \pm 0.4), P <0.05], miR-19b [(2.1 \pm 0.4) vs (1.2 \pm 0.3), P <0.05], miR-20 [(6.2 \pm 2.2) vs (1.4 \pm 0.4), P <0.05] and miR-92 [(5.1 \pm 1.9) vs (1.7 \pm 0.5), P <0.05] than the hFOB cells. After transfection, the miR-17-92 group had significantly higher relative expression level of miR-17 [(7.1 \pm 2.2) vs (4.1 \pm 1.3), P <0.05], miR-18a [(3.6 \pm 0.6) vs (2.3 \pm 0.7), P <0.05], miR-19a [(4.4 \pm 1.0) vs (2.1 \pm 0.5), P <0.05], miR-19b [(4.6 \pm 1.0) vs (2.2 \pm 0.5), P <0.05], miR-20 [(9.3 \pm 2.1) vs (6.2 \pm 2.0), P <0.05] and miR-92 [(8.7 \pm 2.3) vs (5.0 \pm 1.4), P <0.05] than the miR-NC group. In addition, the miR-17-92 group had significantly higher OD450 value and the number of invasive cells than the miR-NC group (P <0.05). Furthermore, the miR-17-92 group had significantly higher protein expression levels of TGF- β 1, Smad3, MMP-2 and MMP-9 than the miR-NC group (P <0.05). **[Conclusion]** The abnormally high expression of miR-17-92 gene cluster in osteosarcoma MG-63 cells can enhance cell proliferation and invasion, and its mechanism may be related to the activation of TGF- β 1/Smad3/MMP-9 signaling pathway.

Key words: osteosarcoma, miR-17-92 gene cluster, cell proliferation, invasion

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2023.17.12

作者简介: 吴岳, 主治医师, 研究方向: 骨肿瘤发病机制, (电话)13875893168, (电子信箱)wuyue_123wuyue@163.com

* 通信作者: 杜心如, (电话)13683156652, (电子信箱)duxinru@163.com

骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 多源于间叶组织, 在骨骼系统恶性肿瘤中发病率第一, 以青少年为主, 血行转移后患者5年存活率较低, 具有恶性程度高、预后差特点, 为临床难题^[1-3]。微小RNA (microRNA, miRNA) 被证实参与细胞生长、分化/裂、凋亡等过程, 在肿瘤诊断、预后评估中有重要作用^[4]; 不同肿瘤组织 miRNA 表达谱不一, miR-494 或基因蛋白等参与 OS 发病、进展^[5, 6]。miR-17-92 基因簇分布在人 13q31.3 染色体, 包括 miR-17、miR-18a、miR-19a/b 等共 7 个成熟 miRNA, 属于原癌基因 miRNA 代表, 参与多种恶性肿瘤发生、进展^[7, 8]。miR-17-92 基因簇被发现在人胃癌组织中高表达, 与肿瘤直径、TNM 分期有关; 其过表达可能通过上调 Integrin $\beta 1$ 表达、增强基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) -2 活性以促 MGC-803 细胞侵袭^[9]。有研究称 miR-17-92 基因簇对肿瘤发展起抑制作用, 有抑癌效应^[10]。可见关于 miR-17-92 基因簇在不同肿瘤中的表达趋势不一, 尚无统一论。Arabi 等^[11]研究表明, miR-17-92 簇及其旁链 106a-363/106b-25 在 OS 细胞系中表达上调, 与临床结局、促凋亡靶点等密切相关; 认为 miR-17-92 簇及其 2 个副链在 OS 生物学中有致病、预后影响的关键作用。林金鑫等^[12]研究表明, 人 OS 组织中 miR-17-92 基因簇相比正常骨组织均高表达, 且与预后相关, 认为 miR-17-92 基因簇可能参与 OS 发生、进展, 有望成为 OS 患者预后评估的新标志物。但由于 OS 发病机制复杂, 目前对于 miR-17-92 基因簇在 OS 发生、进展中的作用机制尚不清楚, 且国内相关报道不多。对此本研究以 OS 细胞进行实验, 旨在探究 miR-17-92 基因簇对 OS MG-63 细胞增殖、侵袭的影响, 并从相关信号通路方面分析其可能作用机制, 为 OS 诊断、治疗提供新的肿瘤标记物、靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

MG-63、hFOB1.19 (正常细胞株) 均购于中科院上海细胞研究所, 本实验室内保存。胎牛血清 (上海吉泰依科赛生物科技有限公司); PBS (美国 Sigma); RPMI1640 培养基与 DMEM/F12 培养液 (武汉普诺赛生命科技有限公司); Lipofectamine 2000 试剂盒 (赛默飞世尔科技(中国)有限公司); miR-17-92 基因簇模拟物与阴性对照 (美国 signosis

公司); TaqMan miRNA Isolation Kit 反转录试剂盒 (美国 AB Applied Biosystems 公司); miR-17-92 基因簇引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; Trizol 裂解液与 miRNA 分离试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); CCK-8 试剂盒 (北京沃比森科技有限公司); 转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta 1$)、Smad3、MMP-2、MMP-9 单克隆抗体与 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (日本 Takara 公司)。

1.2 细胞分组与体外转染处理

OS 细胞 MG-63、人成骨细胞 hFOB1.19 分别在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基、DMEM/F12 培养液中培养, 前者设置温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 后者为 34 $^{\circ}\text{C}$, 均 5% CO_2 。选择对数生长期细胞, 依据 Lipofectamine 2000 操作说明书将 miR 模拟物转染到 OS 细胞 MG-63 细胞内, 分为 miR-17-92 基因簇模拟物组 (miR-17-92 组) 与阴性对照组 (miR-NC 组)。

1.3 检测方法与指标

1.3.1 qRT-PCR 检测

对转染前 MG-63、hFOB 细胞及转染 MG-63 后的 miR-17-92 组、miR-NC 组 miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-20、miR-92 相对表达量测定: OS 细胞 MG-63、人成骨细胞 hFOB1.19 应用 PBS 洗涤 2 次, 离心提取细胞沉淀, 依据反转录试剂盒行逆转录反应, 于 7500 Fast Real-Time PCR 仪上开展, 20 μl 反应体系中进行, 稀释逆转录产物 cDNA 后取其 2 μl 和 TaqMan 引物 2 μl 混合, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 变性, 接着 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 40 个循环, 完成后记录各反应管 Ct 值, 选择 U6 为内参, 经由 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 miR-17-92 基因簇相对表达量。相关引物序列: U6 正向、反向引物分别为 CTCGCTTCGGCAG-CACA、AACGCTTCACGAATTTGCGT、has-miR-17、has-miR-18a、has-miR-19a、has-miR-19b、has-miR-20、has-miR-92; 引物序列分别为 5'-GCAAAG TGCTTACAGTGCAGGTAG-3'、5'-UAAGCUCGAUGU AGUGCAGU AAC-3'、5'-TGTGCAAATCTATGCAAA ACTG-3'、5'-GCATCCCAGTGTGCAAATCC-3'、5'-G GTAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG-3'、5'-ATTGCA CTTGTCCCGGCCTGT-3'。

1.3.2 CCK-8 检测

测定转染后 miR-17-92 组、miR-NC 组 MG-63 细胞增殖能力: 转染后选择对数生长期细胞, 经由胰酶消化, 洗涤 2 次, 借助完全培养基调控细胞到 3×10^3 个/ml, 各孔 (96 孔板) 接种细胞液 100 μl 。培

养 1、2、3 d 时分别加入调配好的 CCK-8 试剂（共 100 μ l，CCK-8 试剂、完全培养基分别 10 μ l、90 μ l）孵育 120 min，通过 CLARIOstar 多功能酶标仪对 450 nm 处光密度（optical density, OD）检测，OD450 代表细胞增殖能力。

1.3.3 Transwell 检测

测定转染后 miR-17-92 组、miR-NC 组 MG-63 细胞侵袭数量：MG-63 细胞被消化后经由含血清 DMEM 培养基调节细胞到 3×10^5 个/ml，提细胞液 100 μ l 接种至 Transwell 小室之上室，下室则为 20% FBS DMEM 培养基 500 μ l，随后 Transwell 小室放入培养箱内 1 d。CO₂ 培养箱内取出 Transwell 培养板，舍弃 Transwell 小室上层液体，棉签对小室上层轻拭后倒扣之，室温放置 180~300 s。舍弃孔内液体，无钙 PBS 清洗 2 次，4% 甲醛固定 0.5 h，1% 结晶紫染色，时长 10 min。显微镜下观察 Transwell 培养板，随机选择 5 个视野拍照且计数。

1.3.4 Western blot 检测

测定转染后 miR-17-92 组、miR-NC 组 MG63 细胞相关蛋白水平：转染 MG-63 细胞、培养 48 h 后通过 Western blot 检测细胞内 TGF- β 1、Smad3、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平测定。依据 1:10 (g/ml) 比例滴进 RIPA 裂解液，参考 BCA 蛋白定量试剂盒对各组细胞总蛋白含量检测。裂解、提取各组蛋白后行 SDS-PAGE 电泳分离，之后将其置于硝酸纤维素膜，处理后将该膜放入 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 120 min，常规室温。TBST 洗涤 3 次。一抗滴入，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。再漂洗 3 次，HRP 标记之而抗体滴入，室温孵育 120 min，漂洗 3 次。ECL 工作液显色，经由 Image J 图像分析系统分析相关蛋白显影图，GAPDH 为内参，测定相关蛋白水平。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 24.0 统计学软件对数据进行统计学处理。计量资料满足正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间行独立 *t* 检验；组内时间点比较采用单因素方差分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两个细胞株 miR 的 mRNA 表达

MG-63 细胞 miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-20、miR-92 相对表达量均显著高于 hFOB 细胞 (*P*<0.05)，见表 1。

表 1 两株细胞 miR 的 mRNA 表达（相对表达量， $\bar{x} \pm s$ ）与比较

指标	MG-63 细胞 (n=10)	hFOB 细胞 (n=10)	<i>P</i> 值
miR-17	4.1 \pm 1.0	1.2 \pm 0.3	<0.001
miR-18a	2.3 \pm 0.5	1.4 \pm 0.5	<0.001
miR-19a	2.0 \pm 0.4	1.3 \pm 0.4	<0.001
miR-19b	2.1 \pm 0.4	1.2 \pm 0.3	<0.001
miR-20	6.2 \pm 2.2	1.4 \pm 0.4	<0.001
miR-92	5.1 \pm 1.9	1.7 \pm 0.5	<0.001

2.2 转染后 MG-63 细胞 miR 的 mRNA 表达

miR-17-92 组 miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-20、miR-92 相对表达量均显著高于 miR-NC 组 (*P*<0.05)，见表 2。

2.3 转染后 MG-63 细胞的增殖

miR-17-92 组与 miR-NC 培养 1、2 和 3 d 的 OD450 值均呈现上升趋势，且 miR-17-92 组培养 1、2 和 3 d 的 OD450 值均显著高于 miR-NC 组，见表 2。

2.4 转染后 MG-63 细胞的侵袭

miR-17-92 组侵袭细胞数显著多于 miR-NC 组 (*P*<0.05)，见表 2。

2.5 转染后 MG-63 细胞蛋白表达

miR-17-92 组 TGF- β 1、Smad3、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平均显著高于 miR-NC 组 (*P*<0.05)，见表 2、图 1。

表 2 MG-63 阳性与阴性转染 miR-17-92 后检测结果 ($\bar{x} \pm s$) 与比较

指标	miR-17-92 组 (n=5)	miR-NC 组 (n=5)	<i>P</i> 值
mRNA 检测 (相对表达量)			
miR-17	7.1 \pm 2.2	4.1 \pm 1.3	0.030
miR-18a	3.6 \pm 0.6	2.3 \pm 0.7	0.014
miR-19a	4.4 \pm 1.0	2.1 \pm 0.5	0.002
miR-19b	4.6 \pm 1.0	2.2 \pm 0.5	<0.001
miR-20	9.3 \pm 2.1	6.2 \pm 2.0	0.044
miR-92	8.7 \pm 2.3	5.0 \pm 1.4	0.015
细胞增殖 (OD)			
1 d	0.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.013
2 d	0.9 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2	0.045
3 d	1.2 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2	0.038
<i>P</i> 值	<0.001	0.002	
细胞侵袭 (%)	65.3 \pm 13.5	40.6 \pm 10.3	0.012
蛋白表达 (相对表达量)			
TGF- β 1	3.7 \pm 1.3	1.0 \pm 0.3	0.002
Smad3	1.4 \pm 0.4	0.5 \pm 0.2	0.004
MMP-2	0.7 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1	0.017
MMP-9	1.2 \pm 0.4	0.6 \pm 0.2	0.017

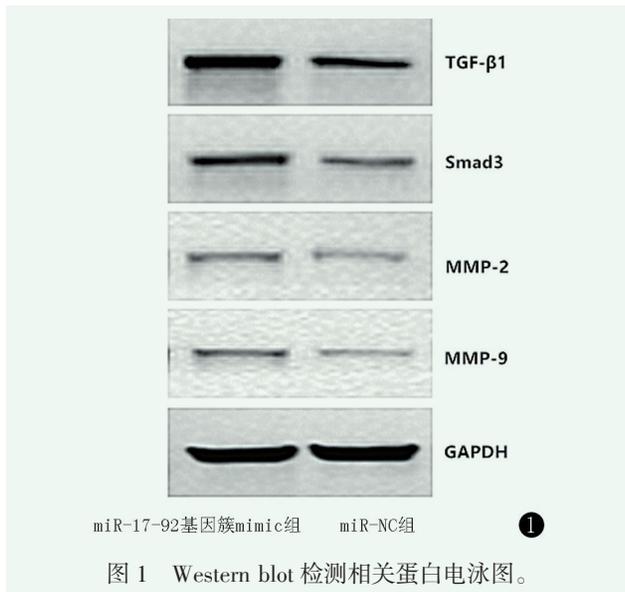


图 1 Western blot 检测相关蛋白电泳图。

3 讨论

目前关于 circRNA-miRNA 在 OS 中的研究较多,为临床热点之一^[13]。miR-17-92 基因簇可产生 miR-17、miR-92 等多个单独的 miRNA,有报道称,OS 组织中多个 miRNA 异常上升或下降,其中 miR-17-92 基因簇各 miRNA 表达均上升^[14]。Arabi 等^[15]报道称 miR-19a、miR-19b、miR-92a 在 OS 组织中高表达,且与 TNM 分期有关,miR-17-92 基因簇高表达患者短期预后更差。Li 等^[16]发现 OS 患者中血清 miR-17 水平相对健康者明显高,与预后相关。可见 miR-17-92 基因簇可能促 OS 发生、进展。对 OS 来说,恶性程度从高到低为 143B、MG-63、U2OS、Saos-2,为此本研究选择恶性程度第二高的 MG-63 细胞进行实验,一方面与临床 OS 恶性程度较高相符,另一方面仅选择一种细胞株研究可减少不同细胞株对数据的偏倚。结果显示相比正常人成骨细胞 hFOB1.19,OS 细胞 MG-63 中 miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-20、miR-92 表达水平显著升高。表明 miR-17-92 基因簇于 MG-63 细胞株中高表达,这与上述报道相符。同时对 MG-63 细胞转染,发现相比 miR-NC 组,miR-17-92 组 MG-63 细胞株中 miR-17-92 基因簇各独立 miRNA 显著增高,提示将模拟物成功导入至 MG63 细胞。

癌细胞侵袭是癌症转移的重要前提与关键;癌细胞明显增殖后借助侵袭作用经由细胞外基质转移至其他器官/组织,导致癌症转移,影响预后^[17, 18]。本研究中,转染 miR-17-92 基因簇至 MG-63 细胞后,CCK-8 检测发现 miR-17-92 组不同时间点的

OD450 值相比 miR-NC 组显著升高,且随时间推移不断增强。同时 miR-17-92 组细胞侵袭能力也显著总结。表明转染 miR-17-92 基因簇模拟物能促进 OS MG-63 细胞进一步增殖、侵袭。而关于 miR-17-92 对 MG-63 细胞的作用机制较多且复杂。Yang 等^[19]表明 OS 发生、进展与 miR-17-92 基因簇/QKI2/catenin 调控轴有关。Wu 等^[20]研究表明 OS 细胞系中 miR-17 表达显著上调,敲除 miR-17 后 OS 细胞下游 SASH1、MMP-2、MMP-9 等表达上升,其中 SASH1 是 miR-17 靶基因。认为 miR-17 通过靶向 SASH1 促细胞增殖、侵袭。TGF-β1 为肿瘤细胞常见信号通路之一,与细胞分化、生长、增殖等有关^[21]。有研究表明,青花钙素 A 通过对 OS 中 TGF-β1/Smad2/3 信号通路抑制以阻断 TGF-β1 诱导的上皮-间质转化^[22]。Smad3 被 TGF-β 诱导会出现磷酸化,p-Smad3 形成至细胞核,和对应靶点结合以激活信号通路^[23]。本研究中,通过 Western blot 检测发现,相比 miR-NC 组,miR-17-92 基因簇 mimic 组 MG-63 细胞 TGF-β1、Smad3 蛋白水平显著升高。提示 miR-17-92 基因簇可能通过 TGF-β1/Smad3 信号通路促进 MG-63 细胞增殖、侵袭。MMP-2、MMP-9 与细胞外基质密切相关,被激活后可至细胞外基质最前端,参与细胞外基质降解过程。肿瘤细胞中 MMP-2、MMP-9 水平均显著上调,促肿瘤侵袭转移。胡晓波等^[24]研究表明,相比正常骨组织,OS 组织中 MMP-9 mRNA 表达水平显著升高,通过沉默 MMP-9 能显著减弱 OS 细胞增殖、侵袭能力,且高表达 MMP-9 者总生存率比低表达者显著低,表明 MMP-9 与 OS 增殖、侵袭、预后相关。本研究中相比 miR-NC 组,miR-17-92 组 MG-63 细胞 MMP-2、MMP-9 蛋白水平显著升高。表明 miR-17-92 基因簇对 MG-63 细胞增殖、侵袭可能与上调 MMP-2、MMP-9 蛋白水平有关。

综上所述,骨肉瘤 MG-63 细胞株中 miR-17-92 基因簇各单独 miRNA 表达均上升,它可能是通过增强 TGF-β1/Smad3/MMP-9 信号通路以提高骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、侵袭能力。本研究仅于体外行细胞实验,且未涉及其他骨肉瘤细胞株,后续会于体内、增多不同类型细胞株进一步分析 miR-17-92 基因簇的作用机制。

参考文献

- [1] Jiang J, Pan H, Li M, et al. Predictive model for the 5-year survival status of osteosarcoma patients based on the SEER database and

- XGBoost algorithm [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1) : 5542.
- [2] Smeland S, Bielack SS, Whelan J, et al. Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort [J]. *Eur J Cancer*, 2019, 109: 36-50.
- [3] Cersosimo F, Lonardi S, Bernardini G, et al. Tumor-associated macrophages in osteosarcoma: from mechanisms to therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (15) : 5207.
- [4] Wang J, Liu S, Shi J, et al. The role of miRNA in the diagnosis, prognosis, and treatment of osteosarcoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2019, 34 (10) : 605-613.
- [5] 张雷, 段广超, 吴智辉. miR-494 对骨肉瘤细胞增殖和侵袭的作用 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2021, 29 (21) : 1974-1977.
- [6] 张懿明, 毛良浩, 江攀, 等. 骨肉瘤潜在关键基因及相关通路的鉴定 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2022, 30 (7) : 644-648.
- [7] Yang C, Jia X, Zhou J, et al. The MiR-17-92 gene cluster is a blood-based marker for cancer detection in non-small-cell lung cancer [J]. *Am J Med Sci*, 2020, 360 (3) : 248-260.
- [8] 邵毅, 沈艺, 牛琛, 等. 食管鳞癌组织中差异表达 miR-17-92 基因簇成员及其靶基因的筛选、生物学功能分析 [J]. *山东医药*, 2021, 61 (15) : 1-5.
- [9] 刘菲, 徐晶晶, 周珺, 等. miR-17-92 基因簇在胃癌组织中的表达和临床意义 [J]. *中国血液流变学杂志*, 2021, 31 (3) : 289-297, 373.
- [10] Mogilyansky E, Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20 (12) : 1603-1614.
- [11] Arabi L, Gsponer JR, Smida J, et al. Upregulation of the miR-17-92 cluster and its two paraloga in osteosarcoma - reasons and consequences [J]. *Genes Cancer*, 2014, 5 (1-2) : 56-63.
- [12] 林金鑫, 王发圣, 叶君健, 等. miR-17-92 基因簇在骨肉瘤中的表达及其临床意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41 (23) : 1532-1535.
- [13] 王兆强, 裴露萍, 李刚. 骨肉瘤中 circRNA-miRNA-mRNA 相关调控网络的构建 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2021, 29 (23) : 2162-2167.
- [14] Namløs HM, Meza-Zepeda LA, Barøy T, et al. Modulation of the osteosarcoma expression phenotype by MicroRNAs [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (10) : e48086.
- [15] Arabi L, Gsponer JR, Smida J, et al. Upregulation of the miR-17-92 cluster and its two paraloga in osteosarcoma-reasons and consequences [J]. *Genes Cancer*, 2014, 5 (1-2) : 56-63.
- [16] Li S, Gao Y, Wang Y, et al. Serum microRNA-17 functions as a prognostic biomarker in osteosarcoma [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12 (6) : 4905-4910.
- [17] Chiappetta C, Carletti R, Della Rocca C, et al. KMT2C modulates migration and invasion processes in osteosarcoma cell lines [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215 (10) : 152534.
- [18] 梁答, 吴晓林, 白俊, 等. miR-300 通过负向调控垂体肿瘤转化基因 1 抑制骨肉瘤细胞 MG63 的侵袭和转移 [J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41 (2) : 285-291.
- [19] Yang H, Peng Z, Liang M, et al. The miR-17-92 cluster/QKI2/β-catenin axis promotes osteosarcoma progression [J]. *Oncotarget*, 2018, 9 (38) : 25285-25293.
- [20] Wu D, Zhang H, Ji F, et al. MicroRNA-17 promotes osteosarcoma cells proliferation and migration and inhibits apoptosis by regulating SASH1 expression [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215 (1) : 115-120.
- [21] Tschernia NP, Gulley JL. Tumor in the crossfire: inhibiting TGF-β to enhance cancer immunotherapy [J]. *Bio Drugs*, 2022, 36 (2) : 153-180.
- [22] Jiang X, Zhang Z, Song C, et al. Glucocalyxin A reverses EMT and TGF-β1-induced EMT by inhibiting TGF-β1/Smad2/3 signaling pathway in osteosarcoma [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 307: 158-166.
- [23] Lee JH, Mellado-Gil JM, Bahn YJ, et al. Protection from β-cell apoptosis by inhibition of TGF-β/Smad3 signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (3) : 184.
- [24] 胡晓波, 李昕, 周庚. 基质金属蛋白酶-9 对骨肉瘤增殖、侵袭及迁移能力的影响及其临床意义 [J]. *重庆医科大学学报*, 2021, 46 (3) : 279-283.

(收稿:2022-12-12 修回:2023-05-05)
(同行评议专家:王守丰,于秀淳)
(本文编辑:宁桦)