

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.008

## siRNA 沉默 *Sema 4D* 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及迁移的影响

陈武桂, 沈伟伟, 胡旭, 卓云云, 毛德举, 初同伟 (第三军医大学第二附属医院 骨科, 重庆 400037)

**[摘要]** **目的:** 观察 siRNA 沉默信号素 4D (semaphorin 4D, *Sema 4D*) 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移的影响。**方法:** 构建靶向 *Sema 4D* 基因的 siRNA, 脂质体法转染 MDA-MB-231 细胞系, 通过实时荧光定量-PCR、Western blotting 检测干扰效率, 筛选有效序列。siRNA 有效干扰 MDA-MB-231 细胞 *Sema 4D* 表达后, CCK-8 法及 Transwell 迁移实验检测细胞增殖及迁移能力的变化。**结果:** *Sema 4D* siRNA 转染 MDA-MB-231 细胞后 *Sema 4D* 的 (mRNA 及蛋白) 表达水平明显下降 ( $P < 0.05$ ), 其中以 siRNA-C 最明显 ( $P < 0.05$ ); 与空白、阴性对照组相比, siRNA-C 沉默 MDA-MB-231 细胞 *Sema 4D* 表达可明显抑制 MDA-MB-231 细胞增殖 (均  $P < 0.05$ ), 同时明显减弱细胞的迁移能力 [穿膜细胞数: ( $105.60 \pm 12.07$ ) vs ( $196.20 \pm 9.04$ )、( $186.40 \pm 6.69$ ) 个, 均  $P < 0.05$ ]。**结论:** siRNA 沉默 *Sema 4D* 可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 并抑制细胞迁移, 可作为乳腺癌基因治疗的潜在位点。

**[关键词]** siRNA; 信号素 4D; 乳腺癌; 增殖; 迁移

**[中图分类号]** R737.9; Q785 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2015)04-0454-05

## Effects of siRNA-mediated Semaphorin 4D silencing on proliferation and migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells

Chen Wugui, Shen Weiwei, Hu Xu, Zhuo Yunyun, Mao Deju, Chu Tongwei (Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Third Medical University, Chongqing 400037, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of siRNA-mediated Semaphorin 4D (*Sema 4D*) gene silencing on the proliferation and migration of breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods:** Small interference RNA targeting different regions of *Sema 4D* gene were transfected into MDA-MB-231 cells by lipofectamine 2000. The most effective siRNA in knockdown *Sema 4D* was screened by using quantitative PCR and Western blotting. The changes of cell proliferation and migration ability after *Sema 4D* knockdown were examined by CCK-8 and transwell assays. **Results:** MDA-MB-231 cells transfected with *Sema 4D* siRNA had significantly decreased expression of *Sema 4D*, especially in these transfected with siRNA-C ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank and scrambled siRNA transfection groups, siRNA-C transfection significantly inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells ( $P < 0.05$ ) and their migration ability (numbers of migration cell: [ $196.20 \pm 9.04$ ] and [ $186.40 \pm 6.69$ ] vs [ $105.60 \pm 12.07$ ],  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Down-regulation of *Sema 4D* by siRNA significantly inhibits the proliferation and migration of MDA-MB-231 cells, suggesting *Sema 4D* is a novel target for breast cancer therapy.

**[Key words]** siRNA; semaphorin 4D; breast cancer; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(4): 454-458]

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 乳腺癌发病率呈逐年升高趋势, 据预测 2015 年中国乳腺癌发病率城市女性为 53.87/10 万 (发病 185 585 例), 农村女性为 40.14/10 万 (发病 132 432 例)<sup>[1]</sup>。近年来针对乳腺癌的靶向治疗, 取得了广泛应用及显著疗效。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术因其特有的低毒性、特异性、高效性, 逐渐成为乳腺癌个

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No. 81271979)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81271979)

**[作者简介]** 陈武桂 (1988 -), 男, 福建省福安市人, 硕士生, 主要从事肿瘤骨转移的基础与临床研究, E-mail: wugui\_chen@sina.com

**[通信作者]** 初同伟 (Chu Tongwei, corresponding author), E-mail: chtw@sina.com

体化基因研究与治疗的新手段<sup>[2]</sup>,其中 siRNA 设计简易、操作简便、特异性强、易获得高水平的瞬时沉默效果,且对细胞或组织的不良反应较小,相对于 shRNA 更有希望用于疾病治疗与诊断<sup>[3]</sup>。*Bcl-2*、*P53*、低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, *HIF*)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*)等多种癌症相关基因位点已被选择作为 RNAi 研究与治疗的靶点<sup>[4-6]</sup>。信号素 4D(*semaphorin 4D*, *Sema 4D*)属于信号素蛋白家族,具有调节轴突生长、免疫反应、细胞黏附、迁移、骨重塑等多种生理功能<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8-11]</sup>发现,其在前列腺癌、乳腺癌、头颈鳞癌、结肠癌、肺癌等多种恶性肿瘤中高表达,与肿瘤的转移、血管生成等密切相关,与患者预后及生活质量呈负相关。本文通过 siRNA 瞬时沉默乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 *Sema 4D* 表达,观察其对乳腺癌细胞增殖、迁移等生理功能的变化,探讨 *Sema 4D* 作为乳腺癌基因诊疗靶点的可能性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂与器材

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系来自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。胎牛血清(fetal blood serum, FBS)、高糖 DMEM 购自美国 Gibco 公司;RNAiso Plus、PrimeScript<sup>®</sup> 反转录试剂盒和荧光染料 SYBR<sup>®</sup> Premix EX Taq<sup>™</sup> II 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;小鼠抗人 *Sema 4D* 多克隆抗体购自美国 BD 公司,小鼠抗人 GADPH 单克隆抗体、小鼠抗人 Tublin 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗、细胞组织快速裂解液(RIPA)、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、结晶紫、CCK-8 试剂盒购自中国碧云天生物技术研究;聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜、Transwell 小室(孔径 8  $\mu\text{m}$ )购自德国 Millipore 公司,转染试剂 Lipofectanme<sup>™</sup> 2000 购自美国 Invitrogen 公司。

### 1.2 siRNA 序列设计合成

以人 *Sema 4D* mRNA 全长序列(XM\_009456869)为 RNAi 的靶区设计 3 条 *Sema 4D* siRNA 序列,同时设计阴性荧光对照(FAM)、阳性对照(*GADPH* siRNA)及阴性对照(negative control, NC)序列,由上海吉玛制药技术有限公司合成,具体序列见表 1。干粉 siRNA 用 DEPC 水稀释成 20  $\mu\text{mol/L}$ , -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

表 1 用于合成 siRNA 的寡核苷酸序列

Tab. 1 Oligonucleotide sequence for synthesis of siRNA

| siRNA       | siRNA sequences(5'→3')   |
|-------------|--|
| siRNA-A     | Sense:5'-GCCCAGGUUAAUCAAGAAATT-3'<br>Antisense: 5'-UUUCUUGAUUAACCUUGGCTT-3'      |
| siRNA-B     | Sense:5'-GCCCUACUAAUUGGGAAGATT-3'<br>Antisense: 5'-UCUUCCAAUUAGUUAGGGCTT-3'      |
| siRNA-C     | Sense:5'-GGCCUGAGGACCUUGCAGAAGATT-3'<br>Antisense:5'-UCUUCUGCAAGGUCCUCAGGCCTT-3' |
| siRNA-FAM   | Sense:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'<br>Antisense: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'      |
| siRNA-NC    | Sense:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'<br>Antisense: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'      |
| siRNA-GADPH | Sense:5'-GUAUGACAACAGCCUCAAGTT-3'<br>Antisense: 5'-CUUGAGGCUGUUGUCAUACTT-3'      |

FAM:Fluorescein; NC:Negative control

### 1.3 细胞培养及 siRNA 转染

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞采用含 10% FBS、100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素、100 U/mL 青霉素的高糖 DMEM 培养,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。取对数生长期 MDA-MB-231 细胞,按  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔板。次日按 Lipofectanme<sup>™</sup> 2000 试剂说明书进行 siRNA 转染。细胞分为 5 组:空白对照组(control)、阴性对照组(siRNA-NC)、siRNA-A、siRNA-B、siRNA-C。转染后 48 h 提取 mRNA,72 h 提取蛋白检测干扰效率。

### 1.4 确定 siRNA 的最佳转染浓度

取对数生长期 MDA-MB-231 细胞,按  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔板。24 h 后按 0、10、25、50、75、100、150、200 nmol/L 浓度梯度转染 siRNA-FAM,24 h 后换液,荧光显微镜观察下荧光强度及数量,确定适宜转染浓度。按 0、25、50、100、200 nmol/L 浓度梯度转染阳性对照 siRNA-GADPH,72 h 后提取总蛋白质,以 Tublin 为内参,Western blotting 检测 GADPH 蛋白表达水平,运用 Image J 图像分析软件分析条带灰度值,以目的蛋白灰度值与内参灰度值之比代表相对表达量,结合荧光及阳性对照结果确定适宜转染浓度。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 检测 siRNA 转染对 MDA-MB-231 细胞中 *Sema 4D* mRNA 表达的影响

siRNA 转染 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,用

RNAiso Plus 提取细胞总 RNA, 分别应用 Prime-Script<sup>®</sup> 反转录试剂盒和荧光染料 SYBR<sup>®</sup> Premix EX Taq<sup>™</sup> II 试剂盒进行反转录和目的片段的扩增。内参 *GADPH* 上游引物序列为: 5'-CCAGCAAGAGCA-CAAGAGGAAGAG-3', 下游引物序列为: 5'-GGTC-TACATGGCAACTGTGAGGAG-3'; *Sema 4D* 基因上游引物序列: 5'-GAGAAGCAGCATGAGGTGATTGGA-3', 下游引物: 5'-GGATGTAGTTGAGGCACTCT-GTCTG-3', 每组均设 3 个重复孔。PCR 反应条件参照 TaKaRa PCR 试剂盒说明书, 以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示目的基因 mRNA 的相对表达水平。

#### 1.6 Western blotting 检测 *Sema 4D* 蛋白表达水平

siRNA 转染 MDA-MB-231 细胞 72 h 后, RIPA 裂解液各组细胞收集总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取等量总蛋白(50  $\mu$ g)行 8% SDS-PAGE, 蛋白分离后电转印至 PVDF 膜, 5% BSA 溶液室温封闭 1 h, 加入一抗(*Sema 4D* 抗体 1:800 稀释, *GADPH* 1:1 000 稀释)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日 TBST 漂洗 10 min  $\times$  3, 辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 2 h, TBST 漂洗 10 min  $\times$  3, ECL-plus 试剂盒化学发光法显色, 凝胶成像仪显像, 运用图像分析软件 Image J 分析条带灰度值, 以目的蛋白灰度值/内参 *GADPH* 灰度值比值代表目的蛋白的相对表达量。

#### 1.7 CCK-8 法检测 *Sema 4D* siRNA 转染对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

实验分为对照组、siRNA-NC 组、siRNA-4D 组 (siRNA-C), 取对数期生长的 MDA-MB-231 细胞, 按 2 000 个/孔接种于 96 孔板, 每孔加入 100  $\mu$ l 培养基, 24 h 后按前述方法进行 siRNA 转染。分别在转染后 24、48、72 h 加入 CCK-8 原液(10  $\mu$ l/孔), 37  $^{\circ}$ C 培养 3 h, 用酶标仪检测 450 nm 下光密度(*D*)值。每组设 3 个复孔。细胞增殖率(%) = (实验组 *D* 值/对照组 *D* 值)  $\times$  100%。

#### 1.8 Transwell 迁移实验检测 *Sema 4D* siRNA 对 MDA-MB-231 细胞纵向迁移能力的影响

实验分为对照组、siRNA-NC 组、siRNA-4D 组 siRNA-4D 组 (siRNA-C), 将 MDA-MB-231 细胞按  $2.5 \times 10^5$  个/孔接种于六孔板, 按前述方法转染各组 siRNA。收集转染后 72 h 各组 MDA-MB-231 细胞, 取  $5 \times 10^4$  个细胞无血清培养基稀释至 800  $\mu$ l, 接种至 Transwell 小室(12 孔)上室, 下室加入 1 ml 含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液。根据预实验结果培养 24 h 后取出小室, PBS 漂洗 2 次, 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, 用棉签擦去上层未迁移细胞, 0.1% 结晶紫染色液染色 15 min, 自来水冲洗 3 次,

倒置相差显微镜下拍照。高倍镜(100  $\times$ )下随机选 4 个视野对细胞进行计数, 以迁移细胞均数比较纵向迁移能力。

#### 1.9 统计学处理

所有实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 18.0 统计学软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 *LSD-t* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 测定 siRNA 转染效率及最佳转染浓度

siRNA 转染浓度及转染效率因不同细胞系敏感性、转染条件的差异而有所差别, 因此需要通过阴性荧光对照 (siRNA-FAM) 及阳性对照 (*GADPH*-siRNA) 来摸索最适宜的实验条件。siRNA-FAM 转染 MDA-MB-231 细胞 24 h 后, 荧光显微镜观测结果 (图片未展示) 显示荧光强度与 siRNA-FAM 浓度呈正相关, 至少需要 25 nmol/L 浓度可见较明显荧光 (约 30%), 在 50 nmol/L 浓度下约 90% 细胞可见荧光。但是随着 siRNA 浓度及转染试剂浓度的增高, 细胞状态易发生变异, 凋亡细胞增多。另外利用 *GADPH* siRNA 作为阳性对照转染 MDA-MB-231 细胞后进行 Western blotting (图片未展示) 检测 *GADPH* 表达, 发现转染 siRNA 后可明显降低 *GADPH* 表达, 与浓度呈正相关, 50 nmol/L 条件下干扰效率为 (35.71  $\pm$  5.42)%, 100 nmol/L 浓度下干扰效率为 (51.65  $\pm$  7.59)%。结合转染效率及细胞状态, 选择 100 nmol/L 作为最佳 siRNA 转染浓度进行下一步实验。

#### 2.2 *Sema4D* siRNA 转染降低乳腺癌细胞 *Sema4D* 表达

siRNA 转染 MDA-MB-231 细胞 48 h 后荧光实时定量-PCR 检测 *Sema 4D* mRNA 表达 (图 1A) 显示, *Sema4D* siRNA 组较空白组不同程度降低 ( $F = 56.87, P < 0.05$ ), mRNA 相对表达量分别为 siRNA-A (69.50  $\pm$  2.95)%、siRNA-B (57.70  $\pm$  1.91)%、siRNA-C (35.40  $\pm$  2.40)%, 其中以 siRNA-C 组的 *Sema 4D* mRNA 相对表达量下降较其他两组更为明显 ( $P < 0.05$ ), 而 siRNA-NC 组与空白组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。Western blotting (图 1B) 显示, siRNA 转染后各组相对 siRNA-NC 及空白组 *Sema 4D* 蛋白表达水平不同程度下调 ( $F = 215.58, P < 0.05$ ), 沉默效率分别为 siRNA-A (46.58  $\pm$  6.06)%、siRNA-B (51.75  $\pm$  4.24)%、siRNA-C (64.84  $\pm$  2.89)%, 而 siRNA-NC 组与空白组之间无

明显差异 ( $P > 0.05$ )。以上结果表明,3 条 *Sema 4D* mRNA 对 MDA-MB-231 细胞 *Sema 4D* 表达均具有沉默效果,其中 siRNA-C 干扰效率最高,因此选取 siRNA-C 序列作为有效序列( siRNA-4D 组)进行下一步实验。

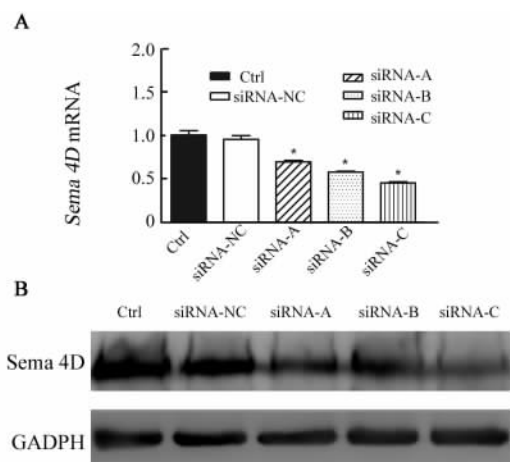


图 1 *Sema 4D* siRNA 在 MDA-MB-231 细胞中的干扰效率  
Fig. 1 Interference efficiency of *Sema 4D* siRNA in MDA-MB-231 cells

A: The expression levels of *Sema 4D* mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative-PCR; B: The protein expression levels of *Sema 4D* were determined by Western blotting, GAPDH was used as control  
\*  $P < 0.05$  vs the control group ( $n = 3$ )

2.3 *Sema 4D* 沉默抑制 MDA-MB-231 细胞增殖  
CCK-8 法检测结果显示(图 2)在 24、48、72 h

siRNA-4D 组细胞增殖率分别为(  $80.22 \pm 9.11$  )%、(  $62.86 \pm 7.62$  )%、(  $53.38 \pm 4.80$  )%,均明显低于空白组(F 值分别为(  $3.68$ 、 $16.47$ 、 $73.16$ 、 $P < 0.05$  )及 siRNA-NC 组,而 siRNA-NC 组与空白对照组相比无明显差别 ( $P > 0.05$ )。

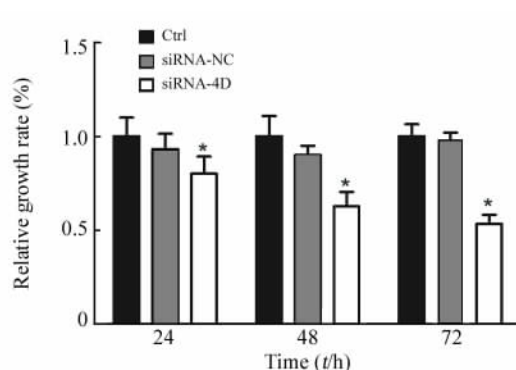


图 2 *Sema 4D* siRNA 转染抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖  
Fig. 2 Proliferation of MDA-MB-231 cells were suppressed by *Sema 4D* siRNA transfection  
\*  $P < 0.05$  vs the Ctrl group ( $n = 3$ )

2.4 siRNA 沉默 *Sema4D* 抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移

Transwell 迁移实验(图 2)显示,siRNA-4D 组穿过滤膜的细胞数显著少于对照组及 siRNA-NC 组 [ (  $105.60 \pm 12.07$  ) vs (  $196.20 \pm 9.04$  )、(  $186.40 \pm 6.69$  )个,  $P < 0.05$  ],纵向迁移能力明显减弱,空白对照组与 *Sema 4D*-NC 组间相比无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

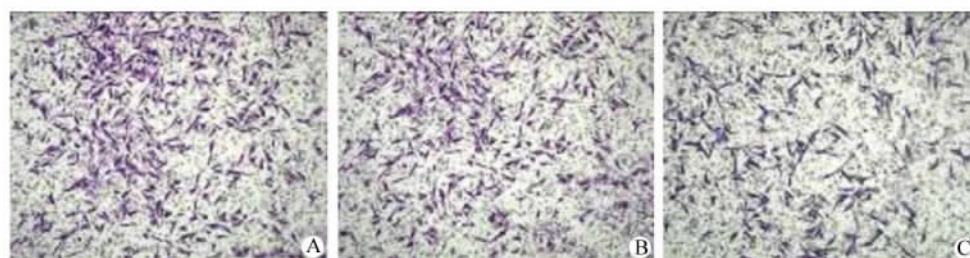


图 3 *Sema 4D* siRNA 转染降低 MDA-MB-231 细胞的迁移能力 (  $100 \times$  )  
Fig. 3 Migration ability of MDA-MB-231 cells were inhibited by *Sema 4D* siRNA transfection (  $100 \times$  )  
A: Ctrl; B: siRNA-NC; C: siRNA-4D

### 3 讨论

*Sema 4D* 属于 Semaphorins( Semas )蛋白家族,是近年发现的新型肿瘤相关因子,包括 7 个亚型、近

30 种蛋白,除在神经系统发挥重要作用外,在免疫系统、骨重塑、癌症等也发挥着广泛的生理与病理功能<sup>[7,12]</sup>。本课题组前期实验发现,*Sema 4D* 在乳腺癌高转移细胞系 MDA-MB-231 的表达高于低转移

细胞系 MCF-7, 推测 *Sema 4D* 可能与乳腺癌的恶性行为相关。以往的研究<sup>[13-14]</sup>表明, *Sema 4D* 在肿瘤微环境中可以促进内皮细胞的迁移, 促进肿瘤转移及血管生成, 通过基因敲除等方法可以达到抑制肿瘤生长及血管生成的效果, 未见 *Sema 4D* 对肿瘤细胞增殖、迁移直接影响的相关文献报道。

本研究利用 siRNA 瞬时干扰技术, 沉默乳腺癌细胞 *Sema 4D* 的表达, 观察其对增殖与迁移的影响。从多条设计序列中筛选了最有效序列, 其 72 h 蛋白水平干扰效果可达 65%。siRNA 沉默 *Sema 4D* 表达后, 转染组乳腺癌细胞的增殖与迁移明显受到抑制, 表明 *Sema 4D* 在乳腺癌发生发展中不但可以促进血管生成、改善肿瘤生长环境, 同时促进肿瘤细胞自身的增殖与迁移, 有望成为乳腺癌基因靶向治疗的潜在治疗靶点。

总而言之, 本实验筛选了有效的 *Sema 4D* siRNA 干扰序列, 同时 siRNA 靶向 *Sema 4D* 沉默抑制乳腺癌细胞的增殖与迁移, 表明以 *Sema 4D* 为靶点的 siRNA 可成为乳腺癌诊疗与研究的新手段。特异性分子靶向治疗与传统化疗方案相结合, 可降低化疗剂量, 提高敏感性, 降低不良反应, 提升治疗效果, 有望成为乳腺癌治疗的有效辅助治疗手段<sup>[15-16]</sup>。但是因为 siRNA 的短效性、干扰效率不稳定等缺陷, 对于 *Sema 4D* 沉默后远期的效果与相关机制研究则需要建立 sh-RNA 稳定干扰细胞系进行深入研究。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 李霓, 郑荣寿, 张思维, 等. 中国城乡女性乳腺癌发病趋势分析和预测 [ J ]. 中华预防医学杂志, 2012, 46( 8 ): 703-707.  
 [ 2 ] Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Liposomal siRNA nano-carriers for cancer therapy [ J ]. Adv Drug Deliv Rev, 2014, 66: 110-116.  
 [ 3 ] 田晓琦, 牛响, 张同先. RNA 干扰在乳腺癌靶向治疗中的研究进展 [ J ]. 中华实验外科杂志, 2013, 30( 11 ): 2470-2471.  
 [ 4 ] Salva E, Turan SO, Eren F, et al. The enhancement of gene si-

lencing efficiency with chitosan-coated liposome formulations of siRNAs targeting HIF-1 and VEGF [ J ]. Int J Pharm, 2014, 478( 1 ): 147-154. .  
 [ 5 ] Rieber M, Strasberg-Rieber M. P53 inactivation decreases dependence on estrogen/ERK signalling for proliferation but promotes EMT and susceptibility to 3-bromopyruvate in ER+ breast cancer MCF-7 cells [ J ]. Biochem Pharmacol, 2014, 88( 2 ): 169-177.  
 [ 6 ] Jagani HV, Josyula VR, Hariharapura RC, et al. Nanoformulation of siRNA silencing Bcl-2 gene and its implication in cancer therapy [ J ]. Arzneimittelforschung, 2011, 61( 10 ): 577-586.  
 [ 7 ] Jongbloets BC, Pasterkamp RJ. Semaphorin signalling during development [ J ]. Development, 2014, 141( 17 ): 3292-3297.  
 [ 8 ] Eissler N, Rolny C. The role of immune semaphorins in cancer progression [ J ]. Exp Cell Res, 2013, 319( 11 ): 1635-1643.  
 [ 9 ] Ch'ng ES, Kumanogoh A. Roles of *Sema 4D* and plexin-B1 in tumor progression [ J ]. Mol Cancer, 2010, 9: 251.  
 [ 10 ] Gabrovskva PN, Smith RA, Tiang T, et al. Semaphorin-plexin signalling genes associated with human breast tumourigenesis [ J ]. Gene, 2011, 489( 2 ): 63-69.  
 [ 11 ] Ch'ng E, Tomita Y, Zhang B, et al. Prognostic significance of CD100 expression in soft tissue sarcoma [ J ]. Cancer, 2007, 110( 1 ): 164-172.  
 [ 12 ] Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: Versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis [ J ]. Nat Rev Cancer, 2008, 8( 8 ): 632-645.  
 [ 13 ] Zhou H, Binmadi NO, Yang Y-H, et al. Semaphorin 4d cooperates with VEGF to promote angiogenesis and tumor progression [ J ]. Angiogenesis, 2012, 15( 3 ): 391-407.  
 [ 14 ] Basile JR, Afkhami T, Gutkind JS. Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway [ J ]. Mol Cell Biol, 2005, 25( 16 ): 6889-6898.  
 [ 15 ] 陈枚, 卢先州, 张树友. RNA 干扰 DNA 修复提高肿瘤细胞的放疗敏感性 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21( 2 ): 227-230.  
 [ 16 ] Guo W, Chen W, Yu W, et al. Small interfering RNA-based molecular therapy of cancers [ J ]. Chin J Cancer, 2013, 32( 9 ): 488-493.

[ 收稿日期 ] 2015 - 02 - 05 [ 修回日期 ] 2015 - 05 - 15  
 [ 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 3358 - 93《统计学术语》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 ) 卡方检验用希腊文小写  $\chi^2$ ; ( 7 ) 相关系数用英文小写  $r$ ; ( 8 ) 自由度用希腊文小写  $\nu$ ; ( 9 ) 样本数用英文小写  $n$ ; ( 10 ) 概率用英文大写  $P$ ; ( 11 ) 以上符号  $\bar{x}$ 、 $s$ 、 $s_x$ 、 $t$ 、 $F$ 、 $\chi^2$ 、 $r$ 、 $\nu$ 、 $n$ 、 $P$  均为斜体。请作者注意遵照执行。

( 本刊编辑部 )