doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.17.003

慢病毒介导 NCL 基因沉默的胃癌细胞系的建立及对细胞增殖影响的研究 *

闫静川[1] 余彦平[2] 乔一桓[3] 黄 硕[1] 丁晓琛[4] 刘 俊[5] 姜勋亮[6] 王 贺[1] 李纪鹏[4,6△]

(1 空军军医大学基础医学院 陕西 西安 710032;2 陕西省肿瘤医院 陕西 西安 710061;
3 西安医学院临床医学院 陕西 西安 710021;4 空军军医大学第一附属医院西京医院 实验外科 陕西 西安 710032;
5 空军军医大学生物化学与分子生物学教研室,肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032;
6 空军军医大学第一附属医院西京医院消化病院 消化外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:本研究通过建立慢病毒介导的 NCL 基因沉默的胃癌细胞系,研究 NCL 沉默对胃癌细胞增殖能力的影响,为深入探究胃癌发生发展的分子机制提供理论基础。**方法:**利用小发卡 RNA(shRNA)介导的慢病毒系统沉默胃癌细胞中的 NCL,并利用 RT-qPCR 和免疫印迹检测基因沉默效果;并利用 CCK-8 实验和平板克隆形成实验检测胃癌细胞的增殖能力的改变。**结果:**琼脂糖凝胶电泳实验检测经酶切鉴定的 pKLO.1-NCL 载体,显示 5000 bp 和 2000 bp 两条带,测序峰图显示与设计序列一致;利用 HEK293T 包装病毒,感染胃癌细胞 SGC-7901,免疫印迹结果显示 sh NCL 组 NCL 蛋白水平显著低于对照组,RT-qPCR 结果显示,sh NCL 组 NCL 表达量显著降低,为对照组的 0.4209± 0.087 倍(P<0.001);CCK-8 实验结果显示,sh NCL 组在第 5 天的吸光值较对照组显著降低(P<0.001),平板克隆形成实验结果显示,sh NCL 组克隆形成能力较对照组显著降低,克隆形成数量显著低于对照组(P<0.01)。**结论:**建立了慢病毒介导的 NCL 基因沉默的胃癌细胞系 SGC-7901,并利用此系统研究了 NCL 基因对胃癌细胞增殖能力的影响,证明了 NCL 基因能够促进胃癌细胞的增殖,为后续研究 NCL 基因在胃癌细胞中的作用提供基础。

关键词:核仁素;慢病毒;基因沉默;胃癌;增殖

中图分类号:R-33;Q78;R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)17-3212-05

Establishment of a Lentivirus Mediated NCL Gene Silencing System and Its Effect on Proliferation of Gastric Cancer Cells*

YAN Jing-chuan[1], YU Yan-ping[2], QIAO Yi-huan[3], HUANG Shuo[1], DING Xiao-chen[4], LIU Jun[5], JIANG Xun-liang[6], WANG He[1], LI Ji-peng[4,6△]

(1 School of Basic Medicine, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Shaanxi Provincial Tumor Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710061, China; 3 School of Clinical Medicine, Shaanxi, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710021, China; 4 Experimental surgery, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 5 State Key Laboratory of Cancer Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 6 Department of digestive surgery, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: In this study, we established a gastric cancer cell line with lentivirus mediated NCL gene silencing, and studied the effect of NCL silencing on the proliferation of gastric cancer cells. We provide a theoretical basis for further exploring the molecular mechanism of NCL in gastric cancer. **Methods:** Small hairpin RNA (shRNA) mediated lentivirus system was used to silence NCL gene in gastric cancer cells. And RT-qPCR and immunoblotting were used to detect gene silencing effect. CCK-8 assay and plate clone formation experiment were used to detect the proliferation of gastric cancer cells. **Results:** Agarose gel electrophoresis was used to detect the pKLO.1-NCL vector identified by restriction enzyme digestion, and the result showed two bands located at 5000 bp and 2000 bp. Lentivirus was produced by using HEK293T cells, and then infected SGC-7901 gastric cancer cells. Western blot showed that the protein level of NCL in sh NCL group decreases significantly compared with that in control group. RT-qPCR showed that the expression of NCL in sh NCL group reduces significantly compared with that in control group, which was 0.4209 ± 0.087 times than that in control group (P<0.001). CCK-8 assay showed that the absorbance value of sh NCL group on the 5th day significantly reduces compared with that of control group (P<0.001). The plate clone formation experiment showed that the clone formation ability of sh NCL group significantly reduces, and the number of clones drops significantly (P<0.01). **Conclusions:** We establish a lentivirus mediated NCL silenced sys-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81672751);陕西省重点研发计划项目(2019SF-010)

作者简介:闫静川(1999-),男,本科,E-mail:1246254725@qq.com

△ 通讯作者:李纪鹏(1974-),男,副教授,副主任医师,主要研究方向:生物医学,E-mail:jipengli1974@aliyun.com,电话:13991316190

(收稿日期:2020-01-31 接受日期:2020-02-28)

tem in gastric cancer cell line SGC-7901 successfully, and demonstrate the silencing of NCL gene in SGC-7901 cells can inhibit the proliferation of cells. Our finding can provide a basis for the study of the role of NCL gene in gastric cancer cells.

Key words: Necleolin; lentivirus; Gene silencing; Gastric cancer; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; R735.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2020)17-3212-05

前言

核仁素(C23,necleolin,NCL)是核仁最丰富的非核糖体蛋白之一,是一种主要位于核仁中的多功能蛋白,在聚合酶 I 转录中起着重要作用[1]。由于 NCL 在核仁外部、核质、细胞质以及细胞膜都有分布，并且其分布在细胞内维持在一定稳定状态，因此 NCL 能够在癌症发展中发挥不同的作用[2]。NCL 的过表达及其在细胞膜上定位的增加是几种肿瘤细胞的共同特征[3]。NCL 参与多种方面,例如核糖体生物发生、染色质组织和稳定性、DNA 和 RNA 代谢、细胞分裂素、细胞增殖、血管生成、凋亡调节、应激反应和 microRNA 转录[2,4-6]。NCL 的功能涉及众多的病理过程,尤其是在肿瘤形成和病毒感染方面,这使得 NCL 成为抗肿瘤和抗病毒发展策略的潜在治疗靶点[7,8]。胃癌是发病率和死亡率都较高的恶性肿瘤。胃癌的分子分型分为四类:EBV 阳性、微卫星不稳定型、基因组稳定型和染色质不稳定型[9]。研究表明 NCL 在胃癌中高表达[10],但是其对胃癌发生发展的影响目前还有待深入研究。本文利用慢病毒介导的系统构建了 NCL 基因沉默的胃癌细胞系,旨在阐明该系统在研究 NCL 对胃癌细胞增殖的恶性表型的影响，为后续研究 NCL 基因在胃癌细胞中的功能以及动物的研究提供可行可靠的方法,为研究 NCL 基因对胃癌的发生发展的影响的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI 1640 培养基 DMEM 高糖培养基、FBS 为美国 Gibco 公司产品;TRIzol 试剂、Lipofectamine 2000 均为美国 Invitrogen 公司产品;PVDF 膜为德国 Millipore 公司产品;RIPA 强细胞裂解液、ECL 发光试剂盒、和 BCA 蛋白浓度检测试剂盒以及 HRP 标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠的二级抗体均为西安晶彩生物科技有限公司产品。载体构建所用 T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Age* I 和及 *Nco* I、反转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 均为日本 TaKaRa 公司产品;necleolin 抗体为美国 CST 公司产品,β-Actin 为美国 Sigma Aldrich 产品;pLKO-TRC 质粒、病毒包装质粒 psPAX 和 pMD2.G、大肠杆菌感受态 DH5α 由空军军医大生物化学与分子生物学教研室馈赠;qPCR 引物和 shRNA 引物为北京奥科股份有限公司合成，测序由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胃癌细胞系 SGC-7901 为空军军医大学肿瘤生物学国家重点实验室提供;SGC-7901 细胞用含 10%的胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养。人胚肾上皮细胞 HEK293T 来源于空军军医大学生物化学与分子生物学教研室;HEK293T 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养。培养液中添加青霉素和链霉素,细胞置于 37℃,5%的 CO_2 孵箱中恒温培养。

1.2.2 NCL 基因沉默的病毒载体质粒的构建 利用 Sigma Aldrich 公司 MISSION shRNA 产品设计针对 NCL 的 shRNA，设计引物序列如下:shNCL-Forword:5'-CCGGCGTTCGGGCAAGGATAGTTACCTCGAGGTAACTATCCTTGCCCGAACGTTTTTG-3';

shNCL-Reverse:5'-AATTCAAAAACGTTCGGGCAAGGATAGTTACCTCGAGGTAACTATCCTTGCCCGAACG-3';

引物由北京奥科生物合成。用无酶水将引物溶解至 200 mM，分别取 2 μL 上游和下游引物加于 95 ℃水浴锅中进行反应 5 min,自然降温至室温备用。pLKO-TRC 载体利用限制性内切酶 *EcoR*I 和 *Age*I 进行酶切，利用紫外成像系统检测酶切情况,观察到 7000 bp 和 1900 bp 两条带,利用胶回收试剂盒回收 7000 bp 左右的条带。将退火的 shRNA 与回收的载体片段在 4 ℃过夜连接，连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态,将 DH5α 涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板过夜培养，挑取单克隆进行扩增，提取质粒利用 *EcoR* I 和 *Nco* I 进行酶切鉴定,同时质粒送至北京奥科生物进行测序。

1.2.3 慢病毒的包装 构建 NCL 基因沉默的病毒载体质粒 pLKO.1-NCL，与病毒包装辅助质粒 psPAX、pMD2.G 按 4:3:1 比例混合后利用 Lipofectamine 2000 共转染 HEK293T 细胞,在培养 48 h 和 72 h 后收集培养上清，经 1000 rpm 离心 10 min 后,病毒上清用 0.45 μM 无菌滤器过滤,分装后置于 -80 ℃保存。同时包装 pLKO.1-control 质粒作为对照。

1.2.4 慢病毒感染和稳定细胞株筛选 在 6 孔培养板每孔内接种 3-5× 10^5 个细胞，使其进行感染时细胞融合率控制在 30-50 %;取 1 mL 新鲜病毒液和 1 mL 含血清新鲜培养液混合，加入 polybrene(聚凝胺,终浓度 0.8-1 μg/mL),室温 2500 rpm 离心 45 min,置于二氧化碳培养箱(37 ℃、5% CO_2)孵育过夜;24 h 后更换为 10 %血清的新鲜细胞培养液并添加 puromycin(嘌呤霉素,工作浓度 2 μg/mL)筛选。嘌呤霉素筛选过程为 3-5 天,待未感染病毒组细胞全部死亡后将抗性药物浓度减半致维持计量,扩增细胞备用。

1.2.5 细胞 RNA 提取和 qRT-PCR 取 5× 10^6 个处于对数生长期细胞,PBS 洗 3 次,使用 Trizol 提取细胞总 RNA,放置 -80 ℃备用。以总 RNA 为模板,以 Oligo(dT)引物为引物,利用日本宝生物的反转录酶获得 cDNA 模板,利用 SYBR Green 荧光染料进行定量 PCR 检测 NCL 的基因沉默效果，以 β-actin 为内参照。NCL 引物序列为:Forward Primer: GGTGGTCGTTTCCCCAACAAA,Reverse Primer: GCCAGGTGTGGTAACTGCT;β-actin 引物序列为:Forward Primer: CGGCACCACCATGTACCCTG,Reverse Primer: ACACGGAGTACTTGCGCTCA。

1.2.6 细胞样品处理和免疫印迹 取 5× 10^6 个处于对数生长期细胞,PBS 洗 3 次,使用 RIPA 提取细胞蛋白,BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,调整浓度后蛋白上样量为 10-20 μg,进行电

泳。电泳结束后将蛋白转移至 NC 膜上，牛奶封闭 1 h 后，分别于 4 ℃过夜孵育 NCL 和 β-actin 的一抗。TBST 洗去一抗后再孵育相应的 HRP 标记的二抗，利用 ECL 发光液进行发光显色并拍照，以 β-actin 为内参照。

1.2.7 CCK-8 **实验检测细胞增殖** 在 96 孔板中接种细胞悬液（100 μL/ 孔），每 1000 个细胞。按照实验需要处理 0.5-4 h。每孔加 10 μL（原细胞培养液体积 1/10）CCK-8 溶液，以加等量细胞培养基和 CCK-8 但不加细胞的孔作为空白对照。在细胞培养箱内继续孵育 0.5-4 小时。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光值。以时间为横坐标、绝对吸光值（各组吸光值减去空白哦对照组吸光值）为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.8 **平板克隆形成实验检测细胞增殖** 取 300-500 个稳定建系的胃癌细胞 SGC-7901 铺至 6 孔板中，培养 2-3 周至每个克隆含有 50 个细胞，PBS 清洗后，利用 4 %的多聚甲醛固定，0.1 %结晶紫染色后，流水冲洗，空气干燥；利用奥德赛扫描仪进行扫描，ImageJ 统计克隆形成数。

1.3 统计学分析

采用 Prism 软件绘图及数据分析，数据均采用均数± 标准差表示，采用 student-t 检验进行差异性分析，$P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 NCL 基因沉默的病毒质粒的构建

pLKO-TCR 载体经 *EcoR* I 和 *Age* I 双酶切获得约 7000 bp 片段。将靶向 NCL 的双链 shRNA 与该片段连接。提取质粒后利用 *EcoR* I 和 *Nco* I 酶切鉴定，琼脂糖凝胶电泳出现预期大小（约 5000 bp 和 2000 bp）条带（图 1），说明 shRNA 与载体连接成功。阳性克隆送至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序，测序结果与设计的 shRNA 序列相同，载体构建成功。

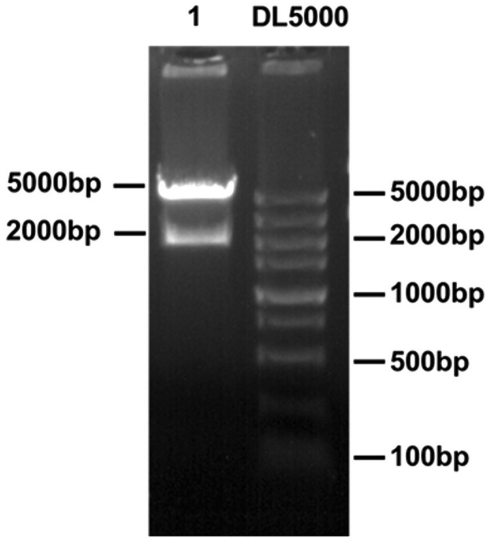

图 1 NCL 基因沉默的病毒载体的构建

Fig.1 Construction of viral plasmid silencing NCL gene

2.2 NCL 基因沉默的胃癌细胞系的建立

利用构建成功的 pLKO.1-NCL 和 pLKO.1-control 包装病毒，感染胃癌细胞系 SGC-7901，建立 NCL 沉默的的胃癌细胞系。免疫印迹结果显示，感染 pLKO.1-NCL 病毒的胃癌细胞中，NCL 蛋白表达量较感染对照病毒（pLKO.1-control）的细胞显著降低（图 2A）；荧光实时定量 PCR 结果显示，sh NCL 组中 NCL 的 mRNA 水平降低为对照组（con）的 0.4209± 0.087 倍（$P<0.001$）（图 2B 和图 2C）。以上结果显示基因沉默的 SGC-7901 细胞系成功建立。

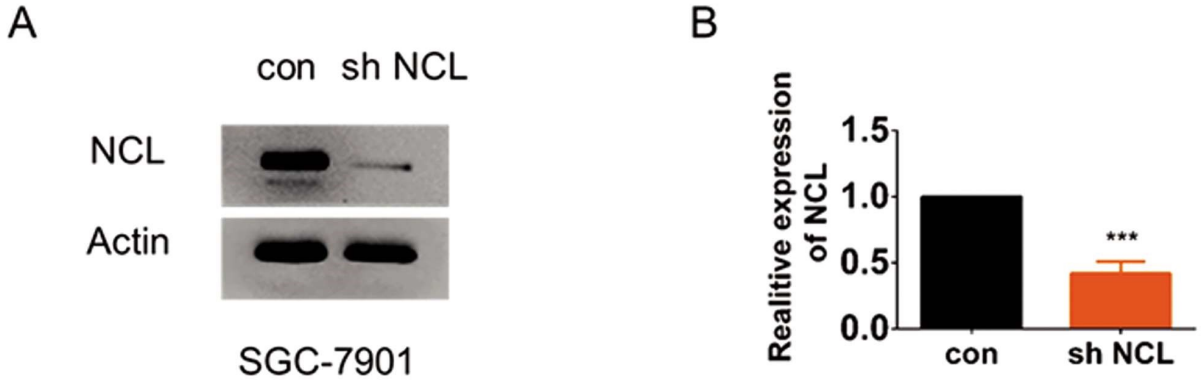

图 2 NCL 基因沉默的胃癌细胞系的建立

Fig.2 Establishment of gastric cancer cell line silenced by NCL gene

Note: Data are expressed as $\bar{x}$± SD, n=3. ***$P<0.001$, compared with con group.

2.3 NCL 基因沉默对胃癌细胞 SGC-7901 增殖的影响

利用细胞计数（CCK-8）实验和平板克隆形成实验检测细胞的增殖能力。CCK-8 实验显示，NCL 沉默后胃癌细胞 SGC-7901 的增殖明显受到抑制，在细胞生长的第 5 天，CCK-8 试剂处理后，450 nm 处的吸光值较对照组显著降低（$P<0.001$）（图 3A）。平板克隆形成实验结果显示，NCL 沉默组克隆形成数较对照组显著降低（$P<0.01$）。上述结果说明 NCL 基因沉默后胃癌细胞 SGC-7901 增殖能力降低。

3 讨论

核蛋白是一种多功能蛋白，主要定位于核仁，它参与 DNA 代谢的几个方面，广泛参与 RNA 调控机制，包括转录、核糖体组装、mRNA 稳定性和翻译以及微 RNA 合成[1]。核仁蛋白主要位于核仁和核浆的致密纤维区和颗粒区，但也存在于细胞质和细胞膜中，并且在细胞质和细胞膜中不同的核仁蛋白也同样发挥着重要的功能[2]。研究表明，在多种肿瘤细胞和上皮细胞，以

及多种肿瘤来源的组织中都发现核仁素的上调和膜定位。在细胞核中的核仁素控制染色质的状态，从而调控 RNA 聚合酶 I 转录活性[11]。其与未甲基化 rRNA 基因的结合干扰转录终止因子 1 与启动子近端终止子 T0 的结合，进一步有助于维持常染色质状态，促进 RNA 聚合酶 I 进行转录[11]。此外，核仁蛋白也是参与前提 RNA 组装和成熟的关键因素[12,13]。总之，核仁蛋白的过度表达可以通过增加蛋白质合成来促进癌细胞的持续增殖。

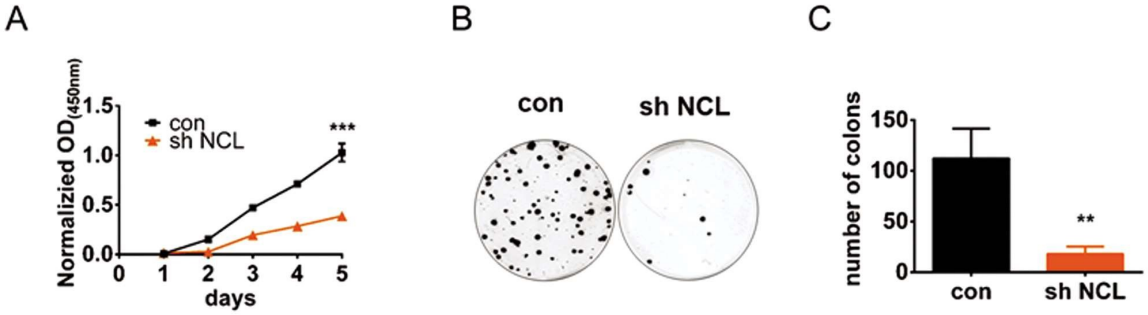

图 3 NCL 基因沉默对胃癌细胞 SGC-7901 增殖的影响

Fig.3 Effect of NCL gene silencing on the proliferation of gastric cancer cell SGC-7901

Note: Data are expressed as ± SD, n=3. **P<0.01, ***P<0.001, compared with con group.

核仁蛋白也能通过直接结合靶基因的启动子区域(在核质中)或通过调节 mRNA 的稳定性或翻译(在细胞质中)发挥转录因子的作用促进肿瘤的发生。例如，核仁蛋白和人异种核核糖核蛋白 K(hnRNP K)分别与 VEGF 启动子区富含鸟苷(G)和胞嘧啶(C)的序列选择性结合，作为转录激活因子促进 VEGF 的表达[14]。在 mRNA 水平上，核仁蛋白调节与癌症生长和发展相关的几个关键蛋白的表达，如 BCL2、p53、Akt1、MMP-9、MMP-7 等[2]。核仁蛋白 NCL 与 BCL2 mRNA 富含腺嘌呤尿嘧啶(AU)的元素结合，增加了其稳定性，导致 BCL2 在多种癌症中的过度表达[15]；NCL 调控 MMP-9 也有着类似的机制，核仁蛋白结合到 mRNA 的 3' 非翻译区(3' UTR)，提高了蛋白酶的翻译效率，MMP-9 表达上调[16]。近期实验证明，在肺癌中，C 端截短的 NCL (TNCL) 促进包括 MMP9 和低氧诱导因子 1α (HIF1α) 在内的众多癌基因的表达，并且抑制 BRD4、PCM1、TFG 和 KLF6 各种肿瘤抑制因子的表达[17]。此外，核仁蛋白通过调控 HPV18 增强子区染色质结构参与 HPV18 相关宫颈癌的发生。核仁蛋白表达下调导致 E6 和 E7 癌基因转录抑制，选择性抑制 HPV18+ 宫颈癌细胞生长[18]。此外，NCL 在乳腺癌中能够调控特定的 miRNAs 的表达，并且与正常组织相比，肿瘤标本中核仁调节的 miRNAs(如 miR-103，和 miR-222 等)有显著的过度表达[19,20]。在多种肿瘤中 NCL 的高表达与患者预后不良相关。对人源性胰腺导管腺癌(PDAC)的分析显示，与非肿瘤组织相比，74.5%的病理组织显示核仁蛋白表达增加，并且核仁蛋白表达增加的患者总生存率显著降低[21]。随着核仁蛋白在癌症发生机制的研究的深入，以及其在人类癌症中的表达，引起了靶向治疗领域的兴趣。细胞表面核仁蛋白已被证实为抗癌治疗的新靶点。目前已有的基于核仁蛋白的靶向策略包括 HB-19 和 N6L 核仁蛋白拮抗剂(NucAnt)假肽、AS1411 适配体和 F3 肽[22-24]。这些靶向药物在人类乳腺癌细胞、肺癌细胞、胰腺癌细胞模型以及胶质瘤小鼠模型上都有较好的效果[25-28]。

尽管 NCL 在促进肿瘤的发展发面发挥重要的作用，但是其在胃癌中的研究仍然较少。NCL 在胃癌发生发展的过程中，其定位能够从细胞核向细胞膜上转移，并且与膜上的肿瘤坏死因子 Tipalpha 结合，促进胃癌的发展[29]。在一项对胃癌的临床研究中，发现 124 例胃癌患者中 85 例(68.5%)核仁高表达，核仁蛋白表达的胞浆染色和核仁染色均与患者预后相关，核仁蛋白的高水平表达是预后较好的独立指标，而胞浆中 NCL 的高表达则与 GC 患者预后较差密切相关[10]。进一步的实验表明，利用 NCL 的小干扰 RNA 处理胃癌细胞 MGC803，细胞的迁移和侵袭能力受到抑制，并且 NCL 能过通过上调 Erk1/2 和 Akt 信号通路介导 BMP2 诱导的胃癌 EMT[30]。而我们的研究中，利用慢病毒介导的 shRNA 沉默 NCL，研究 NCL 对胃癌细胞增殖的影响，结果表明 NCL 能够促进胃癌细胞的增殖能力，这种促进细胞增殖的机制可能是通过激活 Erk1/2 和 Akt 信号通路实现的。本文中所用到的慢病毒介导的基因敲减的系统能够为研究 NCL 促进胃癌恶性表型的机制以及后续动物实验提供可靠的方法，同时，NCL 敲减导致胃癌细胞增殖受到抑制的表型为研究 NCL 在胃癌中的作用提供了基础。

参 考 文 献(References)

[1] Jia Wen-yu, Yao Zhen-yu, Zhao Jian-jun, et al. New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL)[J]. Life Sci, 2017, 186: 1-10

[2] Berger CM, Gaume X, Bouvet P. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer[J]. Biochimie, 2015, 113: 78-85

[3] Ugrinova I, Petrova M, Chalabi-Dchar M, et al. Multifaceted Nucleolin Protein and Its Molecular Partners in Oncogenesis [J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2018, 111: 133-164

[4] Scott DD, Oeffinger M. Nucleolin and nucleophosmin: nucleolar proteins with multiple functions in DNA repair [J]. Biochem Cell Biol, 2016, 94(5): 419-432

[5] Durut N, Sáez-Vásquez J. Nucleolin: dual roles in rDNA chromatin transcription[J]. Gene, 2015, 556(1): 7-12

[6] Srivastava M, Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights [J]. FASEB J, 1999, 13 (14): 1911-1922

[7] Chen Zhou, Xu Xin-hua. Roles of nucleolin. Focus on cancer and anti-cancer therapy[J]. Saudi Med J, 2016, 37(12): 1312-1318

[8] Koutsioumpa M, Papadimitriou E. Cell surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2014, 9

(2): 137-152

[9] Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma [J]. Nature, 2014, 513(7517): 202-209

[10] Qiu Wen-sheng, Zhou Fang, Zhang Qian, et al. Overexpression of nucleolin and different expression sites both related to the prognosis of gastric cancer[J]. Apmis, 2013, 121(10): 919-925

[11] Cong Rong, Das S, Ugrinova I, et al. Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(19): 9441-9454

[12] Roger B, Moisand A, Amalric F, et al. Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly[J]. Chromosoma, 2003, 111(6): 399-407

[13] Bouvet P, Diaz JJ, Kindbeiter K, et al. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain[J]. J Biol Chem, 1998, 273(30): 19025-19029

[14] Uribe DJ, Guo Ke-xiao, Shin YJ, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and nucleolin as transcriptional activators of the vascular endothelial growth factor promoter through interaction with secondary DNA structures[J]. Biochemistry, 2011, 50(18): 3796-3806

[15] Ishimaru D, Zuraw L, Ramalingam S, et al. Mechanism of regulation of bcl-2 mRNA by nucleolin and A+U-rich element-binding factor 1 (AUF1) [J]. J Biol Chem, 2010, 285(35): 27182-27191

[16] Fähling M, Steege A, Perlewitz A, et al. Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1731(1): 32-40

[17] Hsu TI, Lin SC, Lu PS, et al. MMP7-mediated cleavage of nucleolin at Asp255 induces MMP9 expression to promote tumor malignancy [J]. Oncogene, 2015, 34(7): 826-837

[18] Grinstein E, Wernet P, Snijders PJ, et al. Nucleolin as activator of human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cervical cancer [J]. J Exp Med, 2002, 196(8): 1067-1078

[19] Pichiorri F, Palmieri D, De Luca L, et al. In vivo NCL targeting affects breast cancer aggressiveness through miRNA regulation [J]. J Exp Med, 2013, 210(5): 951-968

[20] Kumar S, Gomez EC, Chalabi-Dchar M, et al. Integrated analysis of mRNA and miRNA expression in HeLa cells expressing low levels of Nucleolin[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9017

[21] Gilles ME, Maione F, Cossutta M, et al. Nucleolin Targeting Impairs the Progression of Pancreatic Cancer and Promotes the Normalization of Tumor Vasculature[J]. Cancer Res, 2016, 76(24): 7181-7193

[22] Romano S, Fonseca N, Simões S, et al. Nucleolin-based targeting strategies for cancer therapy: from targeted drug delivery to cytotoxic ligands[J]. Drug Discov Today, 2019, 24(10): 1985-2001

[23] Bates PJ, Reyes-Reyes EM, Malik MT, et al. G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017, 1861(5 Pt B): 1414-1428

[24] Yazdian-Robati R, Bayat P, Oroojalian F, et al. Therapeutic applications of AS1411 aptamer, an update review [J]. Int J Biol Macromol, 2019, S0141-8130(19): 37475-6

[25] Gregório AC, Lacerda M, Figueiredo P, et al. Meeting the needs of breast cancer: A nucleolin's perspective [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2018, 125: 89-101

[26] Romano S, Moura V, Simões S, et al. Anticancer activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of novel anti-nucleolin antibodies[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 7450

[27] Mosafer J, Mokhtarzadeh A. Cell Surface Nucleolin as a Promising Receptor for Effective AS1411 Aptamer-Mediated Targeted Drug Delivery into Cancer Cells[J]. Curr Drug Deliv, 2018, 15(9): 1323-1329

[28] Noaparast Z, Hosseinimehr SJ, Piramoon M, et al. Tumor targeting with a (99m)Tc-labeled AS1411 aptamer in prostate tumor cells[J]. J Drug Target, 2015, 23(6): 497-505

[29] Watanabe T, Hirano K, Takahashi A, et al. Nucleolin on the cell surface as a new molecular target for gastric cancer treatment [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(5): 796-803

[30] Yang Yong-gang, Yang Chun-yan, Zhang Jian-ping. C23 protein meditates bone morphogenetic protein-2-mediated EMT via up-regulation of Erk1/2 and Akt in gastric cancer [J]. Med. Oncol, 2015, 32 (3): 76

(上接第 3247 页)

[21] Shen Y, Dong LF, Zhou RM, et al. Role of long non-coding RNA MIAT in proliferation, apoptosis and migration of lens epithelial cells: a clinical and in vitro study [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(3): 537-548

[22] Yang R, Chen J, Wang L , et al. LncRNA BANCR participates in polycystic ovary syndrome by promoting cell apoptosis [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(3): 1581-1586

[23] Yu X, Zheng H, Chan MT , et al. BANCR: a cancer-related long non-coding RNA [J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(9): 1779-1787

[24] Ma S, Yang D, Liu Y, et al. LncRNA BANCR promotes tumorigenesis and enhances adriamycin resistance in colorectal cancer[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(8): 2062-2078

[25] Zou Y, Li J, Chen Y, et al. BANCR: a novel oncogenic long non-coding RNA in human cancers [J]. Oncotarget, 2017, 8 (55): 94997-95004

[26] Wang Y, Gu J, Lin X , et al. lncRNA BANCR promotes EMT in PTC via the Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2018, 15 (4): 5865-5870

[27] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741

[28] Brennan LA, Kantorow WL, Chauss D, et al. Spatial expression patterns of autophagy genes in the eye lens and induction of autophagy in lens cells[J]. Mol Vis, 2012, 18: 1773-1786

[29] Morishita H, Mizushima N. Autophagy in the lens [J]. Experimental Eye Research, 2016, 144: 22-28

[30] Cadwell, Ken. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis [J]. Nature Reviews Immunology, 2016, 16(11): 661-675

[31] Saint RJ, D'Elia RV, Bryant C, et al. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are modulated during Francisella tularensis infection, but inhibition of extracellular-signal-regulated kinases (ERKs) is of limited therapeutic benefit [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016. 35 (12): 2015-2024

[32] Zhang GL, Guo YY, Zhang L, et al. The effect of edaravone on MAPKs signal pathway associated with Abeta (25-35) treatment in PC12 cells [J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2015, 46(2): 179-184, 190