

Arch Surg 2014 ,399(2) :225 - 228.

[13] Yip L ,Nikiforova MN ,Carty SE ,et al. Optimizing surgical treatment of papillary thyroid carcinoma associated with BRAF mutation [J]. Surgery 2009 ,146(6) :1215 - 1223.

[14] So YK ,Son YI ,Hong SD ,et al. Subclinical lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma: A study of 551 resections [J]. Surgery 2010 ,148(3) :526 - 531.

[15] Howell GM ,Nikiforova MN ,Carty SE ,et al. BRAF^{V600E} mutation independently predicts central compartment lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer [J]. Ann Surg Oncol , 2013 ,20(1) :47 - 52.

[16] Lee JW ,Koo BS. The prognostic implication and potential role of BRAF mutation in the decision to perform elective neck dissection for thyroid cancer [J]. Gland Surgery 2013 ,2(4) :206 - 211.

(编校: 蔺玥)

缺氧诱导因子 - 1A 上调 HMG5 表达并促进骨肉瘤远处转移机制的实验研究

张珂 徐恩杰 尹佳 马骁 周许辉

Hypoxia - inducible factor - 1A up - regulates HMG5 expression and promotes distant metastasis of osteosarcoma

Zhang Ke ,Xu Enjie ,Yin Jia ,Ma Xiao ,Zhou Xuhui

The Fourth Department of Spine ,Shanghai Changzheng Hospital ,Shanghai 200003 ,China.

【Abstract】 Objective: To explore the molecular mechanism of the effect of hypoxia - inducible factor - 1A (HIF - 1A) on promoting the expression of high - mobility group nucleosome - binding domain 5 (HMG5) and further affecting the distant metastasis of osteosarcoma. **Methods:** Lentivirus infection was used to overexpress and knock down the expression of target gene in osteosarcoma cell line U2OS. We obtained a total of 3 groups of cells ,namely the virus infection control group ,HIF - 1A overexpression group ,HIF - 1A overexpression and HMG5 knockdown group. We examined the ability of osteosarcoma cells to migrate and invade by wound healing assay and Transwell invasion experiment. To use PROMO software to predict the transcription factor of HMG5 and fluorescence quantitative PCR to identify it. Western - blot was used to detect the expression of HIF - 1A ,HMG5 and tumor metastasis - related pathway members. **Results:** Overexpression of HIF - 1A up - regulated the expression of transcription factor GATA1 and promoted the expression of HMG5. The higher expression of HMG5 upregulated the expression of MMP - 2 and MMP - 9 through the c - jun pathway ,and finally promoted the migration and invasion of osteosarcoma cells. **Conclusion:** The up - regulation of HMG5 expression is an important downstream factor in the promotion of distant metastasis of osteosarcoma by HIF - 1A ,and it has important clinical practical significance in the selection of therapeutic targets for osteosarcoma.

【Key words】HIF - 1A ,HMG5 ,osteosarcoma ,metastasis ,molecular mechanism

Modern Oncology 2019 ,27(04) :0556 - 0560

【摘要】 目的: 探讨缺氧诱导因子 - 1A(hypoxia - inducible factor - 1A ,HIF - 1A) 上调高迁移率核小体结合域 5(high - mobility group nucleosome - binding domain 5 ,HMG5) 表达进而影响骨肉瘤远处转移的分子机制。方法: 应用慢病毒感染的方式在骨肉瘤细胞系 U2OS 内过表达、敲低表达目的基因 ,我们共获得 3 组细胞 ,分别为病毒感染对照组、HIF - 1A 过表达组、HIF - 1A 过表达并 HMG5 敲低组。通过划痕实验、Transwell 侵袭实验检测对比骨肉瘤细胞迁移、侵袭能力。应用 PROMO 软件预测并应用荧光定量 PCR 筛选确定 HMG5 的

【收稿日期】 2018 - 05 - 30

【修回日期】 2018 - 06 - 14

【基金项目】 上海市科学技术委员会科研计划项目(编号: 16140901800)

【作者单位】 上海长征医院脊柱四科 ,上海 200003

【作者简介】 张珂(1988 -) ,男 ,山东淄博人 ,医师 ,主要从事脊柱畸形和脊柱肿瘤的外科治疗研究。E - mail: zhangke2003@ 126. com

【通讯作者】 周许辉(1969 -) ,男 ,江西九江人 ,教授 ,主任医师 ,博士生导师 ,主要从事脊柱畸形和脊柱肿瘤的外科治疗研究。E - mail: 13916331933@ 163. com

转录因子,Western-blot 检测 HIF-1A、HMG5 及肿瘤转移相关通路成员表达情况。结果:HIF-1A 过表达能上调表达转录因子 GATA1 进而促进 HMG5 的高表达,高表达的 HMG5 通过 c-jun 途径上调 MMP-2、MMP-9 的表达,最终促进骨肉瘤细胞的迁移和侵袭。结论:HMG5 表达上调是 HIF-1A 促进骨肉瘤远处转移的重要下游因素,在控制骨肉瘤转移治疗靶点的选择上具有重要的临床实践意义。

【关键词】缺氧诱导因子-1A; HMG5; 骨肉瘤; 转移; 分子机制

【中图分类号】R738.1

【文献标识码】A

DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2019.04.004

【文章编号】1672-4992-(2019)04-0556-05

骨肉瘤是一种来源于有成骨潜能的间叶细胞的高度恶性的骨肿瘤疾病,是儿童和青少年常见的恶性肿瘤之一^[1-2]。骨肉瘤易早期转移,约有 15%~25% 的患者在初诊为骨肉瘤时即有可探查到的肺部转移^[3]。目前主要的治疗手段仍为肿瘤切除和非特异的联合化疗^[4-8]。尽管随着手术与化疗技术的进步,骨肉瘤患者的远期生存率有所提高^[9],但合并远处转移的患者 5 年生存率仍较低,为 0~29%^[10,11]。临床实践发现,骨肉瘤这类快速增长的实体瘤内常常存在缺氧微环境^[9],而缺氧微环境又进一步促进了骨肉瘤细胞的远处转移。缺氧诱导因子-1A(hypoxia-inducible factor-1A, HIF-1A)是肿瘤在缺氧微环境中的关键因子,其调控转录过程,与多种肿瘤相关因子的表达密切相关。高迁移率核小体结合域 5(high-mobility group nucleosome-binding domain 5, HMG5)是高迁移率核小体结合域(high-mobility group nucleosome-binding domain, HMGN)的新成员,研究发现在人类许多癌症中其都表达存在,更重要的是 HMG5 的缺乏已被证明与癌细胞生长、细胞周期调节、迁移、侵袭和临床结果密切相关^[11]。由此我们通过建立相关骨肉瘤细胞模型,对缺氧环境下 HIF-1A 调控 HMG5 表达进而影响骨肉瘤远处转移的机制进行了研究探讨。

1 材料与与方法

1.1 材料

U2OS 骨肉瘤细胞及 293FT 细胞购自中科院细胞库(中国,上海)。慢病毒载体、阴性对照载体以及病毒包装材料购自吉凯基因(上海,中国)。一抗体购自 Abcam 公司(美国),二抗购自 CST 公司(美国)。

1.2 药物和试剂

TRIzol 试剂、Lipofectamine 2000、DMEM、胎牛血清均购自 Gibco Invitrogen 公司(美国),SYBR-Green 预混液购自 Takara 公司(日本)。

1.3 HIF-1A 过表达稳转株构建

人 HIF-1A cDNA 通过逆转录 PCR 获得,插入慢病毒载体 GV326(元件顺序:Ubi-MCS-SV40-Cherry)的 AgeI 和 NheI 限制性酶切位点。293FT 细胞平铺于 75 cm² 培养瓶内并转染 10 μg HIF-1A 或对照慢病毒载体,进行细胞换液并培养 48 h 后收获上清,并以 0.45 μm 过滤膜过滤。以上清培养 U2OS 细胞 48 h,并进行流式分选,获得稳定表达樱桃红荧光细胞。转染 HIF-1A 慢病毒载体的细胞定为 HIF-1A 组,转染空载体的阴性对照定为 Cherry 组。

1.4 HMG5、GATA1 敲低稳转株构建

HMG5 敲低 shRNA 序列为 CCGGGATCAAAGAAGAT-GATGGAACTCGAGTTTCATCATCTTCTTTGATCTTTTTC, GATA1 敲低 shRNA 序列为 CCGGCCTCAATTCAGCAGC-CTATTCCTCGAGGAATAGGCTGCTGAATTGAGCTTTTTC。shRNA 序列插入慢病毒载体 GV493(元件顺序:hU6-MCS-

CBh-gcGFP-IRES-puromycin)的 AgeI 和 EcoRI 限制性酶切位点。293FT 细胞平铺于 75 cm² 培养瓶内并转染 10 μg HMG5 敲低或 GATA1 敲低慢病毒及它们的对照慢病毒,进行细胞换液并培养 48 h 后收获上清,并以 0.45 μm 过滤膜过滤,以培养基上清感染细胞。HMG5 敲低慢病毒、GATA1 敲低慢病毒及对照慢病毒感染上述步骤获得的 HIF-1A 过表达细胞株及对照细胞,培养 48 h 后进行流式分选,获得稳定表达绿色荧光细胞。根据 HIF-1A 过表达和 HMG5 敲低的情况不同,共获得 3 株稳转细胞:感染樱桃红和绿色荧光空载病毒的 Cherry-GFP 组,HIF-1A 过表达而 HMG5 未敲低的 HIF-1A-GFP 组,HIF-1A 过表达而 HMG5 敲低的 HIF-1A-HMG5^{sh}组。根据 HIF-1A 过表达和 GATA1 敲低的情况不同,也分为 3 组:Cherry-GFP 组,HIF-1A-GFP 组,以及 HIF-1A 过表达而 GATA1 敲低的 HIF-1A-GATA1^{sh}组(表 1)。

表 1 各组细胞病毒感染情况

Tab.1 Cell virus infection

Group	Overexpression	Knockdown
Cherry-GFP	Cherry(control)	GFP(control)
HIF-1A-GFP	HIF-1A overexpression	GFP(control)
HIF-1A-HMG5 ^{sh}	HIF-1A overexpression	HMG5 knockdown
HIF-1A-GATA1 ^{sh}	HIF-1A overexpression	GATA1 knockdown

1.5 荧光定量 PCR

为了定量检测各组骨肉瘤细胞系中 HIF-1A 及 HMG5 的表达水平,以荧光定量 PCR 检测 HIF-1A mRNA 及 HMG5 mRNA 的表达量,试剂为 SYBR-Premix Ex Taq (Takara,日本)在 ABI 7900HT 上进行检测(Applied Biosystem 美国)。按照标准操作步骤以 TRIzol 从每组细胞中提取全 RNA。设计特异性寡核苷酸引物扩增基因,内参为 β-actin。PCR 引物序列:HIF-1A 正向引物 5'-GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG-3',反向引物 5'-CCT-TATCAAGATGCGAACTCACA-3'; HMG5 正向引物 5'-CAGGTCAAGGTGATATGAGGCA-3',反向引物 5'-GCTT-GGGCACTTGTATCTATGT-3'; GATA1 正向引物 5'-CTGTC-CCCAATAGTGCTTATGG-3',反向引物 5'-GAATAGGCT-GCTGAATTGAGGG-3'; β-actin 正向引物 5'-AC-CGAGCGCGGCTACAG-3',反向引物 5'-CTTAATGTCAGC-CAGGATTTCC-3'。应用 Ct 值比较法(2^{-ΔΔCt})分析数据。每组细胞独立进行 3 次实验。

1.6 Western-blot

应用蛋白提取试剂盒(thermo,美国)收集经处理的细胞并提取蛋白,以 BCA 蛋白定量试剂盒(thermo,美国)进行蛋白定量。取相同总量蛋白溶液以 SDS-PAGE 胶电泳分离,

分离的蛋白质条带被转移至PVDF膜(Millipore,美国),并以5%脱脂牛奶封闭。将PVDF膜置于HIF-1A、HMGNS5、GATA1的一抗稀释液中4℃孵育过夜,以磷酸盐缓冲液洗膜3次,再将膜置于连接辣根过氧化物酶的二抗稀释液中室温孵育2小时,一抗及二抗的稀释比按相应说明书,以磷酸盐缓冲液洗膜3次,再以ECL-Plus试剂盒按照说明书显色蛋白条带。每组独立进行3次实验。

1.7 划痕实验

将各组细胞接种于6孔版中,待细胞生长至90%融合后用200μl吸头在6孔版内垂直划痕,用PBS清洗细胞3次,加入无血清培养基继续培养48h。实验分别于0h、24h、48h在倒置光学显微镜下观察并测量划痕的宽度,计算细胞迁移率=(0h划痕宽度-24h或48h划痕宽度)/0h划痕宽度×100%,并进行统计学分析,以此判断其迁移能力的差异性。

1.8 Transwell 侵袭实验

培养各组细胞,往24孔板内加入500μl完全培养基,并在孔内放入铺好的Matrigel胶的穿透小室(coming,美国),往小室内加入100μl无血清培养基和5×10⁴细胞,在37℃、5%CO₂培养箱内培养。48h后取出小室,置于4%多聚甲醛内固定30min,磷酸盐缓冲液清洗3次,将小室置于0.1%结晶紫染液内染色30min,磷酸盐缓冲液清洗3次,用棉签将小室内侧的细胞擦除,将小室于倒置显微镜下观察并拍摄,每个小室随机取6个视野拍照,计数穿透细胞个数,并进行统计学分析。

1.9 统计学分析

进行至少3次独立实验,结果以均值±标准误表示。不同组间以方差分析进行数据分析。当方差分析显示有统计

学差异时进行最小显著差异多重比较。 $P < 0.05$ 说明具有统计学差异。

2 结果

2.1 构建细胞系

我们应用慢病毒感染的方式在骨肉瘤细胞内过表达HIF-1A,以及敲低表达HMGNS5,共获得3组细胞,分别为感染樱桃红和绿色荧光空载病毒的Cherry-GFP组,HIF-1A过表达而HMGNS5未敲低的HIF-1A-GFP组,HIF-1A过表达而HMGNS5敲低的HIF-1A-HMGNS5^{sh}组。过表达及敲低的效果应用荧光定量PCR和Western-blot实验进行验证。荧光定量PCR结果显示,成功在HIF-1A-GFP组和HIF-1A-HMGNS5^{sh}组内过表达HIF-1A,以及在HIF-1A-HMGNS5^{sh}组内敲低表达HMGNS5(图1A)。此外,HIF-1A-GFP组的结果还显示,过表达HIF-1A能上调HMGNS5的表达(图1A)。同样的,我们也成功构建了GATA1敲低细胞系,且HIF-1A过表达也能上调GATA1表达(图1B)。Western-blot的结果进一步证实了过表达和敲低有效(图3A)。

2.2 划痕实验和Transwell 侵袭实验

将上述慢病毒感染实验获得的各组细胞进行划痕实验和Transwell侵袭实验,研究HIF-1A和HMGNS5对骨肉瘤细胞迁移和侵袭能力的影响。结果显示,相对于Cherry-GFP组,HIF-1A-GFP组的迁移和侵袭能力都有显著的增强,而HIF-1A-HMGNS5^{sh}组的迁移和侵袭能力则显著低于HIF-1A-GFP组。结果证实了,在骨肉瘤细胞内过表达HIF-1A能显著提高细胞迁移和侵袭的能力,而敲低HMGNS5则能逆转上述效果(图2)提示HIF-1A增强细胞迁移和侵袭能力是通过HMGNS5的作用来实现的。

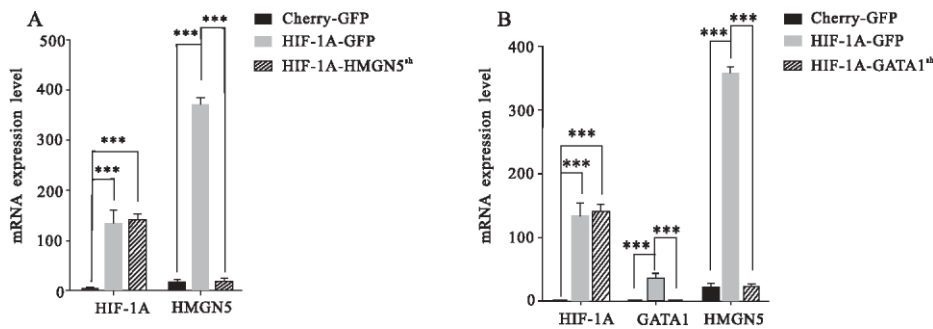


图1 荧光定量PCR检测各组细胞内mRNA表达水平变化

A: HIF-1A过表达上调HMGNS5表达; B: HIF-1A上调表达GATA1,敲低GATA1抑制HMGNS5的转录(*** $P < 0.001$)。

Fig. 1 Real-time quantitative PCR detection of mRNA expression levels in various groups

A: The overexpressed HIF-1A-GFP increased the expression of HMGNS5. B: HIF-1A updated the expression of GATA1. Knocking down GATA1 inhibited the transcription of HMGNS5(*** $P < 0.001$).

2.3 转录因子GATA1对HMGNS5的调控

HIF-1A主要通过影响下游成员的转录来实现调控细胞功能,应用PROMO转录因子预测软件预测HMGNS5的转录因子,发现GATA1可能是HMGNS5的转录因子,而前人的研究和进一步的荧光定量PCR(图1B)结果均证实HIF-1A能上调GATA1表达。为了证实HIF-1A通过GATA1对HMGNS5转录的调控,我们敲低了HIF-1A-GFP组细胞内的GATA1,即HIF-1A-GATA1^{sh}组,荧光定量PCR和Western-blot实验结果显示:HIF-1A过表达能上调GATA1和

HMGNS5的表达,而GATA1敲低后,HMGNS5 mRNA表达水平显著降低,相应的,HMGNS5蛋白表达水平也有显著降低(图1B、图3B)。

2.4 HMGNS5调控骨肉瘤细胞的迁移、侵袭分子途径

既往已有较多的研究证实HMGNS5通过c-jun途径上调MMP2、MMP9的表达来影响肿瘤的转移,我们进一步证实了在骨肉瘤细胞内,受HIF-1A影响上调的HMGNS5通过上调c-jun来提高MMP2、MMP9的表达水平,从而影响骨肉瘤细胞迁移、侵袭的能力,而敲低HMGNS5则能逆转HIF-1A

上调所引起的 c-jun、MMP2、MMP9 表达增加(图 3A)。

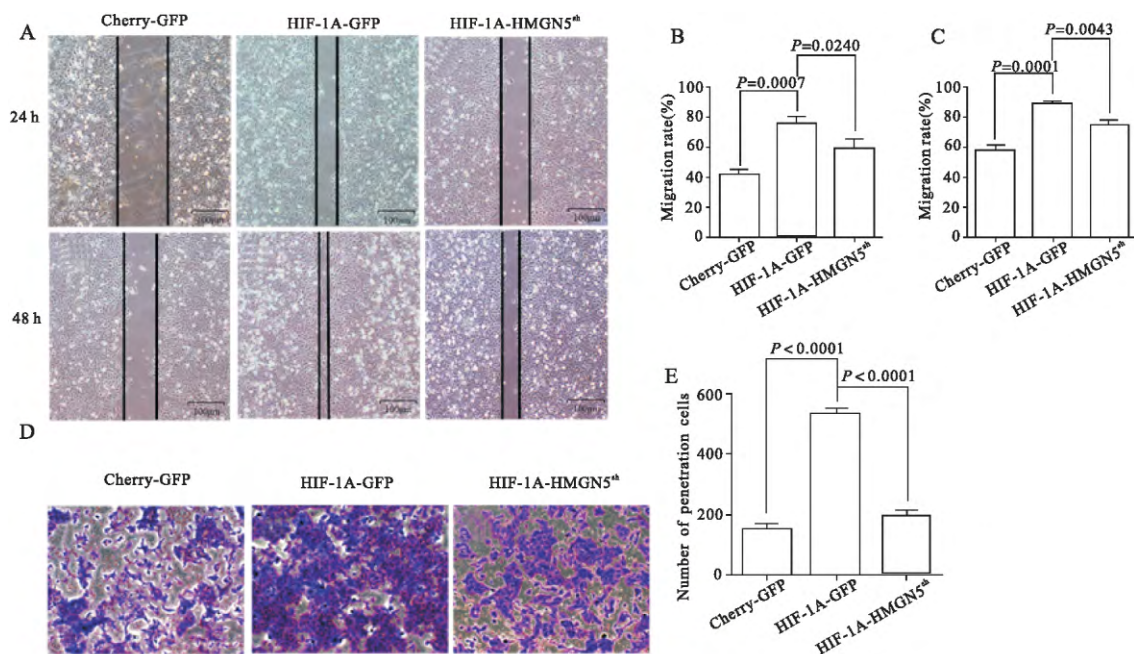


图2 划痕实验和 Transwell 侵袭实验检测各组细胞迁移、侵袭能力的差异

A: 划痕实验的显微镜照片(×100); B: 划痕实验 24 h 的各组细胞迁移率统计分析; C: 划痕实验 48 h 的各组细胞迁移率统计分析; D: Transwell 侵袭实验的显微镜照片(结晶紫染色×200); E: Transwell 侵袭实验的各组细胞穿透数目统计分析。

Fig. 2 Wound healing and Transwell assay detected the difference of cell migration and invasion in each group

A: Wound healing assay(×100). B: Statistical analysis of cell migration rate at 24 h in each group. C: Statistical analysis of cell migration rate at 48 h in each group. D: Transwell assay(crystal violet staining×200). E: Statistical analysis of cell penetration number in each group.

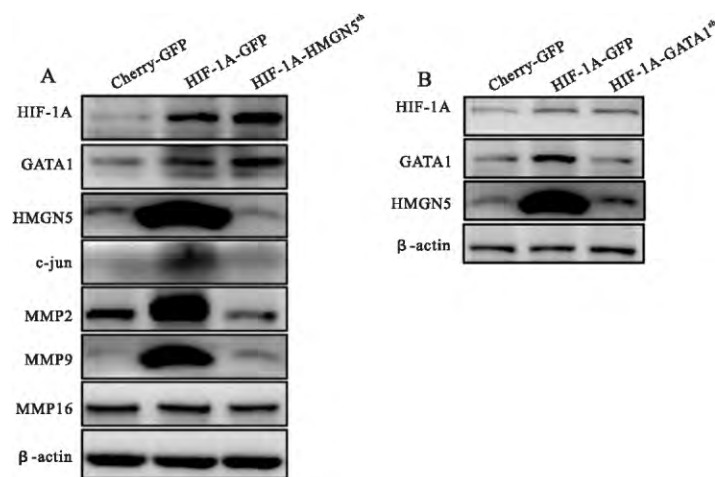


图3 Western - blot 检测各组细胞内蛋白表达水平

A: HIF - 1A 过表达上调 HMGN5 表达 增加了 c - jun、MMP2、MMP9 表达水平; B: HIF - 1A 上调 GATA1 并增加 HMGN5 表达水平。

Fig. 3 Western - blot detected the expression of intracellular protein in each group

A: Overexpression of HIF - 1A can upregulate the expression of HMGN5 and increase the expression of c - jun ,MMP2 and MMP9. B: HIF - 1A increased the expression of HMGN5 by up - regulating GATA1.

3 讨论

骨肉瘤瘤体可在较短的时间内迅速增大,而瘤内血管生长速度常常无法跟上瘤体增长的速度,即会形成瘤内缺氧微环境^[9]。HIF - 1A 是细胞在缺氧环境下高表达的适应性因子,它是具有转录活性的核蛋白,在细胞内过表达 HIF - 1A 是较为成熟的研究缺氧微环境的细胞模型。我们的实验中

通过过表达 HIF - 1A 模拟了细胞缺氧微环境,应用 PROMO 转录因子预测软件发现 GATA1 可能是 HMGN5 的转录因子。我们又分别构建了敲低表达 HMGN5 细胞系和敲低表达 GATA1 细胞系,通过荧光定量 PCR 和 Western - blot 证明了过表达 HIF - 1A 通过上调表达转录因子 GATA1 进而促进了 HMGN5 的表达。

高迁移率蛋白家族 (high mobility group, HMG) 包含 HMGA、HMGB、HMG5 三类。早期研究证实了 HMGA、HMGB 在肿瘤的转移中发挥了重要作用,近年来, HMG5 尤其是 HMG5 在肿瘤侵袭转移中作用与机制得到了广泛的研究^[11]。研究显示, HMG5 在促进前列腺癌^[12]、膀胱癌^[13, 14]、肾癌^[15]、乳腺癌^[16]的转移中发挥了重要作用,而在骨肉瘤细胞系 (U2OS, SaO2) 中敲低 HMG5 后,其肿瘤细胞的侵袭、转移的能力下降^[17]。我们既往的工作也证实了 HMG5 对肿瘤侵袭、转移具有促进作用,上调表达的 HMG5 通过 c-jun 途径上调 MMP2、MMP9 表达,影响 PI3K/AKT 信号通路或 MAPK/ERK 信号通路进而实现骨肉瘤细胞的迁移和侵袭活动^[11]。至此缺氧微环境促进骨肉瘤远处转移的信号通路基本阐明。

由于研究设施的限制,无法将细胞乃至动物置于真实的缺氧环境内并进行分析,只能采取在细胞内过表达 HIF-1A 来模拟缺氧环境,与实际病理可能存在不一致情况。在下一步的研究中,我们期望能在梯度浓度的细胞培养箱内对细胞进行培养,并结合缺氧饲养的动物模型对缺氧微环境下骨肉瘤细胞转移和 HMG5 的关系进行更为深入的研究。

【参考文献】

- [1] ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol* 2014, 25(Suppl 3): iii113-123.
- [2] Jo VY, Fletcher CD. WHO classification of soft tissue tumours: An update based on the 2013 (4th) edition [J]. *Pathology* 2014, 46(2): 95-104.
- [3] Gordon N, Kleinerman ES. Aerosol therapy for the treatment of osteosarcoma lung metastases: Targeting the Fas/FasL pathway and rationale for the use of gemcitabine [J]. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2010, 23(4): 189-196.
- [4] Reed DR, Hayashi M, Wagner L, et al. Treatment pathway of bone sarcoma in children, adolescents, and young adults [J]. *Cancer*, 2017, 123(12): 2206-2218.
- [5] Wagner MJ, Livingston JA, Patel SR, et al. Chemotherapy for bone sarcoma in adults [J]. *J Oncol Pract* 2016, 12(3): 208-216.
- [6] Palmerini E, Jones RL, Marchesi E, et al. Gemcitabine and docetaxel in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma and spindle cell sarcoma of bone [J]. *BMC Cancer* 2016, 16: 280.
- [7] Podda MG, Luksch R, Puma N, et al. Oral etoposide in relapsed or refractory Ewing sarcoma: A monoinstitutional experience in children and adolescents [J]. *Tumori* 2016, 102(1): 84-88.
- [8] Nakano K, Takahashi S. Current molecular targeted therapies for bone and soft tissue sarcomas [J]. *Int J Mol Sci* 2018, 19(3): E739.
- [9] Wittig JC, Bickels J, Priebe D, et al. Osteosarcoma: A multidisciplinary approach to diagnosis and treatment [J]. *Am Fam Physician*, 2002, 65(6): 1123-1132.
- [10] Tsuchiya H, Kanazawa Y, Abdel-Wanis ME, et al. Effect of timing of pulmonary metastases identification on prognosis of patients with osteosarcoma: The Japanese Musculoskeletal Oncology Group study [J]. *J Clin Oncol* 2002, 20(16): 3470-3477.
- [11] Shi Z, Tang R, Wu D, et al. Research advances in HMG5 and cancer [J]. *Tumour Biol* 2016, 37(2): 1531-1539.
- [12] Wei P, Qiao B, Li Q, et al. MicroRNA-340 suppresses tumorigenic potential of prostate cancer cells by targeting high-mobility group nucleosome-binding domain 5 [J]. *DNA Cell Biol* 2016, 35(1): 33-43.
- [13] Gan Y, Tan J, Yang J, et al. Knockdown of HMG5 suppresses the viability and invasion of human urothelial bladder cancer 5637 cells in vitro and in vivo [J]. *Med Oncol* 2015, 32(4): 1-9.
- [14] Wu J, Wang J. HMG5 expression in bladder cancer tissue and its role on prognosis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018, 22(4): 970-975.
- [15] Wei X, Yu L, Kong X, et al. miR-488 inhibits cell growth and metastasis in renal cell carcinoma by targeting HMG5 [J]. *Oncotargets Ther* 2018, 11: 2205-2216.
- [16] Weng M, Song F, Chen J, et al. The high-mobility group nucleosome-binding domain 5 is highly expressed in breast cancer and promotes the proliferation and invasion of breast cancer cells [J]. *Tumour Biol* 2015, 36(2): 959-966.
- [17] Zhou X, Yuan B, Yuan W, et al. The expression and clinical significance of high mobility group nucleosome binding domain 5 in human osteosarcoma [J]. *Tumour Biol* 2014, 35(7): 6539-6547.

(编校: 蔺玥)