

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.11.002

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.11.002>

沉默 CIT 基因可通过调控 CIT 相关基因的表达 抑制膀胱癌细胞的进展

赵书恒, 杨杨, 刘赞, 修有成

(哈尔滨医科大学附属第一医院泌尿外科, 哈尔滨 150000)

[摘要] 目的: 寻找Citron(CIT)基因调控膀胱癌的相关分子通路。方法: 选择人膀胱癌细胞T24, 沉默CIT基因, 使用微阵列分析找出与正常肿瘤细胞的差异基因, 对差异基因进行生物信息学分析, 绘制CIT基因潜在的调控网络, 对筛选出的表达水平较高的相关基因采用蛋白质印迹法进行分析验证。结果: 膀胱癌细胞CIT基因可以被成功敲减, 敲减后有表达上调及下调的基因, 将其分为两组后进行生物信息学分析, 发现CIT基因的潜在调控网络, 之后选取细胞周期蛋白1(Cyclin D1, CCND1), 微小体维持蛋白3(mini chromosome maintenance 3, MCM3), 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA), 微小体维持蛋白7(mini chromosome maintenance 7, MCM7), (cyclin dependent kinases 1, CDK1)5个基因进行蛋白质印迹法验证, 发现可能存在CIT相关信号通路。结论: 目的基因CIT在膀胱癌细胞上通过调控CCND1, MCM3, MCM7, CDK1基因的表达在膀胱癌的进展中发挥一定的作用。

[关键词] 膀胱肿瘤; CIT基因; 生物信息学; 微小体维持蛋白3

Silencing CIT gene inhibits the development of bladder cancer cells by regulating CIT-related gene expression

ZHAO Shuheng, YANG Yang, LIU Zan, XIU Youcheng

(Department of Urology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China)

Abstract **Objective:** To explore the molecular pathway of Citron (CIT) gene regulating bladder cancer. **Methods:** CIT gene was silenced by the selection of human cyst cancer cell T24, and the differentially expressed genes from normal tumor cells were identified by microarray analysis. The differentially expressed genes were analyzed by bioinformatics, the potential regulatory network of CIT gene was plotted, and the screened related genes with high expression level were verified by Western blotting. **Results:** Bladder cancer cell CIT gene was successfully knocked out. The gene expression after knock reduction was divided into two groups after the bioinformatics analysis, showed that the potential of CIT gene regulation network, after selecting CyclinD1 (CCND1), mini chromosome maintenance 3 (MCM3), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), mini chromosome maintenance 7 (MCM7), and cyclin dependent kinases 1 (CDK1) with Western blot verification. The underlying CIT related

收稿日期 (Date of reception): 2019-10-14

通信作者 (Corresponding author): 修有成, Email: 694484688@qq.com

signaling pathway was found. **Conclusion:** CIT plays a role in the development of bladder cancer by regulating the expression of CCND1, MCM3, MCM7, and CDK1 genes.

Keywords bladder cancer; CIT gene; bioinformatics; mini chromosome maintenance 3

膀胱癌又称为浸润性尿路上皮癌, 是泌尿外科最常见的肿瘤之一^[1]。按浸润深度膀胱癌可分为非肌层浸润性膀胱癌(non-muscular invasive bladder cancer, NMIBC)和肌层浸润性膀胱癌(muscular invasive bladder cancer, MIBC)^[2-3]。膀胱癌的发生是复杂、多因素、多步骤的病理过程^[4]。目前膀胱癌的诊治主要靠膀胱镜检查以及手术^[5], 创伤较大且预后不满意。因此, 迫切需要寻找更高效准确的诊治方法。生物信息学^[6]主要以计算机、软件等为研究工具, 研究核酸和蛋白质序列, 并对其进行整合分析的科学^[7]。与传统研究方法相比, 生物信息学有独特的优势, 其可以对不同系统的各类分子进行整体、系统的分析, 进而发现其整体水平的功能和联系。生物信息学比较常用的数据库有癌症基因组图谱数据库(The Cancer Genome Atlas, TCGA)、基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)、京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)以及基因本体数据库(Gene Ontology, GO)^[8], 这些数据库相互联系, 可以为肿瘤的相关治疗提供帮助。Chen等^[9]通过GEO数据库的鼻咽癌数据集, 分析出差异表达基因, GO和KEGG对差异基因进行富集分析, 筛选出了鼻咽癌发病机制中可能的关键基因及通路。

CIT是一种丝氨酸/苏氨酸激酶^[10]。在多种细胞通路中, Rho蛋白发挥通路开关或信号转导的作用, 而CIT作为Rho蛋白的一种效应器, 广泛表达于各种动物体的增殖细胞中, 在细胞分裂后期作为一个重要的调控者^[11]。微小体维持蛋白(mini chromosome maintenance, MCM)包括10个在DNA复制起始和延长过程中起重要作用的分子^[12]。其中MCM3蛋白对DNA上双六聚体的招募和装载具有重要影响。近年来, 越来越多的研究^[13-18]表明: MCM3过表达与肿瘤细胞增殖及口腔鳞状细胞癌、唾液腺肿瘤、胃癌、成髓细胞瘤、卵巢癌、恶性黑色素瘤等预后不良相关。MCM3与膀胱癌的关系鲜有研究, 本研究通过敲减CIT基因, 发现MCM3蛋白下降明显, 因此预测在膀胱癌中可能存在CIT-MCM3相关信号通路调控癌细胞的生长增殖。

本研究通过证实敲减CIT基因后膀胱癌细胞生长受到抑制, 并应用生物信息学方法研究CIT基因抑制膀胱癌生长的潜在分子机制, 以期关于CIT基因在膀胱癌中的作用提供有用的信息。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人膀胱癌细胞株T24购自中国科学院上海细胞库, 胎牛血清购自上海威正翔禹生物科技公司, DEAM培养基购自美国康宁公司, TRIzol试剂盒购自上海普飞生物技术有限公司, PCR引物来自广州市锐博生物科技有限公司, 基因芯片及3'IVT表达试剂盒均购自美国Affymetrix公司, BCA蛋白测定试剂盒购自美国Hyclone公司。

1.2 细胞培养

将膀胱癌细胞放在含10%胎牛血清的DEAM培养基中, 在37℃, 5% CO₂条件下培养, 24 h后更换1次培养液继续培养, 待细胞汇合度达约80%传代培养, 保持细胞良好的生长状态。

培养生长状态良好的目的细胞, 根据慢病毒转染预实验结果设计各组实验条件, 正式转染。

1.3 RNA干扰及效率测定

使用慢病毒[LV-CIT-RNAi(2915-1)]转染T24细胞[实验组(Knock Down, KD组)]和阴性对照细胞(NC细胞), 按照制造商的说明操作。在转染后96 h在100×显微镜下观察细胞状态, 选择感染效率合格组, 用qPCR检测细胞中的CIT mRNA表达以评估RNAi的效率。

使用TRIzol试剂盒从感染的T24细胞和NC细胞中提取总RNA, 并利用反转录酶和已经配置好的反转录引物分别进行microRNA和RNA反转录, 使用qPCR仪器(Agilent公司)进行CIT mRNA表达的qPCR分析并制作熔解曲线, 使用2^{-ΔΔCt}法分析数据, GAPDH作内参对照, 引物设计: GAPDH正向引物5'-TGAAGTTCACAGCGACACCCA-3', 反向引物5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'; CIT正向引物5'-CAGGCAAGATTGAGAACG-3', 反向引物5'-GCACGATTGAGACAGGGA-3'。

1.4 总 RNA 质检及高通量芯片分析CIT基因表达谱

使用TRIzol试剂盒从CIT敲减细胞和阴性对照细胞中分离总RNA, 首先用分光光度仪(Nanodrop 2000/2000C)测定其浓度以及质量, 筛选合格样本进入下一步的芯片实验。选择6片芯片并进行分组(表1)。随后采用GeneChip 3'IVT表达试剂盒制备aRNA(amplified RNA), 即利用反转录酶和已经配置好的反转录引物进行RNA反转录合成互补DNA, 进一步经过二链合成得到双链DNA模板, 纯化aRNA, 然后将其片段化后与芯片探针杂交。杂交完成后, 洗染芯片。最后扫描得到图片和原始数据。通过通路分析和GO分析利用KEGG和BIOCARTA数据库进行基因功能和途径的富集分析。

表1 芯片原始数据与样品编号对应表

Table 1 Original chip data and sample number table

编号	原始数据文件名	样品名称
1	3481-1_(PrimeView).CEL	KD
2	3481-2_(PrimeView).CEL	KD
3	3481-3_(PrimeView).CEL	KD
4	3480-1_(PrimeView).CEL	NC
5	3480-2_(PrimeView).CEL	NC
6	3480-3_(PrimeView).CEL	NC

1.5 蛋白质印迹法检测

综合以上生信分析, 推测目的基因CIT较可能通过调节以上基因的表达在膀胱癌方向发挥功能, 收集生长状态良好的CIT敲减细胞和阴性对照细胞, 提取蛋白, 进行免疫凝胶电泳、显色, 分析检测目的基因的表达情况。

1.6 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用独立样本t检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒转染成功

将实验组和对照组分别用慢病毒转染, 96 h后即观察到荧光标记的基因表达情况(图1)目的细胞的感染效率均达到70%以上。

2.2 CIT基因成功敲减

慢病毒转染后, 与对照组相比, 在T24细胞中, 实验组CIT mRNA的表达量受到抑制, 敲减效率达59.9%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 高通量芯片分析CIT基因表达谱

2.3.1 样本总RNA完整性检测

样本中提取出的总RNA完整性影响芯片的检测, 因此利用Nanodrop 2000测定其浓度以及 A_{260}/A_{280} 值, 通过Agilent 2100仪器分析总RNA的RNA Integrity Number(RIN)值来表现其完整性。检测结果 displays 样本均合格。

2.3.2 芯片可靠性检测

为控制变量, 需检测芯片可靠性, 以确定所得结果真实可靠。根据芯片信号值分布, 可见信号分布曲线大致重合, 因此可确定本次实验所用基因芯片可靠性较高。

2.3.3 CIT基因敲除后的差异基因表达

因为对照组和实验组基因来自同一组细胞, 配对t检验后调整P值, 保证 $P < 0.05$, 共发现835个差异表达基因, 其中在CIT基因敲减标本中上调基因数为364个(43.6%), 下调基因数为471个(56.4%)。火山图直观表示实验组和对照组的差异表达基因(图3), 之后利用热图证明整体基因的表达(图4)。应用主成分分析主成分分析(principal component analysis, PCA)检测差异表达基因是否可以用于区分实验组与对照组, PCA结果显示(图5): 实验组基因向右侧聚集, 对照组基因向左侧聚集, 说明差异表达的基因可以分成两组。

2.3.4 差异基因表达通路分析

根据KEGG与BIOCARTA中所有通路的基因信息, 将差异基因进行富集分析, 根据P值排序后展示前10位(图6)。通过富集分析, 大部分差异表达基因在有丝分裂的调控通路中富集, 如DNA复制和细胞循环, 这与CIT蛋白作为细胞分裂调节剂的功能表现一致。通路分析结果显示: 在所有的候选基因中, 有17个基因参与了肿瘤KEGG通路的基因组。利用已知的CIT与这些候选基因的相互作用信息, 绘制其中的基因关系网络图(图7), 图中圆点代表基因芯片下调基因: 圆点大小和实验组中基因表达差异相关, 圆点越大, 实验组和对照组中的表达差异越大; 菱形代表系统添加的关联基因。根据图中的结果, 可以清楚地显示出CIT基因的表达下调导致相关目的基因的表达均出现不

同程度的下调。因此推测目的基因CIT较可能通过调节以上基因的表达在膀胱癌的发生上发挥功能。为对结果加以确认, 在17个候选基因中选择CCND1, MCM3, PCNA, MCM7及CDK1 5个基因进行蛋白质印迹法验证(图8)。之后根据相关数

据, 绘制了实验组蛋白表达量相对于阴性对照组的柱形图(图9)。图中结果显示CCND1蛋白表达下调66.2%, MCM3蛋白表达下调88%, MCM7蛋白下调76%。这与基因的表达方向一致。但PCNA相反, 它在转录水平下调, 但在蛋白水平上调。

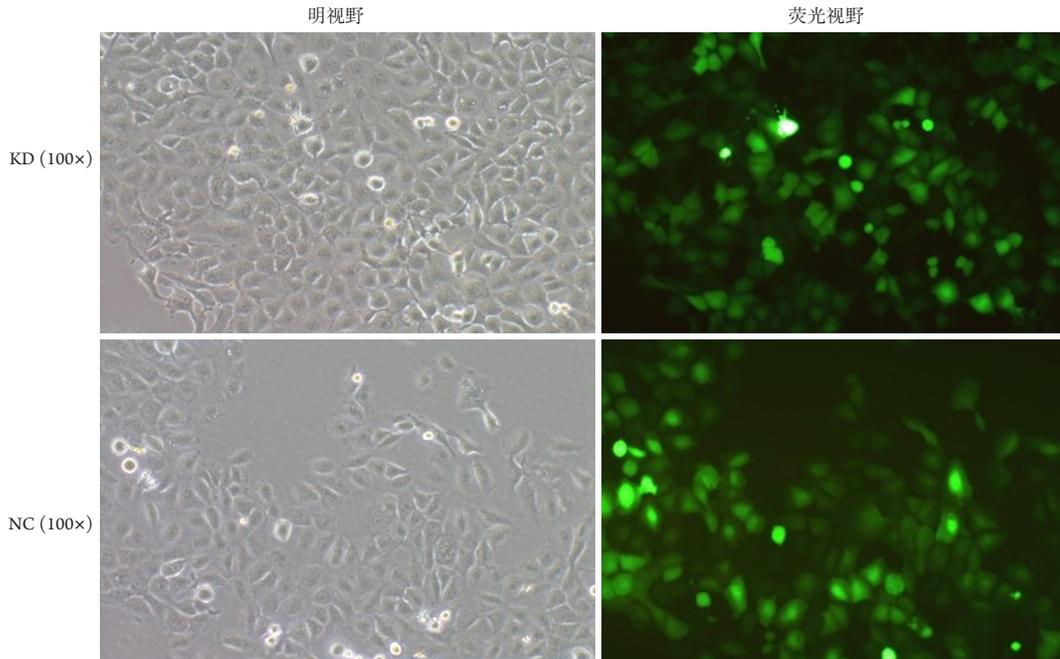


图 1 慢病毒感染后的膀胱肿瘤细胞
Figure 1 Bladder tumor cells after lentivirus infection

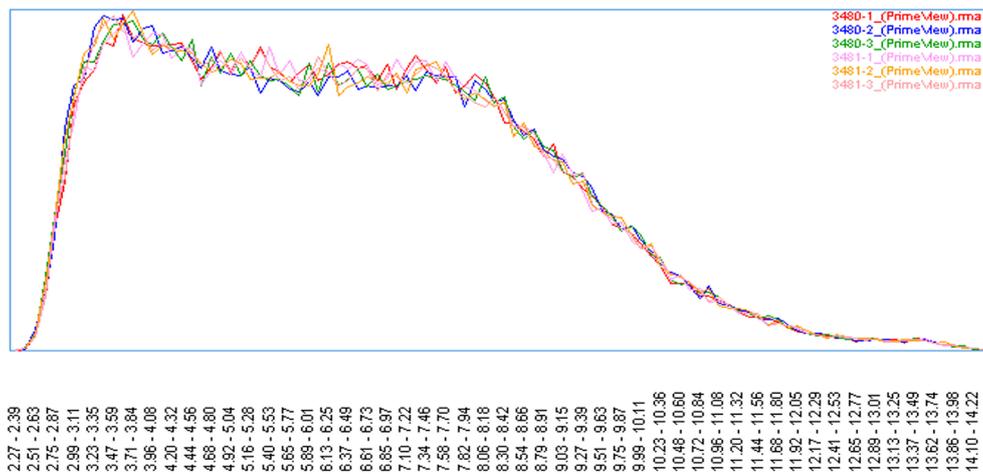


图 2 芯片信号分布曲线
Figure 2 Chip signal distribution curve

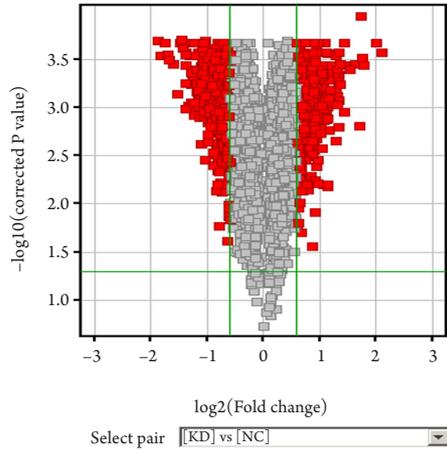


图3 样本中差异表达基因分布

Figure 3 Distribution of differentially expressed genes in samples

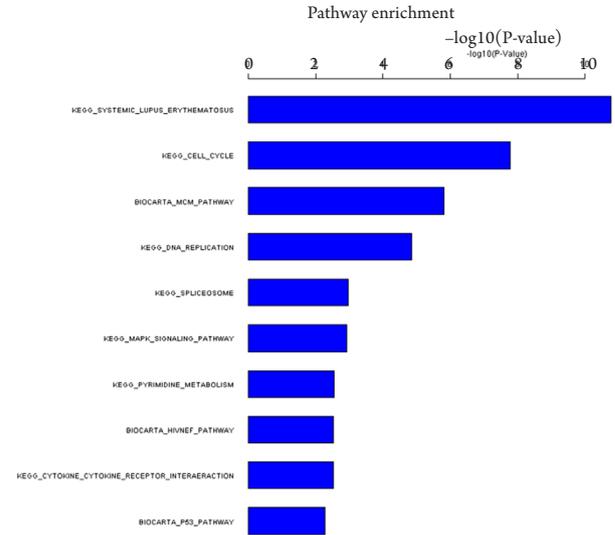


图 6 CIT 基因调控信号通路

Figure 6 CIT gene regulation signaling pathway

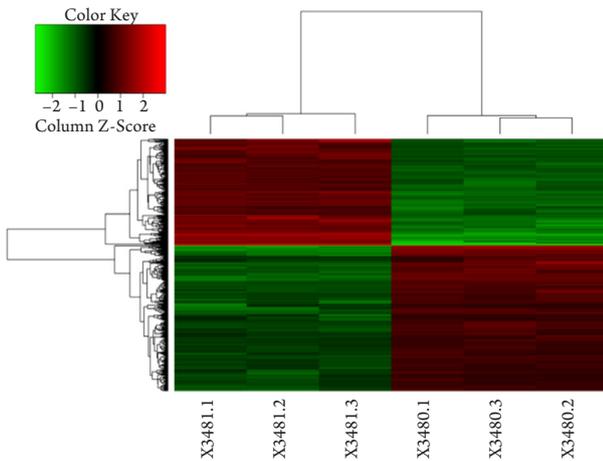


图4 差异基因表达簇的热图

Figure 4 Heat map of differentially expressed gene clusters

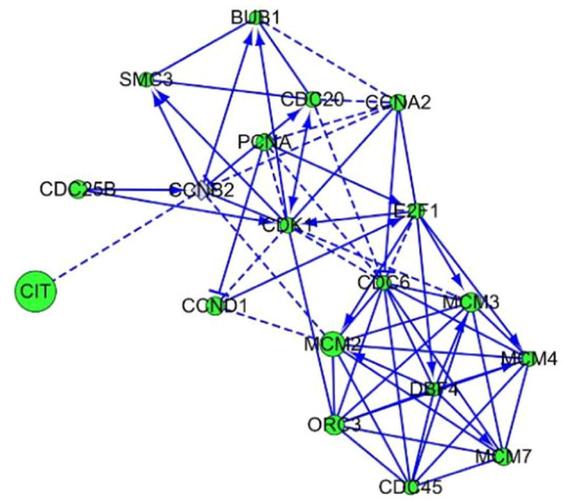


图 7 CIT 基因潜在的调控网络

Figure 7 Potential regulatory network of CIT gene

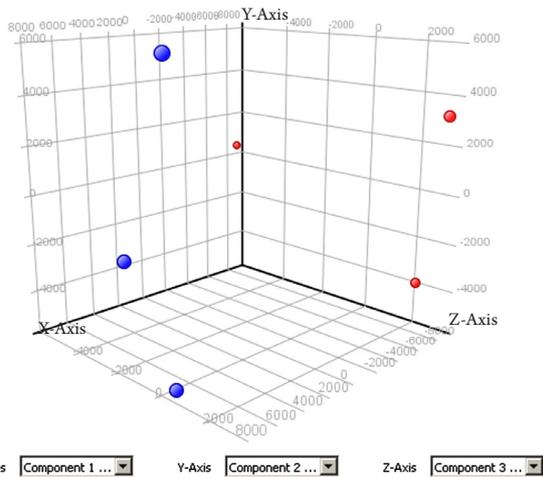


图5 3对样本的PCA分布

Figure 5 PCA distribution of three pairs of samples

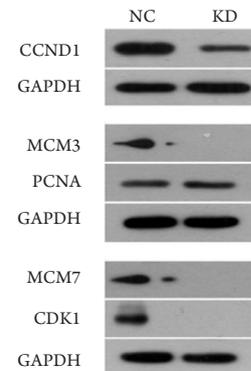


图 8 Western blot 结果

Figure 8 Western blot results

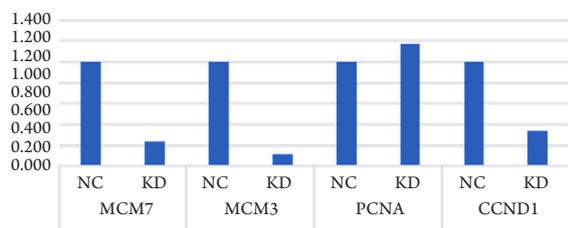


图9用NC校正的蛋白定量结果

Figure 9 Protein quantification results corrected by NC

3 讨论

恶性肿瘤现已成为威胁人类健康的主要疾病, 目前对肿瘤的发病机制、治疗方向的研究较以往已经有了长足的发展。但恶性肿瘤的治疗仍然以外科手术切除为主, 对一些已经远处转移的晚期恶性肿瘤患者往往缺乏相应的治疗手段, 治疗效果不佳, 病死率高。诊断为肌肉浸润性膀胱癌的患者预后最差, 10年生存率约为50%。非肌肉浸润性膀胱癌患者预后较好, 但许多患者最终复发并进展为肌肉浸润性膀胱癌^[19-20]。在肿瘤治疗方面, 随着基因靶向治疗研究的深入及该治疗方法的逐步发展, 对膀胱癌的靶向治疗越来越受到关注, 研究者们一直在探索, 寻找与膀胱癌增殖、侵袭及凋亡有关的基因。

研究^[21-22]证实: Rho蛋白与细胞增殖、细胞黏附、细胞迁徙及细胞凋亡有关。CIT作为Rho蛋白的一种效应器, 与Rho蛋白结合后参与胞质分裂, 并通过多种蛋白组件对中间体进行调控。CIT的表达开始于S或G₂晚期之后。CIT在细胞中间体结构的维持和细胞有丝分裂过程中起重要作用^[23]。CIT过表达会导致细胞分裂失调, 产生多倍体细胞, 与正常细胞恶性转化密切相关^[24-25]。研究^[26-27]表明: CIT敲除的小鼠由于细胞分裂失调和大量的细胞凋亡表现出明显的神经缺陷和睾丸损害。据报道^[28], CIT在卵巢癌组织中的过表达及其浓度与患者的治疗效果密切相关。CIT基因的下调表达会显著降低乳腺癌、宫颈癌和结直肠癌细胞的增殖水平^[29]。

本课题组在前期研究过程中, 已经证明CIT基因的表达下调可以抑制膀胱癌细胞的生长。文献^[30]报道下调CIT基因的表达可引起肿瘤细胞凋亡和细胞周期停滞, 这可能是由下调CIT引起的有丝分裂障碍和肿瘤相关信号通路失调引起的。因此本研究进一步探究CIT基因介导的信号通路。由于CIT是介导细胞有丝分裂过程中中间体形成的关

键因素, 其表达可促进细胞分裂和增殖。因此, 本研究使用CIT-RNAi慢病毒敲减了过表达的膀胱癌细胞系中CIT基因的表达。在实验过程中, 将CIT-RNAi慢病毒通过RNAi慢病毒介导, 对CIT基因在膀胱癌细胞中的表达进行mRNA水平的敲减。之后, 将敲减基因的实验组和对照组共6对样本进行基因芯片微阵列分析, 共筛选出835个差异表达基因。对差异基因的通路富集分析结果表明: 一些具有异常表达模式的基因可能导致膀胱癌细胞的有丝分裂增强和细胞外基质的变异。更进一步的研究揭示了CIT基因如何调控细胞周期进展和潜在的分子机制。目前微阵列数据显示: 在膀胱癌细胞中, CIT基因和一些关键调控因子之间存在一种此前未知的联系。在这些被改变的基因之中, MCM3的改变最为突出, 因为MCM3在调节细胞周期和肿瘤进展中起至关重要的作用^[31]。小分子体维持蛋白包括10个在启动和启动过程中对DNA复制的延伸起重要作用的成员^[17]。MCMs定位于细胞核中, 在G₁早期表达^[32], MCMs被细胞激酶、DBF4依赖性激酶(DBF4-dependent kinase, DDK)和细胞周期依赖性激酶(Cyclin-dependent kinases, CDK)磷酸化, 以激活和补充复制所需的其他细胞蛋白。MCM1和MCM10不属于这个家族, 但也在DNA合成中发挥作用。MCM复合物是由MCM2-7组成的六聚体, 它与复制起点结合, 溶解dsDNA, 启动复制, 并对DNA的伸长起解旋酶的作用^[33]。在这些蛋白中, MCM3对DNA上二聚体的招募和嵌入具有重要影响。在转录水平和蛋白水平上, 在CIT基因敲除后, MCM3蛋白显著下调, 提示MCM3蛋白可能作为CIT基因的下游因子, 绕过细胞周期控制促进癌细胞增殖。之前通过预实验已证实CIT基因敲除膀胱癌细胞在细胞周期的S期被抑制。本研究的微阵列结果还显示: CIT基因敲除与经典的Rho/ROCK通路之间没有关联。这表明CIT基因可能通过一个与Rho无关的通路发挥作用, 即可能存在特定的CIT-MCM3信号通路。CCND1和MCM7蛋白表达的下调也进一步证实可能存在其他与Rho无关的特定信号通路。

目前的研究仍然存在一些局限性。首先, 本研究不够深入, 没有对CIT-MCM3信号通路做进一步的研究; 其次, 没有提供关于功能获得实验的数据来进一步验证CIT基因在膀胱癌细胞中的功能。如果过表达CIT基因导致膀胱癌细胞具有更高的侵袭性和致瘤性, 本研究的论证依据肯定会更加完善。最后, 没有研究CIT基因敲减后的双核和多核细胞群的变化, 而CIT失调可能导致细胞分裂

失败而产生多倍体细胞。

综上所述, 本研究首次在体外评价 CIT 基因的下调对膀胱癌细胞生物学特性起调控作用, 证实目的基因 CIT 在膀胱癌细胞上通过调控 CCND1, MCM3, MCM7, CDK1 基因的表达在膀胱癌的进展中发挥一定的作用。膀胱癌细胞中 CIT 基因缺失后细胞增长显著抑制, 表明作为药物开发的靶点, CIT 基因抑制具有潜在的治疗价值。然而, 由于目前的微阵列分析发现下调 CIT 基因也会导致许多癌基因上调, 如 PCNA, 因此, 对 CIT 基因靶向癌症治疗的不良反应值得进行更深入的研究。

参考文献

- Li HT, Duymich CE, Weisenberger DJ, et al. Genetic and epigenetic alterations in bladder cancer[J]. *Int Neurourol*, 2016, 20(Suppl 2): S84-S94.
- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013[J]. *Eur Urol*, 2013, 64(4): 639-653.
- Burger M, Oosterlinck W, Konety B, et al. ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012: non-muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder[J]. *Eur Urol*, 2013, 63(1): 36-44.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 1(5): 646-674.
- Messer JS, Chew DJ, McLoughlin MA. Cystoscopy: Techniques and clinical applications[J]. *Clin Tech Small Anim Pract*, 2005, 20(1): 52-64.
- 吴茜, 宋兴勃, 钟慧钰. 基于生物信息学分析参与结核病的关键基因和通路[J]. *华西医学*, 2019, 34(9): 1033-1041.
WU Qian, SONG Xingbo, ZHONG Huiyu. Bioinformatics and functional analysis of key genes and pathways in tuberculosis[J]. *West China Medical Journal*, 2019, 34(9): 1033-1041.
- Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field[J]. *Methods Inf Med*, 2001, 40(4): 346-358.
- 马俊, 吴霞, 官伟. 生物信息学相关数据库在肿瘤研究中的应用[J]. *中国医药生物技术*, 2019, 14(1): 69-71.
MA Jun, WU Xia, GONG Wei. Application of bioinformatics related databases in cancer research[J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2019, 14(1): 69-71.
- Chen F, Shen C, Wang X, et al. Identification of genes and pathways in nasopharyngeal carcinoma by bioinformatics analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(38): 63738-63749.
- 陈海平. CIT 在前列腺癌 PC-3 细胞株增殖、迁移和侵袭中的作用及机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
CHEN Haiping. Role and mechanism of CIT in proliferation, migration and invasion of pc-3 cell line of prostate cancer[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2019.
- Naim V, Imarisio S, Di Cunto F. Drosophila citron kinase is required for the final steps of cytokinesis[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(11): 5053-5063.
- Samson RY, Bell SD. MCM loading—an open-and-shut case[J]. *Mol Cell*, 2013, 50(4): 457-458.
- Kobierzycki C, Pula B, Skiba M, et al. Comparison of minichromosome maintenance proteins (MCM-3, MCM-7) and metallothioneins (MT-I/II, MTIII) expression in relation to clinicopathological data in ovarian cancer[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(12): 5375-5383.
- Rezvani G, Andisheh-Tadbir A, Ashraf MJ, et al. Evaluation of mini chromosome maintenance-3 (MCM3) in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Dent*, 2015, 16: 87-92.
- Nodin B, Fridberg M, Jonsson L, et al. High MCM3 expression is an independent biomarker of poor prognosis and correlates with reduced RBM3 expression in a prospective cohort of malignant melanoma[J]. *Diagn Pathol*, 2012, 7: 82.
- Vidal MT, Lourenço SV, Soares FA, et al. The sonic hedgehog signaling pathway contributes to the development of salivary gland neoplasms regardless of perineural infiltration[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 9587-9601.
- Jian T, Chen Y. Regulatory mechanisms of transcription factors and target genes on gastric cancer by bioinformatics method[J]. *Hepatogastroenterology*, 2015, 62: 524-528.
- Lau KM, Chan QK, Pang JC, et al. Mini chromosome maintenance proteins 2, 3 and 7 in medulloblastoma: overexpression and involvement in regulation of cell migration and invasion[J]. *Oncogene*, 2010, 29(40): 5475-5489.
- DeGraff DJ, Robinson VL, Shah JB, et al. Current preclinical models for the advancement of translational bladder cancer research[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(2): 121-130.
- Talukdar S, Emdad L, Das SK, et al. Noninvasive approaches for detection and monitoring bladder cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015, 15(3): 283-294.
- Xie F, Shao S, Aziz AUR, et al. Role of Rho-specific guanine nucleotide dissociation inhibitor α regulation in cell migration[J]. *Acta Histochem*, 2017, 119(3): 183-189.
- Harding MA, Theodorescu D. RhoGDI signaling provides targets for cancer therapy[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(7): 1252-1259.
- Bassi ZI, Audusseau M, Riparbelli MG, et al. Citron kinase controls a molecular network required for midbody formation in cytokinesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(24): 9782-9787.
- Anastas SB, Mueller D, Semple-Rowland SL, et al. Failed cytokinesis of

- neural progenitors in citron kinase-deficient rats leads to multiciliated neurons[J]. *Cereb Cortex*, 2011, 21(2): 338-344.
25. Serres MP, Kossatz U, Chi Y, et al. p27(Kip1) controls cytokinesis via the regulation of citron kinase activation[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 844-858.
 26. Di Cunto F, Imarisio S, Hirsch E, et al. Defective neurogenesis in citron kinase knockout mice by altered cytokinesis and massive apoptosis[J]. *Neuron*, 2000, 28(1): 115-127.
 27. Cunto FD, Imarisio S, Camera P, et al. Essential role of citron kinase in cytokinesis of spermatogenic precursors[J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 24): 4819-4826.
 28. Ehrlichova M, Mohelnikova-Duchonova B, Hrdy J, et al. The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma[J]. *Genomics*, 2013, 102(2): 96-101.
 29. McKenzie C, D'Avino PP. Investigating cytokinesis failure as a strategy in cancer therapy[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 87323-87341.
 30. Fu Y, Huang J, Wang KS, et al. RNA interference targeting CITRON can significantly inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(2): 693-702.
 31. Cheng DD, Zhang HZ, Yuan JQ, et al. Mini chromosome maintenance protein 2 and 3 promote osteosarcoma progression via DHX9 and predict poor patient prognosis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 26380-26393.
 32. Carreon-Burciaga RG, Gonzalez-Gonzalez R, Molina-Frechero N, et al. Immuno-expression of Ki-67, MCM2, and MCM3 in ameloblastoma and ameloblastic carcinoma and their correlations with clinical and histopathological patterns[J]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 683087.
 33. Stewart PA, Khamis ZI, Zhau HE, et al. Upregulation of minichromosome maintenance complex component 3 during epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 39209-39217.

本文引用: 赵书恒, 杨杨, 刘赞, 修有成. 沉默CIT基因可通过调控CIT相关基因的表达抑制膀胱癌细胞的进展[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(11): 2805-2812. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.11.002

Cite this article as: ZHAO Shuheng, YANG Yang, LIU Zan, XIU Yucheng. Silencing CIT gene inhibits the development of bladder cancer cells by regulating CIT-related gene expression[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(11): 2805-2812. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.11.002