

miRNA-29b-RTKN 对人乳腺癌细胞凋亡的影响及机制研究

孔向阳 徐小平 姜贻乾*

温州医科大学附属萧山医院 浙江杭州 311200

摘要: 目的 研究微小RNA(microRNA, miRNA)-29b-Rhotekin (RTKN)对乳腺癌细胞凋亡的影响及其分子生物学机制。方法 构建RTKN过表达、miRNA-29b过表达细胞,将细胞分组为1) NC/空载体组、2) RTKN过表达组、3) miRNA-29b过表达组、4) miRNA-29b&RTKN均过表达组、5) miRNA-29b过表达+NF- κ B抑制剂组、6) NF- κ B抑制剂组,采用流式细胞法对各组细胞进行凋亡率及细胞周期分布情况的测定,同时利用Western blot法分析细胞周期相关因子(包括cyclinD1、c-myc、CDK1、CDK2、MCM6)和细胞抗凋亡相关因子(如c-IAP2、BCL-xL)的表达情况。结果 与NC/空载体组相比,RTKN过表达组细胞周期相关蛋白及细胞抗凋亡相关因子的表达显著提高($p < 0.05$),肿瘤细胞凋亡率明显下降($p < 0.01$),而miRNA-29b过表达细胞实验结果则恰好相反($p < 0.05$)。与NC组相比,miRNA-29b过表达组及NF- κ B抑制剂组的肿瘤细胞周期相关蛋白及细胞抗凋亡相关因子的表达显著减少($p < 0.05$),细胞G0/G1期显著延长($p < 0.05$),肿瘤细胞的凋亡率也明显提高($p < 0.01$);与miRNA-29b过表达组及NF- κ B抑制剂组相较,miRNA-29b过表达+NF- κ B抑制剂组的肿瘤细胞周期相关蛋白及细胞抗凋亡相关因子的表达显著减少($p < 0.05$),细胞G0/G1期显著延长($p < 0.05$),肿瘤细胞的凋亡率也较之明显提高($p < 0.01$)。结论 miRNA-29b-RTKN对乳腺癌细胞的凋亡的调控是通过NF- κ B信号通路实现的,可以为乳腺癌药物的研发及治疗提供新的方向。

关键词: 乳腺癌; miRNA-29b; RTKN; NF- κ B通路; 分子机制

微小RNA(又称miRNA)是一种细胞内的小型非编码RNA,通常由含有19至23个核苷酸的分子组成,它具备着对蛋白质编码信使RNA(mRNA)表达进行调控的能力,因此被归类为基因表达的转录后调节因子^[1,2]。miRNA-29家族成员在各种人类癌症中都有异常表达,可作为肿瘤启动子或抑制肿瘤基因发挥作用^[3],是乳腺癌治疗的可能靶点^[4]。Rhotekin(RTKN)蛋白是RhoA下游效应分子,能与激活状态的Rho分子结合,并参与下游信号通路,在细胞内起到调节细胞骨架重塑、细胞迁移和细胞收缩等重要作用^[5,6]。我们过去的研究发现,乳腺癌细胞系中的miRNA-29b过表达后,RTKN的表达被下调,从而抑制细胞的增殖、迁移^[7]。

NF- κ B途径是一个被广泛关注的生物学途径。在各类肿瘤细胞中,NF- κ B存在持续激活及过量表达,而在对应的正常组织中却并未出现此种改变^[8]。NF- κ B已被证实可以控制肿瘤细胞增殖、肿瘤介导的血管生成以及转移,是肿瘤治疗可能的免疫调节靶点^[9,10]。NF- κ B在乳腺癌中的异常活化,激活的NF- κ B促进细胞增殖和抗凋亡基因的表达,进而促使细胞恶性转化,参与乳腺癌的发生发展^[11,12]。

且MiR-29b与肿瘤细胞中NF- κ B信号通路的表达相关^[16],但是其关联在乳腺癌中未被证实。

因此,我们对NF- κ B信号途径在乳腺癌中被激活是否与miRNA-29b-RTKN通路有关予以验证。我们构建了miRNA-29b与RTKN不同表达的肿瘤细胞组,对其凋亡情况进行检测,探究NF- κ B是否是miRNA-29b-RTKN影响乳腺癌细胞凋亡的可能通路,为乳腺癌的药物研发及治疗提供新的思路和途径。

1 仪器与材料

1.1 材料

人乳腺癌细胞MCF-7购自上海赛百慷生物技术有限公司;RIPA裂解液、PMSF、BCA蛋白定量试剂盒购自中国上海碧云天生物技术股份有限公司;蛋白酶抑制剂购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司;预染蛋白marker购自北京Solarbio科技有限公司;RTKN Antibody、GAPDH Antibody购自江苏亲科生物有限公司;Anti-rabbit IgG、HRP-linked Antibody、Anti-mouse IgG、HRP-linked Antibody购于美国Cell Signaling Technology公司;胎牛血清、

Penicillin-Streptomycin(100X) 购于中国北京 TRANSGEN 有限公司; MEM 试剂购于美国 Gibco 公司; 牛胰岛素购于赛百慷(上海)生物技术股份有限公司; JSH-23 试剂购于美国 Med Chemexpress 生物科技公司; 甲醇购于天津市永大化学试剂有限公司; 30%acrylamide、EZ-10 总 RNA 小量提取试剂盒购、DNA 纯化回收试剂盒于上海生工生物工程有限公司; 1.5M Tris PH8.8、1.0M Tris PH6.8 购于合肥市 Biosharp Life Sciences; BSA 购于广州赛博科技有限公司 Bio Froxx 产品, 10%APS 购于上海市 BBI Life Sciences 集团; 胎牛血清购于浙江天杭生物科技; Trypsin 0.25%(1×) Solution 购于 Hyclone 公司; 无水乙醇购于江苏强盛功能化学股份有限公司; pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO 购于 Invitrogen 公司; SYBR Green qPCR 试剂盒购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 逆转录试剂盒购于江苏康为世纪生物科技股份有限公司; 异丙醇购于浙江三鹰化学试剂; T4 连接酶、限制性内切酶 EcoR V、限制性内切酶 NotI 购于纽英伦生物技术(北京)有限公司;

1.2 仪器

低温高速离心机购于美国赛默飞世尔科技公司; 电泳仪、电泳槽、转膜仪购于中国天能科技(上海)有限公司; 化学发光仪购于中国勤翔科学仪器(上海)有限公司; 普通 PCR 仪购于 Eppendorf 生命科学有限公司; mRNA 定量仪购于美国 Thermo Scientific 公司; Light Cycler 96 实时荧光定量 PCR 仪购于瑞士罗氏集团; 光学显微镜购于香港 MOTIC 实业集团有限公司;

2 方法

2.1 构建 RTKN 过表达质粒

在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库获取人 RTKN 基因序列基因, 选择合适酶切载体(名称: pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO; 6.16kb;)。5' 测序引物及序列: GFP Forward 5' -CGCGCCGCATGGTGCCGG-3', 3' 测序引物及序列: BGH Reverse 5' -TCTAGACTAGCGA-CACCCG-3'; 提取 RTKN 高表达细胞 RNA, 对其进行逆转录, 以获得的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物长度 66157bp, 反应条件为: 98℃, 2min 变性; 95℃, 15s; 60℃, 60s; 40 次循环。将 PCR 产物和 pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO 空质粒予限制性内切酶(EcoR V、NotI)双酶切后, 回收目的片段, 连接酶室温(RT)链接过夜, 使目的基因插入质

粒中。挑取单菌落, 采用 PCR 及 EcoR V 和 NotI 双酶切鉴定。将鉴定正确的质粒进行测序, 分析基因序列及阅读框架是否正确。

2.2 MCF-7 细胞转染 RTKN 过表达质粒

取 $1\sim 4 \times 10^5$ /mL MCF-7 细胞接种于 6 孔培养板, 每孔 2ml, 将质粒 DNA 与 P3000 试剂及 lipofectamine3000 分别稀释于无血清培养液中室温孵育, 将复合物加入培养孔, 混匀进行 1:3 传代, 并继续在完全培养基中培养 24-48h。当细胞汇合度为 80~90% 时, 收集细胞根据实验分组种板, 进行后续实验。

2.3 Western blot 检测重组细胞 RTKN 表达水平

取对照组、NC 组、RTKN 重组细胞, 加入足量裂解液充分裂解细胞, 二辛可酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度。制备 10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳转染后封闭 2h, 加入一抗 4℃ 过夜孵育, 二抗室温孵育 2h, 并用 ECL 化学发光仪显影法检测蛋白的表达情况。

2.4 检验各组细胞凋亡、细胞周期分布及细胞周期相关蛋白表达情况。

将细胞分为 6 组, 分别记为 1) NC/空载体组、2) RTKN 过表达组、3) miRNA-29b 过表达组(过往实验已成功构建^[7])、4) miRNA-29b&RTKN 均过表达组、5) miRNA-29b 过表达+NF-κB 抑制剂组、6) NF-κB 抑制剂组;

2.4.1 流式细胞术检测细胞凋亡

将对数周期内的上述六组细胞接种到 6 孔培养皿中, 并调整细胞密度至每毫升 1×10^6 个细胞。利用胰蛋白酶对细胞进行消化, 并遵循 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒的操作指南操作。最终加入 400 微升结合缓冲液, 在 1 小时内运用流式细胞仪(BD LSRFortessa)进行分析。

2.4.2 流式细胞术检测细胞周期实验

将对数生长期的上述六组细胞悬浮液分别接种到 6 孔板中, 每孔加入足量胰蛋白酶进行充分消化后, 将 500 μl 含有 PI 染液和 RNase A 的 DNA Staining solution, 以及 5 μl Permeabilization solution(破膜剂)的渗透溶液加入其中, 并避光条件下室温孵育 30 分钟, 流式细胞仪进行细胞分析。

2.4.3 Western Blot 检测细胞中的 cyclinD1、c-myc、CDK1、CDK2、MCM2、MCM26、c-IAP2、BCL-xL 表达情况。

将上述 6 组细胞行 BCA 法、Western blot 法检验, 方法同上, 检测各组的各类细胞因子的表达情况。

2.5 统计学方法

实验重复3次,使用SPSS 25.0与Graphpad Prism8.0软件对所得数据进行分析与作图。根据数据的正态分布和方差齐性情况,对于多组间的计量资料采用不同的统计方法进行分析,包括One-way-ANOVA单因素方差分析、Turkey检验、Dunnett's T3检验或独立样本t检验、以及Kruskal-Wallis H检验。显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)

表示, $P<0.05$ 表示具有统计学意义的差异。

3 结果

3.1 RTKN 过表达细胞构建成功

与空载组相比,RTKN过表达组MCF-7细胞中RTKN蛋白表达水平较其显著上升($P<0.01$,图1),具有统计学意义,提示RTKN过表达的MCF-7细胞构建成功;



图1 各组人乳腺癌细胞中RTKN蛋白表达电泳图($\bar{x} \pm s$, n=3)

“注:与NC组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与RTKN过表达组比较,★ $P<0.05$,★★ $P<0.01$;与miRNA-29b过表达+NF- κ B抑制剂组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。”

3.2 各组MCF-7细胞凋亡情况、细胞周期分布情况及各类蛋白表达情况

3.2.1 各组细胞凋亡情况

与NC组比较,RTKN过表达组MCF-7细胞的凋亡率显著降低($P<0.05$),miRNA-29b过表达组、miRNA-29b过表达+NF- κ B抑制剂组及NF- κ B抑制剂组MCF-7细胞的凋亡率显著升高($P<0.05$)。与RTKN过表达组比较,

miRNA-29b与miRNA-29b&RTKN均过表达组MCF-7细胞的凋亡率显著升高($P<0.05$)。与miRNA-29b过表达组比较,miRNA-29b&RTKN均过表达组MCF-7细胞的凋亡率显著降低($P<0.05$),miRNA-29b过表达+NF- κ B抑制剂组MCF-7细胞的凋亡率显著升高($P<0.01$)。与NF- κ B抑制剂组比较,miRNA-29b过表达+NF- κ B抑制剂组MCF-7细胞的凋亡率显著升高($P<0.01$)。见图2及表1。

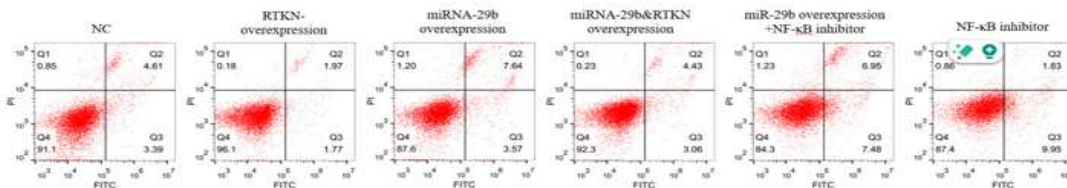


图2 各组别细胞凋亡的流式图($\bar{x} \pm s$, n=3)

表1 各组别细胞凋亡率($\bar{x} \pm s$, n=3)

Groups	apoptosis rate (%)
NC group	7.32 \pm 0.8
RTKN-overexpression group	3.93 \pm 0.31 [▲]
miRNA-29b overexpression group	10.39 \pm 1.13 ^{★★}
miRNA-29b&RTKN overexpression group	7.29 \pm 0.96 ^{▲★★}
miRNA-29b expression+NF- κ B inhibitor group	15.24 \pm 1.19 ^{▲★★★}
NF- κ B inhibitor group	10.34 \pm 1.44 [▲]

compared with the NC group, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$;
 compared with RTKN overexpression group, ★ $P<0.05$,

★★ $P<0.01$; compared with miRNA-29b overexpression group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; compared with NF- κ B inhibitor group,* $P<0.05$, ** $P<0.01$;

注:与NC组相比,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与RTKN过表达组相比,★ $P<0.05$,★★ $P<0.01$;与miRNA-29b过表达组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与NF- κ B抑制剂组相比* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.2.2 各组细胞周期情况

与 NC/空载体组比较, miRNA-29b 过表达组、miRNA-29b&RTKN 均过表达组及 NF-κ B 抑制剂组 MCF-7 细胞在 G0/G1 期细胞数量均显著增加 (P<0.01), S 期和 G2 期细胞数均无显著变化 (P>0.05); 与 RTKN 过表达组比较, miRNA-29b&RTKN 均过表达组细胞在 G0/G1 期细胞数量

均显著增加 (P<0.01), S 期和 G2 期细胞数均无显著变化 (P>0.05); 与 miRNA-29b 过表达 +NF-κ B 抑制剂组相比, miRNA-29b 过表达组及 NF-κ B 抑制剂组细胞在 G0/G1 期细胞数显著减少 (P<0.01), S 期和 G2 期细胞数量均无显著变化 (P>0.05)。见图 3 及图 4。

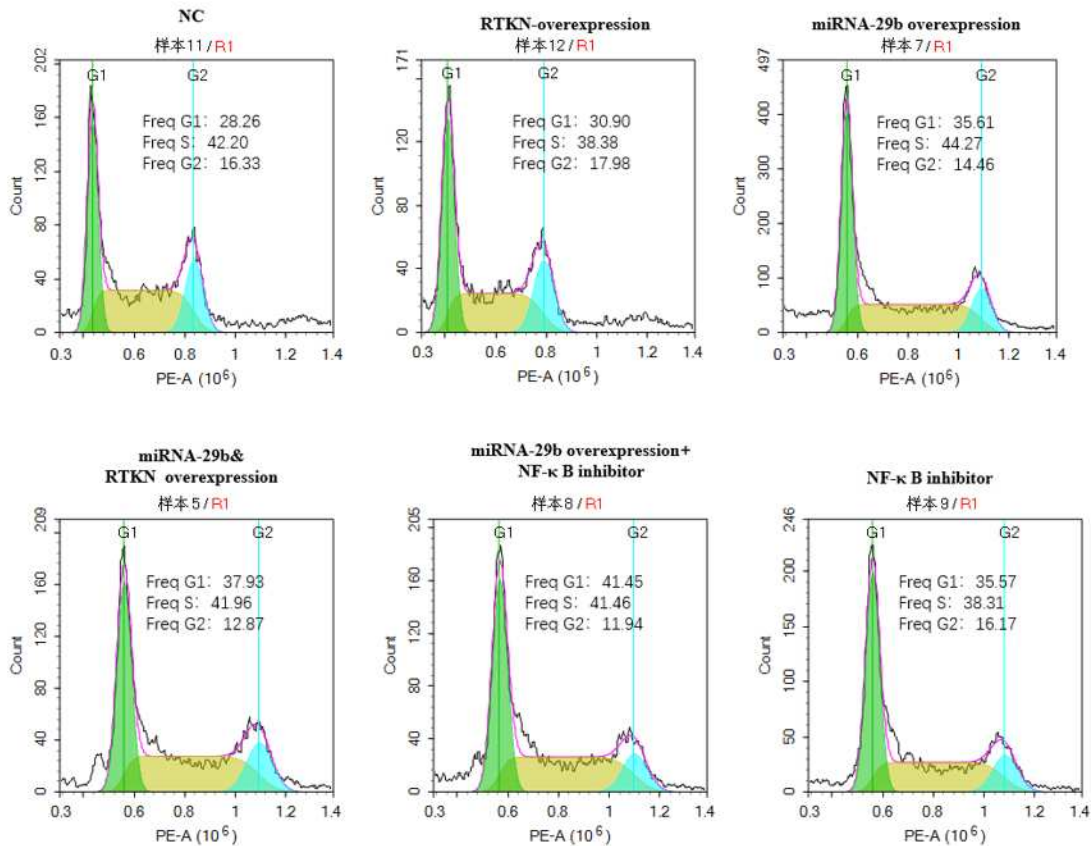
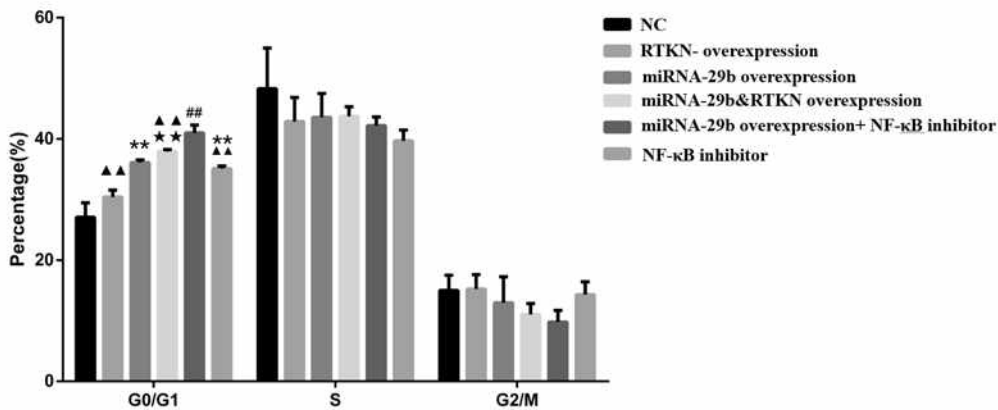


图 3 各组细胞周期分布情况的流式细胞图



compared with the NC group, ▲ P<0.05, ▲▲ P<0.01; compared with the RTKN overexpression group, ★ P<0.05, ★★ P<0.01; compared with miRNA-29b overexpression+ NF-κ B inhibitor group,*P<0.05, **P<0.01

图 4 各组细胞周期分布情况 ($\bar{x} \pm S$, n=3)

3.3 各组 MCF-7 细胞中 cyclinD1、c-myc、CDK1、CDK2、MCM2、MCM6、c-IAP2、BCL-xL 的蛋白表达水平与空载组相比, RTKN 过表达组细胞中 cyclinD1、c-myc、CDK1、CDK2、MCM2、MCM6、c-IAP2、BCL-xL 蛋白表达水平显著性升高 (P<0.05 或 P<0.01), miRNA-29b 过表达组 MCF-7 细胞中 c-myc、CDK1、CDK2、MCM2、MCM6、c-IAP2、BCL-xL 蛋白表达水平其显著性降低 (P<0.05 或 P<0.01); 与 miRNA-29b&RTKN 均过表达组相比, RTKN 过表达组细胞中 c-myc、CDK1、CDK2、MCM2、MCM6、c-IAP2、BCL-xL 蛋白表达水平显著性升高 (P<0.05 或 P<0.01), miRNA-29b 过表达组中 cyclinD1、c-myc、CDK1、CDK2、MCM2、MCM6、c-IAP2、BCL-xL 蛋白表达水平显著性降低 (P<0.05 或 P<0.01); 与 NF-κ B 抑制剂组及 miRNA-29b 过表达组相比, miRNA-29b 过表达 +NF-κ B 抑制剂组 MCF-7 细胞中 c-myc、CDK1、CDK2、MCM2、MCM6、c-IAP2、BCL-xL 蛋白表达水平显著性降低 (P<0.05 或 P<0.01)。

中, 我们发现 RTKN 蛋白是 MiRNA-29b 调控的下游靶基因, miRNA-29b 能下调 RTKN 蛋白的表达水平来抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移^[7]。RhoA-RTKN 能激活胃癌细胞中 NF-κ B 信号通路, 并诱导抗凋亡蛋白 cIAP-2、BCL2 相关蛋白 A1 和 BCL2 相关蛋白 A20 的表达^[15]; 且大量研究发现 miRNA 对 NF-κ B 信号通路具有调节作用^[16], miRNA-29b 的表达可抵消 NF-κ B 等炎症通路的表达, 导致肿瘤发展及不良预后^[3]; 且乳腺癌中 NF-κ B 存在异常激活, 异常激活的 NF-κ B 通路促进细胞增殖和抗凋亡基因表达, 引起细胞恶性转化, 从而调控乳腺癌的发生发展 [11, 17]。因此我们推测 miRNA-29b-RTKN 对乳腺癌细胞的凋亡调控可能也是通过 NF-κ B 信号途径实现, 并予以验证。

在本研究中, 我们首先成功构建了 RTKN 过表达质粒, 感染乳腺癌 MCF-7 细胞后, 采用 Western Blot 法检测到重组 MCF-7 细胞中 RTKN 蛋白表达水平显著性升高, 证实构建 RTKN 过表达质粒并转染成功。随后, 我们对 NC/空载体组、RTKN 过表达组、miRNA-29b 过表达组、miRNA-29b&RTKN 均过表达组、miRNA-29b 过表达 +NF-κ B 抑制剂组、NF-κ B 抑制剂组六个组别细胞进行实验, 对各组细胞的凋亡情况、细胞周期分布情况及各类蛋白表达情况进行检测及对比分析。

实验发现, 与 NC 组相比, miRNA-29b 过表达后, 细胞周期相关蛋白 (c-myc、CDK1、CDK2、MCM2、MCM6) 及细胞抗凋亡相关因子 (c-IAP2、BCL-xL) 的表达明显减少, 肿瘤细胞凋亡率显著上升, RTKN 过表达的作用则恰好相反。且与 RTKN 过表达组相比, miRNA-29b&RTKN 均过表达细胞能抑制细胞周期相关蛋白及抗凋亡因子的表达, 提高细胞凋亡率, 即 miRNA-29b 的过表达可以下调 RTKN 蛋白抑制肿瘤细胞凋亡的作用, 这进一步证明了 RTKN 蛋白是 MiRNA-29b 调控的下游靶基因, 与我们之前的研究相符^[7]。与 NC 组相比, miRNA-29b 过表达组和 NF-κ B 抑制剂组的肿瘤细胞周期相关蛋白及细胞抗凋亡相关因子的表达减少, 细胞的 G0/G1 期显著延长, 肿瘤细胞的凋亡率显著提高。这说明 miRNA-29b 过表达下调 RTKN 与 NF-κ B 抑制剂阻断下游通路起到了相同的作用。同时, miRNA-29b 过表达

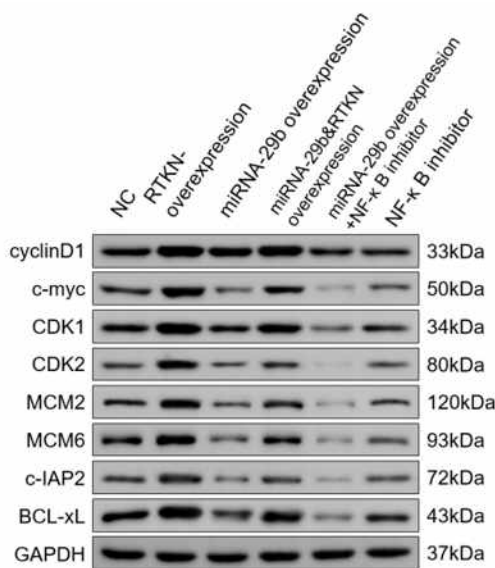


图 5 各组细胞中各类蛋白表达电泳图

4 讨论

研究者们发现, RTKN 在多种恶性肿瘤中高表达, 能发挥增强肿瘤细胞增殖和迁移的作用, 与肿瘤细胞的浸润转移及患者不良预后关系密切 [13, 14]。在过去的研究

+NF- κ B 抑制剂组的肿瘤细胞周期相关蛋白及细胞抗凋亡相关因子的表达减少更加明显, 细胞的 G0/G1 期显著延长, 肿瘤细胞的凋亡率最高, 即通过抑制 miRNA-29b-RTKN 下游 NF- κ B 通路的激活, 进一步增加了肿瘤细胞的凋亡率。因此, 我们推断 miRNA-29b-RTKN 对乳腺癌细胞凋亡的调控是通过 NF- κ B 信号通路实现的。

综合上述研究结果, miRNA-29b 通过抑制 RTKN 的表达促进乳腺癌细胞凋亡。同时, miRNA-29b-RTKN 对乳腺癌细胞凋亡的调控可能是通过调控 NF- κ B 通路实现的。这些发现为 miRNA-29b 在乳腺癌细胞中的调控提供了新的依据和支持, 也为乳腺癌的治疗和研究提供了新的方向。

参考文献:

- [1] KWON J J, FACTORA T D, DEY S, et al. A Systematic Review of miR-29 in Cancer [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2019, 12: 173-94.
- [2] AMIRIAN M, JAFARI-NOZAD A M, DARROUDI M, et al. Overview of the miR-29 family members' function in breast cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 230: 123280.
- [3] BOTTA C, CUCE M, PITARI M R, et al. MiR-29b antagonizes the pro-inflammatory tumor-promoting activity of multiple myeloma-educated dendritic cells [J]. *Leukemia*, 2018, 32(4): 1003-15.
- [4] DEMIR CETINKAYA B, BIRAY AVCI C. Molecular perspective on targeted therapy in breast cancer: a review of current status [J]. *Med Oncol*, 2022, 39(10): 149.
- [5] LI B, CHEN P, CHANG Y, et al. Let-7a inhibits tumor cell growth and metastasis by directly targeting RTKN in human colon cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 739-45.
- [6] ITO H, MORISHITA R, NAGATA K I. Functions of Rhotekin, an Effector of Rho GTPase, and Its Binding Partners in Mammals [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7).
- [7] 姜贻乾, 郭庆敏, 谷建钟, 等. 微小 RNA-29b 对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响及其分子生物学机制 [J]. *浙江大学学报 (医学版)*, 2017, (04): 349-56.
- [8] LALLE G, TWARDOWSKI J, GRINBERG-BLEYER Y. NF-kappaB in Cancer Immunity: Friend or Foe? [J]. *Cells*, 2021, 10(2).
- [9] QUINN J A, BENNETT L, PATEL M, et al. The relationship between members of the canonical NF-kB pathway, tumour microenvironment and cancer specific survival in colorectal cancer patients [J]. *Histol Histopathol*, 2020, 35(6): 569-78.
- [10] RAMADASS V, VAIYAPURI T, TERGAONKAR V. Small Molecule NF-kappaB Pathway Inhibitors in Clinic [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14).
- [11] ZHANG M, LIU Z Z, AOSHIMA K, et al. CECR2 drives breast cancer metastasis by promoting NF-kappaB signaling and macrophage-mediated immune suppression [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(630): eabf5473.
- [12] PAVITRA E, KANCHARLA J, GUPTA V K, et al. The role of NF-kappaB in breast cancer initiation, growth, metastasis, and resistance to chemotherapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114822.
- [13] ZHOU J, ZHANG Y, QI Y, et al. MicroRNA-152 inhibits tumor cell growth by directly targeting RTKN in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 1227-34.
- [14] QU G Q, LU Y M, LIU Y F, et al. Effect of RTKN on progression and metastasis of colon cancer in vitro [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 74: 117-23.
- [15] LIU C A, WANG M J, CHI C W, et al. Rho/Rhotekin-mediated NF-kappaB activation confers resistance to apoptosis [J]. *Oncogene*, 2004, 23(54): 8731-42.
- [16] WU J, DING J, YANG J, et al. MicroRNA Roles in the Nuclear Factor Kappa B Signaling Pathway in Cancer [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 546.
- [17] DRAGO-FERRANTE R, PENTIMALLI F, CARLISI D, et al. Suppressive role exerted by microRNA-29b-1-5p in triple negative breast cancer through SPIN1 regulation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 28939-58.

作者简介:

孔向阳 (2000—), 女, 汉族, 江西上饶人, 温州医科大学内科学 (肿瘤方向) 研究生在读。

* 通信作者: 姜贻乾。

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划 (2024XY109); 杭州市卫生科技计划项目 (B20220132)