

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.05.005

miR-155 对人肺癌 95D 细胞生物学行为的影响

赵娟娟¹, 李永菊¹, 陈超¹, 郭萌萌¹, 陶弋婧¹, 任涛², 徐林¹(1. 遵义医学院 免疫学教研室, 贵州 遵义 563000; 2. 同济大学附属上海东方医院 呼吸内科, 上海 200120)

[摘要] **目的:** 构建携 microRNA-155(miR-155)的真核表达载体并观察其转染高转移性人巨细胞肺癌 95D 细胞后细胞的生物学行为变化。**方法:** 以 95D 细胞基因组 RNA 为模板, 经 PCR 法扩增 miR-155 的前体序列, 由 BamH I 和 Hind III 双酶切后将其亚克隆入真核表达载体 pcDNA 3.1(-), 并进行双酶切及测序鉴定; 将构建成功的 pcDNA3.1(-)-pri-miR-155 载体(命名为 p-miR-155)体外瞬时转染人肺癌 95D 细胞, 利用 Real-time PCR 探针法检测 miR-155 成熟体的表达水平, 并利用 CCK-8 法、克隆形成实验和划痕法检测 95D 细胞的增殖、克隆形成以及体外迁移能力。**结果:** 成功构建携 miR-155 的真核表达载体; 与空白(Mock)和对照组(p-Ctrl)相比, 转染后的 95D 细胞过表达 miR-155[(2.04 ± 0.62) vs (0.76 ± 0.62)、(1.00 ± 0.45)], 均 $P < 0.01$], p-miR-155 载体转染组 95D 细胞的增殖抑制明显增加[(46.70 ± 6.89)% vs (3.70 ± 1.40)%、(1.11 ± 0.75)%], $P < 0.01$], 克隆形成能力(在 100 和 1 000 个细胞/孔接种条件下)明显下降[(12 ± 3) vs (34 ± 3)、(35 ± 3)个, $P < 0.01$]; (78 ± 4) vs (159 ± 4)、(165 ± 4)个, $P < 0.01$], 此外, 细胞的迁移细胞数也明显减少[(110 ± 5) vs (295 ± 5)、(325 ± 5)个, $P < 0.01$]。**结论:** 通过 miR-155 真核表达载体转染产生的过表达 miR-155 可显著抑制人肺癌 95D 细胞的增殖和迁移能力。

[关键词] microRNA-155(miR-155); 真核表达; 肺癌; 95D 细胞; 增殖; 迁移

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)05-0510-06

Biological effects of miR-155 on human lung cancer 95D cell

Zhao Juanjuan¹, Li Yongju¹, Chen Chao¹, Guo Mengmeng¹, Tao Yijing¹, Ren Tao², Xu Lin¹(1. Department of Immunology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Shanghai East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of microRNA-155 (miR-155) on human lung cancer cell behaviors *in vitro*. **Methods:** A plasmid vector (p-miR-155) carrying the pri-miR-155 sequence amplified from genomic RNA of human lung cancer 95D cells by PCR was constructed. Lung cancer 95D cells were transiently transfected with p-miR-155. p-miR-155 mRNA abundance in 95D cells was assessed by real-time PCR before and after transfection. Cell proliferation and migration in control, mock-transfected and transfected 95D cells were assessed by CCK-8 assay wound assay respectively. **Results:** The abundance of miR-155 mRNA was increased significantly in 95D cells transfected with p-miR-155 than in mock-transfected and control cells (2.045 ± 0.62 vs 0.76 ± 0.62, 1 ± 0.45; $P < 0.01$). The proliferation was markedly inhibited in p-miR-155 transfectants as compared in mock-transfected and control cells ([46.70 ± 6.89]% vs [3.70 ± 1.40]%, [1.11 ± 0.75]%; $P < 0.01$). The number of colonies formed was significantly decreased ([12 ± 3] vs [34 ± 3], [35 ± 3]; $P < 0.01$) and so was migration capability ([110 ± 5] vs [295 ± 5], [325 ± 5]; $P < 0.01$) in p-miR-155-transfected cells as compared with mock-transfected and control cells. **Conclusion:** A eukaryotic expression vector carrying human pri-miR-155 sequence is capable of effectively inhibiting lung cancer cell proliferation and migra-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81260398, No. 31370918); 教育部新世纪优秀人才计划(No. NCET-12-0661)。Projects supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81260398, No. 31370918), and the Foundation for New Century Excellent Talents by the State Education Commission(No. NCET-12-0661)

[作者简介] 赵娟娟(1987-), 女, 河南省新乡市人, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究, E-mail: jj.z.2008@163.com

[通信作者] 徐林(Xu Lin, corresponding author), E-mail: xulinzhouya@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140928.1509.005.html>

tion, thus having a significant clinical implication.

[**Key words**] microRNA-155 (miR-155); eukaryotic expression; lung cancer; 95D cell; proliferation; migration
[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 510-515]

微小 RNA(MicroRNAs, miRNAs)是一类由内源基因编码的长度约为 22 个碱基的单链非编码小分子 RNA,主要通过靶向 mRNA 的 3'非翻译区(3' UTR)降解或抑制 mRNA 的蛋白质翻译,从而广泛作用于一系列生理活动,并参与多种疾病的发生过程^[1-3]。大量研究^[4-7]显示,miRNAs 在肺癌细胞的生长和迁移中起着重要的调控作用,在肺癌的发生、发展过程中充当重要角色。microRNA-155 (miR-155)作为广受关注的 miRNAs 家族成员之一,位于 21 号染色体非转录本 B 细胞整合簇(B-cell integration cluster, BIC)基因上的第三个外显子,其可通过调控多种肿瘤相关基因的表达而调控肿瘤的增殖、分化以及迁移^[8]。本实验室前期研究^[9]发现,应用 miR-155 模拟物(mimics)可通过下调 SOS 蛋白同源体 1(son of sevenless homolog 1, SOS1)的表达,从而抑制人肺癌细胞的体外增殖及侵袭能力,然而,miR-155 参与肺癌发生、发展的具体作用及其分子机制仍待深入研究。本研究构建携 miR-155 的真核表达载体并转染人肺癌 95D 细胞,鉴定其表达活性及在体外对人肺癌细胞生物学影响,为后续深入研究 miR-155 在肺癌发生、发展中的作用机制及基于 miR-155 的肺癌基因治疗策略研究奠定实验基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞株、菌株及主要试剂

人高转移肺巨细胞癌株 95D 购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,pcDNA3.1(-)真核表达载体和 LipofectamineTM 2000 转染试剂均购自美国 invitrogen 公司,*E. coli* DH5a 感受态细胞为本实验室保存,限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind*III 以及 T4 DNA 连接酶均购自 Fermentas 公司,SYBR Premix Ex Taq real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自碧云天生物技术研究所,质粒抽提试剂盒购自天根生化科技有限公司,Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自博士德生物工程有限公司,RPMI 1640 培养基和优质胎牛血清购自 Hyclone 公司。

1.2 引物设计

由于 miR-155 是宿主基因 *BIC* 基因序列上第三个外显子,通过搜索 miRBase 数据库(<http://www.mirbase.org>)得到 miR-155 的前体序列及其宿主基

因 *BIC* 的序列。应用 Primer 5.0 设计 pri-miR-155 序列上下游引物,并应用 BLAST 软件进行在线筛查比对,以消除潜在的同源干扰,上游引物(引入 *Bam*H I 位点): 5'-CGCGGATCCCTGGAGGCTT-GCGAAG;下游引物(引入 *Hind* III 位点): 5'-CCCAAGCTTGACTTGTATCCTCCC(划线部分为酶切位点,前面为保护碱基)。

1.3 PCR 扩增 miR-155 前体

TRIzol 法提取人巨细胞肺癌高转移细胞株 95D 基因组 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并利用紫外分光光度仪测量 D_{260}/D_{280} 值以检测其纯度,再逆转录为 cDNA,并引入 BIC 基因上下游引物经 PCR 仪扩增,利用 *GAPDH* 作为阳性对照,扩增条件均为 95 °C 5 min;95 °C 30 s;55 °C 30 s;72 °C 30 s;35 个循环后 72 °C 5 min。PCR 产物分别在 2.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳,回收 171 bp 目的片段。

1.4 构建 pcDNA3.1(-)-miR-155 真核表达载体

将真核表达载体 pcDNA3.1(-)与 BIC/pri-miR-155 回收产物分别经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,琼脂糖凝胶电泳分别回收酶切后片段,回收产物在 T4 DNA 连接酶的作用下于 16 °C 连接过夜。将连接产物转化入 *E. coli* DH5a 的感受态细菌,于 LB 中摇床孵育 1.5 h,再在含有 100 μg/ml Ampicillin(Amp)的固体 LB 培养基培养 12 h, Amp + 固体培养基中筛选培养 12 h,挑取 4 个连接反应菌落,克隆于 LB (Amp⁺)液体培养基培养 12 h。按照天根生物公司质粒抽提试剂盒说明书抽提质粒,并运用 pri-miR-155 上下游引物经 PCR 技术鉴定抽提质粒,以及用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,并送上海生物工程有限公司进行测序。验证正确后再进行大量扩增抽提,重组质粒命名为 pcDNA3.1(-)-pri-miR-155(p-miR-155)。

1.5 p-miR-155 转染 95D 细胞

用含 100 ml/L 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素及 2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 细胞培养液,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 95D 细胞,待单层细胞生长达到 80% 融合时,用 0.15% 胰蛋白酶消化细胞,收集细胞,PBS 冲洗 1 次后备用。细胞实验分组:转染试剂空白对照组(Mock)、pcDNA3.1(-)空载体对照组(p-Ctrl)以及 pcDNA3.1(-)-pri-miR-155 转染组(p-miR-155)。将 5×10^4 个

细胞重悬于 1 ml RPMI 1640 培养液中, 转移至 24 孔板, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。12 h 后, 将 p-miR-155 瞬时转染至 95D 细胞, 光学显微镜下观察细胞形态的改变。

1.6 Real-time PCR 检测 95D 细胞中 miR-155 的表达

通过 iCycler iGTM Real-time PCR Detection System 进行定量分析。内参基因 GAPDH 逆转录反应体系及条件按试剂盒说明书操作, Real-time PCR 反应体系及条件: 2 × SYBR Premix Ex Tag™ 10 μl, ddH₂O 8 μl, cDNA 1 μl, PCR Forward Primer 0.5 μl, PCR Reverse Primer 0.5 μl, 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 40 个循环, 获取荧光信号温度为 84 °C, 以排除引物二聚体的干扰; miR-155 逆转录反应体系及条件按试剂盒说明书操作, Real-time PCR 反应体系及条件: Premix Ex Taq Version 2.0 10 μl, ddH₂O 8 μl, cDNA 1 μl, 20 × TaqMan Small RNA Assay 1 μl, 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 45 个循环, 获取荧光信号温度为 60 °C。在扩增结束后将每对引物的扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳分析, 确定扩增产物与目的片段大小是否一致。对各组目的基因的核酸含量, 采用 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量分析。

1.7 CCK-8 法检测 p-miR-155 转染对 95D 细胞增殖的影响

收集上述各实验组细胞, 以 3 × 10³ 个细胞/孔接种于 96 孔培养板, 每孔培养液总量 200 μl, 于 37 °C 5% CO₂ 全湿度培养箱中培养, 分别在 24、48、72 h 时光镜下观察, 并按照博士德生物公司说明书要求在目的检测时间前 2.5 h 每孔加入 20 μl 的 CCK-8 试剂, 继续培养 2.5 h, 然后将培养板置于微孔板振荡器上振荡 5 min, 在酶标仪上 450 nm 处检测各孔光密度(D)值。

1.8 克隆形成实验检测 95D 细胞的克隆形成能力

收集 p-Ctrl-95D 细胞和 p-miR-155-95D 细胞, 制成细胞悬液, 细胞悬液反复吹打, 使细胞充分分散, 并进行细胞计数, 用培养基调节细胞密度, 将 2 ml 细胞悬液按照每孔 100、200、400、600、800、1 000 个细胞分别接种于 6 孔板中, 轻轻晃动使细胞分散均匀; 置 37 °C、5% CO₂ 全湿度培养箱中培养 10 ~ 15 d, 中间根据培养液变化适时更换新鲜培养基, 当出现肉眼可见克隆时终止培养, 倒掉孔里的培养液, PBS 小心洗涤 2 次, 空气干燥, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 小心洗涤 2 次, 再用 1% 结晶紫染液染色 30 min, 用去离子水小心洗去染液, 干燥后拍照。

1.9 划痕实验检测 p-miR-155 转染后 95D 细胞的

体外迁移能力

收集 95D 细胞, 按 3 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板, 培养 12 h; 实验同上分 Mock、p-Ctrl、p-miR-155 三组, 然后培养 6 h; 用 1 ml 枪头沿板中线刮出 15 mm 刮痕, PBS 小心洗涤 3 次, 显微镜下观察刮痕内无细胞, 加上培养液, 继续培养 48 h; 吸去培养上清, 加入新鲜的培养液; 光学显微镜下计算刮痕内细胞总数, 并拍照。

1.10 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计学软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组以上数据的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-155 前体 PCR 扩增产物的鉴定

图 1A 显示, 提取高转移性巨细胞肺癌 95D 株的总 RNA, 逆转录为 cDNA, 经 PCR 扩增出 miR-155 条带(171 bp)和作为阳性对照的 GAPDH 条带(450 bp)。利用 T4 DNA 连接酶分别将 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后和纯化的 pcDNA3.1(-)载体和 pri-miR-155 片段进行连接, 连接产物转化入 DH5a 感受态细菌, Amp 抗性筛选培养 12 h 后随机挑取 4 个克隆, 分别培养 16 h, 进行菌液 PCR 鉴定, 琼脂糖凝胶电泳结果均可见 171 bp 目的条带(图 1B), 表明所挑取的 4 个克隆均为 miR-155 质粒的阳性克隆。

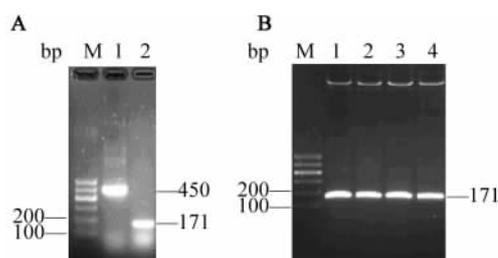


图 1 miR-155 前体 PCR 产物的鉴定

Fig. 1 Identification of pri-miR-155 PCR products

A: The electrophoresis of PCR products of pri-miR-155 (171 bp) and GAPDH (450 bp) from the cDNA. B: The electrophoresis of PCR products of bacterium solution; 1 ~ 4: Electrophoresis of different PCR products; M: DNA marker

2.2 重组质粒 p-miR-155 的鉴定

将经鉴定为阳性的克隆培养后进行质粒小量抽提, 产物经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 并进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳后可见约 5.5 kb 线性化 pcDNA3.1

(-)载体及 171bp pri-miR-155 条带(图 2A)。DNA 测序结果(图 2B)显示,插入片段与 Genbank 中人

pri-miR-155 序列完全一致。结果表明,重组载体 p-miR-155 构建成功。

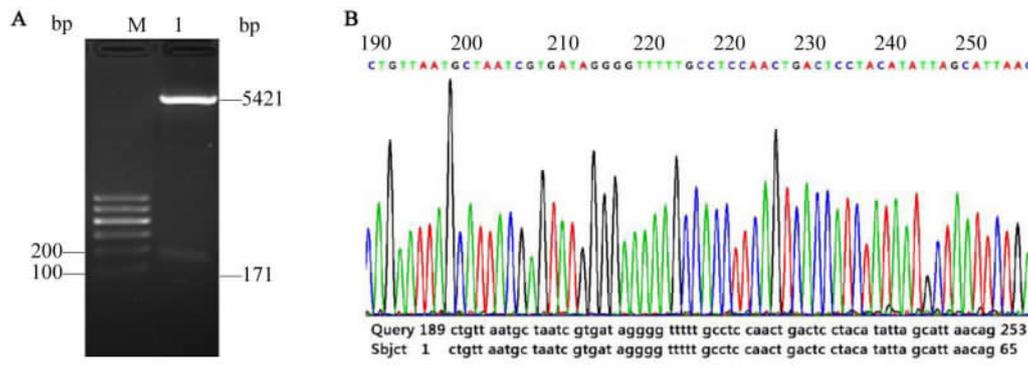


图 2 p-miR-155 质粒的 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切(A)及测序(B)鉴定

Fig.2 Identification of p-miR-155 plasmid by *Bam*H I and *Hind*III double digestion(A)and sequencing(B)

2.3 p-miR-155 转染上调 95D 细胞 miR-155 表达

将 p-miR-155 瞬时转染人肺癌 95D 细胞 48 h 后,Real-time PCR 检测结果(图 3)显示,与空白组 Mock 和对照组 p-Ctrl-95D 细胞相比,p-miR-155-95D 细胞中 miR-155 的表达水平显著增加(2.04 ± 0.62 vs 0.76 ± 0.62 、 1.00 ± 0.45 ,均 $P < 0.01$)。

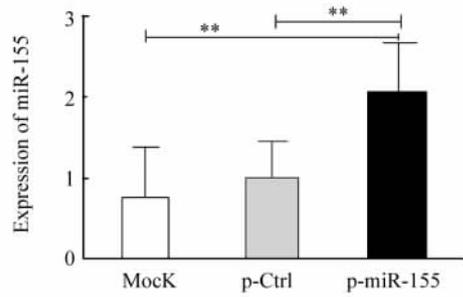


图 3 p-miR-155 转染人肺癌 95D 细胞后 miR-155 的表达

Fig.3 Expression level of miR-155 in human lung cancer 95D cells transfected by p-miR-155

** $P < 0.01$ vs mock or p-Ctrl

2.4 过表达 miR-155 抑制 95D 细胞体外增殖

CCK-8 法检测结果(图 4)显示,在 72 h 的结果相对比较显著,瞬时转染 p-miR-155 组与 Mock 和 p-Ctrl 两组比较,光镜下可见 95D 细胞增殖明显受到抑制;miR-155 转染组对 95D 细胞的增殖抑制率较 Mock 和 p-Ctrl 两组显著增高,具有统计学意义 [$(46.70 \pm 6.89)\%$ vs $(3.70 \pm 1.40)\%$ 、 $(1.11 \pm$

$0.75)\%$,均 $P < 0.01$]。

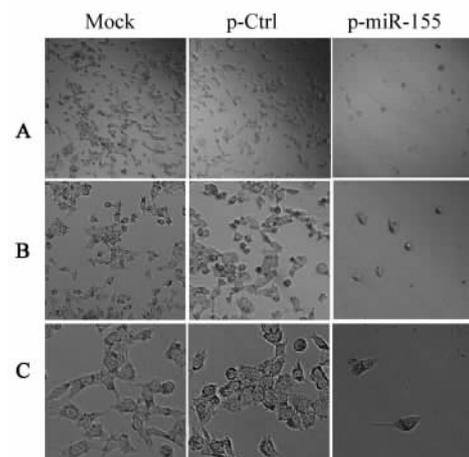


图 4 p-miR-155 转染后过表达的 miR-155 抑制 95D 细胞的增殖

Fig.4 Inhibitory effect of p-miR-155 on the proliferation of 95D cells

A: $\times 100$;B: $\times 200$;C: $\times 400$

2.5 过表达 miR-155 抑制 95D 细胞克隆形成

克隆形成实验结果(图 5)显示,在 100 和 1 000 个/孔的接种条件下,p-miR-155 组中 95D 细胞克隆形成数较 p-Ctrl 组和 Mock 组均明显降低 [(12 ± 3) vs (34 ± 3) 、 (35 ± 3) 个,均 $P < 0.01$; (78 ± 4) vs (159 ± 4) 、 (165 ± 4) 个,均 $P < 0.01$]。结果表明,miR-155 不仅抑制肺癌 95D 细胞的增殖,同时也影响其克隆形成能力。

2.6 miR-155 过表达抑制 95D 细胞的迁移

为了进一步明确真核载体 p-miR-155 表达 miR-155 成熟体的生物学效应,采用划痕法观察 95D 细胞体外迁移能力的改变。结果(图 6)显示,与 p-Ctrl-95D 细胞相比,p-miR-155-95D 细胞的体外迁移能力受到显著抑制,48 h 后的细胞迁移数为(110 ± 5)个,而 p-Ctrl-95D 细胞的迁移数为[(295 ± 5)个, $P < 0.01$],Mock 组 95D 细胞的迁移数为[(325 ± 5)个, $P < 0.01$]。结果表明,p-miR-155 转染可显著抑制 95D 细胞的迁移。

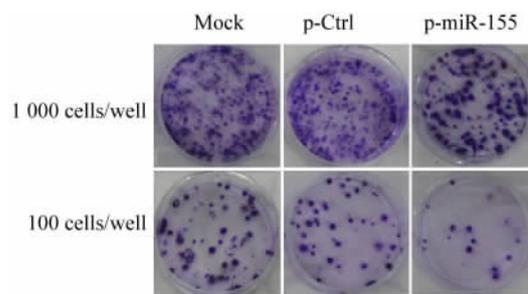


图 5 p-miR-155 转染抑制 95D 细胞的克隆形成能力(× 100)
Fig. 5 The colony formation ability of 95D cells were inhibited by transfected with p-miR-155(× 100)

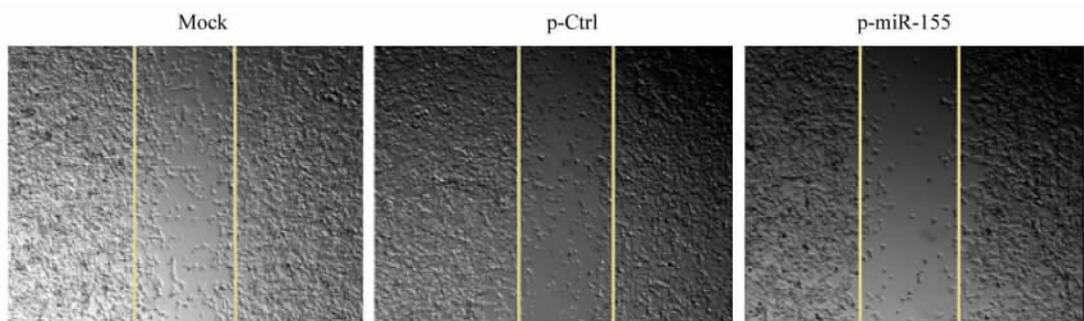


图 6 p-miR-155 转染抑制 95D 细胞的体外迁移(× 100)
Fig. 6 The migration ability of 95D cells were inhibited by transfected with p-miR-155 *in vitro*(× 100)

3 讨论

近年来的研究显示,miR-155 在人肺癌组织中的表达异常,且与患者预后密切相关。如 Yang 等^[10]报道肺癌组织中 miR-155 高表达的患者,其预后不良且生存期更短。新近 Gao 等^[11]进一步报道,在肺腺癌患者血清中,miR-155 的表达水平也显著增加,提示其可作为肺癌的潜在诊断靶标。Donnem 等^[12]发现,miR-155 与临床肺癌的预后相关性可能与肺癌病理类型有关,在鳞癌且伴淋巴结转移的患者中,miR-155 高表达与患者的 5 年生存率呈正相关。这些研究显示,miR-155 与肺癌的关系比较复杂,因此,深入研究 miR-155 在肺癌发生中的作用及机制不仅对于阐明肺癌发生机制而且对于肺癌基因诊断和治疗新靶标开发均具有重要意义。

在本研究中,利用人肺巨细胞癌细胞系 95D 基因组 RNA 为模板逆转录成 cDNA,再利用 PCR 技术成功扩增出 miR-155 前体序列,纯化产物经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,克隆入 pcDNA3.1(-)真核表达载体,经菌液 PCR、双酶切鉴定以及测序验证,成功构建了真核表达载体 p-miR-155。将 p-miR-155 瞬时转染人肺癌 95D 细胞可显著增加 miR-155 成熟体的

表达水平,提示 CMV 启动子可有效启动 miR-155 前体序列在真核细胞中的转录和成熟体的表达。重要的是,CCK-8 实验和克隆形成实验显示,上调 miR-155 表达后,95D 细胞的增殖能力受到明显抑制,这与前期工作^[9]发现的 miR-155 模拟物可明显抑制 95D 细胞生长的结果是一致的。新近 Zang 等^[13]报道,miR-155 还可通过靶向调控凋亡蛋白酶激活因子(apoptosis protease activating factor, Apaf-1)致使肺癌细胞 DNA 损伤而导致细胞凋亡。在本研究中,划痕实验结果显示,过表达 miR-155 还可显著抑制 95D 细胞的体外迁移能力。Li 等^[14]也发现,过表达 miR-155 可显著抑制胃癌细胞中 SMAD2 的表达,并削弱胃癌侵袭能力。近来 Ko 等^[15]也报道,SMAD2 可作用 EMT 信号通路,在肺癌细胞的转移及侵袭中具有重要作用。值得注意的是,Zhang 等^[16-18]研究发现,高水平的 miR-155 可显著削弱肺癌细胞对化疗药物吉西他滨、顺铂等的敏感性,且促进肺癌进程。这些研究提示了 miR-155 在肺癌生物学行为作用中的复杂性,推测这可能与不同肿瘤细胞病理类型、表达 miR-155 的水平有关,然而,其具体作用机制有待后续深入探讨阐明。

综上所述,本研究成功构建基于 CMV 启动子的

miR-155 真核表达载体并转染入肺癌细胞,在 miR-155 过表达时可明显抑制 95D 细胞的增殖、克隆形成以及迁移能力。结果提示,miR-155 在肺癌发生和转移过程中存在复杂的生物学作用机制,为基于 miR-155 的肺癌基因治疗策略开发提供了更多的实验数据。

[参 考 文 献]

- [1] Zhou X, Yang PC. MicroRNA: A small molecule with a big biological impact [J]. *Microna*, 2012, 1(1): 1.
- [2] Lehrbach NJ, Castro C, Murfit K J, et al. Post-developmental microRNA expression is required for normal physiology, and regulates aging in parallel to insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans* [J]. *RNA*, 2012, 18(12): 2220-2235.
- [3] Staton AA, Giraldez AJ. Use of target protector morpholinos to analyze the physiological roles of specific miRNA-mRNA pairs in vivo [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(12): 2035-2049.
- [4] Edmonds MD, Eischen CM. Differences in miRNA expression in early stage lung adenocarcinomas that did and did not relapse [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(7): e101802.
- [5] Kupczyk M, Kuna P. MicroRNAs-new biomarkers of respiratory tract diseases [J]. *Pneumonol Alergol Pol*, 2014, 82(2): 183-190.
- [6] He J, Zhang F, Wu Y, et al. Prognostic role of microRNA-155 in various carcinomas: Results from a meta-analysis [J]. *Dis Markers*, 2013, 34(6): 379-386.
- [7] Xiang X, Zhuang X, Ju S, et al. miR-155 promotes macroscopic tumor formation yet inhibits tumor dissemination from mammary fat pads to the lung by preventing EMT [J]. *Oncogene*, 2011, 30(31): 3440-3453.
- [8] Elton TS, Selemo H, Elton SM, et al. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes [J]. *Gene*, 2013, 532(1): 1-12.
- [9] 秦安东,周涯,盛美霞,等. MicroRNA-155 对人肺癌 95D 细胞生长的影响 [J]. *中国肺癌杂志*, 2011, 14(7): 575-580.
- [10] Yang M, Shen H, Qiu C, et al. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(3): 604-615.
- [11] Gao F, Chang J, Wang H, et al. Potential diagnostic value of miR-155 in serum from lung adenocarcinoma patients [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(1): 351-357.
- [12] Donnem T, Eklo K, Berg T, et al. Prognostic impact of miR-155 in non-small cell lung cancer evaluated by in situ hybridization [J]. *J Transl Med*, 2011, 9(6): 1-9.
- [13] Zang YS, Zhong YF, Fang Z, et al. miR-155 inhibits the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin via negative regulation of Apaf-1 expression [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(11): 773-778.
- [14] Li CL, Nie H, Wang M, et al. MicroRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(6): 1960-1966.
- [15] Ko H, So Y, Jeon H, et al. TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and acetylation of Smad2 and Smad3 are negatively regulated by EGCG in Human A549 lung cancer cells [J]. *Cancer Letters*, 2013, 335(1): 205-213.
- [16] Zhang HH, Zhang ZY, Che CL, et al. Array analysis for potential biomarker of gemcitabine identification in non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(9): 1734-1746.
- [17] Pouliot LM, Chen YC, Bai J, et al. Cisplatin sensitivity mediated by WEE1 and CHK1 is mediated by miR-155 and the miR-15 family [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(22): 5945-5955.
- [18] Pu J, Bai D, Yang X, et al. Adrenaline promotes cell proliferation and increases chemoresistance in colon cancer HT29 cells through induction of miR-155 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 428(2): 210-215.
- [收稿日期] 2014 - 05 - 21 [修回日期] 2014 - 08 - 27
[本文编辑] 阮芳铭

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

参考文献题名后须标注文献类型和文献载体标志代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都须标上[文献类型标志]或[文献类型标志/文献载体标志]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[M/OL]。

现将常用的文献类型标志代码和电子文献载体标志代码介绍如下:

表 1 文献类型和文献载体标志代码

文献类型	标志代码	文献类型	标志代码	载体类型	标志代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联 机 网 络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		