

· 基础研究 ·

连接粘连分子 3 对肾癌细胞迁徙和凋亡的作用机制

王志刚¹, 李 燕¹, 孙吉平¹, 余晓洋¹, 张文静¹, 吕 佳¹, 邵耀中¹, 张亚莉¹, 李旭东²

(西安交通大学第一附属医院: 1. 肾脏病医院肾脏内科; 2. 泌尿外科, 陕西西安 710061)

Junctional adhesion molecules regulate migration and apoptosis of renal cell carcinoma

WANG Zhi-gang¹, LI Yan¹, SUN Ji-ping¹, YU Xiao-yang¹, ZHANG Wen-jing¹, LV Jia¹, SHAO Yao-zhong¹, ZHANG Ya-li¹, LI Xu-dong²

(1. Department of Nephrology, Kidney Hospital, Xi'an 710061; 2. Department of Urology, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the expression of junctional adhesion molecule 3 (JAM3) in renal cell carcinoma (RCC), and to explore the mechanism of regulating renal cell migration and apoptosis. Methods The mRNA and protein expressions of JAM3 were detected with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blotting. The effects of JAM3 on the migration and apoptosis of RCC cells were analyzed using siRNA, flow cytometry, wound healing assay and cell migration assay. The expressions of E-cadherin, N-cadherin, integrin $\beta 1$ and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were detected with Western blotting to analyze the mechanism of JAM3's effects on cancer cell migration. Results Compared with normal renal tubular epithelial cells, RCC cells had significantly up-regulated JAM3 expression ($P < 0.05$). JAM3 knockdown promoted RCC cell apoptosis ($P < 0.05$) and inhibited the migration ($P < 0.05$). JAM3 gene silence increased expression of E-cadherin, but decreased expressions of N-cadherin, integrin $\beta 1$, MMP-2 and Bcl-2 ($P < 0.05$). Conclusion JAM3 expression is up-regulated in RCC cells. JAM3 may inhibit cancer cell apoptosis and promote the migration by regulating E-cadherin, N-cadherin, integrin $\beta 1$ and MMP-2 levels.

KEY WORDS: renal cell carcinoma; junctional adhesion molecules 3; E-cadherin; N-cadherin; integrin $\beta 1$; matrix metalloproteinase 2

摘要: 目的 研究连接粘附分子 3(JAM3)在肾癌细胞中的表达情况以及在调控肾癌细胞迁徙和凋亡过程中的可能作用及机制。方法 ①RT-qPCR 和 Western-blot 检测 JAM3 的表达水平; ②siRNA、流式细胞仪、细胞划痕实验及细胞迁移实验分析其对 RCC 迁移和凋亡的影响; ③Western-blot 检测 E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、整合素 $\beta 1$ 和基质金属蛋白酶 2(MMP-2)表达水平, 初步探究 JAM3 影响癌细胞迁移的可能机制。结果 ①与正常肾小管上皮细胞相比, 人肾癌细胞中的 JAM3 表达显著上调($P < 0.05$); ②JAM3 敲除可促进肾癌细胞的凋亡($P < 0.05$)及抑制肾癌细胞迁移($P < 0.05$); ③JAM3 基因敲除后, 肾癌细胞中 E-粘蛋白的表达增加, N-粘蛋白、整合素 $\beta 1$ 、MMP-2、Bcl-2 的蛋白水平下降($P < 0.05$)。结论 RCC 中 JAM3 表达上调, 并可能通过调控 E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、整合素 $\beta 1$ 、MMP-2 表达水平抑制癌细胞凋亡和促进其迁移。

关键词: 肾细胞癌; 连接粘附分子 3; E-钙粘蛋白; N-钙粘蛋白; 整合素 $\beta 1$; 基质金属蛋白酶 2

中图分类号: R692.9

文献标志码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1009-8291.2020.03.012

全世界有 40 万人被诊断患有肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC), 2018 年就有 17.5 万人死于 RCC^[1]。RCC 的高死亡率主要是由于在初诊时 17% 的患者已存在局部浸润或远处转移^[2-3]。目前治疗主要包括手术切除、放化疗以及使用靶向生物药物。然而 RCC 对化疗及放疗均不敏感, 即使接受手术治疗, 部分手术切除的患者中仍有 1/3 会复发^[4], 靶向治疗

虽然能够显著改善患者的预后^[5], 但后续耐药性成为大多数患者不得不面临的问题。所以, 迫切需要寻找新的抗肿瘤药物, 确定有用的临床预测标志物。

连接粘附分子 3 (junctional adhesion molecule 3, JAM3), 是一种血管粘附分子, 可调节细胞间的粘附及相互作用。据报道 JAM3 在肿瘤进展期间有调节肿瘤生长的作用^[6]。结直肠癌中 JAM3 启动子存在高甲基化, 致使其基因表达下调, 而去甲基化可使 JAM3 恢复, 减少癌细胞迁移^[7]。虽然 JAM3 在各种肿瘤的发展中起到重要作用, 但对肾癌细胞的影响鲜

收稿日期: 2019-09-07

修回日期: 2019-12-12

通信作者: 李旭东, 副教授. E-mail: 13991851033@163.com

作者简介: 王志刚, 助理研究员, 博士学位. 研究方向: 代谢相关肾脏疾病. E-mail: wangzhigang@xjtyfh.edu.cn

有报道,作用及机制仍不明确,因此,本研究欲通过揭示 JAM3 与 RCC 细胞的迁移和凋亡的关系,寻找新的抗肿瘤途径。

钙粘蛋白在癌症的迁移中起到重要作用^[8]。整合素是粘附蛋白受体,在细胞间及细胞与基质之间起到重要作用,同样被证实与癌症的迁移有关。基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)可以通过调节淋巴管和血管生成来改变肿瘤的侵袭性^[9],肿瘤细胞通过 MMP-2 可以降解胶原蛋白增强迁移能力。本研究观察了 JAM3 与这些癌细胞相关迁移蛋白的关系,旨在探究其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞、试剂及软件

人永生化肾小管上皮细胞(human renal tubular epithelial cells)HK-2 细胞株以及人肾透明细胞癌细胞(human renal clear cell carcinoma cell)Caki-1 和人肾透明细胞腺癌细胞(Human renal clear cell adenocarcinoma cell)786-O 细胞株(美国模式培养物集存库);含有 10%胎牛血清的 Dulbecco's 改良 Eagle's 培养基(dulbecco's modified eagle medium,DMEM)(美国赛默飞世尔科技公司);聚偏二氟乙烯膜(美国密理博公司);含有 5%牛血清白蛋白的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液(tris buffer solution, TBS)(中国上海生工生物技术有限公司);裂解缓冲液(百泰克生物技术有限公司);Prime Script RT 试剂盒(日本 TaKaRa);Real Master mix(中国天跟科技有限公司);JAM3 小干扰 siRNA(美国圣克鲁斯生物技术公司);阴性 siRNAs(美国圣克鲁斯生物技术公司);Lipofectamine 2000 试剂盒(美国赛默飞科技公司);APC Annexin V 试剂盒(美国 BD Biosciences)。一抗:单克隆抗连接粘附分子 3(德国 Sigma-Aldrich);E-粘连蛋白(美国贝弗利的生物技术公司);N-粘连蛋白(美国 cell Signaling Technology);整合素 $\beta 1$ (英国 Abcam);MMP-2(英国 Abcam);B 细胞淋巴瘤 2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(英国 Abcam);Bcl-2 相关 X 蛋白(英国 Abcam);甘油醛 3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)(圣克鲁斯生物技术公司);二抗:辣根过氧化物酶标记(美国 cell Signaling Technology)。

1.2 实验方法

1.2.1 培养细胞

将 HK-2、Caki-1 和 786-O 细胞在 37 °C;DMEM 中培养,使用倒置显微镜测量生长状态。在达到 80%~90%的分辨率时,将细胞传代培养并用胰蛋白酶消化。通过 MTT 常规测定细胞

活性。

1.2.2 Western-blot 检测

将 HK-2、Caki-1 和 786-O 细胞用 M2 缓冲液(含有 20mmol Tris-HCl (pH7.6), 0.5% NP-40, 250 mmol NaCl, 3 mmol EDTA, 2 mol DTT, 0.5 mmol 苯甲基磺酰氟, 20 mmol β -甘油磷酸盐, 1 mmol 钒酸钠和 1 μ g/mL 亮氨酸)均质化。使用 BCA 测定法测定蛋白质浓度。使用 12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分析相等的量(40 μ g)蛋白质匀浆,并转移到聚偏二氟乙烯膜上,然后用含有 5%牛血清白蛋白的 Tris 缓冲盐水(TBS)和 0.1% Tween-20(TBS-T)在 37 °C 下封闭 2 h。随后用 TBS-T 洗涤膜 3 次。膜用一抗封闭,4 °C 过夜,接着在室温下与二抗孵育 1 h。通过增强化学发光检测信号。使用 ImageJ 软件 5.0 对免疫印迹做灰度的半定量分析,并使用 GAPDH 作为内参。

1.2.3 RT-qPCR 分析

将 HK-2、Caki-1 和 786-O 细胞在六孔板中培养 24 h。使用裂解缓冲液从这些细胞获得 RNA,进行逆转录。通过 qPCR 分析确定连 JAM3 的 mRNA 表达水平。使用 Real Master mix 处理反应,总体积为 10 μ L,含有 2 μ L cDNA, 5 μ L SYBR 溶液,各 0.15 μ L 正向和反向引物,最高 2.7 μ L ddH₂O。JAM3 的引物序列如下:正向 5'-CGT AGT TAG GGT TGG GAT TC-3',反向 5'-GAA ATC CGA CGA CTA TCC GA-3'; β -肌动蛋白的引物序列如下:正向 5'-GTG GAC ATC CGC AAA GAC-3',反向 5'-GAA AGG GTG TAA CGC AAcCT-3。PCR 扩增如下进行:95 °C 持续 10 min,接着 40 个循环,95 °C 持续 15 s, 58~60 °C 持续 1 min,总体积 10 μ L,基于 7900HT 快速实时 PCR 系统。使用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}方法分析 JAM3 的表达。

1.2.4 细胞转染

Caki-1 和 786-O 细胞在不含抗生素的无血清 DMEM 中培养。JAM3 小干扰 siRNA 和阴性 siRNAs。使用 Lipofectamine 2000 转染细胞。转染 6 h 后,将新鲜培养基加入转染的细胞中并培养 24 h。收集细胞以通过使用蛋白印迹分析评估 JAM3 的蛋白质表达来验证基因敲除。

1.2.5 流式细胞术

JAM3 siRNA 转染 6 h 后,向转染的细胞中加入新鲜培养基并培养 24 h。随后,使用 APC Annexin V 试剂盒通过流式细胞术检测膜联蛋白 V/碘化丙锭染色。使用 SLR II 流式细胞仪软件进行流式细胞分析。使用 FACSDIVA 软件 6.0 分析数据。

1.2.6 细胞划痕实验

将 Caki-1 和 786-O 细胞以每孔 2 \times 10⁵个细胞的密度接种在六孔板中。然后用阴性或 JAM3 siRNA 转染细胞 24 h 并生长至 80%

~90%汇合。用20 μ L移液管尖端刮擦细胞层,用磷酸盐缓冲液洗涤3次,在不含FBS的培养基中培养。每24 h使用荧光显微镜捕获划痕区域的图像。划痕两侧的细胞迁移到无细胞区域。使用ImageJ软件至少重复3次记录和测量每组的3个不同划痕表面的宽度。

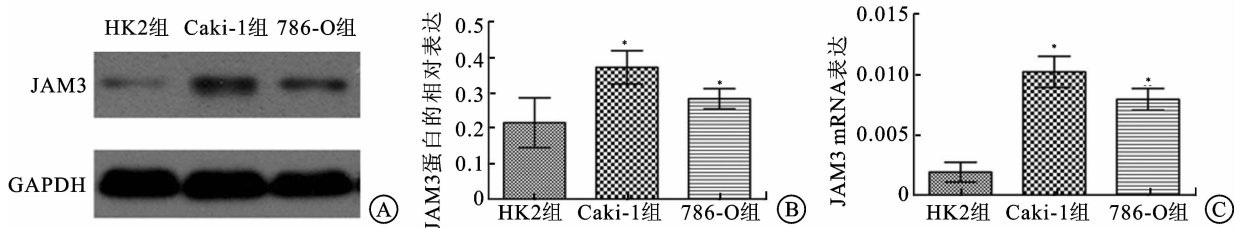
1.2.7 细胞迁移实验 siRNA转染Caki-1和786-O细胞24 h,计数并悬浮于无血清DMEM中。然后将100 μ L(2×10^5 个细胞)接种到Transwell小室上部中,其中将8.0 μ mol聚碳酸酯膜(EMD Millipore)插入24孔板中,并添加500 μ L含有10%FBS的培养基到下部。将细胞在37 $^{\circ}$ C培养24 h,然后用棉签除去Transwell小室顶部的细胞。将附着在下表面的细胞用4%多聚甲醛固定15 min,并用结晶紫

染色。使用倒置相差显微镜在5个随机选择的区域中评估迁移。

1.3 统计学分析 使用GraphPad Prism 5.0软件分析本研究中的数据,并以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用单因素方差分析比较多组之间的统计学差异,然后进行Tukey检验或 t 检验(参数)/Mann-Whitney(非参数)检验。如果整体测试显著,Tukey检验将用于各组之间的比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计意义。

2 结果

2.1 RCC细胞中JAM3的表达情况 Western-blot及RT-qPCR检测各组细胞JAM3表达情况,结果显示Caki-1和786-O细胞JAM3蛋白及JAM3 mRNA表达均高于HK-2细胞($P < 0.05$,图1)。

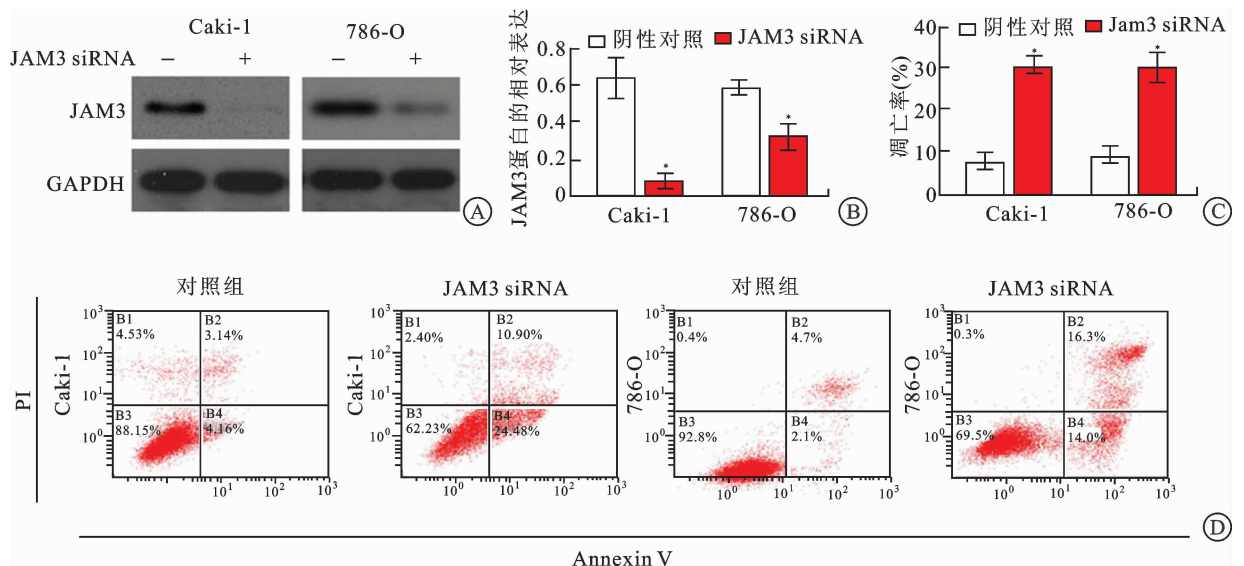


A, B: Western-blot条带图及平均灰度值半定量柱状图检测示,与HK-2细胞相比,JAM3蛋白在Caki-1和786-O细胞中表达水平较高($* P < 0.05$); C: RT-qPCR定量图分析示,与HK-2相比,JAM3 mRNA在Caki-1、786-O细胞中表达水平较高($* P < 0.05$)。

图1 HK-2、Caki-1和786-O细胞中JAM3的表达

2.2 JAM3 siRNA干预后JAM3表达水平及细胞凋亡率变化 Western-blot检测siRNA转染后各组JAM3蛋白表达情况,结果显示JAM3 siRNA组JAM3蛋白表达较对照组明显降低(图2A、B, $P <$

0.05),通过流式细胞仪对各组细胞凋亡率进行检测,JAM3基因敲除的Caki-1和786-O细胞的凋亡率升高($P < 0.05$,图2C、D)。



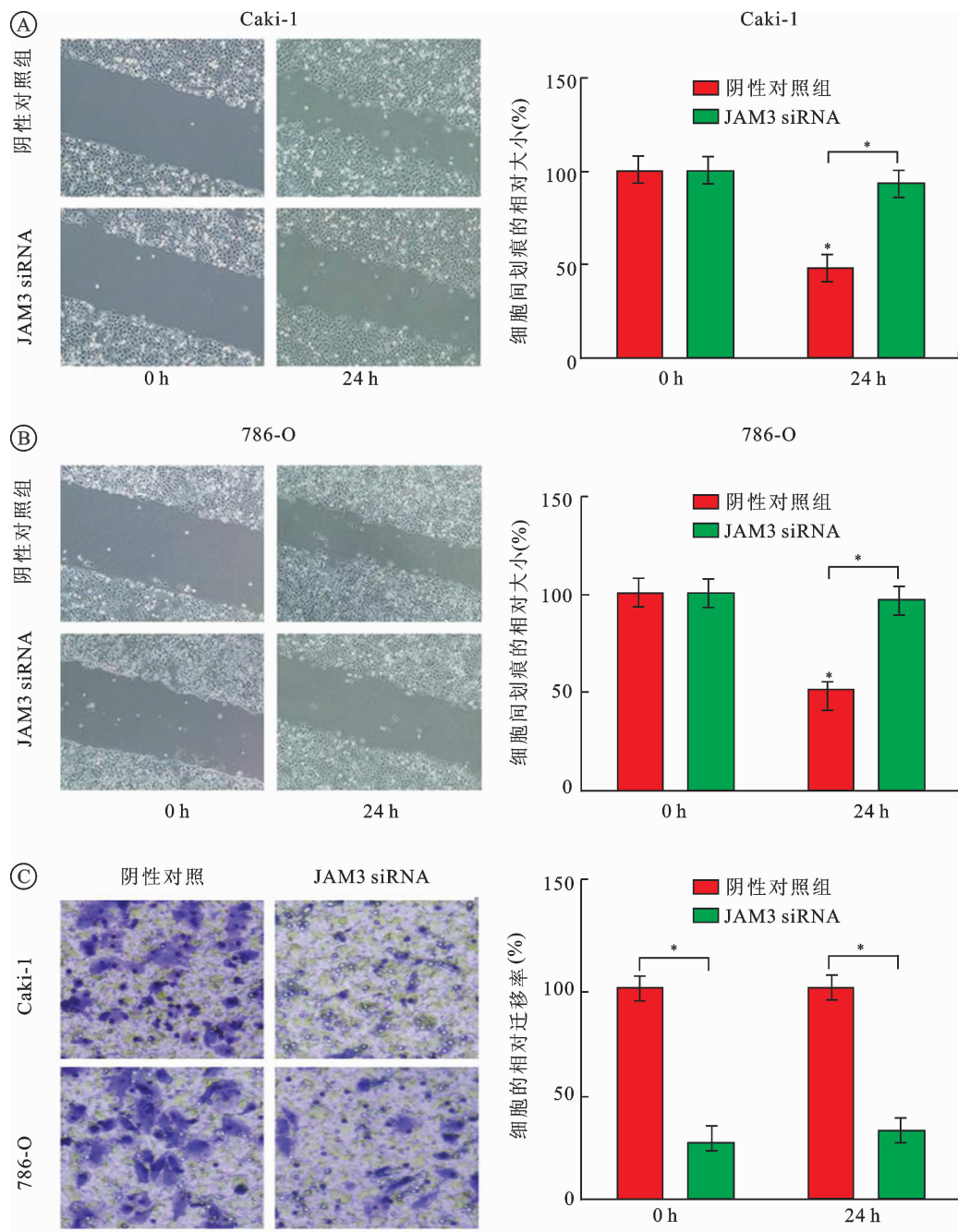
A, B: Western-blot条带图及平均灰度值半定量柱状图检测示,各组中JAM3表达情况,JAM3 siRNA干扰后JAM3表达水平明显降低($* P < 0.05$); C, D: 流式细胞仪定量分析及散点图,检测JAM3敲除对Caki-1和786-O细胞凋亡的影响,JAM3 siRNA干扰后细胞凋亡率明显增高($* P < 0.05$)。

图2 JAM3 siRNA转染后JAM3的表达及细胞凋亡率的变化

2.3 JAM3 siRNA 干预后肾癌细胞的迁移能力变化

细胞划痕实验显示,划痕后 24 h,JAM3 基因敲除后的 Caki-1 和 786-O 细胞的划痕间距面积较对照组更大(图 3A、3B, $P < 0.05$)。细胞迁移实验显示,

JAM3 基因敲除后细胞迁移能力减弱(图 3C, $P < 0.05$)。两种实验结果提示下调 JAM3 表达可以抑制肾癌细胞迁移能力。

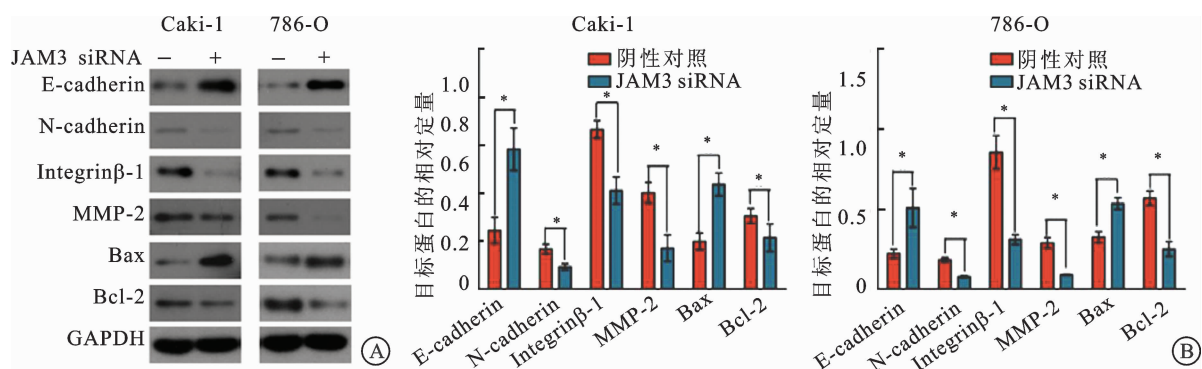


A、B:细胞划痕实验荧光显微镜下观及其定量表达柱状图显示,划痕后 24 h,JAM3 基因敲除组细胞划痕间距面积更大(* $P < 0.05$);C:细胞迁移实验倒置相差显微镜下观及其定量表达柱状图显示,JAM3 基因敲除后 Transwell 小室中 Caki-1 和 786-O 细胞迁移数量明显降低(* $P < 0.05$)。

图 3 JAM3 siRNA 转染后细胞迁移能力变化(×200)

2.4 JAM3 对细胞迁移相关蛋白表达的影响 利用 Western-blot 检测各组 E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、整合素 $\beta 1$ 、MMP-2、Bcl-2 和 Bax 表达水平,与对照组相

比,用 JAM3 siRNA 转染后,E-钙粘蛋白和 Bax 的表达增加,N-钙粘蛋白、整合素 $\beta 1$ 、MMP-2、Bcl-2 的表达降低($P < 0.05$,图 4)。



A: Western-blot 条带图检测示, JAM3 基因敲除后, 2 种细胞的 E-钙粘蛋白、Bax 表达均增加, 而 N-钙粘蛋白、整合素 $\beta 1$ 、MMP-2、Bcl-2 表达降低; B: 平均灰度值半定量柱状图(统计分析均提示有统计学意义, $^* P < 0.05$)。E-cadherin; E-钙粘蛋白; N-cadherin; N-钙粘蛋白; Integrin- $\beta 1$; 整合素 $\beta 1$ 。

图 4 JAM3 对 E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、整合素 $\beta 1$ 、MMP-2、Bcl-2 和 Bax 表达的影响

3 讨论

在常见肿瘤中, RCC 约占成人恶性肿瘤的 3%, 原发性肾肿瘤的 85%。2018 年全世界有 17.5 万人死于 RCC^[1], 中国 2015 年的数据提示肾脏肿瘤约占新发肿瘤的 1.5%, 死亡率高达 35%^[10]。RCC 的外科治疗仅适合于部分早期患者^[11]。对于转移性 RCC, 靶向治疗及免疫检查点抑制剂成为有效的治疗剂, 如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体 (贝伐珠单抗)、VEGF 受体-酪氨酸激酶抑制剂 (vascular endothelial growth factor receptor-tyrosine-kinase inhibitor, VEGFR-TKI) 靶向治疗 (如舒尼替尼等)、mTOR 途径抑制剂 (如依维莫司) 等均已上市, 中林希氏基因 (Von Hippel-Lindau, VHL) 和缺氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF) 信号传导途径^[12]、EZH2- β -catenin 信号通路^[13] 等关于 RCC 血管生长、迁移以及凋亡的通路也有报道。JAMs 属于免疫球蛋白亚家族, 其在多种人体组织中选择性表达, 有 6 个主要成员, JAM3 是其重要的家族成员, 多表达于多种癌细胞系, 参与多种肿瘤进展和转移^[14]。JAM3 的启动子在结直肠癌中存在高甲基化, 并且其甲基化水平与肿瘤阶段显著相关^[7]。甲基化连接 JAM3 已被用作诊断宫颈癌前病变和癌变的生物标志物^[8]。在本研究中, 与 HK-2 相比, 肾癌细胞 (Caki-1 和 786-O) 中 JAM3 的蛋白和 mRNA 水平更高。用 JAM3 siRNA 转染后肾癌细胞凋亡增加。因此, 可推测 JAM3 能够抑制肾癌细胞凋亡。

在许多上皮癌中, 癌细胞通过上皮-间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 发生发展。EMT 的共同特征是 E-钙粘蛋白表达的下调以及伴随 N-钙粘蛋白的上调。E-钙粘蛋白下调的主要

后果是上皮细胞-细胞粘附连接失去稳定性, 从而促进癌细胞迁移^[15]; 而 N-cadherin 可增强肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。在人主动脉平滑肌细胞中, KP-10 通过上调细胞外信号调节激酶 1 和 2、p38、Bax 和 caspase-3, 升高 MMP-2 和 MMP-9 的活性, 增加细胞凋亡。整合素 $\beta 1$ 在细胞迁移中很重要, 可通过将回缩边缘的整合素重新分布到迁移前沿, 诱导癌细胞迁移^[16-17]。MMP-2 通过降解细胞外胶原组织来增加癌细胞的迁移^[18-19]。在本研究中, Caki-1 和 786-O 细胞中的 JAM3 基因敲除后抑制了癌细胞迁移和减少了 N-钙粘蛋白、整合素 $\beta 1$ 、MMP-2 表达, 并增加了 E-钙粘蛋白的表达, 提示其对癌细胞迁移作用可能与这些蛋白有关。

总之, 本研究证实了 JAM3 在肾癌细胞中高水平表达, 并检测到下调其水平可增强癌细胞凋亡并抑制细胞迁移。在已知连接蛋白 E-钙粘蛋白和 N-钙粘蛋白、整合素 $\beta 1$ 和 MMP-2 与肿瘤细胞迁移有关的前提下, 设计本研究, 通过检测到 JAM3 siRNA 在肾癌细胞中的转染后升高了 E-粘蛋白的蛋白水平, 并下调了 N-粘蛋白, 整合素 $\beta 1$ 和 MMP-2 的蛋白水平。推测 JAM3 可能通过调节 E-钙粘蛋白、N-粘蛋白、整合素 $\beta 1$ 和 MMP-2 来影响肾癌细胞的迁移和凋亡。

但是, 本研究未检测 RCC 患者体内 JAM3 水平。因此, 在未来的研究中针对 JAM3 作为监测标志物以及新型 RCC 药物的研究应继续进行。

参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Jemal Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68: 394-424.
- [2] CAPITANIO U, BENSALAH K, BEX A, et al. Epidemiology of

- renal cell carcinoma [J]. *Eur Urol*, 2019, 75: 74-84.
- [3] CAPITANIO U, MONTORSI F. Renal cancer [J]. *Lancet*, 2016, 387: 894-906.
- [4] MAZZA C, ESCUDIER B, ALBIGES L. Nivolumab in renal cell carcinoma: Latest evidence and clinical potential [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2017, 9: 171-181.
- [5] HENG DY. The next 10 years: Challenges for the future and overcoming resistance to targeted therapies for renal cell carcinoma [J]. *Can Urol Assoc J*, 2016, 10 (11-12 Suppl 7): 256-258.
- [6] KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(3): 159-175.
- [7] ZHOU D, TANG W, ZHANG Y, et al. JAM3 functions as a novel tumor suppressor and is inactivated by DNA methylation in colorectal cancer [J]. *Cancer Management And Research*, 2019, 11: 2457-2470.
- [8] YIN A, ZHANG Q, KONG X, et al. JAM3 methylation status as a biomarker for diagnosis of preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 44373-44387.
- [9] SONG Y, WANG L, YANG F, et al. Increased expressions of integrin subunit $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 3$ in patients with acute infection [J]. *Int J Med Sci*, 2015, 12: 639-643.
- [10] SIEGEL R, MA J, ZOU Z. cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64: 9-29.
- [11] MOROZ A, DELELLA FK, LACORTE LM, et al. Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430: 1319-1321.
- [12] CHEN W, HILL H, CHRISTIE, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist [J]. *Nature*, 2016, 539(7627): 112-117.
- [13] 彭浩, 武玉东, 李健, 等. 长链非编码 RNA MALAT1 通过 EZH2- β -catenin 信号通路调控肾癌细胞的增殖、凋亡及侵袭 [J]. *现代泌尿外科杂志*, 2020, 25(1): 63-67. 2019-08-19 知网网络出版.
- [14] HAJJARI M, BEHMANESH M, SADEGHIZADEH M, et al. Junctional adhesion molecules 2 and 3 may potentially be involved in progression of gastric adenocarcinoma tumors [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 380.
- [15] KOURTIDIS A, LU R, PENCE LJ, et al. A central role for cadherin signaling in cancer [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 358(1): 78-85.
- [16] SU NW, WU SH, CHI C W, et al. Metronomic cordycepin therapy prolongs survival of oral cancer-bearing mice and inhibits epithelial-mesenchymal transition [J]. *Molecules*, 2017, 22: E629.
- [17] EBNET K, SUZUKI A, OHNO S, et al. Junctional adhesion molecules (JAMs): More molecules with dual functions [J]. *J cell Sci*, 2004, 117: 19-29.
- [18] SATO K, SHIRAI R, HONTANI M, et al. Potent vasoconstrictor kisspeptin-10 induces atherosclerotic plaque progression and instability: Reversal by its receptor GPR54 antagonist [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6: e005790.
- [19] MATSUBARA M, BISSELL MJ. Inhibitors of Rho kinase (ROCK) signaling revert the malignant phenotype of breast cancer cells in 3d context [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 31602-31622.
- (编辑 何宏灵)
-
- (上接第 246 页)
- [11] ZENG Q, ZHAO Y, YANG Y, et al. Expression of cystatin C in human esophageal cancer [J]. *Tumori*, 2011, 97(2): 203-210.
- [12] ZHANG J, HE P, ZHONG Q, et al. Increasing Cystatin C and Cathepsin B in serum of colorectal cancer patients [J]. *Clin Lab*, 2017, 63(2): 365-371.
- [13] GUO K, CHEN Q, HE X, et al. Expression and significance of Cystatin-C in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1237-1245.
- [14] GUO S, XUE Y, HE Q, et al. Preoperative serum cystatin-C as a potential biomarker for prognosis of renal cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e178823.
- [15] MAGISTER S, KOS J. Cystatins in immune system [J]. *J Cancer*, 2013, 4(1): 45-56.
- [16] VERDOT L, LALMANACH G, VERCRUYSE V, et al. Chicken cystatin stimulates nitric oxide release from interferon- γ -activated mouse peritoneal macrophages via cytokine synthesis [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 266(3): 1111-1117.
- [17] DAS L, DATTA N, BANDYOPADHYAY S, et al. Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response [J]. *J Immunol*, 2001, 166(6): 4020-4028.
- [18] ALESAWI A, NADEAU G, BERGERON A, et al. Cystatin C for early detection of acute kidney injury after laparoscopic partial nephrectomy [J]. *Urol Ann*, 2014, 6(4): 298-304.
- [19] 胡跃世, 李明林, 曹志华, 等. 腹腔镜肾部分切除术与开放性肾部分切除术治疗复杂性肾肿瘤的疗效对比 [J]. *实用医院临床杂志*, 2019, 16(1): 154-157.
- [20] 李永陟, 王忠, 单微微, 等. 胱抑素 C 和同型半胱氨酸对哈萨克族原发性高血压老年患者肾功能损伤的诊断价值 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 21(8): 818-821.
- [21] LAUNAY-VACHER V, JANUS N, DERAY G. Renal insufficiency and cancer treatments [J]. *ESMO Open*, 2016, 1(4): e91.
- [22] 张进, 王共先, 郭剑明, 等. 肾细胞癌随访 5 年生存分析及预后相关因素的多中心研究 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2015, 36(2): 113-117.
- [23] 王永刚, 陈霞. 后腹腔镜下与开放性肾癌根治术后患者的生存分析 [J]. *中国临床研究*, 2014, 27(4): 439-441.
- (编辑 杨婉婉)