

· 基础研究 ·

稳定过表达环状 RNA circ-Fam114a2 膀胱癌 T24 细胞株的建立

王敬梓, 韩杰, 于浩, 周锐, 卢泓成, 杨潇, 李鹏超, 吕强

(南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏南京 210029)

Construction of lentiviral vector-induced circ-Fam114a2 overexpression in bladder cancer T24 cells

WANG Jing-zi, HAN Jie, YU Hao, ZHOU Rui, LU Hong-cheng, YANG Xiao, LI Peng-chao, LV Qiang

(Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish bladder cancer T24 cells with stable overexpression of circ-Fam114a2. **Methods** The pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro plasmid was used to construct lentiviruses with pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro-circ-Fam114a2 (circ-Fam114a2) or pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro-Vector (Vector). Lentiviruses were transfected into bladder cancer T24 cells. The fluorescence intensity of GFP and expression of circ-Fam114a2 were measured with fluorescence microscope, qRT-PCR assays and Northern blot. The effects of circ-Fam114a2 overexpression on T24 cell proliferation were determined with CCK-8 assay and colony formation assay. **Results** After puromycin treatment, the transfected T24 cells showed green fluorescence under a fluorescence microscopy. The qRT-PCR results showed that the expression level of circ-Fam114a2 in experimental group was 28 folds of that in control group, whereas Fam114a2 mRNA was not changed significantly. Northern blot showed that circ-Fam114a2 was successfully overexpressed in T24 cells. CCK-8 assay and colony formation assay showed that circ-Fam114a2 overexpression significantly inhibited the proliferation of T24 cells. **Conclusion** This study successfully established stable overexpression of circ-Fam114a2 bladder cancer T24 cells and preliminarily explored the inhibitory effects of circ-Fam114a2 on the proliferation of bladder cancer cells, which paved the way for further study on the role and mechanism of circ-Fam114a2 in bladder cancer.

KEY WORDS: circ-Fam114a2; circular RNA; transfection; bladder cancer

摘要: **目的** 利用慢病毒载体建立稳定过表达环状 RNA circ-Fam114a2 的膀胱癌 T24 细胞株。 **方法** 利用 pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro 质粒, 制备慢转录病毒 pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro-circ-Fam114a2 (circ-Fam114a2) 和 pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro-Vector (Vector), 并转染膀胱癌 T24 细胞系。用嘌呤霉素筛选阳性表达细胞, 并用荧光显微镜, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Northern 印记等实验验证 circ-Fam114a2 基因成环及过表达情况。最后, 通过 CCK-8 实验和克隆形成实验初步探究 circ-Fam114a2 对 T24 细胞增殖的影响。 **结果** 转染并用嘌呤霉素药筛后的 T24 细胞在荧光显微镜下呈现出绿色荧光。qRT-PCR 显示过表达组细胞 circ-Fam114a2 水平是对照组的 28 倍, 而 Fam114a2 mRNA 没有明显变化。Northern 印迹显示 circ-Fam114a2 在 T24 细胞中成功成环并过表达。CCK-8 实验和克隆形成实验表明过表达 circ-Fam114a2 显著抑制 T24 细胞增殖。 **结论** 该实验成功建立了稳定高表达 circ-Fam114a2 的膀胱癌 T24 细胞模型, 并初步探究 circ-Fam114a2 对膀胱癌细胞的增殖抑制作用。为进一步研究 circ-Fam114a2 在膀胱癌中的作用和机制奠定了基础。

关键词: circ-Fam114a2; 环状 RNA; 转染; 膀胱癌

中图分类号: R737.14

文献标志码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1009-8291.2019.06.014

膀胱癌是世界上第 10 大最常见恶性肿瘤, 2018 年约有 55 万新诊断、20 万新死亡的病例^[1]。膀胱肿

瘤内在的生物侵袭性和特异的放射、化学抗性导致高复发率和进展率^[2]。深入了解膀胱癌的发病机制有助于鉴定新的、有效的治疗靶标。

环状 RNA (circRNA) 是一类不具有 5' 末端帽子和 3' 末端 poly(A) 尾巴、并以共价键形成环形结构的非编码 RNA 分子。越来越多的研究表明, circRNA 在各种癌组织或细胞系中差异表达, 并与疾病状态及预后紧密相关^[3]。circRNA 通过 microRNA (miRNA) 海绵吸附作用保护靶基因免受 miRNA 介导的

收稿日期: 2018-11-22

修回日期: 2019-01-31

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81772711, 81602235); 江苏省“333”工程 (No. LGY201600); 江苏省重点人才计划 (No. ZDRCA201600); 江苏省高等学校重点学科建设 (No. JX10231801); 江苏省优秀学科省级启动计划 (No. BE2016791)

通信作者: 吕强, 教授. E-mail: doctorlvqiang@sina.com

作者简介: 王敬梓 (1993-), 男 (汉族), 硕士. 研究方向: 非编码 RNA、转录组. E-mail: wjz19930609@163.com

mRNA 切割,并因此参与到多种癌症的发生过程,例如肝细胞癌、胃癌、结肠直肠癌等^[4]。circRNA 也可以结合 RNA 结合蛋白(RNA-binding protein, RBPs)形成 RNA 蛋白复合物并最终影响基因表达^[3,5]。这些 circRNA 调节网络参与到细胞周期调控、信号转导、表观遗传调节或转录调控靶基因,最终调节癌细胞的增殖、分化、侵袭和转移^[4]。因此,研究环状 RNA 在膀胱癌中的作用对于深入了解膀胱癌的发病机制具有重要的意义。

我们在前期研究中,通过下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术在 5 对膀胱肿瘤组织及癌旁组织中鉴定出差异常表达的新环状 circ-Fam114a2^[6]。因此,进一步建立高表达的 circ-Fam114a2 膀胱癌细胞系对研究其在膀胱癌中的作用及机制起到了关键性作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 人膀胱癌 T24 和肾 293T 细胞株购自中科院上海细胞库。胎牛血清、胰蛋白酶、DMEM

(Dulbecco's modified Eagle medium)培养基、生物素显色检测试剂盒购自 Thermo 公司。尼龙膜(带正电荷)购自碧云天公司。Trizol 试剂、大肠杆菌菌株 DH5 α 、质粒 DNA 抽提试剂盒购自 Tiangen 公司。嘌呤霉素购自 sigma 公司。逆转录及实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂购自南京诺唯赞公司。慢病毒包装三质粒系统(pSPAX2, pMD2G, pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro)、LipofiterTM 购自汉恒公司。PCR 引物由上海生工合成。DNA 生物素探针由上海吉玛合成。Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自 Dojindo 公司。

1.2 pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro-circ-Fam114a2 慢病毒的构建

1.2.1 载体序列分析 在环状 RNA 过表达载体 pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro 中,由 EF1 启动子调控 ZsGreen 基因和 Puro 共表达,由 CMV 启动子调控目的片段的表达(图 1)。

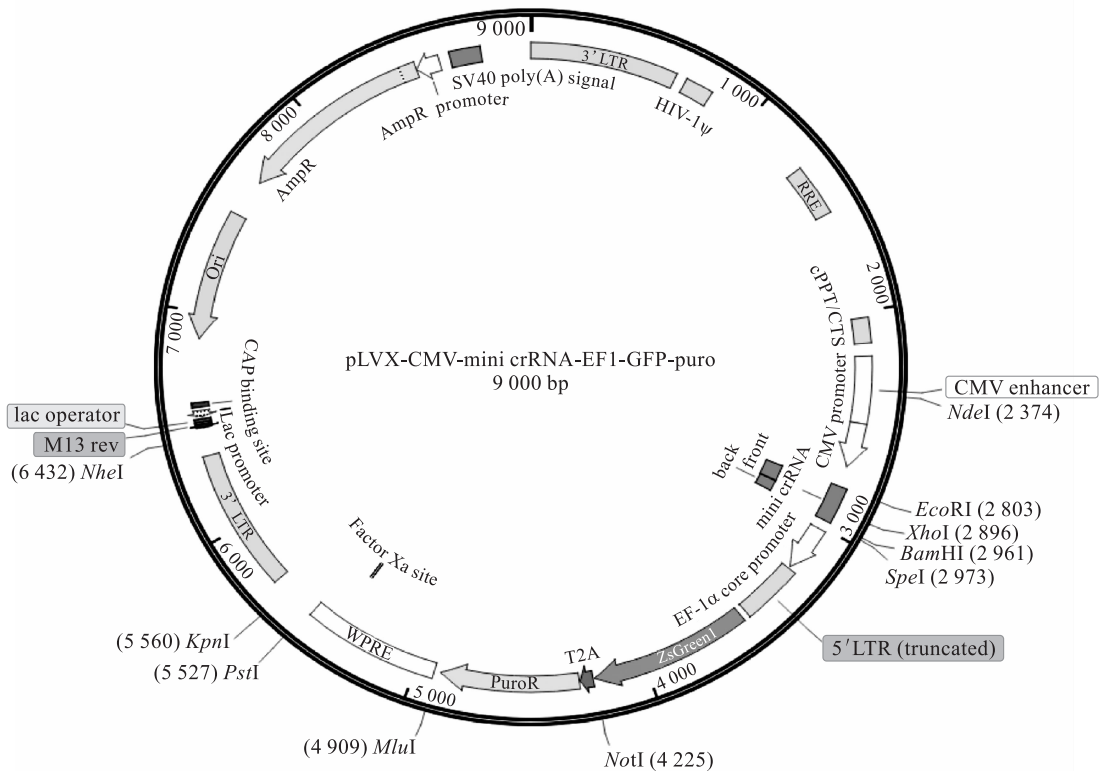


图 1 pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro 载体结构图谱

1.2.2 目的基因引物设计 根据 <http://www.circbase.org/> 和 NGS 测序结果查找 circ-Fam114a2 序列,并设计 circ-Fam114a2 的全长线性序列引物:F1, 5'-tgacttttttttataacttcagCTGATGTTCTAATCATGTCA-3'; R1, 5'-attcttttctgttcttcttaeCTGCTACATACTTGACTTCA-3'(小写字母为载体上序列),跨

成环接头反向引物:F2, 5'-GGGGCAAGTC-CATACT-3'; R2, 5'-TTGGCTGGCTCACAG-3' 以及 Fam114a2 mRNA 引物:F3, 5'-ACTGCTGTTCAGAGCACAGG-3'; R3, 5'-CCTTCTGCTATCACATCCATTGT-3'。其中 F 代表正向引物,R 代表反向引物。

1.2.3 circ-Fam114a2 慢病毒载体的构建 plvx-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro 载体用 *XhoI* 单酶切, 酶切完成后 1% 琼脂糖凝胶回收。用引物 F1 和 R1 PCR 扩增 circ-Fam114a2 序列后, 将目的片段与载体连接形成重组质粒并转入感受态细胞 DH5 α 。转化后的细胞涂于含氨苄青霉素的细菌培养板上, 37 °C 培养过夜。转化后的 circ-Fam114a2 平板挑菌后, 37 °C 250 r/min 摇菌 14 h。用菌液进行 PCR 鉴定后, 并将阳性克隆菌液送汉恒公司进行 Sanger 测序。

1.2.4 慢病毒 circ-Fam114a2 和 Vector 制备 铺板 293T 细胞并置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中用于转染。48 h 后, 待细胞密度达到 70%~80% 的汇合率时按照 LipofiterTM 试剂盒说明书进行脂质体转染, 转染 6 h 后进行换液, 于 48 h 和 72 h 后分别两次收集病毒上清(48 h 收集后置换新鲜完全培养基)。病毒上清经 4 °C、2 000 r/min 离心 10 min 后去除细胞碎片; 然后收集病毒原液上清置于超速离心管中, 4 °C、82 700 r/min, 离心 120 min 后, 将慢病毒超离液分装到灭菌处理的病毒管中, 置于 -80 °C 保存。

1.3 慢病毒感染 T24 细胞系 将 T24 细胞铺于 6 孔板中, 待胞密度达到 50%~60% 的汇合率时, 每孔加入不同量慢病毒, 并置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中。48 h 后将培养基换为加有 3 μ g/mL 嘌呤霉素的培养基培养。待传代后用含有 4 μ g/mL 嘌呤霉素的培养传代, 至第二代后更换为无嘌呤霉素培养基。

1.4 荧光显微镜观察 用 6 孔板铺入已转入 circ-Fam114a2 和 Vector 的膀胱癌 T24 细胞, 待细胞贴壁后, 置于荧光倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白的分布情况并收集图像。

1.5 qRT-PCR 检测环状 RNA circ-Fam114a2 及 Fam114a2 mRNA 表达水平 Trizol 法提取的总 RNA, 根据试剂盒说明书利用 The Applied Biosystems Stepone Plus PCR System 仪器进行逆转录及 qRT-PCR 实验。 β -actin 用作内参, 所有实验重复 3

次。得出各组循环阈值 (cycle threshold, CT) 后, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量。 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{试验组 circ-Fam114a2/Fam114a2 mRNA}} - Ct_{\text{试验组 } \beta\text{-actin}}) - (Ct_{\text{试验组 circ-Fam114a2/Fam114a2 mRNA}} - Ct_{\text{对照组 } \beta\text{-actin}})$, 其中试验组为 circ-Fam114a2 过表达组、对照组为 Vector 空载体组。

1.6 Northern 印迹检测 circ-Fam114a2 的表达水平 在环状 RNA circ-Fam114a2 接头处设计并合成生物素标记 DNA 探针, 探针序列: 5'-GAACATCAGCT-GCTACATACTTGACTTC-3'。Trizol 法提取的总 RNA (30 μ g) 先在甲醛中变性, 并在 1% 琼脂糖-甲醛凝胶中进行电泳。然后将其转移到尼龙膜上并与生物素标记 DNA 探针杂交。生物素显色检测试剂盒用于检测 DNA 探针结合的 RNA, 并使用 Image Lab 软件分析最终显色结果。

1.7 CCK-8 实验和克隆形成实验 对于 CCK-8 实验, 将 T24 细胞在 96 孔板上以每孔 1 000 个细胞的密度培养。分别在 1、2、3、4、5 d 后用 CCK-8 试剂盒测定 450 nm 波长处吸光度值。对于克隆形成实验, 将 500 个细胞接种到 6 孔板中并保持在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中 8 d。将克隆板在 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 并用 0.1% 结晶紫染色, 然后拍摄可见的群落并计数。

1.8 统计学分析 使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。通过 *t* 检验或卡方检验分析两组之间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组 circ-Fam114a2 慢病毒载体鉴定 重组 pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro-circ-Fam114a2 载体, PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示, 位置正确。进一步测序证实插入目的基因序列与 circBase 报道序列一致 (图 3)。证明重组慢病毒质粒构建成功。

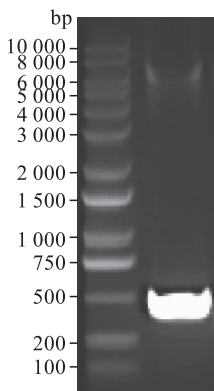


图 2 重组质粒酶切鉴定电泳结果

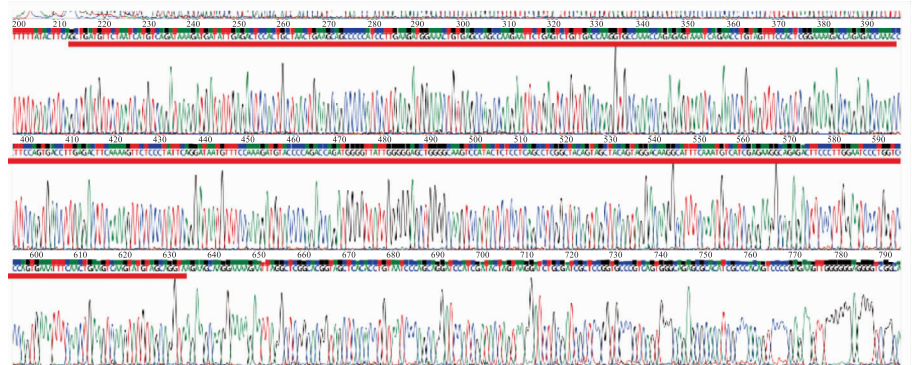


图 3 pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro-circ-Fam114a2 测序图

2.2 慢病毒感染 T24 细胞及稳定 circ-Fam114a2 过表达细胞株制备 细胞转染 48 h 后,可见部分 T24 细胞内有绿色荧光表达。转染的细胞先用含有 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养基传代培养。细胞最初死亡较多,待细胞几乎无死亡现象时,用含有 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养基继续传代培养。最终,筛选出均含有嘌呤抗性的已转染细胞。荧光倒置显微镜下可见 95% 以上细胞内有绿色荧光表达(图 4)。

2.3 qRT-PCR 检测 为了鉴定慢病毒载体成功过表达 circ-Fam114a2 而不是 Fam114a2 mRNA,我们

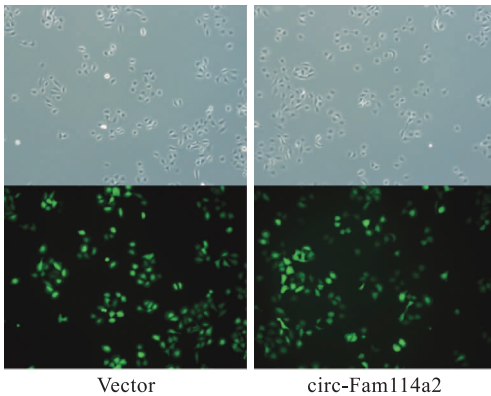


图 4 Vector 及 circ-Fam114a2 在荧光显微镜下观察的结果

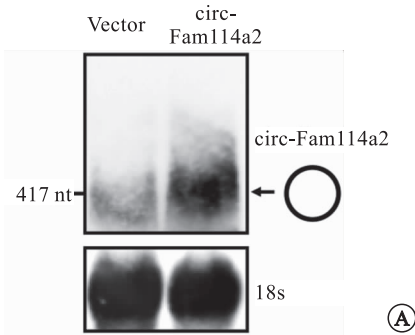


图 6 转染后 T24 细胞的 Northern 印迹(A)和相应态度值分析(B)(*** $P < 0.001$)

2.5 过表达 circ-Fam114a2 对人膀胱癌细胞 T24 增殖的影响 CCK-8 实验结果(图 7A)表明:过表达 circ-Fam114a2 后,人膀胱癌细胞 T24 增殖活力显著

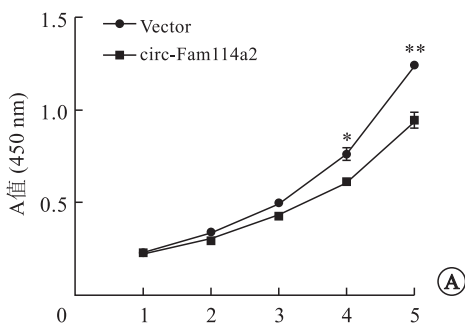


图 7 转染后 T24 细胞的 CCK8 实验(A)和克隆形成实验(B)(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

进行了 qRT-PCR 实验。qRT-PCR 结果显示(图 5),与 Vector 空载体对照组之间相比,circ-Fam114a2 慢病毒感染组 circ-Fam114a2 显著升高,差异达 28 倍($P < 0.05$),而 Fam114a2 mRNA 却没有明显改变。这证明 circ-Fam114a2 稳定过表达细胞系构建成功。

2.4 Northern 印记检测 为了鉴定慢病毒载体成功过表达 circ-Fam114a2,我们进行了 Northern 印记实验。实验结果表明(图 6):在 T24 细胞中相较于 Vector 空载体对照组,circ-Fam114a2 慢病毒感染组 circ-Fam114a2 显著升高。

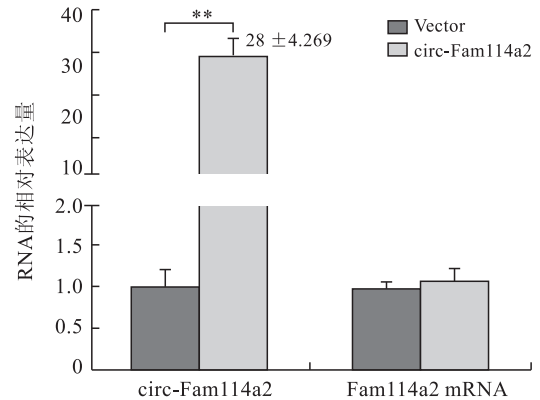
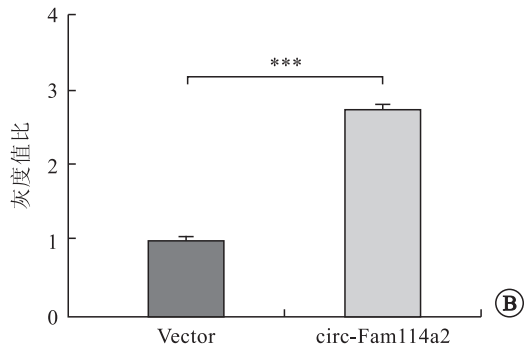
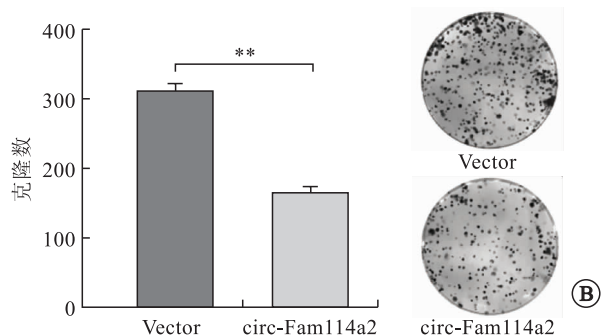


图 5 qRT-PCR 检测细胞中 circ-Fam114a2 和 Fam114a2 mRNA 的表达(** $P < 0.01$)



下降($P < 0.05$);克隆形成实验(图 7B)表明:T24 的克隆形成数目在过表达 circ-Fam114a2 之后也明显减少($P < 0.05$)。



3 讨论

最近,数以千计的内源性环状 RNA 在真核细胞中被鉴定^[7]。circRNA 成为继 microRNA(miRNA)和长非编码 RNA(lncRNAs)后,另一非编码 RNA 重要组成部分。circRNA 是一类由非选择性剪接产生的独特的内源性非编码 RNA^[5,8],首先在病毒 RNA 中发现^[9]。随着下一代测序(NGS)技术和生物信息学的进步,circRNA 目前进入学术研究前沿。与具备 5'帽和 3'尾的线性 mRNA 不同,circRNA 的 5'端和 3'端连接在一起,形成共价闭环结构^[10]。没有极性或多聚腺苷酸尾的特性增强了 circRNA 的稳定性,使它们能够抵抗 RNase R 优先降解^[11]。

膀胱癌发生、发展的潜在分子机制,特别是遗传和表观遗传的变化,人们知之甚少。近期,越来越多研究表明,一些 circRNA 在膀胱癌组织及相应癌旁组织中表达存在差异,如: Circular RNA MYLK、Circular RNA TCF25、Circular RNA PRMT5、Circular RNA CEP128、Circular RNA PTK2、Circular RNA VANGL1、Circular RNA BPTF 在膀胱癌组织中高表达^[12-18],Circular RNA HIPK3、Circular RNA BCRC-3、Circular RNA UBXN7 在膀胱癌组织中低表达^[19-21],并因此影响了膀胱癌细胞的增值、凋亡、迁移和侵袭。我们之前的研究也表明 Circular RNA ITCH 和 Circular RNA Cdr1as 在膀胱癌组织中低表达,并通过海绵吸附 miRNA 抑制膀胱癌细胞增值^[22-23]。这些研究表明 circRNA 可能参与到膀胱癌发生、发展中,且有可能成为膀胱癌独立的诊断或预后指标。我们进一步的 circRNA 高通量测序将 circ-Fam114a2 鉴定为膀胱癌相关环状 RNA^[3]。因此构建稳定高表 circ-Fam114a2 膀胱癌细胞系为研究其与膀胱癌的诊断、治疗和预后之间的关系,以及研究其对膀胱癌细胞的肿瘤生物学影响提供实验基础。

circRNA 的过表达一直有成环效率低、容易错配成环等难点。本研究中环状 RNA 过表达载体 pLVX-CMV-minicrRNA-EF1-GFP-Puro 是模拟内源性的环化模式,在扩增的目的 circRNA 序列 5'和 3'端分别加上一段通用的成环序列和 *EcoRI*、*BamHI* 两个酶切位点,然后做酶切连接。整体框架可使插入的环状 RNA 序列高效率环化,并在 AG-GT 位点精确地剪切,具有表达高、成环稳定等特点。但此载体也存在成环失败可能,于是我们进一步利用 qRT-PCR 验证了 circ-Fam114a2 在膀胱癌 T24 细胞成功过表达,而线性的 Fam114a2 mRNA 没有发生改变。

并通过 Northern 印记实验证明了相较于对照组, circ-Fam114a2 在过表达组 417nt 长度附近过表达。此外,成功建立 circ-Fam114a2 过表达 T24 细胞后,初步功能实验(CCK-8 和克隆形成实验)表明 circ-Fam114a2 在膀胱癌细胞中起抑制细胞增殖作用。

总之,本研究首次通过 qRT-PCR、Sanger 测序及 Northern 印记等实验验证了 circ-Fam114a2 的存在,并成功建立了稳定高表达的膀胱癌 T24 细胞。初步的功能实验表明 circ-Fam114a2 在膀胱癌细胞中起抑制细胞增殖作用,这为后续研究 circ-Fam114a2 在膀胱癌的功能及机制奠定了基础,为环状 RNA 的研究提供了新的思路。

参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] MASSARI F, CICCARESE C, SANTONI M, et al. Metabolic phenotype of bladder cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2016, 45: 46-57.
- [3] LI J, YANG J, ZHOU P, et al. Circular RNAs in cancer: novel insights into origins, properties, functions and implications[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(2): 472-480.
- [4] ZHAO ZJ, SHEN J. Circular RNA participates in the carcinogenesis and the malignant behavior of cancer[J]. RNA Biol, 2017, 14(5): 514-521.
- [5] WILUSZ JE, SHARP PA. Molecular biology. A circuitous route to noncoding RNA[J]. Science, 2013, 340(6131): 440-441.
- [6] YANG X, YUAN W, TAO J, et al. Identification of circular RNA signature in bladder cancer[J]. J Cancer, 2017, 8(17): 3456-3463.
- [7] MENG X, LI X, ZHANG P, et al. Circular RNA: an emerging key player in RNA world[J]. Brief Bioinform, 2017, 18(4): 547-557.
- [8] HOUSELEY JM, GARCIA-CASADO Z, PASCUAL M, et al. Noncanonical RNAs from transcripts of the *Drosophila* muscleblind gene[J]. J Hered, 2006, 97(3): 253-260.
- [9] SANGER HL, KLOTZ G, RIESNER D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. Proc Natl Acad Sci, 1976, 73(11): 3852-3856.
- [10] CHEN LL, YANG L. Regulation of circRNA biogenesis[J]. RNA Biol, 2015, 12(4): 381-388.
- [11] JECK WR, SORRENTINO JA, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. Rna, 2013, 19(2): 141-157.
- [12] BI J, LIU H, CAI Z, et al. Circ-BPTF promotes bladder cancer progression and recurrence through the miR-31-5p/RAB27A axis

- [J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(8):1964-1976.
- [13] CHEN X, CHEN RX, WEI WS, et al. PRMT5 Circular RNA promotes metastasis of urothelial carcinoma of the bladder through sponging mir-30c to induce epithelial-mesenchymal transition[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(24):6319-6330.
- [14] ZHONG Z, HUANG M, LV M, et al. Circular RNA MYLK as a competing endogenous RNA promotes bladder cancer progression through modulating VEGFA/VEGFR2 signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2017, 403:305-317.
- [15] WU Z, HUANG W, WANG X, et al. Circular RNA CEP128 acts as a sponge of miR-145-5p in promoting the bladder cancer progression via regulating SOX11[J]. Mol Med, 2018, 24(1):40.
- [16] ZHONG Z, LV M, CHEN J. Screening differential circular RNA expression profiles reveals the regulatory role of circTCF25-miR-103a-3p/miR-107-CDK6 pathway in bladder carcinoma[J]. Sci Rep, 2016, 6:30919.
- [17] XU ZQ, YANG MG, LIU HJ, et al. Circular RNA hsa_circ_0003221 (circPTK2) promotes the proliferation and migration of bladder cancer cells[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(4):3317-3325.
- [18] ZENG Z, ZHOU W, DUAN L, et al. Circular RNA circ-VAN-GL1 as a competing endogenous RNA contributes to bladder cancer progression by regulating miR-605-3p/VANG1 pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4):3887-3896.
- [19] XIE F, LI Y, WANG M, et al. Circular RNA BCRC-3 suppresses bladder cancer proliferation through miR-182-5p/p27 axis[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1):144.
- [20] LI Y, ZHENG F, XIAO X, et al. CircHIPK3 sponges miR-558 to suppress heparanase expression in bladder cancer cells[J]. EMBO Rep, 2017, 18(9):1646-1659.
- [21] LIU H, CHEN D, BI J, et al. Circular RNA circUBXN7 represses cell growth and invasion by sponging miR-1247-3p to enhance B4GALT3 expression in bladder cancer[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(10):2606-2623.
- [22] YANG C, YUAN W, YANG X, et al. Circular RNA circ-ITCH inhibits bladder cancer progression by sponging miR-17/miR-224 and regulating p21, PTEN expression[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1):19.
- [23] LI P, YANG X, YUAN W, et al. CircRNA-Cdr1as exerts anti-oncogenic functions in bladder cancer by sponging MicroRNA-135a[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4):1606-1616.

(编辑 王 玮)

(上接第 454 页)

- [10] 文卫军, 陈棉智, 石宇强, 等. 阴茎离断再植术及术后并发症的防治[J]. 现代泌尿外科杂志, 2011, 16(3):278-279.
- [11] EHRICH WS. Two unusual penile injuries[J]. J Urol, 1929, 21:239-243.
- [12] COHEN BE, MAY JW, DALY JS, et al. Successful clinical replantation of an amputated penis by microneurovascular repair. Case report[J]. Plast Reconstr Surg, 1977, 59(2):276-280.
- [13] MORRISON SD, SHAKIR A, VYAS KS, et al. Penile replantation: A retrospective analysis of outcomes and complications[J]. J Reconstr Microsurg, 2017, 33(4):227-232.
- [14] LOWE MA, CHAPMAN W, BERGER RE. Repair of a traumatically amputated penis with return of erectile function[J]. J Urol, 1991, 145(6):1267-1270.
- [15] 陈峰. 阴茎离断 38 小时再植成功 1 例[J]. 四川医学, 1998, 19(1):89.
- [16] 郑鸣, 贺宜伟, 文旭东. 阴茎离断血管不吻合再植成功一例报告[J]. 中华泌尿外科杂志, 2000, 21(7):432.
- [17] ZHONG Z, DONG Z, LU Q, et al. Successful penile replantation with adjuvant hyperbaric oxygen treatment[J]. J Urol, 2007, 69(5):983. e3-5.
- [18] ISHIDA O, IKUTA Y, SHIRANE T, et al. Penile replantation after self-inflicted complete amputation: case report[J]. J Reconstr Microsurg, 1996, 12(1):23-26.
- [19] LANDSTROM JT, SCHUYLER RW, MACRIS GP. Microsurgical penile replantation Facilitated by postoperative HBO treatment[J]. Microsurg, 2004, 24(1):49-55.
- [20] LIDMAN D, DANIELSSON P, ABDIU A, et al. The functional result two years after a microsurgical penile replantation[J]. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1999, 33(3):325-328.
- [21] 陈嵘, 朱克文, 田华强, 等. 静脉动脉化再植治疗睾丸撕脱性离断伤一例报告[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(10):700.

(编辑 何宏灵)