

miR-23c 靶向调控 MTDH 抑制胶质瘤 U87 细胞增殖迁移与侵袭

张金灿, 廖勇仕, 周敏, 刘小飞, 廖凌骁

南华大学附属第二医院神经外科, 湖南省衡阳市 421001

摘要:目的 探讨 miR-23c 对胶质瘤细胞 U87 增殖、迁移和侵袭的影响及初步机制。方法 将 miR-23c mimics 转染于 U87 细胞中, 用 miR- 无关序列转染于 U87 细胞做为 Control 组, 采用 MTT 法、细胞划痕、Transwell 侵袭实验观察 miR-23c 对 U87 细胞增殖、迁移和侵袭的影响; 采用生物信息学软件分析 miR-23c 潜在的靶基因; 采用 Western blot、RT-PCR 和萤光素酶报告基因检测 miR-23c 对靶基因的调控作用; 在转染 miR-23c mimics 的基础上同时转染 MTDH 质粒, 通过 MTT 法、细胞划痕、transwell 侵袭实验观察转染 MTDH 对 miR-23c 抑制 U87 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。结果 MTT 实验显示, miR-23c 组 U87 细胞的 OD 值为 (0.668 ± 0.032) , 明显低于 Control 组的 (1.031 ± 0.060) ($P < 0.01$); 细胞划痕实验显示, miR-23c 组细胞划痕愈合率 (0.35 ± 0.02) 明显低于对照组的 (0.59 ± 0.03) ($P < 0.01$); Transwell 侵袭实验显示, miR-23c 组 U87 细胞穿过基质胶的细胞数 (153.2 ± 8.30) 明显低于与对照组的 (348.4 ± 12.12) ($P < 0.01$); Western blot、RT-PCR 和萤光素酶报告基因检测表明 MTDH 是 miR-23c 直接调控的靶基因; MTT 实验显示, miR-23c + MTDH 组 U87 细胞的 OD 值为 (1.025 ± 0.059) , 明显高于 miR-23c 组的 (0.672 ± 0.024) ($P < 0.01$); 细胞划痕实验显示, miR-23c + MTDH 组细胞划痕愈合率为 (0.45 ± 0.04) , 明显高于 miR-23c 组的 (0.31 ± 0.03) ($P < 0.05$); Transwell 侵袭实验显示, miR-23c + MTDH 组 U87 细胞穿过基质胶的细胞数 (260.9 ± 10.23) , 明显高于 miR-23c 组的 (148.4 ± 9.4) ($P < 0.01$)。结论 上调 miR-23c 能明显抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 其机制可能与其下调 MTDH 表达有关。

关键词: miR-23c; 胶质瘤; MTDH; 增殖; 侵袭; 迁移

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2019.04.010

miR-23c inhibits the proliferation, migration, and invasion of glioma U87 cells via targeted regulation of MTDH

ZHANG Jin-Can, LIAO Yong-Shi, ZHOU Min, LIU Xiao-Fei, LIAO Ling-Xiao. Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

Corresponding Author: LIAO Yong-Shi, E-mail: liaoy66@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of miR-23c on the proliferation, migration, and invasion of glioma U87 cells and preliminary mechanisms. **Methods** U87 cells were transfected with miR-23c mimics, and the U87 cells transfected with miR-negative control were established as control group. MTT assay, wound healing assay, and Transwell invasion experiment were used to observe the effect of miR-23c on the proliferation, migration, and invasion of U87 cells. Bioinformatics software was used to analyze the potential target genes of miR-23c, and Western blot, RT-PCR, and luciferase reporter gene assay were used to observe the regulatory effect of miR-23c on target genes. After U87 cells were co-transfected with miR-23c mimics and MTDH, MTT assay, wound healing assay, and Transwell invasion experiment were used to analyze the effect of MTDH transfection on the proliferation, migration, and invasion of U87 cells inhibited by miR-23c. **Results** The MTT assay showed that the miR-23c group had a significantly lower OD value of U87 cells than the control group (0.668 ± 0.032 vs 1.031 ± 0.060 , $P < 0.01$); the wound healing assay showed that the miR-23c group had a significantly lower wound healing rate than the control group (0.35 ± 0.02 vs 0.59 ± 0.03 , $P < 0.01$); the Transwell invasion experiment showed that the miR-23c group had a significantly lower number of U87 cells passing through the matrigel than the control

基金项目: 湖南省自然科学基金(2018JJ2353)

收稿日期: 2019-06-08; 修回日期: 2019-08-13

作者简介: 张金灿(1979-), 男, 主任医师, 主要研究领域: 脑血管疾病与胶质瘤发病机制。

通信作者: 廖勇仕(1963-), 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究领域: 神经损伤与胶质瘤发病机制。

group (153.2 ± 8.30 vs 348.4 ± 12.12 , $P < 0.01$). Western blot, RT-PCR, and luciferase reporter gene assay showed that MTDH was a target gene directly regulated by miR-23c. The MTT assay showed that the miR-23c + MTDH group had a significantly higher OD value of U87 cells than the miR-23c group (1.025 ± 0.059 vs 0.672 ± 0.024 , $P < 0.01$); the wound healing assay showed that the miR-23c + MTDH group had a significantly higher wound healing rate of U87 cells than the miR-23c group (0.45 ± 0.04 vs 0.31 ± 0.03 , $P < 0.05$); the Transwell invasion experiment showed that the miR-23c + MTDH group had a significantly higher number of U87 cells passing through the matrigel than the miR-23c group (260.9 ± 10.23 vs 148.4 ± 9.4 , $P < 0.01$). **Conclusions** Upregulation of miR-23c can significantly inhibit the proliferation, migration, and invasion of glioma cells, possibly by downregulating the expression of MTDH.

Key words: miR-23c; Glioma; MTDH; Proliferation; Invasion; Migration

MicroRNAs (miRs) 是一组内源的约为 22 个 (20 ~ 24) 核苷酸的小非编码 RNA, 近年来研究发现, miRs 对细胞内各种生理学过程均发挥重要的调节作用^[1]. miRs 对靶基因的调节常常是一种网络调节方式即一个 miRNA 可调控一个或多个靶基因, 同时一个靶基因也可能受一个或多个 miRNA 调控. miRs 可能调控人类约 1/3 的基因表达, 且 miRs 在不同物种中其序列和位置都存在高度的保守性. miRs 发挥重要功能与其位置和序列的高度保守性密切相关. 近年来, 在很多人类的癌症中发现有特异性的 miRs 表达失调^[2]. 这些 miRs 通过负性调控原癌基因或抑癌基因等表达参与癌症的进展和侵袭^[3-5]. 在糖尿病肾病时 miR-23c 能够通过调控 ELAV 样 RNA 结合蛋白 1 抑制肾小管上皮细胞的坏死^[6]. miR-23c 最早发现结直肠癌组织中 miR-23c 高表达, Steviol 抑制胃肠道肿瘤细胞的增殖与其调节 miR-23c 有关^[7]. miR-23c 可通过调节 ERBB2IP 抑制肝细胞癌的细胞增殖并促进细胞凋亡^[8]. 有研究发现异粘蛋白 (metadherin, MTDH) 在许多肿瘤中高表达, 如食管鳞状细胞癌、胃癌等, 并且参与肿瘤的发生、发展^[9,10]. 但是 miR-23c 与 MTDH 在胶质瘤中的作用研究尚少. 本研究旨在探讨 miR-23c 对胶质瘤 U87 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其可能的初步机制。

1 材料与方法

1.1 材料

主要材料 Lip2000、miR-23c mimics、miR-无关序列、MTDH 质粒、MTT 粉以及 Transwell 小室均购自美国 Sigma 公司, RNA 抽提试剂盒购于 Applied Biosystems 公司, DMEM 培养基和小牛血清购自 Gibco 公司, MTDH 3' UTR 的各种报告基因 (Wild-MTDH-3' UTR vector, Mut-MTDH-3' UTR vector) 由复能基因公司构建, 双报告基因载体从复能基因购买. 双荧光素酶活性检测试剂盒购自

Promega 公司. MTDH 抗体和 β -actin 抗体购自 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR 检测 MTDH 表达水平 qRT-PCR 将 miR-23c mimics 或 miR-无关序列转染于 U87 细胞, 分为 miR-23c 组与 Control 组. 48h 后提取用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA. PCR 扩增反应为 20 μ l 体系, 包括: Taq DNA polymerase 5 U/ μ l) 0.2 μ l, 2 \times SYBR Mix 10 μ l, miRNA RT product 2.0 μ l, MiR-PCR primers (5 μ M) 0.4 μ l, 灭菌蒸馏水 7.4 μ l. 循环体系为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 12s, 62 $^{\circ}$ C 35s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 35 个循环. 以 GAPDH 为内参, 所测定的 miR-23c 的相对表达量采用 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析。

1.2.2 Western blot 检测 MTDH 蛋白表达 Western blot 细胞转染与分组同 qRT-PCR. 48h 后提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度. 各组取等量样本, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭, 加入 MTDH 抗体或 β -actin 抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜. TBST 洗膜 30 min, 加入二抗室温孵育 1h, TBST 洗膜 30 min, 然后加 ECL 发光剂, X 片曝光、显影、定影。

1.2.3 荧光素酶活性检测 将荧光素酶报告载体与 miR-23c mimics 或 miR-无关序列共转染于 U87 细胞. 转染 48h 后, 收集细胞. 按照 Promega 公司双荧光素酶活性检测试剂盒说明书操作, 在单光子检测仪检测细胞荧光素酶的活性. 计算相对荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖活性 将 miR-23c mimics 或 miR-无关序列以及在转染 miR-23c 的同时也转染 MTDH 质粒时, 即分为 Control 组, miR-23c 组和 miR-23c + MTDH 组. 各组 U87 细胞培养 24 h 后, 用胰酶 (0.25%) 常规消化, 尽量制成单

细胞悬液,离心收集。用含胎牛血清(10%)的 DMEM 培养基(含 50U/ml 青霉素,50mg/ml 链霉素)稀释细胞悬液,取 $(1-2) \times 10^4$ 个细胞接种于孔板(96 孔)中,并常规每组设置复孔 6 个。置于 5% 的 CO_2 孵箱中于 37°C 培养 24h 或 48h。每孔加入 20 μl 灭菌的 5mg/ml 的 MTT 液。选择波长,在酶标仪上 570nm 处检测 96 孔板中各孔的吸光值,记录统计结果。

1.2.5 细胞划痕实验 细胞分组同 MTT 法,将各组细胞采用胰酶常规消化后制成浓度为 $4 \sim 5 \times 10^6$ 的单细胞悬液。当细胞生长的融合率达到 70%~80% 时用 10 μl 的 Tip 头做一划痕,然后用 PBS 冲洗 3~4 次以洗掉已经脱落的细胞,继续培养 24 h 或 48 h 后进行拍照,测量多个不同点的划痕的宽度,计算出划痕愈合率的平均值。统计分析各组平均划痕愈合率的差异。

1.2.6 Transwell 侵袭实验 细胞分组同 MTT 法,先将小室铺上一层基质胶,准备好细胞悬液($2 \times 10^5/\text{ml}$),然后将 300 μL 细胞悬液加入到上室,并加入 300 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基到下室。在 37°C 条件下培养 24 h 或 48 h 后,用 PBS 冲洗下室 2~3 遍,然后将下室用 90% 酒精固定 20 min,弃掉固定液,PBS 冲洗 2~3 次后,用苏木素对酯膜进行染色,封片观察。将 transwell 下室底部的膜切下,倒置显微镜下随机观察并拍照计数膜底部的细胞个数(每个视野)(10 个视野),以穿膜细胞数目(10 个视野以上的平均值)评价肿瘤细胞的侵袭能力。

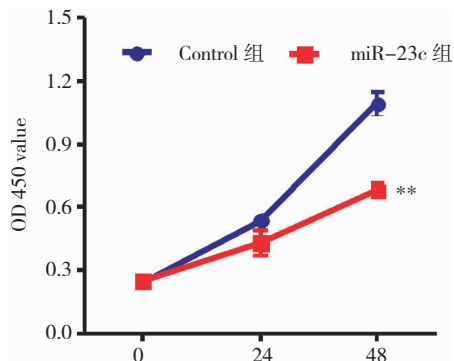
1.3 统计学分析

统计学处理用 SPSS 19.0 软件统计处理所有数据,计量资料采取均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示,两组间比较采用 t 检验,当 $P < 0.05$ 时,为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-23c 对胶质瘤 U87 细胞增殖的影响

MTT 结果显示,在 48h 时 miR-23c 组 U87 细胞的 OD 值为 (0.668 ± 0.032) ,明显低于 Control 组的 (1.031 ± 0.060) ,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。提示外源高表达 miR-23c 能抑制胶质瘤 U87 细胞的增殖。

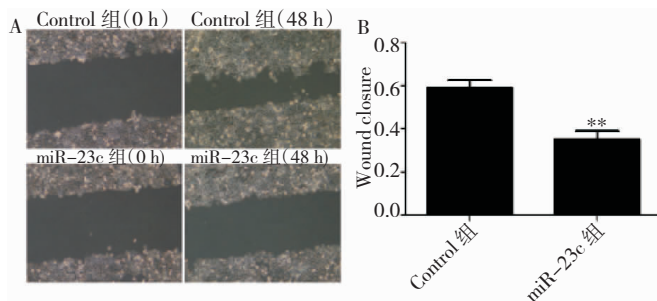


注:与 Control 组相比,** $P < 0.01$ 。

图 1 MTT 法检测 miR-23c 对 U87 细胞增殖能力的影响

2.2 miR-23c 对胶质瘤 U87 细胞迁移能力的影响

细胞划痕 48 h 后结果显示,miR-23c 组细胞划痕愈合率 (0.35 ± 0.02) 明显低于对照组的 (0.59 ± 0.03) ,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。提示外源高表达 miR-23c 能抑制胶质瘤 U87 细胞的迁移能力。

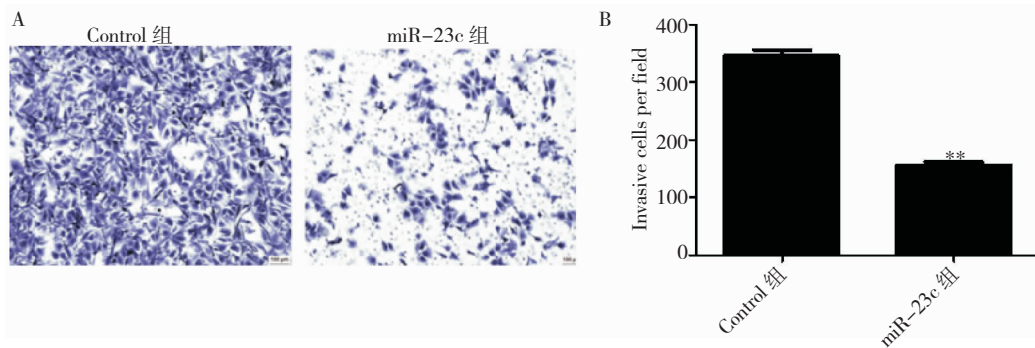


注:与 Control 组相比,** $P < 0.01$ 。

图 2 划痕实验检测 miR-23c 对 U87 细胞迁移能力的影响

2.3 miR-23c 对胶质瘤 U87 细胞侵袭能力的影响

Transwell 结果显示,miR-23c 组 U87 细胞穿过基质胶的细胞数量为 (153.2 ± 8.30) ,与对照组 (348.4 ± 12.12) 相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。提示外源高表达 miR-23c 能抑制胶质瘤 U87 细胞的侵袭能力。



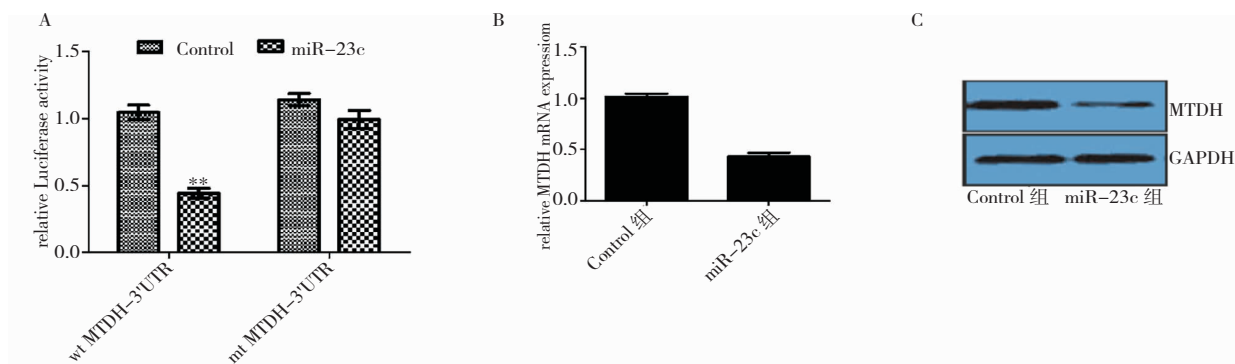
注:与 Control 组相比,** $P < 0.01$ 。

图3 Transwell 侵袭实验检测 miR-23c 对 U87 细胞侵袭能力的影响

2.4 miR-23c 对 MTDH 的表达调控分析

生物信息学结果显示 miR-23c 与 MTDH 有共同的结合位点。萤光素酶报告基因结果显示,miR-23c mimics 对突变型 Mut -miR-23c /MTDH 质粒组萤光素酶活性强度无明显影响,但对野生型 Wt-miR-23c /MTDH 报告质粒组萤光素酶活性强度下降了约 57%。差异有统计学意义($P < 0.01$) (图

4A)。qRT-PCR 实验结果显示,miR-23c 组 MTDH mRNA 的相对表达量为 (0.435 ± 0.034) 明显低于 Control 组 (1.013 ± 0.032),差异有统计学意义($P < 0.01$) (图 4B)。蛋白质印迹试验结果显示,miR-23c 组 MTDH 蛋白表达水平较 Control 组明显降低(图 4C)。结果提示,MTDH 是 miR-23c 直接调控的靶基因。

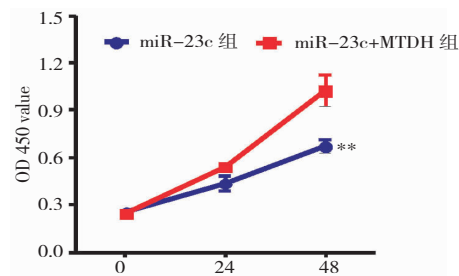


A:萤光素酶报告系统检测 miR-23c 对抑制 MTDH 3'UTR 的萤光酶活性的影响,与 Control 组相比,** $P < 0.01$; B:qRT-PCR 检测 miR-23c 对 MTDH mRNA 的影响,与 Control 组相比,** $P < 0.01$; C:Western blot 检测 miR-23c 对 MTDH 蛋白的影响

图4 MTDH 是 miR-23c 直接调控的靶基因

2.5 转染 MTDH 对 miR-23c 抑制 U87 细胞增殖的影响

前面的实验结果已经证实 miR-23c 能抑制 MTDH 表达,但是 miR-23c 抑制 MTDH 表达是否对 U87 细胞的生物学行为起作用尚不清楚。为了验证这一点,接下来的实验在转染 miR-23c 的同时也转染 MTDH 质粒即分为两个组:miR-23c 组和 miR-23c + MTDH 组。MTT 结果显示,miR-23c + MTDH 组 U87 细胞的 OD 值为 (1.025 ± 0.059),明显高于 miR-23c 组的 (0.672 ± 0.024),差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 5。

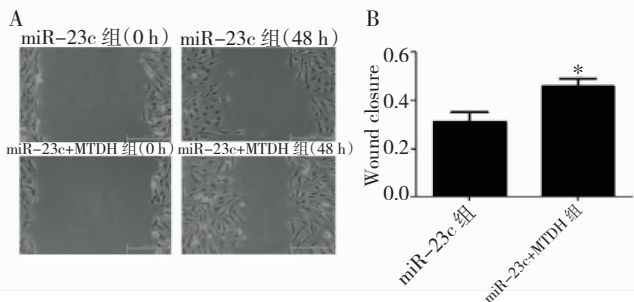


注:与 miR-23c 组相比,** $P < 0.01$

图5 MTT 法检测 miR-23c + MTDH 对 U87 细胞增殖能力的影响

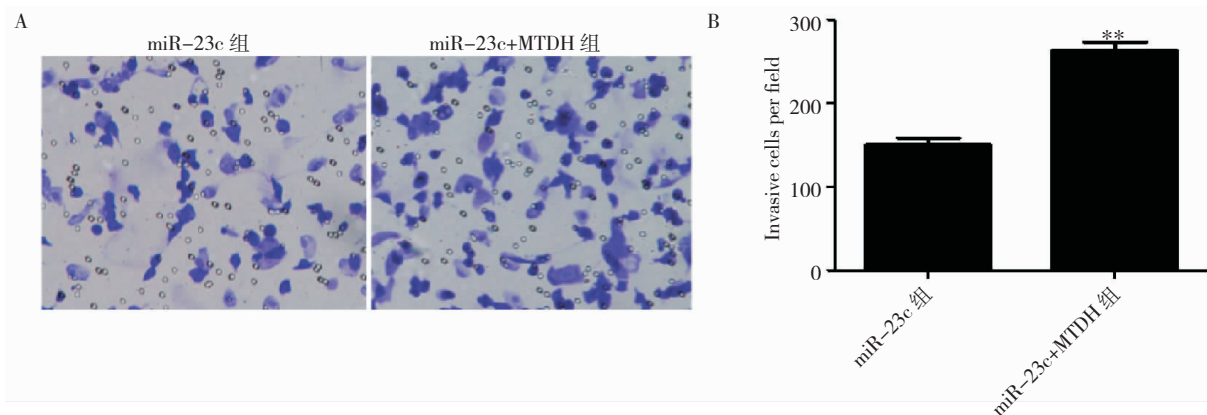
2.6 转染 MTDH 对 miR-23c 抑制 U87 细胞迁移的影响

细胞划痕结果显示,细胞划痕 48 h 后 miR-23c + MTDH 组细胞划痕愈合率为 (0.45 ± 0.04) ,明显高于 miR-23c 组细胞划痕愈合率 (0.31 ± 0.03) ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 6。



注:与 miR-23c 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 6 划痕实验检测 miR-23c + MTDH 对 U87 细胞迁移能力的影响



注:与 miR-23c 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 7 Transwell 侵袭实验检测 miR-23c + MTDH 对 U87 细胞侵袭能力的影响

靶点成为了目前研究的热点,特异性激活或抑制其表达,可能会达到促进肿瘤细胞凋亡抑制肿瘤增殖迁移以及侵袭的目的。

近年来随着对肿瘤分子机制研究的逐渐深入,学者们认识到肿瘤的形成和进展与细胞周期调控失衡密切相关。miRs 参与了细胞增殖分化以及凋亡的调控,其功能与肿瘤形成和进展密切相关。已有研究证实 miR-23c 在人类癌症中起重要作用^[12-14]。但是 miR-23c 在胶质瘤中的作用研究尚少。本次研究通过 MTT 实验和细胞划痕以及 Transwells 实验分别检测了细胞的增殖与迁移以及侵袭能力,发现过表达 miR-23c 可抑制胶质瘤细胞 U87 的增殖、迁移以及侵袭。本实验结果与 Zhang 等人

2.7 转染 MTDH 对 miR-23c 抑制 U87 细胞侵袭能力的影响

Transwell 结果显示,miR-23c + MTDH 组 U87 细胞穿过基质胶的细胞数量为 (260.9 ± 10.23) ,明显高于 miR-23c 组 (148.4 ± 9.4) ,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 7。

3 讨论

胶质瘤是严重危害人类生命健康最常见的中枢神经系统肿瘤之一。胶质瘤的发病率高约占颅内肿瘤发病率的 30%,常与周围组织分界不清,呈浸润型生长方式,手术难以全切效果不佳,且术后在脊髓或颅内其他部位容易发生复发转移,且胶质瘤的病程进展迅速,一年生存率低于 50%^[11]。因此,胶质瘤的分子发病机制及其防治方法一直都是神经外科学领域的热点和难点。目前基因诊断和治疗已经越来越受到关注,寻找肿瘤发病的特异性

在肝细胞癌中的实验结果相吻合^[8]。但 miR-23c 抑制胶质瘤细胞 U87 增殖、迁移以及侵袭的机制尚不明确。随后进一步采用 TargetScanVert 寻找 miR-23c 可能的作用靶基因,结果显示 MTDH 可能是 miR-23c 调控的下游靶基因。

MTDH 第一次被发现在 2002 年暴露于 HIV-1 的原发性人类胎儿星形胶质细胞中,2005 年 MTDH 的 cDNA 被成功克隆^[15]。一些研究人员已经证实发现 MTDH 在许多癌症组织和细胞系中存在高表达,MTDH 参与调节与肿瘤形成与进展有关的信号通路,调节肿瘤相关基因的表达。MTDH 还能调节肿瘤的血管生成、侵袭性、转移和化疗耐药性。对 MTDH 的信号通路、药物或分子靶标的研究表明

MTDH 在恶性肿瘤中具有潜在的治疗作用。据报道,MTDH 的异位表达增强了许多类型癌细胞的增殖,包括乳腺癌细胞,前列腺癌细胞,神经母细胞瘤细胞,食管鳞状细胞癌细胞,HCC 细胞,神经胶质瘤细胞和胃癌细胞^[9,10,16,17]。相反,MTDH 的削弱降低了它们的增殖能力。我们的实验结果证实 miR-23c 可直接抑制 MTDH 的表达,且 miR-23c 抑制胶质瘤细胞 U87 增殖、细胞迁移以及细胞侵袭的机制部分与其下调 MTDH 表达有关。表明 miR-23c 可能可作为一个潜在的治疗靶点用于胶质瘤的治疗。但是本实验对象仅为 U87 细胞系,miR-23c 在其它细胞系与动物学水平中的作用尚不清楚。因此,进一步在动物学水平探讨 miR-23c 及其调控 MTDH 表达在神经胶质瘤中的作用及机制可为胶质瘤的防治提供重要的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Yang F, Ning Z, Ma L, et al. Exosomal mirnas and mirna dysregulation in cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer*. 2017,16(1):148.
- [2] Acunzo M, Romano G, Wernicke D, et al. MicroRNA and cancer—a brief overview. *Adv Biol Regul*. 2015,57:1-9.
- [3] 袁洁,费智敏. miRNA-21—治疗神经胶质瘤的新靶标? [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2018,45(2):211-214.
- [4] Xie Y, Murray-Stewart T, Wang Y, et al. Self-immolative nanoparticles for simultaneous delivery of microRNA and targeting of polyamine metabolism in combination cancer therapy. *J Control Release*. 2017,246:110-119.
- [5] Momtazi AA, Shahabipour F, Khatibi S, et al. Curcumin as a microRNA regulator in cancer: A review. *Rev Physiol, Biochemi Pharmacol*. 2016,171:1-38.
- [6] Li X, Zeng L, Cao C, et al. Long noncoding rna malat1 regulates renal tubular epithelial pyroptosis by modulated mir-23c targeting of elavl1 in diabetic nephropathy. *Exp Cell Res*. 2017,350(2):327-335.
- [7] Yamazaki N, Koga Y, Taniguchi H, et al. High expression of mir-181c as a predictive marker of recurrence in stage ii colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017,8:6970-6983.
- [8] Zhang L, Wang Y, Wang L, et al. Mir-23c suppresses tumor growth of human hepatocellular carcinoma by attenuating erbb2ip. *Biomed Pharmacother*. 2018,107:424-432.
- [9] Yu C, Chen K, Zheng H, et al. Overexpression of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is associated with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) progression and pathogenesis. *Carcinogenesis*. 2009,30(5):894-901.
- [10] Jian-bo X, Hui W, Yu-long H, et al. Astrocyte-elevated gene-1 overexpression is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Med Oncol*. 2011,28(2):455-462.
- [11] 刘志强,方薪淇,宋涛,等. 92 例高级别胶质瘤患者术后生存分析[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2018,45(6):577-581.
- [12] Lee SG, Su ZZ, Emdad L, et al. Astrocyte elevated gene-1 activates cell survival pathways through pi3k-akt signaling. *Oncogene*. 2008,27(8):1114-1121.
- [13] Ash SC, Yang DQ, Britt DE. Lyric/aeg-1 overexpression modulates bccpalpha protein levels in prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008,371(2):333-338.
- [14] Chen J, Xia Y, Sui X, et al. Steviol, a natural product inhibits proliferation of the gastrointestinal cancer cells intensively. *Oncotarget*. 2018,9(41):26299-26308.
- [15] Thirkettle HJ, Girling J, Warren AY, et al. Lyric/AGE-1 is targeted to different subcellular compartments by ubiquitinylation and intrinsic nuclear localization signals. *Cancer Res*. 2009,15(9):3003-3013.
- [16] Xia Z, Zhang N, Jin H, et al. Clinical significance of astrocyte elevated gene-1 expression in human oligodendrogliomas. *Clin Neurol Neurosurgery*. 2010,112(5):413-419.
- [17] Song H, Li C, Li R, et al. Prognostic significance of aeg-1 expression in colorectal carcinoma. *Int J colorectal Dis*. 2010,25(10):1201-1209.