

食管鳞癌中 miRNA224 调控 *RKIP* 基因表达及 miRNA224 基因启动子区甲基化的研究

牛中喜¹, 杨晓龙², 刘明佳², 胡开锋², 陈利弘^{2△}, 刘 戟²

1. 中国人民武装警察部队总医院 胸外科(北京 100039);

2. 四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 研究食管鳞癌组织中 Raf 激酶抑制蛋白(RKIP)、miRNA224 表达情况,miRNA224 对 RKIP 的靶向作用,以及 miRNA224 基因上游启动子区甲基化水平。方法 在食管鳞癌组织及癌旁对照组织临床标本中,用免疫组化法检测 RKIP 蛋白的表达;用荧光定量 PCR 法检测 miRNA224 的表达,荧光素酶报告基因检测 miRNA224 对 *RKIP* 的靶向作用;亚硫酸盐测序 PCR(BSP)法检测食管鳞癌及癌旁对照组织 miRNA224 基因上游启动子区甲基化水平。结果 在食管鳞癌组织中,RKIP 低表达,miRNA224 高表达;在癌旁对照组织中,RKIP 高表达,miRNA224 低表达。荧光素酶报告基因验证 miRNA224 可靶向抑制 *RKIP* 3'UTR 表达。BSP 法显示食管鳞癌组织 miRNA224 上游启动子区呈低甲基化状态,癌旁对照组织呈高甲基化状态。结论 食管鳞癌组织 RKIP 表达下降、miRNA224 基因启动子甲基化状态降低,miRNA224 表达上升,*RKIP* 是 miRNA224 下游作用的靶点,可能同食管鳞癌发生密切相关。

【关键词】 miRNA224 RKIP 食管鳞癌 甲基化

MiRNA224 Regulation Role on *RKIP* Gene Expression and Methylation of miRNA224 Gene Promoter Region in Esophageal Squamous Cell Carcinoma NIU Zhong-xi¹, YANG Xiao-long², LIU Ming-jia², HU Kai-feng², CHEN Li-hong^{2△}, LIU Ji². 1. Department of Thoracic Surgery, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: chenlih@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the expression levels of tumor suppressor gene *RKIP* and miRNA224 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues. To determine whether miRNA224 targets *RKIP* and the methylation status of miRNA224 gene promoter region in esophageal carcinoma. **Methods** The expression levels of *RKIP* and miRNA224 in ESCC and normal tissue were detected by using immunohistochemistry and real-time qPCR, respectively. Luciferase assay was used to determine the targeting of miRNA224 to *RKIP*. The methylation status of miRNA224 promoter region was studied by bisulfite sequencing PCR (BSP). **Results** In 40 cases of ESCC, *RKIP* expression was significantly lower than that of normal tissue; miRNA224 expression was higher in ESCC than in paracancerous tissue. Luciferase assay showed that miRNA224 targets *RKIP* 3'UTR thus inhibit its expression. The miRNA224 gene promoter region was hypomethylated in ESCC. **Conclusion** Compared with normal tissue, in ESCC, *RKIP* was downregulated, while miRNA224 was upregulated, and the promoter region of miRNA224 gene was hypomethylated. *RKIP* is the target of miRNA224, which may be closely related to esophageal squamous cell carcinoma.

【Key words】 miRNA224 RKIP Esophageal squamous cell carcinoma Methylation

食管癌是世界高发的恶性肿瘤,发病率逐年上升^[1],临床治疗效果欠佳。目前对我国高发的食管鳞状细胞癌(ESCC)^[2]的研究尚不足,探讨其发生、发展的确切分子机制意义重大。Raf 激酶抑制蛋白(RKIP),可保护染色体稳定,遏止细胞增殖,促进分化,其表达缺失可导致肿瘤发生和转移^[3-5]。研究

发现 RKIP 通过 Raf-1、MEK、ERK、NF- κ B 以及 GPCR 等通路^[6-7],影响细胞生长、增殖、凋亡,与肿瘤发生密切相关^[7]。微小 RNA(miRNA)是长约 18~23 nt 的内源保守性非编码小 RNA^[8],在肿瘤中有类似癌基因/抑癌基因作用^[9]。研究证实 miRNA224 在肝癌、宫颈癌、神经胶质瘤中高表达,而在前列腺癌、直肠癌中低表达^[10-12]。miRNA224 可靶向调控 RKIP,抑制胃癌、乳腺癌细胞增殖和侵

衰^[13-14]。基因启动子区高甲基化可导致抑癌基因失活,使肿瘤发生发展^[15-17]。但该机制在 ESCC 中未见报道。

本研究以 ESCC 为对象,通过 *RKIP* 基因 3'-UTR 荧光素酶报告系统,确认 miRNA224 对 *RKIP* 的抑制作用;qRT-PCR 法检测 miRNA224 表达,免疫组化法检测 *RKIP* 蛋白表达;亚硫酸氰盐测序 PCR(BSP)检测 miRNA224 基因启动子区甲基化状态,探讨 ESCC 发生、发展机制,为筛选 miRNA224 作为 ESCC 临床标志物提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

组织标本及病例资料均来自四川大学华西医院胸外科 2014 年 7~11 月接受手术治疗的 ESCC 患者,共计 40 例(实验取材、标本处理及病历资料整理均符合相关要求)。按标本来源分为 ESCC 组和癌旁对照(正常)组,免疫组化染色试剂盒 SP9000、DAB 显色液购自北京中杉金桥公司,兔抗人 *RKIP* 单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology。苏木素、伊红、结晶紫染料购自武汉博士德生工。质粒 pMD-18T、荧光素酶报告基因载体 pSHICK2 购自广州伯信生化。pLVX-AcGFP-N1 购自 Clontech。组织基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化,质粒小抽提试剂盒、胶回收试剂盒、引物合成购自上海生工,miScript Reverse Transcription Kit、SYBR Green PCR Kit、miRcute miRNA Isolation Kit 购自 Qiagen,TRE-Trizol 购自 Invitrogen,EZ DNA 甲基化试剂盒购自 Zymo Research。Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自 Promega。Lipofectamine 2000 购自 Thermo,限制性内切酶购自 Fermentas,T4 Ligase、rTaq、Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase 购自大连宝生物,miRNA mimics 购自上海吉玛公司,测序由深圳华大完成,大肠杆菌、DH5 α 及细胞培养转染相关试剂均为本实验室保存。

1.2 免疫组化检测 *RKIP* 蛋白表达水平

临床标本使用体积分数为 4% 的多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋后制作 2 μ m 的切片,使用 *RKIP* 抗体及 DAB 显色法检测肿瘤组织及癌旁组织中 *RKIP* 表达情况。每个标本分别经两名经验丰富的病理科医师独立阅片,镜下随机选不重叠的 5 个高倍视野(200 倍),根据细胞 DAB 染色的着色率及着色程度,按临床评价标准对组织样本中 *RKIP* 表达

情况进行分级。具体标准如下:0 级:几乎无着色,阳性细胞百分比<10%;1 级:着色弱,阳性细胞百分比 10%~49%;2 级:着色较明显,阳性细胞百分比 50%~70%;3 级:着色强,阳性细胞百分比>70%。

1.3 荧光定量 PCR 检测 miRNA224 水平

TRE-Trizol 试剂盒提取标本组织总 RNA。逆转录所得 cDNA,以 U6 基因为内参行实时定量 PCR。引物序列:U6 上游引物 5'-CTCGCTTCG GCAGCACA-3',下游引物 5'-AACGCTTCACGA ATTTGCGT-3',扩增产物长度 94 bp;miRNA224 上游引物 5'-GTCTGATCCAGTGCAGGGTCC GAGGTATTCGCAC TGGATACGACTAAACG-3',下游引物 5'-CGCA AGTCCTAGTGGTTCCG-3',扩增产物长度 270 bp。

荧光定量 PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60.2~66.2 $^{\circ}$ C 每隔 0.4 $^{\circ}$ C (共计 13 个温度梯度)退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 44 次,最后由 55~95 $^{\circ}$ C 升温,每上升 0.5 $^{\circ}$ C 维持 5 s 获得溶解曲线。溶解曲线为单峰,显示反应特异性良好。在最佳退火温度 62.6 $^{\circ}$ C 下,再用 8 个 10 倍稀释的样本浓度行 PCR,建立 PCR 扩增标准曲线,确定扩增效率。通过 Bio-Rad CFX Manager Software 1.6 软件采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

1.4 双荧光素酶报告基因检测

以人血总 DNA 为模板,PCR 扩增野生型 *RKIP* 基因 3'UTR 片段(引物序列:P1:5'-CTCG AGGAGCAGGACAGGCCGCTAAAG-3',P2:5'-GCGGCCGCGCCATGTCCCAACAACAGC-3'),扩增片段长 800 bp,平端连接 pMD-18T。针对 miRNA224 结合位点,设计突变引物(P3:5'-GGGTATTTTGGTTGACACTTGGGGTTCATCAA-3',P4:5'-TTTGATGACCCCAAGTGTCAAC CAAAATACCC-3'),分别以 P1+P4、P2+P3 做突变 PCR,产物长度分别为 390 bp 和 450 bp。以这两段产物为模板,以 P1+P2 为引物进行融合 PCR,扩增出 *RKIP* 3'UTR 上 miRNA224 结合位点突变的全长片段 800 bp,进而构建其荧光素酶报告基因载体。将上述两 pMD-18T 克隆载体经 *Xho* I 及 *Not* I 双酶切后连接至含有相同酶切位点的 psiCheck 表达载体,筛选阳性克隆后测序验证,构建含有野生型 *RKIP* 3'UTR 的 psiCheck-*RKIP* 3'UTR wt 和 *RKIP* 3'UTR 中 miRNA224 结合位点突变的 psiCheck-*RKIP* 3'UTR mt 荧光素酶报告基因载

体。

进行双荧光素酶报告基因检测时,293T 细胞以每孔 6×10^4 接种 12 孔板,培养过夜后,用 Lipofectamine 2000 以 psiCheck-*RKIP* 3'UTR wt、miRNA224 mimics、psiCheck-*RKIP* 3'UTR mt、miRNA224 mimics 或相应空白对照组共转染细胞。转染 48 h 后用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)行双荧光素酶活性检测。以萤火虫荧光素酶活性检测值为内参照,计算该组海肾荧光素酶与内参的比值为每组的相对荧光强度。

1.5 BSP 法检测 miRNA224 启动子区甲基化水平

提取临床标本组织总 DNA,用亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA(EZ DNA 甲基化试剂盒)。以修饰后的 DNA 为模板,设计引物扩增 miRNA224 基因上游启动子区片段(BSP 引物序列: F, 5'-GGGGAAGGTCCTGGGTATCT-3', R, 5'-CCC ATGGTTAGCTGGCAGAA-3')。PCR 反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 30 s,62 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s,上述条件循环 35 次,最后72 ℃ 延伸 10 min,20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,胶回收纯化后产物克隆至 pTA2 载体。菌液 PCR 及琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性后送测序。

1.6 统计学方法

采用非参数 Wilcoxon 符号秩和检验比较 ESCC/癌旁对照组 miRNA224 的表达差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测 RKIP 蛋白在 ESCC 与正常组织中的表达

免疫组化结果如图 1 所示,正常组织中的细胞排列规整,细胞形态大小均一,边界清晰,可明显分辨出食管上皮细胞;而 ESCC 组织中出现密集的未分化上皮细胞,细胞排列紊乱,细胞核异常增大且大小不一,染色质数目不均,符合典型的肿瘤细胞特征。RKIP 免疫组化检测结果显示,40 例 ESCC 组织免疫组化染色 RKIP 蛋白表达均为 0~1 级,而正常组织中 19 例 RKIP 蛋白表达为 1~2 级,21 例表达为 3 级。ESCC 组织及正常组织中,RKIP 蛋白阳性表达率分别为 28.16% 和 71.08% ($P<0.05$)。结果初步证实,RKIP 蛋白在 ESCC 组织中低表达,在正常组织中广泛高表达。

2.2 荧光定量 PCR 检测 miRNA224 在 ESCC 与正常组织中的表达

miRNA224 最佳退火温度为 62.6 ℃,此温度下扩增效率为 91.0%,内参 *U6* 最佳退火温度为 60.6 ℃,此温度下扩增效率为 92.8%。结果如图 2 所示,ESCC 组织中 miRNA224 表达平均值为 1.457,正常组织 miRNA224 表达平均值为 0.134。两组结果差异有统计学意义($P<0.01$)。

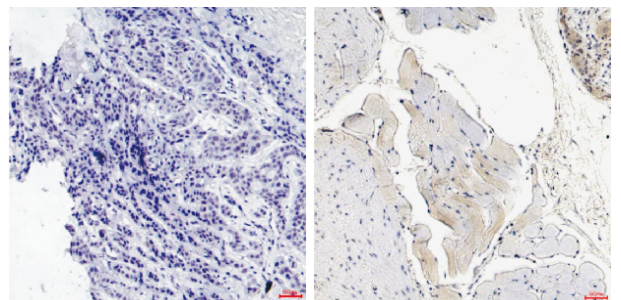


图 1 ESCC 组织(左)和正常组织(右)RKIP 的免疫组化染色结果。 $\times 100$

Fig 1 Immunohistochemical staining of RKIP in ESCC (left) and normal esophageal tissues (right). $\times 100$

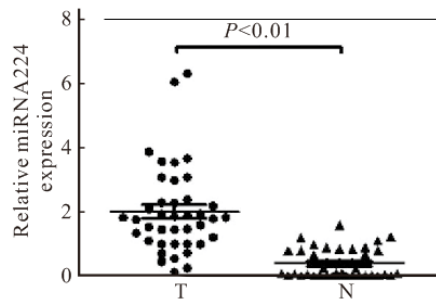


图 2 ESCC 与正常组织中 miRNA224 的表达
Fig 2 Real time PCR result of miRNA224 in ESCC (T) and normal esophageal (N) tissues

2.3 双荧光素酶报告基因检测 miRNA224 对 RKIP 基因的靶向作用

为验证 miRNA224 是否可靶向抑制 *RKIP* 基因表达,我们将 *RKIP* 基因 3'UTR 区域中 miRNA224 的可能结合位点克隆到 psiCheck 质粒中荧光素酶报告基因的下游。双荧光素酶报告基因检测结果如图 3 所示,单转染 psiCheck-*RKIP* 3'UTR wt 时(左侧条柱),荧光素酶报告基因正常表达,表现出一定荧光。共转染 miRNA224 mimics 与 psiCheck-*RKIP* 3'UTR wt 时(右侧条柱),miRNA224 mimics 结合荧光素酶基因 mRNA 3'端的 *RKIP* 3'UTR wt 片段,沉默荧光素酶 mRNA,使荧光素酶表达减少,相对荧光强度较左侧条柱显著减弱,差异有统计学意义($P<0.05$)。当 *RKIP*

3'UTR 中 miRNA224 的可能结合位点突变后 (psiCheck-*RKIP* 3'UTR mt) 与 miRNA224 mimics 共转染时 (中间条柱), miRNA224 mimics 不能与突变的 *RKIP* 3'UTR 片段结合, 其对荧光素酶表达的抑制作用消失, 相对荧光强度恢复, 与单转染组相比差异无统计学意义。以上共同说明了 miRNA224 可靶向作用于 *RKIP* 3'UTR 从而抑制其表达。

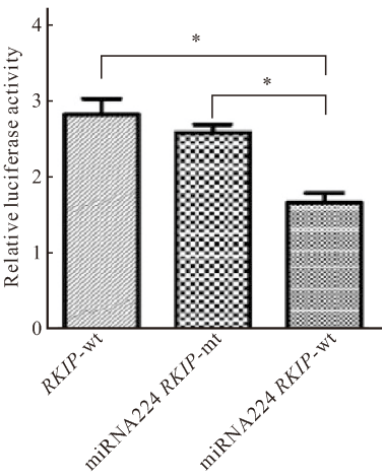


图 3 miRNA224 靶向 *RKIP* 基因的检测
Fig 3 miRNA224 targets *RKIP*

Luciferase analysis in 293T cells. *RKIP*-wt: Transfection of wild-type *RKIP* 3' UTR only; miRNA224 *RKIP*-mt: Co-transfection of miRNA224 mimics and psiCheck-*RKIP* 3'UTR mt; miRNA224-*RKIP* wt: Co-transfection of miRNA224 mimics and psiCheck-*RKIP* 3'UTR wt. * $P<0.05$

2.4 BSP 法检测样本 miRNA224 基因启动子甲基化状态

BSP 测序结果 (图 4) 显示 ESCC 组织中 8 例

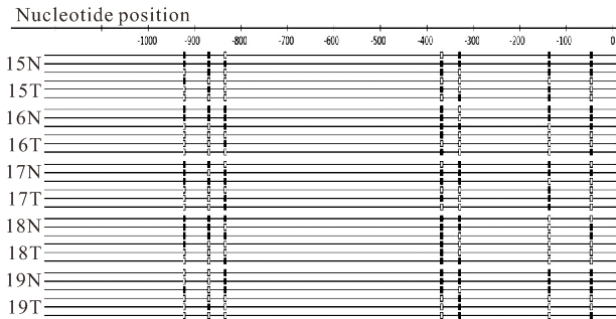


图 4 miRNA224 基因启动子甲基化状态

Fig 4 Methylation pattern of miRNA224 gene promoter CpG region
Methylation pattern of five samples. N: Normal tissue; T: Tumor tissue. White square: Unmethylated; Black square: Methylated

miRNA224 基因上游启动子区呈低甲基化状态, 甲基化率为 20% (8/40), 相配对的正常组织中 25 例 miRNA224 上游启动子区呈高甲基化状态, 甲基化率为 62.5% (25/40)。正常组织高甲基化率是 ESCC 组织的 3.13 倍, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

ESCC 是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率高, 预后差, 目前临床中晚期患者 5 年生存率很低。故阐明 ESCC 发生发展的确切分子机理, 找寻疾病早期生物学标志物, 具有重大意义。

近年来 miRNA 作为一类新近发现的癌基因/抑癌基因正逐步受到重视, 其可参与人体众多生理/病理进程的调控, 其中 miRNA224 已被证实与 ESCC 的发生发展密切相关, 是潜在的致癌基因^[18], 而其基因上游启动子区甲基化水平变化可调控其转录与表达^[19]; Ras-MAPK 激酶信号通路是一条保守通路, 在肿瘤增殖、凋亡、侵袭等众多进程中均可发挥重要作用。RKIP 是该信号通路的内源性抑制剂, 可与 Raf 激酶区相互作用, 进而影响 Ras-MAPK 信号通路的活性。现已成为国内外众多研究机构的研究热点^[20], 但针对 miRNA 作用 RKIP, 进而影响 ESCC 发生发展的假说未见报道, 故本研究将 RKIP-Ras-MAPK 激酶信号通路同 miRNA224 以及 miRNA224 基因上游启动子区甲基化水平联系起来, 探寻三者间的关系, 以及对 ESCC 发生发展的影响。

我们首先通过免疫组化技术, 发现 ESCC 组织 RKIP 蛋白表达量低于正常组织, 证实 ESCC 发生发展同 RKIP 蛋白间存在一定相关关系, *RKIP* 基因有类似抑癌基因性质。其次, 我们从 miRNA 着手, RT-PCR 结果显示 ESCC 组织中 miRNA224 表达量高于正常组织, 证明 miRNA 224 具有类似癌基因性质, 有望作为 ESCC 预防、诊断和预后判断的生物学标志物。再次, 我们构建了野生型 *RKIP* 基因 3' UTR 及针对 miRNA224 结合位点的突变型 *RKIP* 基因 3' UTR 荧光素酶表达载体, 化学发光光谱扫描结果证实 *RKIP* 基因是 miRNA224 下游作用靶基因, miRNA224 对 *RKIP* 基因具有靶向抑制作用。最后, 我们从表观遗传学角度入手, BSP 法检测 miRNA224 基因上游启动子区甲基化水平, 发现 ESCC miRNA224 甲基化水平明显低于食管旁对照组织, 证实基因上游启动子区甲基化所致基

因沉默是造成 ESCC 组织/正常组织 miRNA224 表达差异的重要原因。miRNA224 启动子区高甲基化所造成 miRNA224 的表观遗传沉默可能在抑制 ESCC 发生发展过程中发挥重要作用。

本研究仅在分子、细胞水平研究 ESCC 中 miRNA224 调控 *RKIP* 基因表达及 miRNA224 基因启动子区甲基化的情况,并未在实验动物模型上进行验证,实验结果具有一定局限性。后续研究将进一步研究 miRNA224 调控 *RKIP* 基因对 ESCC 细胞行为的影响,以及在实验动物模型上进行验证。

综上所述,本研究初步探究 DNA 甲基化、miRNA224 以及 *RKIP* 三者间可能存在的相互作用,阐明 ESCC 发生发展可能存在的确切分子机理,为 ESCC 的早期分子生物学诊断及探寻新的治疗方法提供了理论参考。

参 考 文 献

- [1] ACUNZO M, ROMANO G, PALMIERI D, *et al.* Cross-talk between MET and EGFR in non-small cell lung cancer involves miR-27a and Sprouty2. *Proc Natl AcadSci U S A*, 2013,110(21):8573-8578.
- [2] WU CY, WANG C, GUAN XC, *et al.* Diagnostic and prognostic implications of a serum mirna panel in oesophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 2014 (9): e92292 [2014-03-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3961321/>. doi: 10.1371/journal.pone.0092292.
- [3] ANDREOLI SC, GASPARINI NJ, CARVALHO GP, *et al.* Use of microRNAs in directing therapy and evaluating treatment response in colorectal cancer. *Einstein (São Paulo)*, 2014,12(2):256-258.
- [4] ARROYO JD, GALLICHOTTE EN, TEWARI M. Systematic design and functional analysis of artificial microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2014,42(9):6064-6077.
- [5] ASSOU S, AL-EDANI T, HAOUZI D, *et al.* MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex. *Hum Reprod*, 2013,28(11):3038-3049.
- [6] AL-MULLA F, BITAR MS, AL-MAGHREBI M, *et al.* Raf kinase inhibitor protein rkip enhances signaling by glycogen synthase kinase-3. *Cancer Res*, 2011,71(4):1334-1343.
- [7] BANIN HIRATA BK, ODA JM, LOSI GR, *et al.* Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. *Dis Markers*, 2014;513158[2014-01-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3925609/>. doi: 10.1155/2014/513158.
- [8] VENKATESH T, NAGASHRI MN, SWAMY SS, *et al.* Primary microcephaly gene *mcph1* shows signatures of tumor suppressors and is regulated by mir-27a in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 2013, 8(3): e54643 [2013-03-05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3589425/>. doi: 10.1371/journal.pone.0054643.
- [9] HE L, THOMSON JM, HEMANN MT, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, 435(7043):828-833.
- [10] CHEN Q, XU J, LI L, *et al.* MicroRNA-23a/b and microRNA-27a/b suppress Apaf-1 protein and alleviate hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Cell Death Dis*, 2014, 20(5):e1132[2014-03-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3973202/>. doi: 10.1038/cddis.2014.92.
- [11] CHEN Z, CHENG Q, MA Z, *et al.* Overexpression of rkip inhibits cell invasion in glioma cell lines through upregulation of miR-98. *Biomed Res Int*, 2013; 695179 [2013-12-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874320/>. doi: 10.1155/2013/695179.
- [12] CHEN Z, SAAD R, JIA P, *et al.* Gastric adenocarcinoma has a unique microRNA signature not present in esophageal adenocarcinoma. *Cancer*, 2013,119(11):1985-1993.
- [13] LIU H, LI P, LI B, *et al.* RKIP suppresses gastric cancer cell proliferation and invasion and enhances apoptosis regulated by microRNA-224. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 10095-10103.
- [14] HUANG L, DAI T, LIN X, *et al.* MicroRNA-224 targets RKIP to control cell invasion and expression of metastasis genes in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012,425(2):127-133.
- [15] BEN JEMAA A, BOURAOUI Y, SALLAMI S, *et al.* A comparison of the biological features of prostate cancer with (PSA+, PSMA+) profile according to RKIP. *Biomed Res Int*, 2013;409179[2013-08-07]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749534/>. doi: 10.1155/2013/409179.
- [16] BIRNER P, JESCH B, SCHULTHEIS A, *et al.* RAF-kinase inhibitor protein (RKIP) downregulation in esophageal cancer and its metastases. *Clin Exp Metastasis*, 2012,29(6): 551-559.
- [17] CALURA E, MARTINI P, SALES G, *et al.* Wiring miRNAs to pathways: a topological approach to integrate miRNA and mRNA expression profiles. *Nucleic Acids Res*, 2014,42(11):e96[2014-05-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066781/>. doi:10.1093/nar/gku354.
- [18] 喻 敏, 吕农华. Raf 激酶抑制蛋白在常见消化系统恶性肿瘤中的研究进展. *肿瘤*, 2013,33(4):378-381.
- [19] VANDAMME D, HERRERO A, AL-MULLA F, *et al.* Regulation of the MAPK pathway by raf kinase inhibitory protein. *Crit Rev Oncog*, 2014,19(6):405-415.
- [20] YU M, WANG Q, DING JW, *et al.* Association between raf kinase inhibitor protein loss and prognosis in cancers of the digestive system: a meta-analysis. *Cancer Biomark*, 2014, 14(5):389-400.

(2015-11-18 收稿, 2016-03-09 修回)

编辑 吕 熙