

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.012

P53 通过促进 miR-145 的表达抑制肺腺癌 A549 细胞的干细胞特性

夏凡,王仪民,王辉(解放军第85医院肺科,上海200235)

[摘要] **目的:**探讨 P53 抑制肺腺癌 A549 细胞干细胞特性及其机制。**方法:**收集 2014 年 3 月至 2015 年 12 月解放军第 85 医院胸外科手术切除的 30 例非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)患者癌组织及癌旁组织,采用 Real-time PCR 检测 NSCLC 组织和癌旁组织中 miR-145 的表达。构建人 P53 基因的真核表达载体(pcDNA3.1-P53)和突变载体 [pcDNA3.1-P53R273H(CGT-CAT)],设计靶向 P53 基因的 siRNA,分别转染 A549 细胞;细胞分为对照转染组(Vector 或 NC-siRNA)和实验组(Flag-P53 或 P53-siRNA);Western blotting 检测 P53 蛋白过表达和干扰效率,Real-time PCR 检测 OCT4 和 miR-145 的表达,荧光双报告基因和 Western blotting 技术检测证实 A549 细胞中干细胞多能性调节基因(OCT4)为 miR-145 的靶标分子。**结果:**NSCLC 组织中 miR-145 的表达水平明显低于癌旁组织[(2.31 ± 0.13) vs (3.51 ± 0.27), $P < 0.01$];P53 明显促进 A549 细胞中 miR-145 的表达[(1.84 ± 0.14) vs (1.00 ± 0.00), $P < 0.01$];miR-145 mimics 显著抑制 A549 细胞中 pGL3-OCT4-3'-UTR 活性($P < 0.01$)和 OCT4 蛋白表达水平($P < 0.05$),而转染 miR-145 抑制剂可进一步增加 OCT4 表达水平,且逆转 P53 对 A549 细胞的干细胞特性的抑制作用。**结论:**P53 通过促进 miR-145 表达下调 OCT4 表达,进而明显抑制 A549 细胞的干细胞特性,该结果为肺腺癌的临床诊断和治疗提供了新途径。

[关键词] P53;miR-145;干细胞多能性调节基因(OCT4);非小细胞肺癌;肺腺癌 A549 细胞;干细胞特性

[中图分类号] R730.54;R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)01-0058-06

P53 inhibits stem cell characteristics of lung adenocarcinoma A549 cells through regulating miR-145 expression

XIA Fan, WANG Yimin, WANG Hui(Department of Respiratory Disease, the 85th Hospital of PLA, Shanghai 200235, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the mechanism of P53 regulating stem cell characteristics of lung adenocarcinoma A549 cells. **Methods:** Carcinoma tissues and relevant para-carcinoma tissues from 30 non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients who underwent surgical resection at No. 85 Military Hospital from March 2014 to December 2015 were collected for this study; Levels of miR-145 in collected tissues were determined by Real-time PCR. Human P53 gene eukaryotic expression vector (pcDNA3.1-P53), mutant vector [pcDNA3.1-P53R273H(CGT-CAT)] and siRNA that targeting P53 (P53-siRNA) were constructed and transfected into A549 cells. The cells were divided into transfection group (vector or NC-siRNA) and experiment group (Flag-P53 or P53-siRNA). Western blotting was used to examine P53 protein over-expression and interference efficiency; Real-time PCR was used to determine the expressions of miR-145 and OCT4. Dual-luciferase reporter and Western blotting were used to confirm that miR-145 directly targeted OCT4 in A549 cells. **Results:** Compared with para-carcinoma tissues, miR-145 was obviously decreased in NSCLC samples ([2.31 ± 0.13] vs [3.51 ± 0.27], $P < 0.01$), and P53 significantly promoted miR-145 expression in A549 cells ([1.84 ± 0.14] vs [1.00 ± 0.00], $P < 0.01$); miR-145 mimics significantly inhibited the activity of pGAL3-OCT4-3'-UTR ($P < 0.01$) and protein expression of OCT4 ($P < 0.05$) in A549 cells. Additionally, miR-145 inhibitor transfection further increased OCT4 expression and reversed the inhibitory effect of P53 on stem cell characteristics of A549 cells. **Conclusion:** P53 down-regulates OCT4 expression by promoting miR-145 expression, and further suppresses the stem cell characteristics of A549 cells, which might be a new and safe treatment approach for NSCLC.

[Key words] P53; miR-145; OCT4; non-small cell lung carcinoma (NSCLC); A549 cell; stem cell characteristic

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(1): 58-63. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.012]

[作者简介] 夏凡(1978-),男,博士生,主治医师,主要从事肺部肿瘤及肺结核分子生物学的研究,E-mail:xf2000@hotmail.com

[通信作者] 王辉(WANG Hui, corresponding author),硕士,副主任医师,主要从事气道性疾病和肺肿瘤的研究,E-mail:wanghui-sh@sohu.com

非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)已位居我国城市人口恶性肿瘤死亡原因的第 1 位^[1-2]。P53 是迄今临床发现与肿瘤发病相关性最高的抑癌基因,该基因突变是肺癌中发生频率最高的遗传改变,其功能失活对肺癌的发生起重要作用^[3-5]。低分化、细胞异质性是大部分侵袭性和致死性癌症的重要特征,这些特征是由于存在干细胞样癌细胞所致^[6]。有关研究^[7-9]表明,P53 可以通过经典的 P53-P21 信号途径或通过调节 miRNAs 抑制胚胎干细胞特性,另外 P53 突变也可使肺癌细胞重新获得干细胞样“编程”^[10]。miR-145 在前列腺癌^[11-12]、膀胱癌^[13]、结直肠癌^[14-15]、卵巢癌^[16]和 B 细胞恶性肿瘤^[17]等癌组织中低表达。P53 可以诱导 miR-145 表达,进而具有抑制癌细胞增殖的功能^[18]。在人胚胎干细胞分化过程中,过度表达的 miR-145 能够通过靶向调控 OCT4 而抑制干细胞的多能性^[18]。在癌细胞中,miR-145 通过靶向调控 OCT4 的表达,破坏人肺癌干细胞增殖活性^[19]。P53 如何抑制 NSCLC 干细胞特性,以及 P53 是否能够通过调控 miR-145 影响干细胞特性的机制尚不清楚。本课题选用肺腺癌 A549 细胞研究 P53 通过调控 miR-145 表达抑制肺癌干细胞特性的机制,探讨 P53 调控的 miR-145 与肺癌干细胞之间的关系,为肺癌的诊治提供新思路。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集 2014 年 3 月至 2015 年 12 月解放军第 85 医院胸外科手术切除的 30 例 NSCLC 组织标本,其中男性 21 例、女性 9 例,中位年龄 51.9 岁(40 ~ 70 岁)。同时取距离癌灶边缘 3 ~ 5 cm 的相应癌旁组织标本作为阴性对照。所选患者术前 3 ~ 5 个月内均未行任何抗肿瘤治疗,并均于术后有确切的病理学诊断。本课题全部研究方案及程序经本院伦理委员会审查批准,试验中涉及到人肺腺癌组织标本的收集均与患者签署知情同意书。

1.2 细胞系、主要试剂与仪器

人肺腺癌上皮细胞系 A549 和人肾上皮细胞系 293T 均购自中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所,分别用含有 10 % 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液,置 37 °C、5 % CO₂ 饱和湿度培养箱中传代培养。待单层细胞生长达到 80% 时,用 0.25% 胰酶消化,收集细胞备用。

胎牛血清、DMEM 和 0.25% 的胰酶、TRIzol 试

剂、Lipofectamin™2000 均购自 Invitrogen 公司,荧光基因报告载体 pGL3-Luciferase Reporter 购自 Ambion 公司,内参载体 pRL-TK 和双荧光报告检测试剂均购自 Promega 公司,兔抗人 P53 和 OCT4(Cell Signaling Technology, USA)均购自上海优宁维生物科技有限公司,P53-siRNA、对照 siRNA(Ctrl-siRNA)、miRNA mimics 及抑制剂均购自上海吉玛生物技术有限公司,转染用 jetPRIME 购自达科为生物科技有限公司。多功能酶标仪(Synergy™2)购自 BioTek 公司,运行及分析软件为 Gen5,荧光定量 PCR 仪(LightCycler 480 II)购自 Roche 公司,其运行及数据分析软件为 Lightcycler3,化学发光仪购自 BD 公司。

1.3 pcDNA3.1-P53 和 pcDNA3.1-P53R273H (CGT-CAT)突变载体构建及转染 A549 细胞

扩增人 P53 基因的引物,P53-F-EcoR I :5'-ccg gaattc ATGGAGGAGCCGCAG TCAGATCCTAGCGT-3' 和 P53-R-Xho I :5'-ccg ctcgag GTCTGAGTCAGGCC TTCTGTCTTGAACA-3'。PCR 反应扩增条件为 95 °C 2 min,95 °C 30 s,58 °C 30s,72 °C 2 min,35 个循环后 72 °C 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳,回收 1 182 bp 目的片段。将真核表达载体 pcDNA3.1-Flag 和人 P53 基因克隆 PCR 胶回收产物分别用 EcoR I 和 Xho I 双酶切,连接、转化、鉴定和测序,命名为 Flag-P53。构建 P53R273H (CGT-CAT)突变表达载体,引物 P53-Mu-F:5'-AACAGCTTTGAGGTG CAT GTTTGTGCCTGTCCT-3' 和 P53-Mu-R:5'-AGGACAGGCACAAACATGCACCTCAAAGCTGTT-3',命名为 Flag-P53 (R273H)。构建突变表达载体,利用上述设计构建的 P53 R273H (CGT-CAT)突变表达载体的上下游引物,进行环行 PCR 反应,扩增条件为:95 °C 2 min,95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 8 min,35 个循环后 72 °C 10 min。取产物 9 μl 加入 1 μl Dpn I 限制内切酶,在 37 °C 消化 2 h 后,转化、挑克隆、提质粒、测序验证。

真核载体转染实验分组:(1)对照组:pcDNA3.1-Flag 空载体(Vector);(2)实验组:pcDNA3.1-P53(P53-Flag);(3)突变组:pcDNA3.1-P53R273H (P53R273H-Flag)。P53-siRNA 转染实验分组:对照组(NC-siRNA)、实验组(P53-siRNA)。miRNA 转染实验分组:对照组(Ctrl-mimics)、实验组(miR145-mimics)和 miR145-抑制剂组。

将 5×10^4 个细胞铺到 24 孔板中,37 °C、5 % CO₂ 条件下培养,12 h 后按照 jetPRIME 转染试剂说明书操作,将真核表达载体、miR145-mimics 或 Ctrl-mimics 瞬时转染到 A549 细胞中,用于后续实验。

1.4 双萤光素酶报告基因法检测 miR145 转染 293T 细胞后 OCT4 3'-UTR 的报告基因活性

以 A549 细胞的 cDNA 为模板,设计引物扩增出野生型 OCT 3'-UTR 序列,并以 3'-UTR 野生型载体为模板构建带突变的 OCT4 3'-UTR 报告载体(miR-145 识别位点序列 AACTGG 突变为 TTGACC)。PCR 扩增引物:OCT4-UTR-Kpn I: 5'-cggggtacc GGTGCCTGCCCTTCTAGGAATG-3'和 OCT4-UTR-Xho I: 5'-ccgctcgag TAAGTGTGTCTATCTACTGTG-3';引物 OCT4(mu)3'-UTR, F:5'-GGGAGTTTGGGGCTTGACCTTGAGGGAAGGTGA-3' 和 R: 5'-TCACCTTCCCTCCAAGGTCAAGCCCCAAACTCCCCT-3'。

293T 细胞报告基因检测实验分组:(1)对照组:vector(转染报告载体 pGL3-Luciferase Reporter 空载体、内参载体 pRL-TK 和 Ctrl-mimics 或 miR145-mimics);(2)实验组:OCT4-3'UTR 或 OCT4(mu)-3'UTR [转染 OCT4 3'-UTR 或 OCT4(mu)-3'UTR 报告载体、内参载体 pRL-TK 和 Ctrl-mimics 或 miR145-mimics]。转染的两组细胞分别转染 293T 细胞于转染前一晚以 1×10^4 个/孔密度接种到 48 孔板中,次日待细胞密度达到 50% 时进行转染。20 mol/L miRNA mimics、25 ng OCT4 荧光报告载体或 OCT4(mu)、6 ng pRL-TK 分别加入细胞培养基中,24 h 后加入 PLB 裂解液室温裂解,15 min 后采用双萤光素酶报告基因法上机检测,以 Firefly 与 TK Renilla 荧光活性的比值作为报告基因活性值(TK Renilla 荧光值作为内参)。实验重复 3 次。

1.5 Real-time PCR 检测 NSCLC 组织和癌旁组织中 miR-145 的表达

抽提 ≤ 100 mg 冻存组织样本总 RNA,逆转录得 cDNA 后,按照反转录试剂盒说明书操作。以 U6 为内参,定量检测 miR-145 相对表达量。反转录引物:miR-145,5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGGAT-3';定量引物如下,U6:Forward 5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATAAC-3' 和 Reverse 5'-AAAAATATGGAACGCTCACGAATTTG-3'; miR-145: Forward 5'-GGAGGCAGGTCAAAAGG GTCCT-3' 和 Reverse 5'-GTGCAGGTCGAGGT-3'。Real-time PCR 反应体系及条件:2 \times SYBR Premix 10 μ l, ddH₂O 8 μ l, cDNA 1 μ l, PCR forward 或 reverse primer 各 0.5 μ l, 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。根据公式:RQ = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的相对表达量[$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ 处理组目的基因} - Ct \text{ 处理组内参基因}) - (Ct \text{ 对照组目的基因} - Ct \text{ 对照组内参基因})$]。实验重复 3 次。

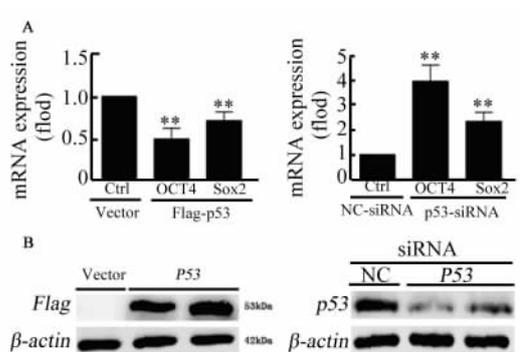
1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计学软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 P53 抑制 A549 细胞 OCT4 和 Sox2 mRNA 表达

Real-time PCR (图 1A) 和 Western blotting 检测结果(图 1B)显示,A549 细胞中过表达 P53 蛋白后 OCT4 mRNA 和 Sox2 mRNA 表达水平较空载体转染组(Vector)显著降低[(0.49 \pm 0.07) 和 (0.71 \pm 0.06) vs (1.00 \pm 0.00), 均 $P < 0.01$]。与对照组 NC-siRNA 相比,转染 siRNA 抑制 P53 mRNA 水平后,OCT4 和 Sox2 mRNA 的表达水平显著升高[(3.99 \pm 0.38) 和 (2.36 \pm 0.21) vs (1.00 \pm 0.00), 均 $P < 0.01$],结果提示,P53 与肺腺癌细胞 A549 的干细胞特性有关。



** $P < 0.01$ vs Vector or NC-siRNA

A: Real-time PCR; B: Western blotting

图 1 P53 抑制 A549 细胞中 OCT4 和 Sox2 mRNA 的表达
Fig. 1 Inhibitory effect of P53 on the expressions of OCT4 and Sox2 mRNA in A549 cells

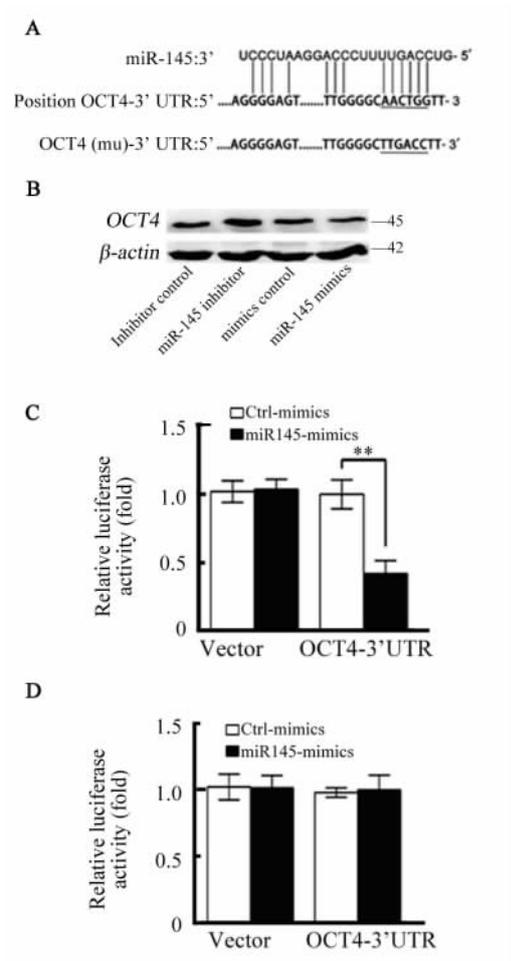
2.2 P53 促进 A549 细胞 miR-145 的表达

Real-time PCR 检测结果显示,NSCLC 组织中 miR-145 的表达量明显低于癌旁组织[(2.31 \pm 0.13) vs (3.51 \pm 0.27), $P < 0.01$];在 A549 细胞中过表达 P53 后,miR-145 的表达水平明显升高[(1.84 \pm 0.14) vs (1.00 \pm 0.00), $P < 0.01$]。相反,转染了 P53(R273H)表达载体后,miR-145 的表达水平明显受到抑制[(0.72 \pm 0.05) vs (1.00 \pm 0.00), $P < 0.01$]。结果提示,在 NSCLC 组织中 miR-145 低表达,且 P53 可以促进 miR-145 的表达。

2.3 miR-145 抑制 293T 细胞 OCT43'-UTR 报告基

因活性

生物信息分析预测结果(图 2A)显示, *OCT4* 基因的 3'-UTR 区域存在 miR-145 的靶向结合序列。与转染 Ctrl-mimics 对照组比较, 在 A549 细胞中过表达 miR-145 mimics 或 miR-145 抑制剂可明显抑制 $[(0.99 \pm 0.01) \text{ vs } (1.58 \pm 0.09), P < 0.05]$ 或促进 $[(0.95 \pm 0.06) \text{ vs } (0.52 \pm 0.07), P < 0.05]$ *OCT4* 表达水平(图 2B)。293T 细胞中双荧光报告基因实验结果(图 2C、2D)显示, miR-145 抑制剂明显抑制 pGL3-*OCT4*-3'-UTR 活性 $[(0.41 \pm 0.07) \text{ vs } (1.01 \pm 0.02), P < 0.01]$, 而转染 pGL3-*OCT4*(mu)-3'-UTR 的报告基因表达无统计学意义($P > 0.05$)。结果提示, 低表达 miR-145 可能是肺癌细胞干细胞高表达 *OCT4* 的一个重要原因。

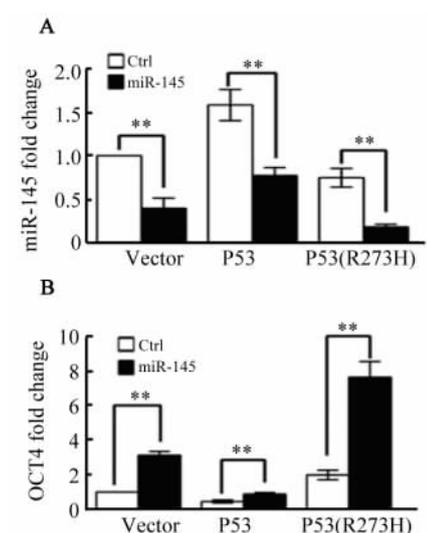


A: Analysis of bioinformation; B. The expression of *OCT4* protein detected by Western blotting; C and D: Detection results of Dual Luciferase Reporter gene $** P < 0.01 \text{ vs Vector group}$

图 2 miR-145 直接靶向调控 OCT4 的表达
Fig.2 miR-145 directly targeted to regulate the expression of OCT4

2.4 P53 通过促进 miR-145 表达抑制 A549 细胞干细胞特性

Real-time PCR 检测结果(图 3)显示, miR-145 抑制剂转染对过表达 *P53* 的 A549 细胞中 miR-145 的抑制率较 Ctrl-mimics 组显著降低 $[(0.77 \pm 0.09) \text{ vs } (1.58 \pm 0.09), P < 0.01]$ (图 3A)。转染 miR-145 抑制剂显著提高 *OCT4* mRNA 的表达水平 $[(3.13 \pm 0.12) \text{ vs } (1.00 \pm 0.00), P < 0.01]$, 更进一步提高 *P53*(R273H)突变载体的 A549 细胞中 *OCT4* mRNA 的表达水平 $[(7.63 \pm 0.55) \text{ vs } (1.99 \pm 0.16), P < 0.01]$ (图 3B), 逆转并使 *P53* 对 A549 细胞中 *OCT4* mRNA 表达水平从抑制转为增强。



A: Decreased expression of miR-145 after transfection with miR-145 inhibitor; B: Enhanced expression of *OCT4* mRNA after transfection with miR-145 inhibitor $** P < 0.01 \text{ vs Vector group}$

图 3 转染 miR-145 抑制剂后 miR-145 表达受到抑制
Fig.3 miR-145 inhibitor transfection suppressed miR-145 expression

3 讨论

肺癌是源于支气管黏膜或腺体的恶性肿瘤, 发病率及病死率极高, 是世界范围内恶性肿瘤的主要死因之一^[1-2]。大约 50% 的肺癌组织中存在着 *P53* 基因的突变, 这些突变常位于 *P53* 基因的阅读框架上, 并在高度保守区改变了 *P53* 蛋白的氨基酸顺序 (G:C→T:A)^[5, 20-21]。研究^[8, 21-22]表明, *P53* 可以抑制胚胎干细胞自我更新、高度增殖和多向分化潜能, 而且 *P53* 可以通过调节 miRNAs 抑制胚胎干细胞特性^[9]。许多实验结果^[23-25]表明, miRNAs 作为重要

的基因调控子在肿瘤细胞获得干细胞样‘编程’中发挥了重要作用,而 OCT4 是维持胚胎干细胞和诱导多能干细胞特性的关键转录因子^[26]。在肺癌组织中,发挥抑癌作用的 miR-145 低表达是一个明显的特征^[27-30]。

在本研究中,miR-145 在 NSCLC 组织中低表达,且在 A549 细胞中过表达的 P53 能够抑制维持干细胞特性的重要转录因子 OCT4 的表达,而干扰 A549 细胞中的 P53 能够促进 OCT4 的表达。相关研究^[19, 31-32]报道,miR-145 可以靶向调控干细胞特性标志转录因子 OCT4 表达,提示肺癌细胞中 P53 基因可能通过调控 miR-145 的表达水平来控制肺癌干细胞特性。在 293T 细胞中的双荧光报告基因实验也证实,过表达的 miR-145 mimics 明显抑制 OCT4-3'-UTR 活性,而对带有 miR-145 靶向序列突变的 OCT4(μ)-3'-UTR 的报告基因活性无影响,进一步证实了 miR-145 可以调控维持干细胞特性的重要转录因子 OCT4 的表达。有研究^[10]表明,肿瘤中存在的干细胞具有自我更新的能力,且不是早期肿瘤的组成部分,而是在肿瘤发生的后期伴随着 P53 功能失活才出现的。另外,由于在 50% 的肺癌组织中 P53 存在点突变,R273H 的突变导致 P53 结合功能域的失活,促进了 K-ras 诱导的肺腺癌的发生和发展^[33]。本研究中,野生型的 P53 可以促进 miR-145 表达,相反地,功能失活的 P53(R273H, G \rightarrow A)过表达后抑制 miR-145 表达。这些结果提示了 P53 功能失活可能是导致肺癌中 miR-145 低表达的一个重要原因。本实验进一步证实,转染 miR-145 抑制剂可显著提高 A549 细胞的 OCT4 mRNA 的表达水平,强化 P53 突变导致的 OCT4 mRNA 表达增高,逆转并使 P53 对 A549 细胞中 OCT4 mRNA 的表达水平从抑制转为增强。这些研究提示 P53 导致的 miR-145 的低表达对于维持肺癌干细胞特性十分重要。

综上,本实验证实野生型 P53 过表达能够促进 miR-145 的表达,而抑制维持干细胞特性的转录因子 OCT4 和 Sox2 的表达。点突变失活的 P53(R273H, G \rightarrow A)抑制 miR-145 的表达。进一步实验揭示,miR-145 在 NSCLC 组织中低表达,且靶向调控关键转录因子 OCT4。对于 miR-145 靶向 Sox2 以及 P53 是否通过调节其他的 miRNAs 来抑制 Sox2,又或直接调控还需要进一步研究。本研究结果提示,miR-145 有望作为 P53 失活导致 NSCLC 诊断的标志物及治疗靶标。

[参考文献]

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90. DOI:10.3322/caac.20107.
- [2] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [3] TAKAHASHI T, CARBONE D, TAKAHASHI T, et al. Wild-type but not mutant P53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions [J]. Cancer Res, 1992, 52(8):2340-234.
- [4] SUZUKI H, TAKAHASHI T, KUROIISHI T, et al. P53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan: association between mutations and smoking [J]. Cancer Res, 1992, 52(3):734-736.
- [5] AHRENDT S A, HU Y, BUTA M, et al. P53 mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study [J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(13):961-970. DOI:10.1093/jnci/95.13.961.
- [6] MAGEE J A, PISKOUNOVA E, MORRISON S J. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty [J]. Cancer Cell, 2012, 21(3):283-296. DOI:10.1016/j.ccr.2012.03.003.
- [7] HONG H, TAKAHASHI K, ICHISAKA T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the P53-p21 pathway [J]. Nature, 2009, 460(7259):1132-1135. DOI: 10.1038/nature08235.
- [8] LIU Y, ELF S E, MIYATA Y, et al. P53 regulates hematopoietic stem cell quiescence [J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(1):37-48. DOI:10.1016/j.stem.2008.11.006.
- [9] CHANG C J, CHAO C H, XIZ W, et al. P53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(3):317-323. DOI: 10.1038/ncb2173.
- [10] MIZUNO H, SPIKE B T, WAHL G M, et al. Inactivation of P53 in breast cancers correlates with stem cell transcriptional signatures [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(52):22745-22750. DOI:10.1073/pnas.1017001108.
- [11] OZEN M, CREIGHTON C J, OZDEMIR M, et al. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer [J]. Oncogene, 2008, 27(12):1788-1793. DOI: 10.1038/sj.onc.1210809.
- [12] PORKKA K P, PFEIFFER M J, WALTERING K K, et al. MicroRNA expression profiling in prostate cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67(13):6130-6235. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-07-0533.
- [13] ICHIMI T, ENOKIDA H, OKUNO Y, et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer [J]. Int J Cancer, 2009, 125(2):345-352. DOI: 10.1002/ijc.24390.
- [14] AKAO Y, NAKAGAWA Y, NAOE T. MicroRNA-143 and -145 in colon cancer [J]. DNA Cell Biol, 2007, 26(5):311-320. DOI: 10.1089/dna.2006.0550.
- [15] SCHEPELER T, REINERT J T, OSTENFELD M S, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer [J]. Cancer

- Res, 2008, 68(15):6416-6424. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-07-6110.
- [16] IORIO M V, VISIONE R, DI LEVA G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8699-8707. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-07-1936.
- [17] AKAO Y, NAKAGAWA Y, KITADE Y, et al. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies[J]. Cancer Sci, 2007, 98(12): 1914-1920. DOI: 10. 1111/j. 1349-7006. 2007. 00618. x.
- [18] SACHDEVA M, ZHU S, WU F, et al. P53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(9): 3207-3212. DOI: 10. 1073/pnas. 0808042106.
- [19] YIN R, ZHANG S, WU Y, et al. microRNA-145 suppresses lung adenocarcinoma-initiating cell proliferation by targeting OCT4[J]. Oncol Rep, 2011, 25(6): 1747-1754. DOI: 10. 3892/or. 2011. 1252.
- [20] MITSUDOMI T, OYAMA T, KUSANO T, et al. Mutations of the P53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1993, 85(24): 2018-2023. DOI: 10. 1093/jnci/85. 24. 2018.
- [21] BODNER S M, MINNA J D, JENSEN S M, et al. Expression of mutant P53 proteins in lung cancer correlates with the class of P53 gene mutation[J]. Oncogene, 1992, 7(4): 743-149.
- [22] ZHAO T and XU Y. P53 and stem cells: new developments and new concerns[J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(3): 170-175. DOI: 10. 1016/j. tcb. 2009. 12. 004.
- [23] CROCE C M, CALIN G A. miRNAs, cancer, and stem cell division[J]. Cell, 2005, 122(1): 6-7. DOI: 10. 1016/j. cell. 2005. 06. 036.
- [24] YU Z, LI Y, FAN H, et al. miRNAs regulate stem cell self-renewal and differentiation[J]. Front Genet, 2012, 3: 191-195. DOI: 10. 3389/fgene. 2012. 00191.
- [25] BAO B, ALI S, AHMAD A, et al. Differentially expressed miRNAs in cancer-stem-like cells: markers for tumor cell aggressiveness of pancreatic cancer[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(16): 1947-1958. DOI: 10. 1089/scd. 2013. 0551.
- [26] NIWA H, MIYAZAKI J, SMITH A G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells[J]. Nat Genet, 2000, 24(4): 372-376. DOI: 10. 1038/74199.
- [27] LIU X, SEMPEREL F, GALIMBERTI F, et al. Uncovering growth-suppressive microRNAs in lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(4): 1177-1183. DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-08-1355.
- [28] CHO W C, CHOW A S, AU J S. MiR-145 inhibits cell proliferation of human lung adenocarcinoma by targeting EGFR and NUDT1[J]. RNA Biol, 2011, 8(1): 125-131. DOI: 10. 4161/rna. 8. 1. 14259.
- [29] SHEN H, SHEN J, WANG L, et al. Low miR-145 expression level is associated with poor pathological differentiation and poor prognosis in non-small cell lung cancer[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2015, 69: 301-305 [2016-06-15]. [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753-3322\(14\)00214-5](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753-3322(14)00214-5). DOI: 10. 1016/j. biopha. 2014. 12. 019.
- [30] ZHAO C, XU Y, ZHANG Y, et al. Downregulation of miR-145 contributes to lung adenocarcinoma cell growth to form brain metastases[J]. Oncol Rep, 2013, 30(5): 2027-2034. DOI: 10. 3892/or. 2013. 2728.
- [31] WU Y, LIU S, XIN H, et al. Up-regulation of microRNA-145 promotes differentiation by repressing OCT4 in human endometrial adenocarcinoma cells[J]. Cancer, 2011, 117(17): 3989-3998. DOI: 10. 1002/cncr. 25944.
- [32] XU N, PAPAGIANNAKOPOULOS T, PAN G, et al. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells[J]. Cell, 2009, 137(4): 647-658. DOI: 10. 1016/j. cell. 2009. 02. 038.
- [33] JACKSON E L, OLIVE K P, TUVESON D A, et al. The differential effects of mutant P53 alleles on advanced murine lung cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(22): 10280-10288. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-05-2193.
- [收稿日期] 2016 - 08 - 16 [修回日期] 2016 - 11 - 07
[本文编辑] 阮芳铭

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》,全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定,正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示(pH 用正体除外),例如 m (质量)、 t (时间)、 c (浓度)、 V (体积)、 p (压力)、 F (力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示,例如 kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的量浓度或质量浓度时,一般使用 L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时,不能写成 mg/kg/d 的形式,应写成 mg/(kg·d)或 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的形式。(5)单位符号常见书写错误:长度单位符号 Å (埃)已不用,应写作 0.1 nm;时间单位“小时”符号为 h(不是 hr)、“秒”符号为 s(不是 sec);转速单位符号为 r/min(不是 rpm);量浓度单位符号为 mol/L(不是 M、N,也不是 mol/mm^3);力的单位“牛顿”符号为 N[不是 dyn(达因)],kgf(千克力),换算 $1 \text{ dyn} = 10^{-5} \text{ N}$];热量单位“焦耳”符号为 J[不是 cal(卡)、kcal(千卡),换算 $1 \text{ cal} = 4.187 \text{ J}$];放射性活度单位符号为 Bq[不是 Ci(居里)],换算 $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$ 。

(本刊编辑部)