

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.005

· 基础研究 ·

MicroRNA-10a 通过靶向作用 E2F3 抑制肝癌细胞的增殖

赵锴¹, 王春梅^{1,Δ}, 曹雪涛^{1,2}(1. 中国医学科学院, 北京协和医学院 基础医学研究所, 北京 100006; 2. 第二军医大学 免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨微小 RNA-10a (microRNA-10a, miR-10a) 对肝癌细胞增殖的影响及其作用机制。**方法:**收集广西医科大学附属肿瘤医院肿瘤科 2001 年 10 月至 2005 年 7 月 144 例肝癌患者手术切除的肝癌组织和癌旁组织(距癌灶组织边缘 2~5 cm)标本, Real-time PCR 法分析 144 例肝癌组织及癌旁组织中 miR-10a 的表达量。在肝癌细胞(QGY-7701、Huh7、PCL/PRF/5)中转染 miR-10a 模拟物, Real-time PCR 法检测转染后细胞 miR-10a 的表达水平; CCK-8 法检测过表达 miR-10a 的肝癌细胞的增殖水平, 流式细胞术检测过表达 miR-10a 的肝癌细胞的凋亡和细胞周期; 生物信息学预测并以 Western blotting 检测过表达 miR-10a 的肝癌细胞中转录因子 E2F3 的表达量。**结果:**与癌旁组织相比, 肝癌组织中的 miR-10a 显著低表达[(-9.89 ± 1.68) vs (-7.84 ± 1.97), $P=0.000$]。转染 miR-10a 模拟物后肝癌细胞系中 miR-10a 的表达量是转染对照小 RNA 组或空白组细胞的 16 倍左右。过表达 miR-10a 可显著抑制 7 种肝癌细胞(QGY-7701、QGY-7703、Huh7、PCL/PRF/5、HepG2、BeL-7402、SMMC-7721)的增殖(均 $P<0.05$), 并引起肝癌细胞细胞周期 G_1/S 期阻滞, 但不能诱导肝癌细胞发生凋亡。生物信息学预测显示 E2F3 是 miR-10a 可能的靶分子, Western blotting 检测显示过表达 miR-10a 可明显抑制肝癌细胞中 E2F3 的表达[(0.50 ± 0.12) vs (0.79 ± 0.21), $P<0.05$]。**结论:**人肝癌组织中低表达 miR-10a, 转染 miR-10a 模拟物后多种肝癌细胞的增殖均受到明显抑制, 其机制可能与 miR-10a 靶向作用转录因子 E2F3 并阻滞肝癌细胞细胞周期于 G_1/S 期有关。

[关键词] 肝癌; 微小 RNA-10a; 增殖; 转录因子; E2F3; G_1/S 期阻滞

[中图分类号] R735.7; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)04-0383-06

MicroRNA-10a inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation through targeting E2F3

Zhao Kai¹, Wang Chunmei^{1,Δ}, Cao Xuetao^{1,2}(1. Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100006, China; 2. National Key Laboratory of Medical Immunology & Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of microRNA-10a (miR-10a) in hepatocellular carcinoma (HCC) growth. **Methods:** Paired HCC and adjacent non-tumor tissue specimens were surgically collected from 144 patients who were diagnosed with primary HCC in Guangxi Medical University-Affiliated Tumor Hospital between October 2001 and July 2005. HCC QGY-7701, Huh7, and PCL/PRF/5 cells were transfected with miR-10a mimics or scramble control miRNA. The abundance of miR-10a in both tissue specimens and transfected cells was quantified by real-time PCR and E2F3 protein in transfected cells was assessed by Western blotting. Proliferation of the transfectants was assessed by a colorimetric cell counting assay. Cell cycle progression and apoptosis of the transfectants were assessed by FACS. **Results:** The abundance of miR-10a mRNA was significantly lower in HCC tissue specimens than in normal tissue specimens (-9.89 ± 1.68 vs -7.84 ± 1.97, $P=0.0001$). HCC cells transfected with miR-10a mimics had miR-10a abundance 16 times higher than both wild-type HCC cells and HCC cells transfected with the control miRNA with scrambled sequences. Over-

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目。Project supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA020901)

[作者简介] 赵锴(1988-), 男, 陕西省汉中市人, 硕士生, 主要从事表观遗传学在肿瘤免疫中调控作用的研究, E-mail: zhaokai16@163.com

[通信作者] 曹雪涛(Cao Xuetao, corresponding author), E-mail: caoxt@immunol.org; 王春梅(Wang Chunmei, co-corresponding author), E-mail: wangcm1977@126.com。Δ共同通信作者

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.005.html>

expression of miR-10a resulted in significant increases in suppression of HCC cell proliferation ($P < 0.05$) and G_1 phase arrest. In contrast, overexpression of miR-10a had no influence on apoptosis of HCC cells. Bioinformatics suggested that transcription factor E2F3 might be a downstream target of miR-10a and the expression of E2F3 in HCC cells transfected with miR-10a was significantly lower than in wild-type HCC cells and HCC cells transfected with the control miRNA (0.50 ± 0.12 vs 0.79 ± 0.21 , $P < 0.05$). **Conclusion:** MiR-10a may suppress HCC cell proliferation through G_1 phase arrest in an E2F3-dependent mechanism.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; microRNA-10a(miR-10a); transcription factor; E2F3; proliferation; G_1/S phase arrest [Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 383-388]

肝癌是癌症中致死率排名第三的侵袭性实体瘤, 严重威胁人类的健康^[1]。众多研究^[2-4]提示, 许多基因的异常表达在肝癌的发生、发展中发挥着重要的作用, 对这些基因的鉴定及其功能的探讨一直是肝癌研究的热点。最近研究^[5-6]表明, 微小miRNA(microRNA, miRNA)与多种人类癌症相关。miRNA 是一类长约 19 ~ 23 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 它通过与靶 mRNA 3'端非编码区结合, 起到下调靶基因表达的作用。目前人们已经发现了一些 miRNA 与肝癌的发生、发展相关^[7-10]。本研究前期利用深度测序方法发现, miRNA-10a(miR-10a)在人肝癌组织表达下调^[7], 提示 miR-10a 可能参与肝癌的发生及发展进程。本研究进一步收集临床肝癌组织标本, 检测肝癌组织中 miR-10a 的表达水平, 并探讨 miR-10a 对肝癌细胞增殖的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集广西医科大学附属肿瘤医院肿瘤科 2001 年 10 月至 2005 年 7 月 144 例肝癌患者手术切除的肝癌组织和癌旁组织(距离癌灶组织边缘 2 ~ 5 cm)标本, 患者术前均未进行化疗和放疗, 所有样本采集均符合医学伦理学规定, 患者均签署知情同意书。患者详细资料见表 1。

1.2 细胞株和实验材料

人胚胎肾细胞系 HEK293T 及人肝癌细胞系 Huh7、HepG2 购自 ATCC, 人肝癌细胞系 QGY-7701、QGY-7703、SMC-7721、Bel-7402、PCL/PRF/5 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。TRIzol、Vybrant 凋亡检测试剂盒均购自 Invitrogen 公司, Interferin siRNA 转染试剂购自 Polypus 公司, miRNA 分析系统购自 Applied Biosystems 公司, PrimeScript RT-PCR 反转录试剂盒、SYBR Premix Ex-Taq 荧光定量 PCR 试剂盒均购自 TOYOBO 公司, miR-10a 模拟物(mimics)及对照小 RNA 购自广州锐博公司, Cell Counting Kit-8(CCK-8)细胞活性检

测试剂盒购自 Dojindo 公司, 鼠抗人 E2F3 单抗购自 Abcam 公司, 细胞裂解液 CLB 购自 Cell Signaling Technology 公司。

荧光定量 PCR 仪 Cyclor1.5 购自 Roche 公司, 运行软件和数据分析软件均为 Lightcycler 3。双荧光素酶报告基因仪器 Synergy 购自 BioTek 公司, 运行软件和数据分析软件均为 Gen 5。FACS LSR II 流式细胞仪购自 BD 公司, 分析软件为 FACS Diva software 和 Flojo6.7。

表 1 广西医科大学附属肿瘤医院 144 例肝癌患者的临床资料
Tab.1 Clinical characteristics of 144 HCC patients from Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University

Variable	n(%)
Gender	
Male	126(87.5)
Female	18(12.5)
Age(t/a)	
Median	46
Range	30-67
HBV	
Negative	10(7.0)
Positive	134(93.0)
Cirrhosis	
No	40(28.0)
Yes	104(72.0)
AFP	
Negative(≤ 20 ng/ml)	48(33.3)
Positive(> 20 ng/ml)	96(66.7)
Tumor size	
≤ 3 cm	110(76.4)
> 3 cm	34(23.6)
Tumor number	
= 1	125(86.8)
> 1	19(13.2)
TNM stage	
I and II	70(55.6)
III and IV	64(44.4)

1.3 Real-time PCR 检测人肝癌、癌旁组织以及肝癌细胞中 miR-10a 的表达

采用 TRIzol 试剂提取相应的人肝癌、癌旁组织和肝癌细胞总 RNA。采用 SYBR Premix ExTaq 荧光定量 PCR 试剂盒和 LightCycler 仪器进行操作和分析。miR-10a 的逆转录引物序列:5'-GTCGTATC-CAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGA CACAAA-3'; miR-10a 的定量引物上游序列:5'-ACGTACCCTGTAGATCCG-3', 下游序列:5'-GTG-CAGGGTCCGAGGT-3'。U6 逆转录引物序列:5'-CGCTTACGAATTTGCGTGTTCAT-3'; U6 定量引物上游序列:5'-CTCGCTTCGGCAGCACAA-3', 下游序列:5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'。按三步法进行 DNA 扩增,反应条件如下:94 ℃、15 s;94 ℃、20 s, 55 ℃、10 s,72 ℃、10 s;40 次循环;72 ℃、10 min。每次定量 PCR 被测标本的 Ct 值减去对应样品中 U6 Ct 值得 ΔCt , 肝癌细胞中 miR-10a 的表达量采用 $2^{-\Delta Ct}$ 计算;肝癌组织标本中 miR-10a 表达量以 \log_2 transformed 计算(也即以 $\log_2 2^{-\Delta Ct}$ 来计算)。

1.4 细胞培养和 miR-10a 模拟物的转染

人肝癌细胞系(QGY-7701、QGY-7703、SMMC-7721、Bel-7402、PCL/PRF/5、Huh7、HepG2)用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,HEK293T 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,均置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中传代培养。

将处于对数生长期的上述肝癌细胞系接种于 12 孔培养板,每孔细胞数约为 3×10^5 个,当细胞生长融合度至 50% 时,将其分为两组,一组为 miR-10a 模拟物转染组,一组为对照(NC)组,分别用含有 miR-10a 模拟物和对照小 RNA 的 Opti-MEM 培养基转染细胞,同时加入 Interferin 以提高转染效率。转染时每孔 miR-10a 模拟物或者对照小 RNA 的终浓度均为 20 nmol/L, Interferin 为 4 μ l,转染 48 或 72 h。实验重复 3 次。

1.5 CCK-8 法检测肝癌细胞增殖能力

参照 CCK-8 试剂盒说明书检测。肝癌细胞转染 miR-10a 模拟物或者对照小 RNA 72 h 后,将转染组和对照组肝癌细胞按照细胞数量 2×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板(100 μ l/孔)中,并各设置 3 个平行孔,3~4 h 后,待细胞贴壁后加入 100 μ l 1640 完全培养液、CCK-8 10 μ l,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 2 h,酶标仪测定 D_{450} 值。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测肝癌细胞周期及细胞凋亡

细胞周期检测:肝癌细胞转染 72 h 后,收取转染组和对照组细胞并用 PBS 洗涤一遍,随后使用

75% 的乙醇 4 ℃ 固定 1 h。固定后的细胞使用 PBS 洗 3 遍,并加入含 40 μ g 碘化丙啶(propidium iodide,PI)和 100 μ g RNase A 的 PBS 1 ml。最后使用 FACS Calibur 流式细胞仪检测细胞周期,并用 FACS Diva 软件分析数据。实验重复 3 次。

细胞凋亡检测:肝癌细胞转染 48 h 之后,转染组和对照组细胞经收取、洗涤、重悬后,按照 Vybrant 凋亡检测试剂盒说明书操作,用 FACS Calibur 流式细胞仪检测细胞凋亡,并用 FACS Diva 软件分析数据。实验重复 3 次。

1.7 Western blotting 检测肝癌细胞中 E2F3 的表达

利用生物信息学网站 TargetScan(<http://www.targetscan.org>)进行生物信息学预测,分析显示 miR-10a 可能的靶分子为转录因子 E2F3。

肝癌细胞转染 72 h 后,收集转染组和对照组细胞,用细胞裂解液裂解细胞。BCA 法测定蛋白浓度,取 50 μ g 蛋白经 8% SDS-PAGE 分离后,转至 PVDF 膜,室温封闭 1 h,分别加入 E2F3 抗体(1:2 000)、 β -actin 抗体(1:10 000),4 ℃ 孵育过夜,洗膜后加过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,洗膜,最后用 ECL 法显影。Gene gnome 采集图片并利用 ImageJ 软件进行灰度值分析。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对或者不配对的 t 检验分析数据,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-10a 在人肝癌组织中低表达

Real-time PCR 法检测 144 例肝癌患者的癌组织与癌旁组织中 miR-10a 的相对表达量,结果(图 1)显示,肝癌组织中 miR-10a 表达明显低于配对的癌旁组织[(-9.89 ± 1.68) vs (-7.84 ± 1.97) , $P = 0.000$]。

2.2 转染 miR-10a 模拟物后肝癌细胞过表达 miR-10a

利用 Real-time PCR 法检测转染组、对照组以及空白组肝癌细胞(QGY-7701、Huh7 和 PCL/PRF/5)中 miR-10a 的相对表达量,结果(图 2)显示,转染组细胞的 miR-10a 表达量是对照或空白组的 16 倍左右。

2.3 过表达 miR-10a 抑制肝癌细胞增殖

为了研究过表达 miR-10a 对肝癌细胞增殖的影响,利用 CCK-8 法检测转染组和对照组细胞的增殖水平。结果(图 3)显示,与对照相比,过表达 miR-

10a 的多种肝癌细胞(QGY-7701, QGY-7703, Bel-7402, SMMC-7721, Huh7, HepG2 和 PCL/PRF/5) 的增殖水平均受到显著抑制(均 $P < 0.05$)。

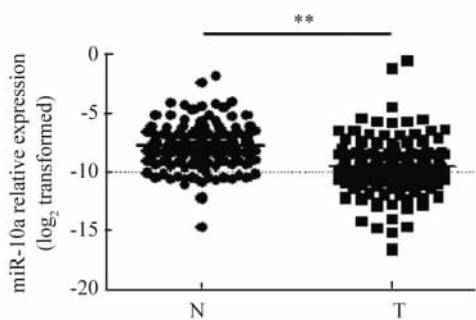


图1 144 例肝癌患者癌旁组织和肝癌组织中 miR-10a 的相对表达量

Fig.1 miR-10a relative expression in 144 paired HCC tissues and adjacent nontumor tissues

N: Nontumor tissues; T: Tumor tissues

** $P < 0.01$

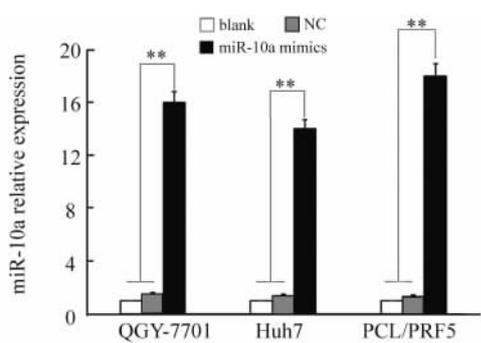


图2 转染 miR-10a 模拟物的肝癌细胞过表达 miR-10a

Fig.2 miR-10a was over-expressed in HCC cells transfected with miR-10a mimics

** $P < 0.01$

2.4 过表达 miR-10a 引起肝癌细胞 G₁/S 期阻滞

进一步检测了过表达 miR-10a 对肝癌细胞凋亡和细胞周期的影响, 发现过表达 miR-10a 对肝癌细胞凋亡没有影响, 但可引起肝癌 G₀/G₁ 期细胞的增加和 S 期细胞的减少。图 4 显示: 在 QGY-7701 细胞过表达 miR-10a 组的 G₀/G₁ 期和 S 期细胞比例分别是(72.1 ± 2.3)% 和 (14.4 ± 1.6)%, 对照组 G₀/G₁ 期和 S 期细胞比例分别是(50.6 ± 1.9)% 和 (37.6 ± 2.5)%; 在 PCL/PRF/5 细胞, 过表达 miR-10a 组的 G₀/G₁ 期和 S 期细胞比例分别是 (60.2 ± 3.1)% 和 (23.6 ± 2.7)%, 对照组 G₀/G₁ 期和 S 期细胞比例分别是 (39.5 ± 1.3)% 和 (45.7 ±

2.2)%。结果提示, 过表达 miR-10a 可引起肝癌细胞 G₁/S 期阻滞。

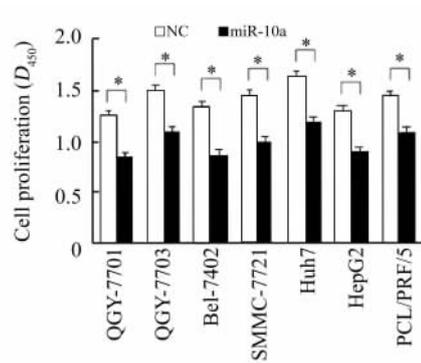


图3 过表达 miR-10a 抑制肝癌细胞增殖

Fig.3 miR-10a overexpression inhibited the proliferation of HCC cells

* $P < 0.05$

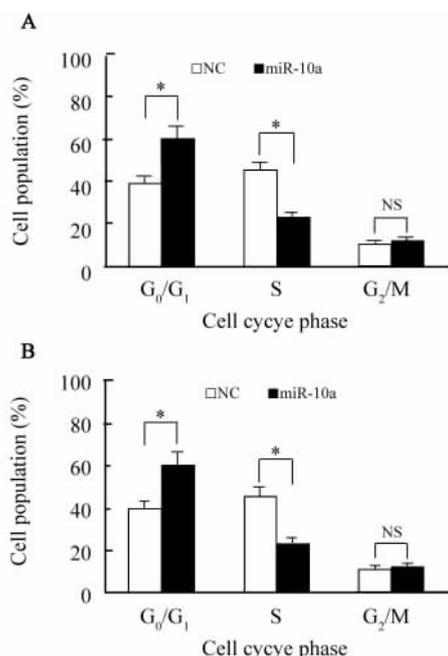


图4 过表达 miR-10a 阻滞肝癌细胞 QGY-7701(A) 和 PCL/PRF/5(B) 于 G₁/S 期

Fig.4 miR-10a overexpression arrested QGY-7701(A) and PCL/PRF/5(B) cells cycle at G₁/S phase

* $P < 0.05$

2.5 过表达 miR-10a 靶向作用转录因子 E2F3 并下调其表达

为了探讨 miR-10a 在肝癌发生发展中作用的分子机制, 通过网站 TargetScan (<http://www.targetscan.org>) 进行分子信息学预测 miR-10a 可能的靶分子, 预测结果(图 5) 显示, miR-10a 可靶向结合

于转录因子 E2F3 的 3'UTR 区。

为验证 miR-10 与可能的靶分子 E2F3 的作用情况,以及作用后对 E2F3 表达的影响,以 Western blotting 检测转染 miR-10a 模拟物后肝癌细胞 QGY-7701 中 E2F3 的表达,结果(图 6)显示,转染组细胞中 E2F3 蛋白表达明显低于对照组细胞(0.50 ± 0.12 vs 0.79 ± 0.21 , $P < 0.05$),结果验证了预测结果,说明 miR-10a 确实靶向作用于 E2F3,并下调了 E2F3 的表达。

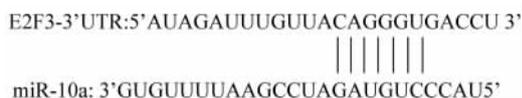


图 5 生物信息学预测 miR-10a 靶向结合于 E2F3 的 3'UTR 区

Fig. 5 Bioinformatics predicted result of miR-10a target to E2F3-3'UTR

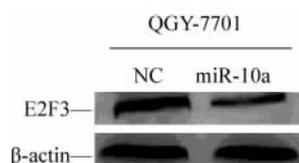


图 6 过表达 miR-10a 显著降低肝癌细胞 QGY-7701 中 E2F3 的表达

Fig. 6 miR-10a overexpression significantly reduced the expression of E2F3 in QGY-7701 cells

3 讨论

在以往的研究中虽然已经报道了一些 miRNA 参与肝癌的发生、发展,但是关于 miRNA 调控肝癌的分子机制却还不是很清楚^[7,9-10]。miR-10a 作为 miRNA 家族中的一员,参与了多种肿瘤的发生发展,并且在不同的肿瘤中 miR-10a 发挥着不同的作用。如在慢性粒细胞性白血病中发现 miR-10a 表达下调,并且同肿瘤细胞增殖呈负相关^[11];而在人宫颈癌和膀胱癌中却发现 miR-10a 表达上调^[12-13],并同肿瘤细胞增殖呈正相关。另外,在胃癌中也还发现 miR-10a 可以促使癌细胞向淋巴结的转移^[14]。可见在不同类型的肿瘤中,miR-10a 既能发挥抑癌作用,又能发挥促癌作用。本研究发现,miR-10a 在人肝癌组织中明显低表达,并且在多种肝癌细胞系中过表达 miR-10a 后可以抑制肝癌细胞的增殖,说明 miR-10a 在肝癌中可能扮演一个抑癌因子的角

色。

同时本研究还发现,miR-10a 并不影响肝癌细胞凋亡,但可阻滞肝癌细胞于细胞周期 G₁/S 期。进一步探讨了 miR-10a 可能的作用机制,发现 miR-10a 可能靶向作用于转录因子 E2F3 的 3'UTR 区,并且过表达了 miR-10a 的肝癌细胞中 E2F3 蛋白的表达明显受到抑制。转录因子 E2F3 可以促使静息细胞从 G₁ 期进入 S 期,对细胞的增殖和凋亡起着至关重要的作用^[15-17]。研究^[15-16]发现,当阻断 E2F3 的活性时,增殖细胞被阻滞于 G₁ 期;E2F3 缺陷小鼠也进一步证实其对胚胎发育必不可少。其他研究^[17]还发现,在 Rb 缺陷的胚胎中,当 E2F3 突变后,可以完全抑制细胞过度的增殖以及抑制 p53 依赖的细胞凋亡,说明 E2F3 在 Rb 缺失后对细胞的凋亡起重要的调控作用。多项研究^[18-21]显示,E2F3 参与肿瘤细胞的发生、发展,如在膀胱癌中发现 E2F3 高表达,并且同癌症的恶性程度呈正相关;在前列腺癌中 E2F3 的表达量与患者的生存率成反比;在所有类型的肺癌中均检测到 E2F3 的高表达。同时,也有一些研究集中于通过靶向作用 E2F3 从而抑制肿瘤增殖,如抑癌因子 Rb 可结合 E2F3,从而抑制 E2F3 调控的基因^[22];miR-125b 靶向 E2F3 抑制膀胱癌增殖^[23]等。本研究发现,在肝癌中过表达 miR-10a 可下调 E2F3 的表达,为肝癌的治疗提供了一个潜在的靶点。

综上,本实验首先观察到在人肝癌组织中 miR-10a 低表达,进而发现过表达 miR-10a 可以抑制肝癌细胞的增殖,而这种抑制作用可能是通过靶向作用于转录因子 E2F3,进而阻滞肿瘤细胞于 G₁/S 期而发生,本研究结果为肝癌的发生、发展寻找到了新的分子机制。

【参考文献】

- [1] Ahmedin J, Freddie B, Melissa M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Barshack I, Meiri E, Rosenwald S, et al. Differential diagnosis of hepatocellular carcinoma from metastatic tumors in the liver using microRNA expression [J]. Int J Biochem Cell B, 2010, 42(8): 1355-1362.
- [3] Budhu A, Jia HL, Forgues M, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2008, 47(3): 897-907.
- [4] Kwak MS, Lee JH, Yoon J H, et al. Risk factors, clinical features, and prognosis of the hepatocellular carcinoma with peritoneal metastasis [J]. Digest Dis Sci, 2012, 57(3): 813-819.
- [5] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-

838.

[6] Farazi TA, Spitzer JL, Morozov P, et al. miRNAs in human cancer [J]. J Pathol, 2011, 223(2): 102-115.

[7] Hou J, Lin L, Zhou W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer cell, 2011, 19(2): 232-243.

[8] Fang JH, Zhou HC, Zeng C, et al. MicroRNA-29b suppresses tumor angiogenesis, invasion, and metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 expression [J]. Hepatology, 2011, 54(5): 1729-1740.

[9] Lan FF, Wang H, Chen YC, et al. Hsa-let-7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by downregulation of c-Myc and upregulation of p16INK4A [J]. Int J Cancer, 2011, 128(2): 319-331.

[10] Zhang J, Yang Y, Yang T, et al. microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumorigenicity [J]. Brit J Cancer, 2010, 103(8): 1215-1220.

[11] Agirre X, Jiménez-Velasco A, San José-Enériz E, et al. Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34⁺ cells increases USF2-mediated cell growth [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(12): 1830-1840.

[12] Veerla S, Lindgren D, Kvist A, et al. MiRNA expression in urothelial carcinomas: Important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31 [J]. Int J Cancer, 2009, 124(9): 2236-2242.

[13] Long M J, Wu F X, Li P, et al. MicroRNA-10a targets CHL1 and promotes cell growth, migration and invasion in human cervical cancer cells [J]. Cancer Lett, 2012, 324(2): 186-196.

[14] Chen W, Tang Z, Sun Y, et al. miRNA expression profile in primary gastric cancers and paired lymph node metastases indicates that miR-10a plays a role in metastasis from primary gastric cancer to lymph nodes [J]. Exp Ther Med, 2012, 3(2): 351-356.

[15] Leone G, DeGregori J, Yan Z, et al. E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase [J]. Gene Dev, 1998, 12(14): 2120-2130.

[16] Humbert PO, Verona R, Trimarchi JM, et al. E2F3 is critical for normal cellular proliferation [J]. Gene Dev, 2000, 14(6): 690-703.

[17] Ziebold U, Reza T, Caron A, et al. E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos [J]. Gene Dev, 2001, 15(4): 386-391.

[18] Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, et al. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer [J]. Oncogene, 2004, 23(33): 5616-5623.

[19] Foster CS, Falconer A, Dodson AR, et al. Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome [J]. Oncogene, 2004, 23(35): 5871-5879.

[20] Skariyachan S, Krishnan RS, Biradar UB. In silico investigation and docking studies of E2F3 tumor marker: Discovery and evaluation of potential inhibitors for prostate and breast cancer [J]. Int J Pharmacol Sci & Drug Res, 2010, 2(4): 254-260

[21] Cooper CS, Nicholson AG, Foster C, et al. Nuclear overexpression of the E2F3 transcription factor in human lung cancer [J]. Lung Cancer, 2006, 54(2): 155-162.

[22] Leone G, Nuckolls F, Ishida S, et al. Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(10): 3626-3632.

[23] Huang L, Luo J, Cai Q, et al. MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3 [J]. Int J Cancer, 2011, 128(8): 1758-1769.

[收稿日期] 2014-04-28 [修回日期] 2014-06-16

[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB/T 3358-2009《统计学词汇及符号》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用英文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用英文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)