

· 基础研究 ·

体外沉默Rce1对舌鳞状细胞癌细胞侵袭和迁移能力的影响

孙君君¹ 陶匀雅² 周元² 何宗轩³ 盛善桂² 王奇民² 童磊² 赵开² 王少如⁴ 陈正岗²
1. 青岛市城阳区人民医院口腔科, 青岛 266109;
2. 青岛大学附属青岛市市立医院口腔医学中心, 青岛 266071;
3. 青岛大学附属医院口腔颌面外科, 青岛 266005; 4. 大连医科大学口腔医学院, 大连 116044

[摘要] 目的 通过RNA干扰技术沉默Rce1基因, 探讨Rce1对舌癌细胞侵袭和迁移能力的影响。方法 体外培养舌鳞状细胞癌Cal-27和SCC-4细胞, 设计合成Rce1基因的小干扰RNA (siRNA), 采用脂质体载体瞬时转染沉默Rce1基因。根据转染的siRNA不同, 将实验组分为Rce1-siRNA-1组、Rce1-siRNA-2组、Rce1-siRNA-3组, 脂质体载体分别转染相对应序列的siRNA。脂质体转染siCON作为阴性对照组, 不转染siRNA作为空白对照组。采用实时定量聚合酶链反应检测各组Rce1、RhoA以及K-Ras基因的表达, 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测Rce1、RhoA、K-Ras、金属基质蛋白酶 (MMP)-2及MMP-9的表达, 采用体外侵袭实验检测Cal-27和SCC-4的侵袭能力, 细胞划痕实验检测细胞迁移能力。结果 实时定量聚合酶链反应及Western blot检测结果显示, 与阴性对照组和空白对照组相比, 实验组的Rce1基因及蛋白表达均下调 ($P < 0.05$), RhoA、K-Ras基因及蛋白表达无统计学差异 ($P > 0.05$), MMP-2、MMP-9表达下降 ($P < 0.05$)。体外侵袭实验表明, 与对照组相比, 实验组在聚碳酸酯膜上的细胞总数明显减少 ($P < 0.05$)。细胞划痕实验表明, 实验组划痕处细胞闭合时间明显长于对照组 ($P < 0.05$)。结论 体外沉默Rce1可以有效下调其在舌癌细胞Cal-27和SCC-4中的表达水平, 降低迁移和侵袭能力。

[关键词] Rce1; 鳞状细胞癌; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2019.02.004



开放科学 (资源服务)
标识码 (OSID)

Effects of silencing Rce1 *in vitro* on the invasion and migration of tongue carcinoma Sun Junjun¹, Tao Yunya², Zhou Yuan², He Zongxuan³, Sheng Shangui², Wang Qimin², Tong Lei², Zhao Kai², Wang Shaoru⁴, Chen Zhenggang². (1. Dept. of Stomatology, Qingdao Chengyang District Hospital, Qingdao 266109, China; 2. Medical Center of Stomatology, Affiliated Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Qingdao 266071, China; 3. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266005, China; 4. Stomatology College, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Supported by: The National Natural Science Foundation of China (81372908). Correspondence: Chen Zhenggang, E-mail: chenzhg1973@163.com.

[Abstract] **Objective** This study aimed to explore the influence of Rce1 on invasion and migration of tongue squamous cell carcinoma cells by silencing the Rce1 gene with RNA interference. **Methods** The tongue squamous cell carcinoma Cal-27 and SCC-4 cells were cultured *in vitro*. The small interfering RNA (siRNA) of the Rce1 gene was designed, and the Rce1 gene expression was silenced via liposome transfection. According to the siRNA transfected by liposome, the experimental group was divided into three groups, namely, Rce1-siRNA-1, Rce1-siRNA-2, and Rce1-siRNA-3 groups. Negative control group was transfected by siCON, and the blank control group was untransfected by siRNA. The Rce1, RhoA, and K-Ras gene expression

levels in each group were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction. The Rce1, RhoA, K-Ras, MMP-2, and MMP-9 protein expression levels were analyzed by Western blot. The invasiveness of tongue cancer cell Cal-27 and SCC-4 were determined by Transwell invasion assay,

[收稿日期] 2018-06-11; **[修回日期]** 2019-01-09

[基金项目] 国家自然科学基金 (81372908)

[作者简介] 孙君君, 住院医师, 硕士, E-mail: 852764479@qq.com

[通信作者] 陈正岗, 副主任医师, 博士, E-mail: chenzhg1973@163.com

com

and cell migration assay was performed by cell scratch assay. **Results** Real-time quantitative polymerase chain reaction and Western blot results showed that compared with the negative and blank control groups, the Rce1 gene and protein expression levels in three experimental groups decreased ($P < 0.05$). The RhoA, K-Ras gene and protein expression levels were insignificantly different among groups ($P > 0.05$). Meanwhile, the MMP-2 and MMP-9 expression levels decreased ($P < 0.05$). Transwell invasion assay results showed that the total number of cells in the PET film of the experimental groups was significantly decreased compared with the control group ($P < 0.05$). The cell scratch test showed that the cell closure time of the scratch in the interference group was significantly longer than those in the control and blank groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing Rce1 *in vitro* can effectively downregulate its expression in tongue squamous cell carcinoma cells Cal-27 and SCC-4 and reduce the migration and invasion abilities of these cells.

[Key words] Rce1; squamous cell carcinoma; invasion; migration

舌鳞状细胞癌 (tongue squamous cell carcinoma, TSCC) 是头颈部鳞状细胞癌中最常见的恶性肿瘤之一, 占有口腔癌的30%^[1]。尽管舌鳞状细胞癌的治疗取得了一定的进展, 但5年生存率依然不甚理想^[2]。舌癌预后不佳主要原因是局部侵袭和远处转移, 而这些行为均受多种基因的调控^[3-4]。因此, 阐明这些基因的作用及其表达方式可以为开发舌鳞状细胞癌治疗药物提供新的有效的靶点。Rce1是一种蛋白水解酶, 通过水解CAAX蛋白末端3个氨基酸来发挥生物学功能, 而经过水解的CAAX蛋白才可以进行后续的甲基化修饰^[5]。Rce1作为CAAX蛋白修饰通路上的关键角色, 其对口腔舌癌的影响尚未见相关报道。本研究通过体外培养舌癌细胞Cal-27和SCC-4, 设计合成Rce1的siRNA并通过脂质体瞬时转染, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、蛋白质免疫印迹 (Western blot)、Transwell侵袭实验和细胞划痕实验等方法, 探究体外沉默Rce1对舌癌细胞Cal-27和SCC-4侵袭及迁移能力的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

胎牛血清、1640培养基、胰蛋白酶 (Hyclone公司, 美国); DMSO (Amresco公司, 美国); riboFECT™CP转染试剂、荧光标记检测试剂及siRNA靶序列设计 (广州锐博生物科技有限公司); RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、PC61-2×SYBR Green qPCR Mix (High ROX) (北京艾德莱生物科技有限公司); 实时定量PCR内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (上海生工生物工程股份有限公司); Sunrise酶标仪 (TECAN公司, 瑞士); 实时定量PCR仪 (Dynamica公司, 英国); 兔抗人Rce1一抗 (Abcam公司, 美国); 兔抗人GAPDH、MMP-2、MMP-9、

RhoA以及K-Ras一抗、羊抗兔IgG二抗 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); Matrigel胶 (BD公司, 美国); Transwell小室 (8.0 μm) (Corning公司, 美国); 化学发光系统 (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont公司, 英国)。Rce1、RhoA及K-Ras实时定量PCR引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。人舌癌细胞株Cal-27和SCC-4购自中南大学高等研究中心。

1.2 细胞培养

分别培养人舌癌细胞株Cal-27和SCC-4细胞, 将细胞置于4 mL的1640培养基 (含10%胎牛血清、青霉素100 mg·mL⁻¹、链霉素100 mg·mL⁻¹), 37 °C、5%CO₂恒温孵育箱中培养。根据细胞生长状况, 待细胞铺满瓶底约80%进行消化, 消化后以1:2的比例传代至新的培养瓶中。

1.3 siRNA合成和瞬时转染

设计合成特异性靶向人的Rce1的siRNA, 具体靶序列见表1。作为对照, 使用以下随机siRNA序列 (siCON): 正向5'-UUCUCCGAACGUGUCACG-U-3', 反向5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3'。根据制造商的说明书操作进行瞬时转染。根据转染的siRNA不同, 将实验组分为3组, 分别是Rce1-siRNA-1组、Rce1-siRNA-2组、Rce1-siRNA-3组, 脂质体载体分别转染相对应序列的siRNA。脂质体转染siCON作为阴性对照组, 不转染siRNA作为空白对照组。转染前12 h, 将细胞以每孔1×10⁵个接种于6孔板内, 待细胞生长至30%~50%时, 加入转染试剂并培养48 h。

1.4 实时荧光定量PCR反应

siRNA转染48 h后, 消化提取6孔板内的细胞, 使用RNA提取试剂盒按照试剂盒说明书操作提取RNA。按照反转录试剂盒说明书操作合成第一链cDNA。实时荧光定量PCR Rce1基因的引物序列: 上游5'-CTCTGGAGGGAACCTCACAGG-3', 下游5'-GAATCATGGTCAGCAACAGG-3'; GAPDH基因的引物序列: 上游5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAA-

C-3', 下游5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGGA-3'; RhoA, 正向5'-GCTGGACTCGGATTCGTTG-3', 反向5'-TGGGAAGTGGTTCCTTGCTG-3'; K-Ras, 正向5'-GCAAGAGTGCCTTGACGATA-3', 反向5'-TCCAAGAGACAGGTTTCTCCA-3'。使用PC61-2×SYBR Green qPCR Mix (High ROX), 根据制造商的说明书制备PCR反应混合物, 每个样本加样3个副孔, 反应条件为: 94 °C进行预变性, 时间为3 min;

94 °C进行变性, 时间为30 s; 60 °C进行延伸, 时间30 s, 共40个循环, 95 °C终止延伸10 s。为了确保仅扩增特定基因, 在每个PCR实验结束时进行溶解曲线分析。实验采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法表示每种mRNA的相对表达量 ($\Delta Ct = Ct_{\text{相应基因}} - Ct_{\text{内参}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组或对照组}} - \Delta Ct_{\text{空白组}}$), 用GAPDH作为内源对照, 每个实验分组进行3次。

表 1 实验组的靶序列

Tab 1 Target sequences of each experimental group

实验组	产品编号	产品名称	靶序列
Rce1-siRNA-1	siG1471135732	si-h-RCE1_001	CCATGTTAGCACCGTGCAAT
Rce1-siRNA-2	siG1471135741	si-h-RCE1_002	CCATGTTAGCACCGTGCAAT
Rce1-siRNA-3	siG1471135750	si-h-RCE1_003	GCCATTCCTTCTGCAATTA

1.5 Western blot

siRNA转染48 h后, 用胰蛋白酶消化细胞。RIPA裂解液冰上裂解30 min。应用BCA试剂盒进行蛋白质浓度测定, 按照4:1 (体积:体积)的比例加入蛋白上样缓冲液。根据测定的蛋白质浓度, 计算加入蛋白的体积 (每泳道50 μg蛋白)。在10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳1 h后, 采用湿转法将蛋白转至PVDF膜。然后用5%脱脂牛奶封闭PVDF膜1 h, 并在4 °C下用1:1 000稀释的一抗孵育过夜。用含0.1%的Tween-20磷酸盐缓冲液洗涤后, 将膜与多克隆羊抗兔的二抗 (1:10 000稀释) 在室温下孵育1 h。使用增强的化学发光系统对结合的抗体进行观察, 以测定蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值表示其蛋白相对表达水平。实验重复3次, 检测Rce1、RhoA、K-Ras蛋白及金属基质蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2和MMP-9的表达。

1.6 Transwell侵袭实验

将500 mg·L⁻¹的人工基质胶20 μL铺于Transwell侵袭小室聚碳酸酯微孔膜的上表面, 置37 °C环境中, 30 min使其聚成凝胶。Transwell上室中加入已混匀的200 μL 2×10⁵个·mL⁻¹无血清培养液, 下室中加入600 μL含10%胎牛血清的培养液, 37 °C、5%CO₂孵育48 h后取出, 用PBS清洗3遍, 棉签去除滤膜上层细胞, 将小室浸入甲醛室温固定30 min, 吸干上室固定液, 在0.1%结晶紫中室温染20 min, PBS冲洗浸泡, 显微镜下观察穿过膜的细胞数。随机选择5个视野, 采用Image J软件进行分析, 计数每个视野内穿过微孔的细胞数。实验重复3次。

1.7 细胞划痕实验

用100 nmol·L⁻¹ siRNA转染细胞 (每孔5×10⁵个细胞) 24 h, 并接种在6孔板上。一旦细胞达到90%

汇合, 通过无菌塑料移液管尖端轻轻刮擦附着的细胞产生单个划痕。然后用无血清培养基洗涤细胞, 使划痕的细胞单层愈合48 h。4×10倍光学显微镜下获取愈合0、24、48 h的图像。实验重复3次, 每个样品一式三份评估。

1.8 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行分析。两组间比较采用独立样本T检验, 多样本比较采用方差分析, 两两比较采用LSD-t法。检验水准α=0.05 (双侧)。

2 结果

2.1 Rce1、RhoA及K-Ras的基因表达

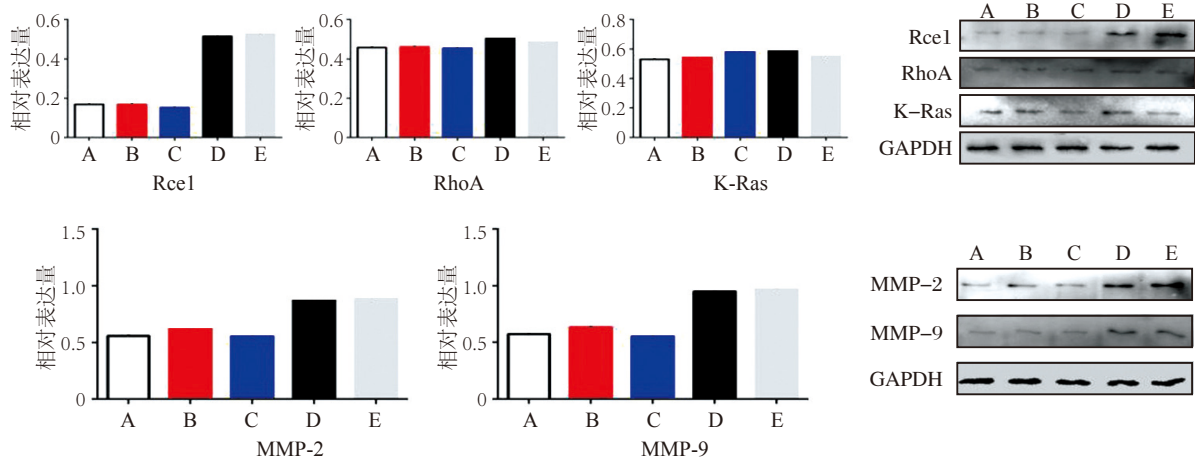
与阴性对照组和空白对照组相比, 3个实验组Rce1的基因表达均下调 ($P < 0.05$), RhoA、K-Ras的基因表达无明显变化 ($P > 0.05$)。各实验组之间均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.2 Rce1、RhoA、K-Ras蛋白及MMP-2、MMP-9的表达

转染48 h后各组蛋白的表达见图1、2。与阴性对照组和空白对照组相比, 3个实验组Rce1的蛋白表达均下调 ($P < 0.05$), RhoA、K-Ras的蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$); MMP-2、MMP-9的表达下调 ($P < 0.05$)。各实验组之间均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.3 Transwell侵袭实验

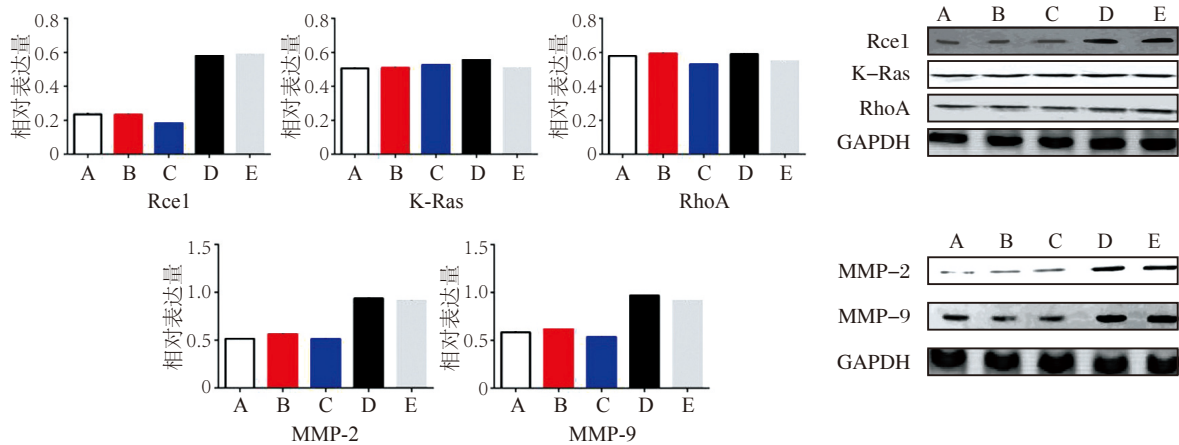
转染后48 h各组在PET膜上的细胞总数见图3。与阴性对照组和空白对照组相比, 3个实验组在PET膜上的细胞总数减少 ($P < 0.05$)。各实验组之间均无统计学差异 ($P > 0.05$)。这表明, siRNA转染处理会影响舌癌细胞系的侵袭。



A、B、C、D、E分别代表Rce1-siRNA-1组、Rce1-siRNA-2组、Rce1-siRNA-3组、阴性对照组、空白对照组。

图 1 Cal-27转染48 h后各组蛋白的表达

Fig 1 The protein expression of each group after 48 h of transfection of Cal-27



A、B、C、D、E分别代表Rce1-siRNA-1组、Rce1-siRNA-2组、Rce1-siRNA-3组、阴性对照组、空白对照组。

图 2 SCC-4转染48 h后各组蛋白的表达

Fig 2 The protein expression of each group after 48 h of transfection of SCC-4

2.4 细胞划痕实验

细胞划痕实验结果(图4)表明,与阴性对照组和空白对照组相比,实验组中迁移的细胞总数减少,划痕处细胞闭合时间延长($P < 0.05$)。

3 讨论

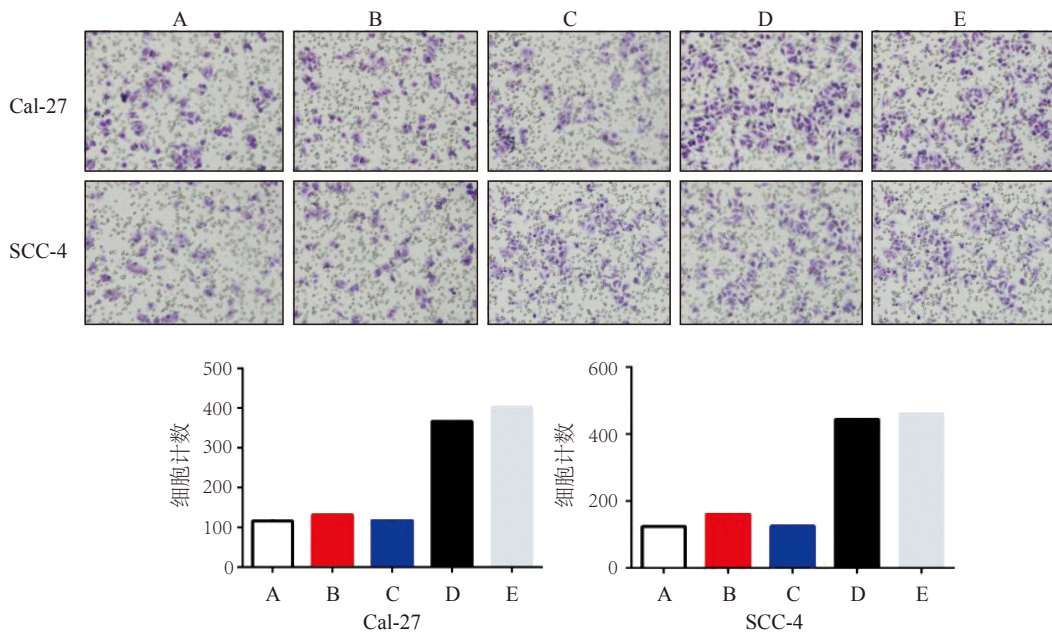
Rce1是位于内质网膜上的II型CAAX蛋白质内切酶。其是谷氨酸内酯蛋白酶新家族中唯一已知的成员,可以通过促进随后的甲基化修饰来水解CAAX蛋白质末端的3个氨基酸^[5-6],是修饰Ras及Rho家族蛋白的重要蛋白。Rce1不但可以酶切法尼基化的CAAX蛋白,也可酶切 γ -谷氨酰化的CAAX蛋白,是CAAX蛋白翻译后修饰的重要调控步骤^[7]。

RhoA和K-Ras都是CAAX蛋白的典型代表。RhoA在乳腺癌、胃癌、胰腺癌、黑色素瘤、大肠癌及肝癌等多种恶性肿瘤细胞中表达增高,参与细胞黏附、

细胞骨架改变和肌动蛋白重组,与肿瘤的浸润侵袭作用密切相关^[8-11]。本课题组前期实验研究表明,通过沉默RhoA基因,舌癌细胞的侵袭相关蛋白Galectin-3和MMP-9表达下降,舌癌侵袭能力降低^[12],可以证实RhoA与舌癌细胞的侵袭能力正相关。在人体大多数的恶性肿瘤中,Ras基因表达水平明显增高^[13]。研究^[14-15]表明,Ras基因在口腔鳞状细胞癌中表达上调,参与肿瘤的发生及发展。研究^[16]发现,Rce1在人类癌症中具有活性。Rce1抑制剂在人结肠癌细胞中具有潜在的治疗作用^[17]。此外,Rce1的缺失会导致细胞内K-Ras和H-Ras融合蛋白的部分错位^[18]。敲除Rce1基因可以有效地抑制成纤维细胞和皮肤癌细胞的生长,减少Ras诱导的转化,并且通过用法尼基转移酶抑制剂共同处理细胞可以获得更好的效果^[7,18],且沉默Rce1能使Ras蛋白的膜定位异常^[18]。Rce1在髓内外增殖性疾病中发挥着重要作用。沉默Rce1可以有效下调其在膀胱癌T24细胞中的表达并诱导细胞凋亡。

RhoA和K-Ras在舌鳞状细胞癌发生发展中起着重要作用。作为修饰以上2种蛋白的关键蛋白，Rce1与舌鳞状细胞癌亦密切相关。本实验中，体外沉默Rce1基因48 h后，RhoA和K-Ras的表达未受到影响，推

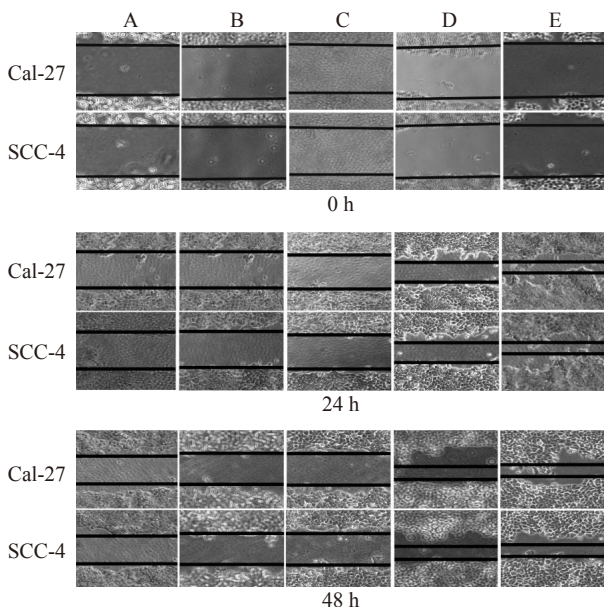
测Rce1基因与RhoA和K-Ras的细胞内合成无关；抑制细胞Rce1基因的表达后，细胞的迁移和侵袭受到抑制，MMP-2、MMP-9的蛋白表达明显降低。



上：光学显微镜 ×100；下：细胞计数。A、B、C、D、E分别代表Rce1-siRNA-1组、Rce1-siRNA-2组、Rce1-siRNA-3组、阴性对照组、空白对照组。

图 3 Transwell侵袭实验结果

Fig 3 The results of Transwell invasion assay



A、B、C、D、E分别代表Rce1-siRNA-1组、Rce1-siRNA-2组、Rce1-siRNA-3组、阴性对照组、空白对照组。

图 4 划痕实验结果 光学显微镜 ×40

Fig 4 The results of scratch test optical microscope ×40

MMPs是一组高度同源的Zn²⁺依赖性内肽酶家族，在肿瘤细胞和基质细胞中都有表达，可降解细

胞外基质（extracellular matrix, ECM），维持其动态平衡。MMP-2和MMP-9都属于明胶酶类MMP，通过对ECM、基底膜（basement membrane, BM）的降解而促进癌细胞对周围组织浸润，是降解ECM、BM的关键酶。

另外，MMP-2和MMP-9可影响血管基底膜的蛋白降解，参与肿瘤的免疫过程，重塑细胞黏附力，打开内皮细胞的转移通路，从而控制血管新生，激发其他一些潜在的生物学特性，是肿瘤细胞向远处转移和侵袭的重要原因^[19]。与正常组织相比，口腔鳞状细胞癌中的MMP-2和MMP-9过表达，提示其与舌癌的侵袭相关^[20]。

在本实验中，沉默Rce1之后，RhoA、K-Ras的mRNA和蛋白表达未受影响，而舌癌细胞迁移和侵袭能力降低，MMP-2、MMP-9表达降低，这可能是Rce1的沉默抑制了RhoA及K-Ras蛋白的相关修饰，改变了其蛋白活性。因此推测Rce1通过影响RhoA及K-Ras蛋白的翻译后修饰通路，间接影响舌癌细胞的侵袭和迁移。

本研究证实了Rce1的沉默可以在一定程度上影响舌癌细胞的迁移以及侵袭能力，但是其具体的分子机制及蛋白抑制程度尚需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ferrari D, Codecà C, Fiore J, et al. Biomolecular markers in cancer of the tongue[J]. *J Oncol*, 2009, 2009: 412908.
- [2] Sano D, Myers JN. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(3/4): 645-662.
- [3] Kruaysawat W, Aekplakorn W, Chapman RS. Survival time and prognostic factors of oral cancer in Ubon Ratcha-thani Cancer Center[J]. *J Med Assoc Thai*, 2010, 93(3): 278-284.
- [4] Wang YH, Wu MW, Yang AK, et al. COX-2 Gene increases tongue cancer cell proliferation and invasion through VEGF-C pathway[J]. *Med Oncol*, 2011, 28(S1): 360-366.
- [5] Jaworski J, Govender U, McFarlane C, et al. A novel RCE1 isoform is required for H-Ras plasma membrane localization and is regulated by USP17[J]. *Biochem J*, 2014, 457(2): 289-300.
- [6] Manolaridis I, Kulkarni K, Dodd RB, et al. Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1[J]. *Nature*, 2013, 504(7479): 301-305.
- [7] Wahlstrom AM, Cutts BA, Karlsson C, et al. Rce1 deficiency accelerates the development of K-Ras-induced myeloproliferative disease[J]. *Blood*, 2007, 109(2): 763-768.
- [8] Wang HB, Liu XP, Liang J, et al. Expression of RhoA and RhoC in colorectal carcinoma and its relations with clinicopathological parameters[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2009, 47(7): 811-817.
- [9] Kasuya K, Nagakawa Y, Hosokawa Y, et al. RhoA activity increases due to hypermethylation of ARHGAP28 in a highly liver-metastatic colon cancer cell line[J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(3): 335-339.
- [10] Cui J, Cai YH, Hu Y, et al. Epigenetic silencing of TPM2 contributes to colorectal cancer progression upon RhoA activation[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(9): 12477-12483.
- [11] Fujimura K, Choi S, Wyse M, et al. Eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF5A) regulates pancreatic cancer metastasis by modulating RhoA and rho-associated kinase (ROCK) protein expression levels[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(50): 29907-29919.
- [12] Yan GX, Zou RH, Chen ZG, et al. Silencing RhoA inhibits migration and invasion through Wnt/ β -catenin pathway and growth through cell cycle regulation in human tongue cancer [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2014, 46(8): 682-690.
- [13] Young A, Lyons J, Miller AL, et al. Ras signaling and therapies[J]. *Adv Cancer Res*, 2009, 102: 1-17.
- [14] Hoa M, Davis SL, Ames SJ, et al. Amplification of wild-type K-Ras promotes growth of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(24): 7154-7156.
- [15] 严国鑫, 樊兵, 邹荣海, 等. 沉默RohA基因对舌鳞状细胞癌细胞增殖的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2016, 34(6): 620-625.
- Yan GX, Fan B, Zou RH, et al. Effects of RhoA silencing on proliferation of tongue squamous cancer cells[J]. *West Chin J Stomatol*, 2016, 34(6): 620-625.
- [16] Huang LL, Li MC, Wang DL, et al. Overexpressed Rce1 is positively correlated with tumor progression and predicts poor prognosis in prostate cancer[J]. *Human Pathol*, 2016, 47(1): 109-114.
- [17] Mohammed I, Hampton SE, Ashall L, et al. 8-Hydroxyquinoline-based inhibitors of the Rce1 protease disrupt Ras membrane localization in human cells[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(2): 160-178.
- [18] Bergo MO, Ambroziak P, Gregory C, et al. Absence of the CAAX endoprotease Rce1: effects on cell growth and transformation[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(1): 171-181.
- [19] Grzelczyk WL, Szemraj J, Józefowicz-Korczyńska M. The matrix metalloproteinase in larynx cancer[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2016, 70: 1190-1197.
- [20] 邓莅霏, 齐淑轶, 陈福进, 等. 舌癌组织中MMP-2、9表达的预后意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(8): 1303-1306.
- Deng LF, Qi SY, Chen FJ, et al. Prognostic significance of MMP-2 and 9 expression in tongue cancer[J]. *J Modern Oncol*, 2008, 16(8): 1303-1306.

(本文编辑 李彩)