

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.03.05

❖ 论著 ❖

敲减 USP25 对乳腺癌细胞生物学行为的影响

荣欣欣¹, 侯令密², 刘家有¹, 李金穗², 谢少利², 杨懿¹, 黄红梅¹, 李静佳¹, 邓世山¹

(1. 川北医学院解剖教研室, 2. 川北医学院附属医院甲状腺乳腺外科, 四川南充 637000)

【摘要】目的: 探讨乳腺癌细胞中敲减泛素特异性蛋白酶 25 (USP25) 后细胞生物学行为的改变。**方法:** 采用慢病毒载体构建 6 条 shRNA-USP25 干扰序列 (LV-shRNA-USP25-1 ~ LV-shRNA-USP25-6), 分别转染乳腺癌 MCF-7 细胞以干扰 USP25 的表达, 并检测敲减效率, 筛选出最佳干扰序列用于实验。采用 CCK8 试剂盒法、Transwell 侵袭实验、流式细胞术检测敲减 USP25 后乳腺癌细胞增殖、侵袭能力及凋亡的变化。**结果:** KD1 组 (转染 LV-shRNA-USP25-1 组) 为干扰效率最高的序列, USP25 蛋白和 mRNA 的敲减率分别为 57.8%、58.3% ($P < 0.001$); 敲减 USP25 后乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、侵袭能力受到抑制, 且出现明显凋亡 ($P < 0.001$)。**结论:** USP25 可能与乳腺癌细胞的增殖、侵袭及凋亡有密切关系, 其可能在乳腺癌的恶性进展中扮演着重要角色。

【关键词】 USP25; 乳腺癌; 细胞增殖; 凋亡; 侵袭

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Effect of knocking down USP25 on biological behavior of breast cancer cells

RONG Xin-xin¹, HOU Ling-mi², LIU Jia-you¹, LI Jin-sui², XIE Shao-li², YANG Yi¹, HUANG Hong-mei¹, LI Jing-jia¹, DENG Shi-shan¹

(1. Department of Anatomy, North Sichuan Medical College; 2. Department of Thyroid and Breast Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the changes of biological behavior after knocking down ubiquitin specific protease 25 (USP25) in breast cancer cells. **Methods:** 6 shRNA-USP25 interference sequences were constructed by lentiviral vector (LV-shRNA-USP25-1 ~ LV-shRNA-USP25-6), and transfected into MCF-7 breast cancer cells to interfere with the expression of USP25. The knock-down efficiency was detected and the best interference sequence was screened for the experiment. CCK8 kit, Transwell test and flow cytometry were used to detect the proliferation, invasion and apoptosis of breast cancer cells after knocking down USP25. **Results:** Group KD1 (transfected with LV-shRNA-USP25-1) was the most effective sequence, with the knockdown rates of USP25 protein and mRNA of 57.8% and 58.3%, respectively ($P < 0.001$). After USP25 was knocked down, the proliferation and invasion of MCF-7 breast cancer cells were inhibited, and showed significant apoptosis ($P < 0.001$). **Conclusion:** USP25 may be closely related to the proliferation, invasion and apoptosis of breast cancer cells, and may play an important role in the malignant progression of breast cancer.

【Key words】 breast cancer; USP25; cell proliferation; invasion; apoptosis

乳腺癌位居女性恶性肿瘤发病率的首位, 中国新诊断乳腺癌病例占全球的 3/20, 严重威胁广大女性的生命及健康^[1]。泛素特异性蛋白酶 25 (ubiquitin specific protease 25, USP25) 是泛素特异性蛋白酶 (ubiquitin specific proteases, USPs) 家族中的一员, 作为一种去泛素化酶, 它能够特异性识别及去泛素化相关的底物蛋白, 从而避免底物蛋白被泛素化途径降解, 对于维持人体正常细胞功能起重要作用。USP25 由一个 N 端泛素结合结构域 UBR 和一个核

心催化结构域 USP 构成, 其中 UBR 结构域又包含 UBA、UIM 两个结构域, UBA-UIM 结构域与泛素相互作用并参与对泛素化底物的识别而发挥重要的调控作用^[2]。USPs 家族与乳腺癌有密切的关系, USP4、USP14、USP32、USP39 等与乳腺癌细胞的增殖、浸润、转移、细胞周期及凋亡等生物学行为有关^[3-6]。Deng 等^[7]通过限制性片段差异显示多聚酶链反应 (RFDD-PCR) 及免疫组化实验发现, USP25 在乳腺癌组织中高表达。本课题组前期研

基金项目: 四川省教育厅科研创新团队项目 (17TD0016); 南充市科技局市校科技战略合作专项 (19SXHZ0316); 南充市科技局市校科技战略合作专项 (NSMC20170401); 校级科研发展计划项目 (CBY16-A-YB03)。

作者简介: 荣欣欣 (1986 -), 女, 硕士, 助教。E-mail: 570109338@qq.com

通讯作者: 邓世山。E-mail: dssgeneral@163.com

究^[8]也报道过,USP25 在乳腺癌组织中高表达,并且与乳腺癌组织学分级、淋巴结转移、Ki-67 的表达相关,但未对其生物学行为与相关机制进行深入研究,且相关报导尚不能阐明这种情况。因而,本课题通过 shRNA-USP25 序列的慢病毒载体敲减 USP25 的表达后,观察乳腺癌 MCF-7 细胞生物学行为的变化,探讨 USP25 在乳腺癌中作用,为乳腺癌的治疗提供一定的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌细胞株 MCF-7 购至中国科学院细胞总库。shRNA-USP25 慢病毒委托上海吉凯基因化学有限公司合成。兔抗人 USP25 多克隆抗体 (Abcam, 美国),山羊抗兔 IgG 二抗 (Proteintech, 中国),BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、ECL 化学发光超特敏试剂盒 (碧云天, 中国),逆转录试剂盒 (Thermo Scientific, 美国),SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, 日本),USP25 上下游引物 (生工生物工程股份有限公司, 中国),CCK8 试剂盒 (碧云天, 中国),Matrigel 基质胶、流式凋亡检测试剂盒 (BD, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及慢病毒转染 MCF7 细胞用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱内培养。委托上海吉凯基因化学有限公司以慢病毒载体构建 6 条 shRNA-USP25 干扰序列 (LV-shRNA-USP25-1 ~ LV-shRNA-USP25-6) 及一组阴性对照序列 (LV-control)。LV-shRNA-USP25-1 ~ LV-shRNA-USP25-6 分别感染 MCF-7 细胞作为实验组 (6 组),LV-control 感染 MCF-7 细胞作为阴性对照组,不作任何处理的细胞作为空白对照组。转染步骤按照吉凯基因说明书进行。

1.2.2 Western blot 实验 配置 RIPA: PMSF = 100:1 的裂解液提取上述 8 组细胞的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳,转膜,抗原抗体免疫反应,按 ECL 超特敏化学发光试剂盒说明进行化学发光反应,荧光成像仪内曝光条带。上述实验重复 3 次。

1.2.3 qRT-PCR 按照试剂盒说明书提取 RNA 及逆转录成 cDNA,在 LightCycler PCR 仪上进行 PCR 反应,设置 PCR 反应条件为:(1) 预变性:95 °C、30 s,1 cycle;(2) 两步法 PCR:95 °C、5 s,60 °C、30 s,40 cycle;(3) 溶解:95 °C、5 s,60 °C、60 s,95 °C、1 s,1 cycle;(4) 降温:50 °C、30 s,1 cycle。

1.2.4 CCK8 实验 实验设置 3 个组,实验组

(USP25 敲减组)、阴性对照组、空白组,每个组设置 5 个复孔,在 96 孔板中进行细胞培养及转染,转染后 24 h、48 h、72 h、96 h,每孔加入 CCK8 试剂 10 μL,培养箱中孵育 2 h,酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度值。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 提前在细胞中加入无血清培养基,让细胞饥饿培养 12 ~ 24 h。按 1:2 比例稀释 Matrigel 基质胶,Transwell 小室放入 24 孔板中,上室加入 60 μL 基质胶,37 °C 孵育 1 h。加入 300 μL 无血清细胞培养基,室温下放置 20 min 水化基质胶。无血清培养基重悬并调整细胞密度为 4×10^4 /mL,在 Transwell 上室加入 200 μL 细胞悬液,下室加入 500 μL 完全培养基,继续培养 24 h。取出 Transwell 小室,用棉签擦去上室面的细胞,用 0.1% 的结晶紫染色下室面的细胞,显微镜下计数下室面的细胞数。

1.2.6 流式细胞术 收集细胞并用 PBS 洗涤两次,取适量浓缩结合缓冲液并稀释至 1 倍,用 200 μL 结合缓冲液重悬细胞并使其浓度为 $2 \sim 5 \times 10^5$ /mL,取上述细胞悬液 195 μL,加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀后室温避光孵育 10 min,用 200 μL 结合缓冲液洗涤细胞,离心,再用 190 μL 结合缓冲液重悬细胞,加入 10 μL 碘化丙啶溶液,轻轻混匀后上流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,细胞增殖能力的比较采用重复测量方差分析,多组均数比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰序列筛选及 USP25 敲减结果验证

2.1.1 Western blot 实验结果 Image J 软件测量灰度值,并进行相对定量分析,结果表明,实验组 USP25 蛋白的相对表达量明显低于空白组,其中 KD1 组 (转染 LV-shRNA-USP25-1) 差异更显著,其敲减效率最高 (57.8%),为最佳干扰片段,且差异具有统计学意义 ($P < 0.001$),阴性对照组与空白组差异无统计学意义 ($P = 0.671$)。因而,后续实验中将采用 LV-shRNA-USP25-1 干扰序列转染乳腺癌细胞作为实验组。见图 1、表 1、图 2。

2.1.2 qRT-PCR 实验结果 实验采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析,结果显示,实验组 (LV-shRNA-USP25-1) 中 USP25 mRNA 的相对表达量明显低于空白组,敲减率为 58.3%,实验组与空白组差异具有统计学意义 ($P < 0.001$),阴性对照组与空白组差

异无统计学意义 ($P = 0.334$)。见表 2、图 3。

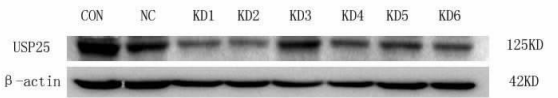


图 1 Western Blot 检测 USP25 蛋白的敲减水平

CON: 空白对照组; NC: 阴性对照组; KD1-6: 实验组 (转染 LV-shRNA-USP25-1~6)。

表 1 USP25 蛋白的敲减水平

Groups	USP25/ β -actin	敲减率	P^* 值
CON	0.526 \pm 0.007	-	-
NC	0.493 \pm 0.031	6.3%	0.671
KD1	0.222 \pm 0.013	57.8%	< 0.001
KD2	0.244 \pm 0.007	53.6%	< 0.001
KD3	0.491 \pm 0.010	6.7%	0.093
KD4	0.314 \pm 0.009	40.3%	< 0.001
KD5	0.270 \pm 0.006	48.7%	< 0.001
KD6	0.281 \pm 0.005	46.6%	< 0.001
F 值	258.055		
P 值	< 0.001		

CON: 空白对照组; NC: 阴性对照组; KD1-6: 实验组 (转染 LV-shRNA-USP25-1~6); P : 单因素方差分析的 P 值; P^* : 实验各组与空白对照组相比较的 P 值。

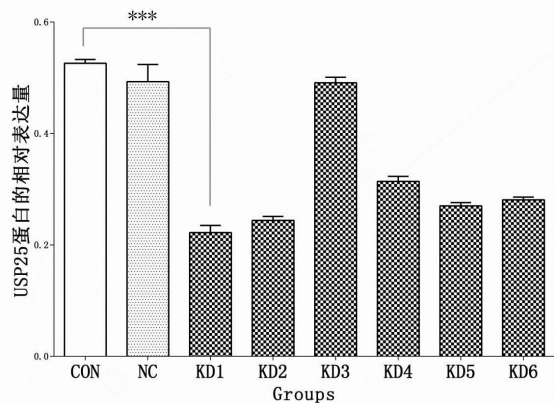


图 2 USP25 蛋白的敲减水平

CON: 空白对照组; NC: 阴性对照组; KD1-6: 实验组 (LV-shRNA-USP25-1~6); ***: $P < 0.001$ 。

表 2 qRT-PCR 检测 USP25 mRNA 的敲减水平 ($\bar{x} \pm s$)

Groups	$2^{-\Delta\Delta CT}$	敲减率	P^* 值
CON	1	-	-
NC	1.033 \pm 0.055	-3.3%	0.334
R	0.417 \pm 0.037	58.3%	$P < 0.001$
F 值	244.930		
P 值	$P < 0.001$		

CON: 空白对照组; NC: 阴性对照组; R: 实验组 (转染 LV-shRNA-USP25-1 组); P : 单因素方差分析的 P 值; P^* : 实验各组与空白对照组相比较的 P 值。

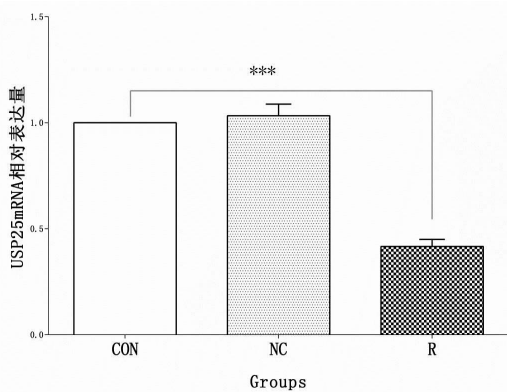


图 3 USP25 mRNA 的敲减水平

CON: 空白组; NC: 阴性对照组; R: 实验组 (转染 LV-shRNA-USP25-1 组); ***: $P < 0.001$ 。

2.2 CCK8 实验检测敲减 USP25 后 MCF-7 细胞增殖能力

在 24 h、48 h、72 h、96 h, 实验组 (LV-shRNA-USP25-1) MCF-7 细胞增殖能力受到抑制, 抑制率分别为 13.6%、15.5%、21.5%、28.1%, 实验组与空白组差异具有统计学意义 ($P < 0.001$), 而阴性对照组与空白组差异无统计学意义 ($P = 0.157$)。实验结果表明敲减 USP25 后 MCF-7 细胞增殖能力受到抑制。见表 3、图 4。

表 3 CCK8 实验检测敲减 USP25 后 MCF-7 细胞不同时段增殖能力

	CON (OD 值)	NC (OD 值)	R (OD 值)	抑制率
24 h	0.772 \pm 0.019	0.756 \pm 0.031	0.667 \pm 0.013	13.60%
48 h	0.825 \pm 0.033	0.817 \pm 0.025	0.697 \pm 0.021	15.50%
72 h	1.026 \pm 0.048	1.007 \pm 0.050	0.805 \pm 0.011	21.50%
96 h	1.347 \pm 0.104	1.293 \pm 0.070	0.968 \pm 0.015	28.10%
F 值		2.621	308.332	
P 值		0.157	$P < 0.001$	

CON: 空白对照组; NC: 阴性对照组; R: 实验组 (转染 LV-shRNA-USP25-1 组)。

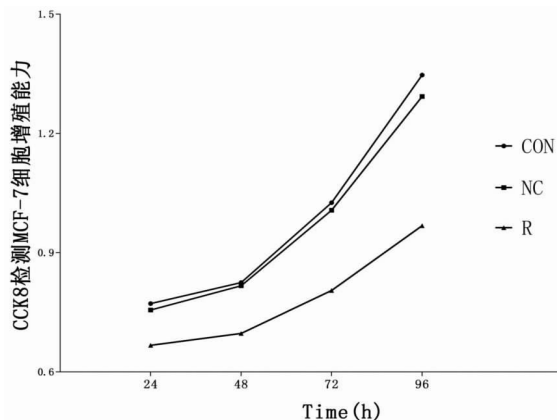


图 4 CCK8 实验检测敲减 USP25 后 MCF-7 细胞不同时段增殖能力

CON: 空白对照组; NC: 阴性对照组; R: 实验组 (转染 LV-shRNA-USP25-1 组)。

2.3 Transwell 检测敲减 USP25 后 MCF-7 细胞的侵袭能力

实验组(转染 LV-shRNA-USP25-1 组)与空白组差异具有统计学意义($P < 0.001$),阴性对照组与空白组差异无统计学意义($P = 0.152$)。实验结果表明敲减 USP25 后细胞侵袭能力明显减弱。见图 5、表 4、图 6。

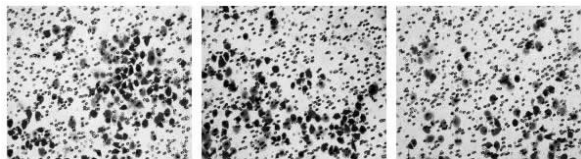


图 5 Transwell 检测敲减 USP25 后 MCF-7 细胞的侵袭能力(结晶紫×200)

CON:空白组;NC:阴性对照组;R:实验组(转染 LV-shRNA-USP25-1 组)

表 4 Transwell 检测敲减 USP25 后 MCF-7 细胞穿过基质胶的细胞数

Groups	Cell	P^* 值
CON	86.333 ± 2.082	-
NC	81.000 ± 3.606	0.152
R	52.333 ± 5.508	$P < 0.001$
F 值	63.133	
P 值	$P < 0.001$	

CON:空白组;NC:阴性对照组;R:实验组(转染 LV-shRNA-USP25-1 组); P :单因素方差分析的 P 值; P^* :实验各组与空白对照组相比较的 P 值。

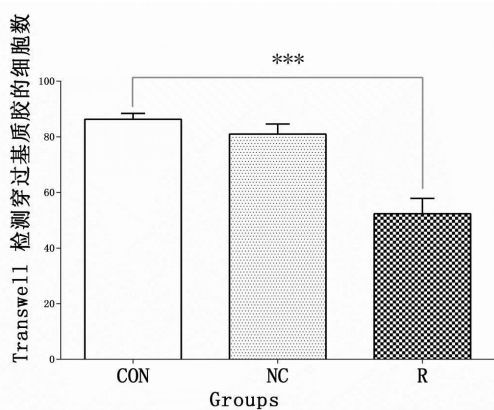


图 6 Transwell 检测敲减 USP25 后 MCF-7 细胞穿过基质胶的细胞数

CON:空白组;NC:阴性对照组;R:实验组(LV-shRNA-USP25-1);***: $P < 0.001$

2.4 流式细胞术检测敲减 USP25 后 MCF-7 细胞凋亡情况

细胞转染 72 h 后,上机检测细胞凋亡率,结果显示,空白组、阴性对照组和实验组细胞凋亡率分别

为(1.533 ± 1.3429)%、(3.0 ± 0.1)%和(16.467 ± 0.6506)%,实验组(LV-shRNA-USP25-1)与空白组差异具有明显统计学意义($P < 0.001$),阴性对照组与空白组差异无统计学意义($P = 0.134$)。实验结果表明敲减 USP25 后细胞出现明显凋亡。见表 5、图 7。

表 5 流式细胞术检测敲减 USP25 后 MCF-7 细胞凋亡率

Groups	细胞凋亡率(%)	P^* 值
CON	1.533 ± 1.3429	-
NC	3.0 ± 0.1	0.134
R	16.467 ± 0.6506	$P < 0.001$
F 值	188.975	
P 值	$P < 0.001$	

注:CON:空白对照组;NC:阴性对照组;R:实验组(转染 LV-shRNA-USP25-1 组); P :单因素方差分析的 P 值; P^* :实验各组与空白对照组相比较的 P 值。

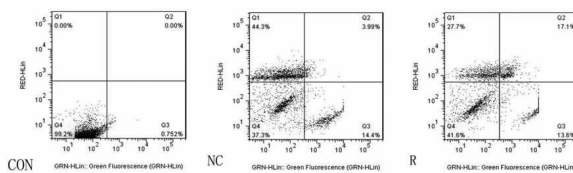


图 7 流式细胞术检测敲减 USP25 后 MCF-7 细胞凋亡率

注:CON:空白组;NC:阴性对照组;R:实验组(转染 LV-shRNA-USP25-1 组)。

3 讨论

乳腺癌已超越肺癌成为女性癌症的第一大杀手,癌细胞的浸润和转移是乳腺癌患者治疗失败和复发的主要因素。因而,探索乳腺癌浸润、转移等恶性生物学行为相关的因子具有重要临床意义。

此次实验中,在乳腺癌 MCF-7 细胞中敲减 USP25 的表达后,CCK8 实验观察到乳腺癌细胞的增殖能力明显降低,流式细胞术发现乳腺癌细胞出现明显凋亡,提示 USP25 可能促进乳腺癌细胞的增殖和抑制细胞凋亡。在乳腺癌的研究中,USPs 家族成员也有类似的研究报道。乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 USP14 促进乳腺癌细胞增殖,抑制凋亡^[4]。在乳腺癌细胞中沉默 USP32 的表达后,MTT 实验表明显著降低乳腺癌细胞增殖能力^[5]。USP39 在乳腺癌 MCF-7 细胞中的研究也是促进细胞的增殖和集落形成,且敲减 USP39 后细胞周期停留在 G0/G1 期且促进细胞凋亡^[6]。

本组结果中,在乳腺癌 MCF-7 细胞敲减 USP25 表达后,Transwell 侵袭实验检测到 MCF-7 细胞的侵袭能力明显减弱。此实验结果与 Li 等^[9]在非小细胞型肺癌(NSCLC)中报道较为一致,在非小细胞型

肺癌中 miR-200c 通过降低 USP25 的表达从而抑制非小细胞型肺癌细胞的浸润和转移。另外,USPs 家族成员在乳腺癌中也有相关研究报道,在乳腺癌 MDA-MB-231 和 T47D 细胞中,过表达 USP4 促进乳腺癌细胞迁移和侵袭,而沉默 USP4 抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭,进一步研究发现 USP4 通过松弛素/TGF- β 1/Smad2/MMP-9 信号通路调节乳腺癌细胞浸润与转移^[3]。另外,在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中,通过 USP14-shRNA 敲减 USP14 的表达,Transwell 迁移实验观察到细胞运动能力减弱^[4]。

本实验结果提示 USP25 促进乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、侵袭和抑制凋亡,但是其具体机制还不清楚。目前,USP25 在炎症免疫方面的报道较多,USP25 去泛素化 TRAF2、TRAF5、TRAF6,产生 I 型干扰素和促炎细胞因子促进抗病毒免疫及调节 IL-17 介导的信号和炎症反应^[10-11]。IL-17 通过介导 Act1-TRAF2-TRAF5 或 Act1-TRAF6 激活下游的信号 NF- κ B 和 AP-1 促进自身免疫和炎症性疾病^[12-13]。NF- κ B 和 AP-1 除了参与炎症免疫反应外,其在肿瘤中研究也较多。TRAF2 可激活 NF- κ B 信号,促进上皮癌细胞增殖以及乳腺癌细胞的浸润和转移能力^[14-15]。另外,TRAF6 可通过调节其下游信号通路 NF- κ B 和 AP-1 的活性调节肝癌细胞增殖、凋亡及转移等^[16]。因而,推断 USP25 可能通过调节 IL-17—TRAF2/TRAF5/TRAF6—NF- κ B/AP-1 信号通路影响乳腺癌细胞的增殖、凋亡和侵袭等。但其具体机制还需进一步实验证实。

综上所述,USP25 影响乳腺癌细胞的增殖、侵袭及凋亡等生物学行为,其可能在乳腺癌的恶性进展中扮演着重要角色。

参考文献

[1] 王速捷,韩有溪,木妮热·木沙江. TAP1、TAP2 在乳腺癌中的表达及临床价值的研究进展[J]. 实用医学杂志,2016,32(16):2761-2763.
[2] Shi L, Wen Y, Zhang N. ¹H, ¹³C 和 ¹⁵N backbone and side-chain resonance assignments of the N-terminal ubiquitin-binding domains of U SP25[J]. Biomol NMR Assign,2013,8(2):255-258.

[3] Cao WH, Liu XP, Meng SL, et al. USP4 promotes invasion of breast cancer cells via Relaxin/TGF-beta1/Smad2/MMP-9 signal [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2016,20(6):1115-1122.
[4] Zhu L, Yang S, He S, et al. Downregulation of ubiquitin-specific protease 14 (USP14) inhibits breast cancer cell proliferation and metastasis, but promotes apoptosis [J]. J Mol Histol,2016,47(1):69-80.
[5] Akhavantabasi S, Akman HB, Sapmaz A, et al. USP32 is an active, membrane-bound ubiquitin protease overexpressed in breast cancers [J]. Mamm Genome,2010,21(7-8):388-397.
[6] Wang H, Ji X, Liu X, et al. Lentivirus-mediated inhibition of USP39 suppresses the growth of breast cancer cells in vitro [J]. Oncol Rep,2013,30(6):2871-77.
[7] Deng S, Zhou H, Xiong R, et al. Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics [J]. Breast Cancer Res Treat,2006,104(1):21-30.
[8] 荣欣欣,周方方,侯令密,等. 乳腺癌组织细胞中 USP25 的表达及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2018,34(7):738-742.
[9] Li J, Tan Q, Yan M, et al. miRNA-200c inhibits invasion and metastasis of human non-small cell lung cancer by directly targeting ubiquitin specific peptidase 25 [J]. Mol Cancer,2014,13(1):166-179.
[10] Zhong B, Liu X, Wang X, et al. Negative regulation of IL-17-mediated signaling and inflammation by the ubiquitin-specific protease USP25 [J]. Nat Immunol,2012,13(11):1110-1117.
[11] Zhong H, Wang D, Fang L, et al. Ubiquitin-specific proteases 25 negatively regulates virus-induced type I interferon signaling [J]. PLoS One,2013,8(11):e80976.
[12] Qu F, Gao H, Zhu S, et al. TRAF6-dependent Act1 phosphorylation by the I κ B kinase-related kinases suppresses interleukin-17-induced NF- κ B activation [J]. Mol Cell Biol,2012,32(19):3925-3937.
[13] Bulek K, Liu C, Swaidani S, et al. The inducible kinase IKKi is required for IL-17-dependent signaling associated with neutrophilia and pulmonary inflammation [J]. Nat Immunol,2011,12(9):844-852.
[14] Jiang L, Yu L, Zhang X, et al. miR-892b Silencing Activates NF- κ B and Promotes Aggressiveness in Breast Cancer [J]. Cancer Res,2016,76(5):1101-1111.
[15] Shen RR, Zhou AY, Kim E, et al. TRAF2 is an NF- κ B-activating oncogene in epithelial cancers [J]. Oncogene,2015,34(2):209-216.
[16] Wang P, Cao J, Liu S, et al. Upregulated microRNA-429 inhibits the migration of HCC cells by targeting TRAF6 through the NF- κ B pathway [J]. Oncol Rep,2017,37(5):2883-2890.

(收稿日期:2019-10-13

学术编辑:罗蕾)