

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.005

## MiR-29a 下调共刺激分子 B7-H3 的表达及其对脑胶质瘤细胞侵袭的影响

高兵<sup>1,2</sup>, 陈翰卿<sup>1,2</sup>, 时正鹏<sup>1,2</sup>, 孙静<sup>4</sup>, 严茹红<sup>5</sup>, 傅丰庆<sup>3△</sup>, 张学光<sup>1,2,3</sup> (1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215000; 2. 苏州大学医学生物技术研究所, 江苏苏州 215000; 3. 苏州大学附属第一医院江苏省临床免疫研究所, 江苏苏州 215000; 4. 苏州卫生职业技术学院, 江苏苏州 215000; 5. 苏州大学附属第二医院检验科, 江苏苏州 215000)

**[摘要]** **目的:** 探讨 miR-29a 调控共刺激分子 B7-H3 在脑胶质瘤中的表达及其对脑胶质瘤细胞侵袭能力的影响。**方法:** 通过 Real-time PCR 检测 miR-29a 和 B7-H3 在正常脑组织、脑胶质瘤组织及人胶质瘤细胞株 U87 中的表达, 并利用脂质体将 miR-29a 的模拟物(mimics)和抑制剂(inhibitors)转入 U87 细胞, 流式术验证 miR-29a 对 B7-H3 表达的调节效果; 采用 CCK-8 和 Transwell 实验观察 miR-29a 对 U87 细胞的增殖和侵袭能力的影响, 并通过流式术分析 miR-29a 干预前后 U87 细胞上与细胞侵袭相关的化学趋化因子的表达变化, 以 miRtarbase 等软件预测 miR-29a 与 CXCR4 的结合能力。**结果:** 胶质瘤组织及细胞株中 miR-29a 低表达而 B7-H3 mRNA 高表达, 且均与瘤组织病理分级相关。转染 miR-29a mimics 可以有效下调 U87 细胞中 B7-H3 mRNA 的表达。转染 miR-29a mimics 可以显著抑制 U87 细胞的侵袭能力( $P < 0.05$ ), 但对细胞增殖并无显著影响。miR-29a 过表达可同时下调 U87 细胞中 CXCR4 的表达, 但软件分析 CXCR4 基因上并不存在 miR-29a 的结合位点。**结论:** miR-29a 可有效下调 B7-H3 分子的表达, 进而抑制脑胶质瘤细胞的侵袭能力, 其作用机制可能与 CXCR4 途径相关。

**[关键词]** B7-H3; miR-29a; 胶质瘤; U87 细胞; 侵袭; 增殖; CXCR4

**[中图分类号]** R739.41; R730.54; Q522

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2015)01-0028-06

## MiR-29a inhibited costimulatory molecule B7-H3 expression and the invasion of glioma growth

Gao Bing<sup>1,2</sup>, Chen Hanqing<sup>1,2</sup>, Shi Zhengpeng<sup>1,2</sup>, Sun Jing<sup>4</sup>, Yan Ruhong<sup>5</sup>, Fu Fengqing<sup>3△</sup>, Zhang Xueguang<sup>1,2,3</sup> (1. Department of Biology and Basic Medical Science, Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu, China; 2. Institute of Medical Biotechnology, Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu, China; 3. Institute of Clinical Immunology of Jiangsu Province, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu, China; 4. Suzhou Health Technology College, Suzhou 215000, Jiangsu, China; 5. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the expression and possible roles of miR-29a and B7-H3 in glioma growth and invasion. **Methods:** Glioma tissue specimens were collected from 19 patients who underwent surgical glioma resection in the Department of Neurosurgery, Soochow University-Affiliated First Hospital between September, 2006 and December, 2010. Levels of miR-29a and B7-H3 mRNAs in the tissue specimens and human glioma U87 cells were determined by Real-time PCR. U87 cells were transfected with miR-29a mimics, and B7-H3 expression and invasive capacity in the transfectants were assessed by flow cytometry and transwell migration assay, respectively. The expression of invasion-related chemical chemokines was analyzed by flow cytometry, and the ability of miR-29a to bind to CXCR4 was predicted by the miRtarbase software. **Results:** In glioma tissue specimens, miR-29a and B7-H3 mRNA levels were inversely correlated. *In vitro*,

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目( No. 30901313, No. 31100626, No. 81301494 )。Project supported by the National Natural Science Foundation of China( No. 30901313, No. 31100626, No. 81301494 )

**[作者简介]** 高兵( 1987 - ), 男, 安徽省六安市人, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫学研究, E-mail: dasanzi@126.com

**[通信作者]** 张学光( Zhang Xueguang, corresponding author ), E-mail: xueguangzh@yahoo.com; 傅丰庆( Fu Fengqing, co-corresponding ), E-mail: fufengqing@suda.edu.cn. △共同通信作者

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150205.1443.005.html>

miR-29a down-regulated *B7-H3* mRNAs expression in U87 cells and miR-29a-mediated down-regulation of *B7-H3* resulted in a significant decrease in the invasive ability but not proliferative activity in U87 cells. Parallel to down-regulation of B7-H3 expression, CXCR4 expression was also down-regulated in U87 cells transfected with miR-29a mimics. No miR-29a binding sites were detected in the *CXCR4* gene. **Conclusions:** In human glioma, miR-29a can effectively down-regulate B7-H3 expression and inhibit invasive activity. It is likely that these effects of miR-29a were at least attributable down-regulated expression of CXCR4.

[ **Key words** ] B7-H3; miR-29a; glioma; U87 cell; invasion; proliferation; CXCR4

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22(1): 28-33 ]

脑胶质瘤是人脑部最常见的恶性肿瘤,约占人颅内肿瘤的 45% ~ 60%。侵袭性生长是脑胶质瘤的一个重要特征,肿瘤细胞侵袭性生长行为限制了脑胶质瘤局部治疗如手术切割和放疗等手段的可行性和有效性<sup>[1-2]</sup>。因此,探索脑胶质瘤病理进程的分子机制已成为诊断和治疗脑胶质瘤的研究热点。

B7-H3 (CD276) 是参与肿瘤免疫逃逸的重要负性 B7 家族分子<sup>[6]</sup>。B7-H3 蛋白在诸多肿瘤组织包括脑胶质瘤中存在异常表达<sup>[7-11]</sup>,并且发现 B7-H3 在脑胶质瘤细胞的侵袭和转移中起重要的调控作用<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13]</sup>表明,miR-29a 能下调成神经细胞瘤细胞上 B7-H3 的表达,但 miR-29a 对脑胶质瘤细胞上 B7-H3 的表达调控及其对肿瘤细胞生物学特性的影响还有待进一步的研究。鉴于此,本研究检测 miR-29a 和 B7-H3 蛋白在脑胶质瘤细胞中表达的相关性,并分析 miR-29a 对 B7-H3 分子表达的调控作用,探讨 miR-29a 下调 B7-H3 的表达对肿瘤细胞侵袭能力的影响,为进一步探索脑胶质瘤侵袭的分子调控机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

收集苏州大学附属第一医院神经外科于 2006 年 9 月至 2010 年 12 月手术切除并经病理确诊为脑胶质瘤的组织标本 19 例,其中男性 8 例、女性 11 例,中位年龄 54 岁(43 ~ 78 岁),全部患者术前未进行过放化疗。根据 WHO 中枢神经系统肿瘤分类标准(2010 年),其中 WHO I 级 2 例、II 级 4 例、III 级 6 例、IV 级 7 例。对照组 2 例为取自距脑胶质瘤灶边缘 2 cm 的瘤旁组织标本。上述标本的获取均取得患者或其家属的知情同意并签署知情同意书。

### 1.2 细胞株及主要试剂

人胶质瘤细胞株 U87 和 U251 均购自中国科学院,培养在 DMEM 培养基(含 10% 小牛血清)于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养,每 2 ~ 3 d 更换培养液,待细胞长满 80% 镜下视野时用 0.25%

胰蛋白酶消化传代,取生长状态良好的对数生长期细胞用于后续实验。

DMEM 培养液和小牛血清均购自美国 HyClone 公司,miR-29 mimics、miR-29 inhibitors、negative control、negative control inhibitors 购于上海吉玛制药技术有限公司,cDNA 逆转录试剂盒购自美国 Thermo 公司,miR-29a 及对照 U6 的反转录引物和试剂均购自广州锐博生物科技有限公司,定量 PCR 试剂盒购自瑞士 Roche 公司,来源于灰色链霉菌( *Pronase E* )的蛋白酶购自德国的 Sigma 公司,PE 标记 B7-H3、CXCR4、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR7 单抗均购自美国 eBioscience 公司,CCK-8 试剂盒购自日本株式会社同仁化学研究所,Lipfectamine™ 2 000 购自美国的 Invitrogen 公司,基质胶购自美国的 BD 公司。

### 1.3 miRNA 转染 U87 细胞

取生长状态良好的 U87 细胞接种,达到 60% ~ 80% 融合时,按照 Lipfectamine™ 2 000 说明书的方法,将 miR-29a mimics、miR-29a inhibitors、NC( miR-29a mimics 的阴性对照 )、NCI( miR-29a inhibitors 的阴性对照 )分别转入 U87 细胞。24 h 后用 *Pronase E* 处理 30 min,再用 PBS 洗 3 遍再培养。实验设 3 个复孔,重复 3 次。

### 1.4 流式细胞术检测 U87 细胞中 B7-H3 分子及 CXCR4、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR7 表达水平

转染 48 h 后收集转染细胞,用 PE 标记 B7-H3、CXCR4、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR7 鼠抗人单抗加入到收集的细胞中,4 °C 孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次后用 0.5 ml PBS 重悬,流式细胞仪检测细胞表面 PE 荧光;同亚型的鼠 IgG 作为阴性对照,各组与未处理 U87 细胞表达的蛋白作比较,观察实验组的蛋白表达变化。

### 1.5 Real-time PCR 检测组织标本和转染细胞中的 miR-29a 和 B7-H3 mRNA 的表达

转染 24 h 后收取的各组转染 U87 细胞未转染的 U87、U251 细胞以及组织样本,用 TRIzol 提取总 RNA,一方面参照逆转录试剂盒说明书将提取的总

RNA 逆转录形成 cDNA,按照 Real-time PCR 试剂盒来检测 B7-H3 mRNA 和内参  $\beta$ -actin 的含量。检测体系如下:10  $\mu$ mol/L 的特异引物 F 1  $\mu$ l,10  $\mu$ mol/L 的特异引物 R 1  $\mu$ l,cDNA 1  $\mu$ l,加无 RNA 酶水至总体积至 20  $\mu$ l。反应条件为:95  $^{\circ}$ C, 5 min;95  $^{\circ}$ C, 10 s;60  $^{\circ}$ C, 20 s;72  $^{\circ}$ C, 20 s;78  $^{\circ}$ C, 20 s;共 40 个循环。每个样品 3 个重复孔。测定 miRNA 的含量:首先将提取的 RNA 与双蒸水和特异的 miRNA RT 引物混合,体系为:RNA 1  $\mu$ g,miRNA RT 引物 1.6  $\mu$ l,加无 RNA 酶水至总体积至 12  $\mu$ l,反应的条件为 70  $^{\circ}$ C 10 min,冰上放置 2 min。再在每个体系中加入下列试剂:dNTP( 2.5 mmol/L)2  $\mu$ l, 5  $\times$  Buffer 4  $\mu$ l, MMLV 反转录酶( 10 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l,RNA 酶抑制剂( 40 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l,反应条件为 65  $^{\circ}$ C 65 min,72  $^{\circ}$ C 10 min。收集产物以备后用。

合成的产物用于 Real-time PCR,所有产物样品分别配制 Real-time PCR 反应体系。体系配置如下:2  $\times$  Syber green I,10  $\mu$ mol/L 的特异引物 F 1  $\mu$ l,10  $\mu$ mol/L 的特异引物 R 1  $\mu$ l,RT 产物 2  $\mu$ l,加无 RNA 酶水至总体积 20  $\mu$ l。反应条件为:95  $^{\circ}$ C, 5 min; 95  $^{\circ}$ C, 10 s;60  $^{\circ}$ C, 20 s;72  $^{\circ}$ C, 20 s; 78  $^{\circ}$ C, 10 min, 35 个循环。每个样品 3 个重复孔。目的产物的量通过公式  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算。

1.6 Transwell 侵袭实验检测 U87 细胞的侵袭能力

实验前一天参照说明书铺基质胶,每孔加入 50  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C 过夜。转染 48 h 后的各组细胞用无血清 DMEM 培养液调整密度至  $50 \times 10^4$ /ml;上室加 100

$\mu$ l 细胞悬液,下室加 500  $\mu$ l 小牛血清。24 h 后用 PBS 洗 3 遍,10% 的甲醛溶液固定 30 min,结晶紫染色 5 min,再用 PBS 清洗,20 倍光学显微镜下随机选取 5 个视野,进行细胞计数。每个实验组设 3 个重复孔,实验重复 3 次。

1.7 CCK-8 法检测 U87 细胞的增殖能力

参照 CCK-8 试剂盒说明书检测。取各组转染 48 h 后的细胞按说明书加入 CCK-8,以加入 CCK-8 为开始,每隔 1 h 在酶标仪上测定 450 nm 处的光密度( $D_{450}$ )值,共测 4 次。

1.8 统计学处理

应用 SPSS.10 统计学软件,组间差异采用两样本均数  $t$  检验,率的比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑胶质瘤组织及细胞株中 miR-29a 和 B7-H3 的表达

Real-time PCR 检测了 U87 和 U251 两种脑胶质瘤细胞株以及正常脑组织和不同病程脑胶质瘤组织中 miR-29a 以及 B7-H3 mRNA 的相对表达量。结果(图 1)显示,miR-29a 在正常组织中高表达,在脑胶质瘤组织和细胞株中低表达,并且与病理分级成负相关;相对地,B7-H3 mRNA 在正常组织中低表达,在脑胶质瘤组织和细胞株中高表达,与病理分级成正相关。由此表明,miR-29a 和 B7-H3 的表达可能与脑胶质瘤的病理进程相关。

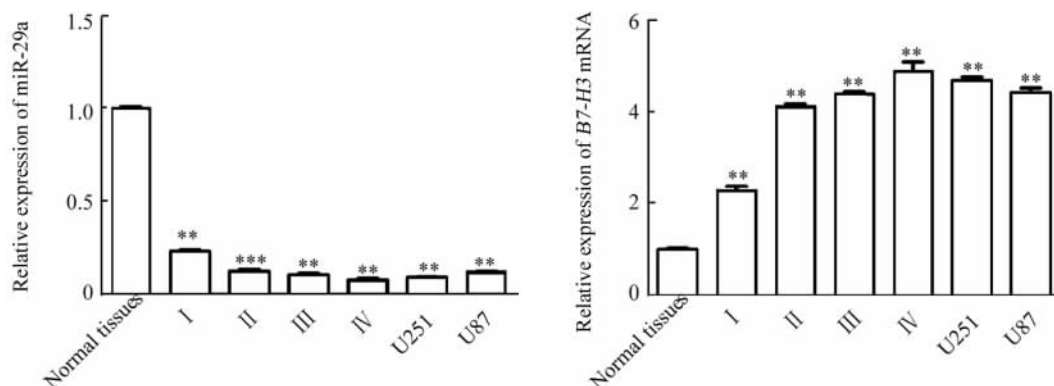


图 1 miR-29a ( A)和 B7-H3 mRNA( B)在脑胶质瘤组织和细胞中的相对表达

Fig.1 Relative expressions of MiR-29a( A ) and B7-H3 mRNA( B ) in the glioma tissues and glioma cells

\*\*  $P < 0.01$  vs normal tissues group

2.2 miR-29a 对 U87 细胞中 B7-H3 表达的调控

Real-time PCR 进一步检测了 miR-29a 对脑胶质瘤细胞中 B7-H3 表达可能的调控作用,结果

(图 2)显示,与阴性对照组( NC )及 U87 组相比,转染 miR-29a mimics 的 U87 细胞中 B7-H3 mRNA 的表达量明显降低(  $P < 0.05$  );而同时转染 miR-29a

mimics 和 miR-29a inhibitors 以及 miR-29a inhibitors 阴性对照组( NCI)的 U87 细胞中 B7-H3 mRNA 的表达量则无显著变化。结果表明,miR-29a 能够抑制脑胶质瘤细胞中 B7-H3 mRNA 的表达(图 2A)。在转染 24 h 后用蛋白酶 Pronase E 处理,以除去细胞表面原有表达的 B7-H3 蛋白,48 h 后检测 B7-H3 的蛋白水平,结果(图 2B)显示,miR-29a 能够显著下调 U87 上 B7-H3 的表达量( $P < 0.05$ )。实验表明,miR-29a 能抑制脑胶质瘤细胞上 B7-H3 蛋白水平的表达。

2.3 miR-29a 明显抑制 U87 细胞的体外侵袭能力,但是对 U87 的增殖并没有影响

Transwell 侵袭实验结果(图 3)显示,与 U87 细胞(图 3A)相比,转染 miR-29a mimics U87 细胞的穿出细胞数明显减少( $P < 0.05$ );而其他转染 NC(图 3B)、转染 NCI(图 3C)以及同时转染 miR-29a mimics 和 miR-29a inhibitors(图 3E)的 U87 细胞,其穿

出的细胞数则没有明显变化( $P > 0.05$ )。CCK-8 检测结果表明,转染 miR-29a mimics 对 U87 增殖无显著影响(图 3G)。结果表明,miR-29a 能够显著抑制 U87 的侵袭能力(图 3F)。

2.4 miR-29a 明显下调 U87 细胞 CXCR4 的表达

转染 48 h 后检测与细胞侵袭相关的趋化因子,流式细胞术检测结果(图 4)显示,转染 miR-29a mimics 的细胞相较于 U87 细胞中 CXCR4 表达有明显下调;用同样方法测出转染细胞上的 CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR7 的表达则无明显变化。采用 TargetsCan、Starbase、RNA22 和 miRtarbase 等软件预测了 miR-29a 与 CXCR4 的结合能力,发现 CXCR4 基因上并不存在 miR-29 的结合位点。实验结果表明,转染 miR-29a mimics 的细胞上 CXCR4 表达下调,但该效应是否与 miR-29a 下调 B7-H3 表达相关,还有待进一步探讨。

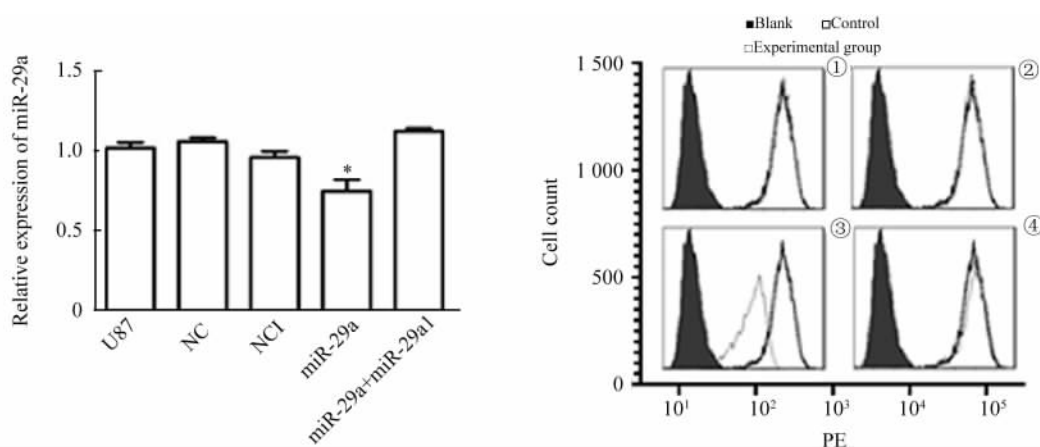


图 2 miR-29a 对脑胶质瘤细胞 B7-H3 mRNA( A)和 B7-H3 蛋白( B)表达的调控

Fig. 2 Regulation of miR-29a on expressions of glioma cell B7-H3 mRNA ( A) and B7-H3 protein( B)

- ① Compare the expressions of B7-H3 in U87 cells before and after transfection NC; ② Compare the expressions of B7-H3 in U87 cells before and after transfection NCI; ③ Compare the expressions of B7-H3 in U87 cells before and after transfection miR-29a mimics; ④ Compare the expressions of B7-H3 in U87 cells before and after transfection miR-29a mimics and miR-29a inhibitors

\*  $P < 0.05$  vs U87 cells or NC group

### 3 讨论

MicroRNA( miRNA)能够通过翻译水平上对靶基因的抑制或切割降解负向调控基因的表达,在控制发育进程<sup>[14-15]</sup>、细胞增殖、分化和凋亡<sup>[16]</sup>等过程中发挥重要作用,且 miRNA 表达与多种癌症相关,大约 52% 得到注解的 miRNAs 在基因组上定位于与肿瘤相关的脆性位点<sup>[17]</sup>。有研究<sup>[5]</sup>将一个重要 miRNA 家族的 miR29 作为调控免疫应答的重要

因子。miR29 家族( miR-29a、miR-29b-1、miR-29b-2 和 miR-29c)在人与鼠的器官中都能检测到表达,其中高表达于心脏和脑组织。其预测靶基因高达 6 000 个,目前已对 50 个靶基因进行了验证,其中 miR-29a 调控了一个重要的协同刺激分子 B7-H3。B7-H3 在脑胶质瘤细胞的侵袭和转移中起重要的调控作用<sup>[12]</sup>,但 B7-H3 在脑胶质瘤肿瘤组织中异常表达的调控机制目前尚未清楚。本研究发现,在脑胶质瘤组织中,miR-29a 表达越高,B7-H3 表达越下

降,并且与病理分级相关。本研究结果提示, B7-H3 的表达可能受到 miR-29a 的调控; 体外实验也进一

步验证了 miR-29a 能下调 B7-H3 的表达并影响肿瘤细胞的侵袭。

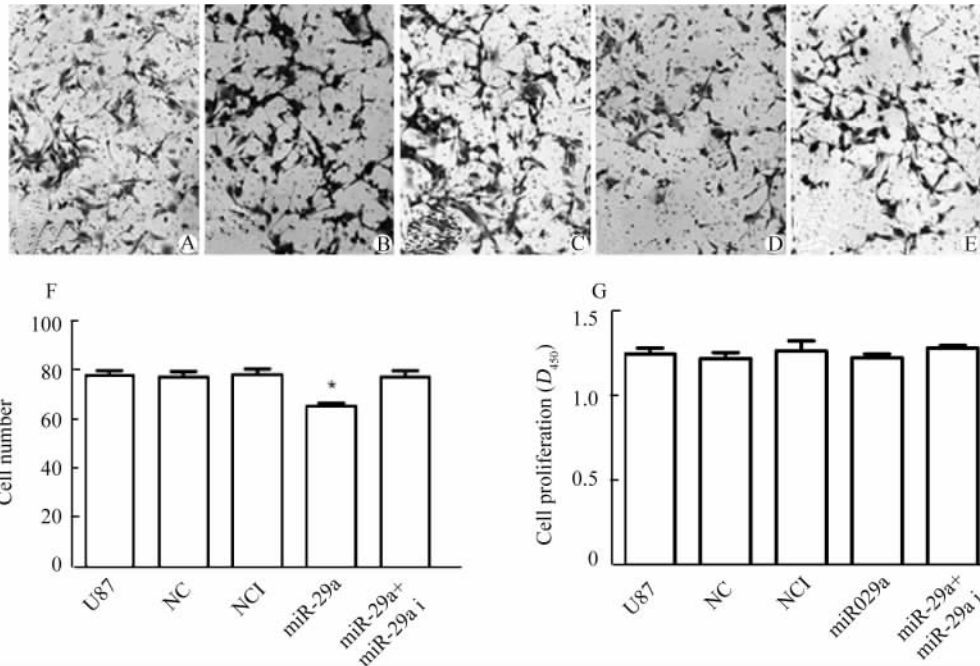


图3 miR-29a 对 U87 细胞侵袭(图 A~F)和增殖(图 G)的影响(A~E, ×200)

Fig. 3 Impact of miR-29a on the U87 cells invasion (A-F) and proliferation (G) (A-E, ×200)

A: U87 cells; B: U87 cells transfected with NC; C: U87 cells transfected with NCI; D: U87 cells transfected with miR-29a mimics; E: U87 cells transfected with miR-29a mimics and miR-29a inhibitors

\* P < 0.05 vs U87 cells

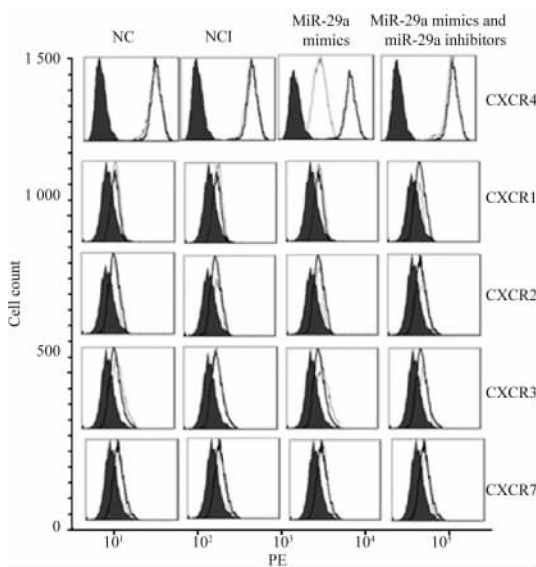


图4 转染细胞表面 CXCR4、CXCR1 和 CXCR2、CXCR3、CXCR7 的表达

Fig. 4 Expression of CXCR4, CXCR1, CXCR2, CXCR3, and CXCR7 on cells after transfection

化学趋化因子及其受体分子传递的信号在肿瘤向正常组织浸润过程中起着至关重要的作用<sup>[16]</sup>。本实验分析了 miR-29a 对趋化因子受体 CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4 和 CXCR7 表达的影响,发现只有 CXCR4 的表达受到显著下调。研究<sup>[17-18]</sup>表明, CXCR4 在多种肿瘤组织包括脑胶质瘤组织中高表达,并参与脑胶质瘤细胞的侵袭和血管生成,是高级别脑胶质瘤患者治疗的潜在靶点。本实验利用 Targetscan、Starbase、RNA22 和 miRtarbase 等软件预测了 miR-29a 与 CXCR4 的结合能力,发现 CXCR4 基因上并不存在 miR-29a 的结合位点。因此, CXCR4 表达的下调可能是由 B7-H3 的下调引起;实验表明, miR-29a 和 B7-H3 可能通过 CXCR4 信号通路来调控脑胶质瘤细胞的侵袭能力,但是这三者间的相互关系还有待于进一步的研究。

综上所述,本研究阐明了 miR-29a 对脑胶质瘤中 B7-H3 分子表达的调控,及其对细胞侵袭的抑制作用,并探讨了其可能的作用途径,为脑胶质瘤的临床诊断和靶向治疗提供了实验依据。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, et al. Changing paradigms-an update on the multidisciplinary management of malignant glioma [ J ]. *Oncologist*, 2006, 11( 2 ): 165-180.
- [ 2 ] Kleber S, Sancho-Martinez I, Wiestler B, et al. Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma [ J ]. *Cancer Cell*, 2008, 13( 3 ): 235-248.
- [ 3 ] Mengfeng Li, Jun Li, Lei Liu, et al. MicroRNA in human glioma [ J ]. *Cancers*, 2013, 5( 4 ): 1306-1331.
- [ 4 ] Low SY, Ho YK, Too HP, et al. MicroRNA as potential modulators in chemoresistant high-grade gliomas [ J ]. *Clin Neurosci*, 2014, 21( 3 ): 395-400.
- [ 5 ] Liston A, Papadopoulou AS, Danso-Abeam D, et al. MicroRNA-29 in the adaptive immune system: Setting the threshold [ J ]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69( 21 ): 3533-3541.
- [ 6 ] Prasad DV, Nguyen T, Li Z, et al. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells [ J ]. *J Immunol*, 2004, 173( 4 ): 2500-2506.
- [ 7 ] Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, et al. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104( 49 ): 19458-19463.
- [ 8 ] Sun Y, Wang Y, Zhao J, et al. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer [ J ]. *Lung cancer*, 2006, 53( 2 ): 143-151.
- [ 9 ] Zhou YH, Chen YJ, Ma ZY, et al. 4IgB7-H3 is the major isoform expressed on immunocytes as well as malignant cells [ J ]. *Tissue Antigens*, 2007, 70( 2 ): 96-104.
- [ 10 ] Wu CP, Jiang JT, Tan M, et al. Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12( 3 ): 457-459.
- [ 11 ] Roth TJ, Sheinin Y, Lohse CM, et al. B7-H3 ligand expression by prostate cancer: A novel marker of prognosis and potential target for therapy [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 16 ): 7893-7900.
- [ 12 ] Lemke D, Pfenning PN, Sahn F, et al. Costimulatory protein 4IgB7H3 drives the malignant phenotype of glioblastoma by mediating immune escape and invasiveness [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18( 1 ): 105-117.
- [ 13 ] Xu H, Cheung IY, Guo HF, et al. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: Potential implications for immune based therapy of human solid tumors [ J ]. *Cancer Res*, 2009, 69( 15 ): 6275-6281.
- [ 14 ] Li H, Kloosterman W, Fekete DM. MicroRNA-183 family members regulate sensorineural fates in the inner ear [ J ]. *J Neurosci*, 2010, 30( 9 ): 3254-3263.
- [ 15 ] Gessert S, Bugner V, Tecza A, et al. FMR1/FXR1 and the miRNA pathway are required for eye and neural crest development [ J ]. *Dev Biol*, 2010, 341( 1 ): 222-235.
- [ 16 ] Ting Y, Medina DJ, Strair RK, et al. Differentiation-associated miR-22 represses Max expression and inhibits cell cycle progression [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394( 3 ): 606-611.
- [ 17 ] Alling A, Seviqani C, Dumitric D, et al. Human micorRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101( 9 ): 2999-3004.
- [ 18 ] Ehtesham M, Min E, Issar NM, et al. The role of the CXCR4 cell surface chemokine receptor in glioma biology [ J ]. *Neurooncol*, 2013, 113( 2 ): 153-162.

[ 收稿日期 ] 2014 - 09 - 23

[ 修回日期 ] 2014 - 12 - 15

[ 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 ]。

现把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		