

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.08.008

· 基础研究 ·

## miR-186通过下调垂体瘤转化基因1的表达抑制骨肉瘤细胞的增殖侵袭并诱导其凋亡

李乾<sup>1</sup>, 魏志辉<sup>1</sup>, 肖前仁<sup>2</sup>, 陈佳骏<sup>1</sup>, 周新<sup>1</sup>, 王滕羽<sup>1</sup>, 张中卒<sup>1</sup>, 张铭华<sup>1</sup> (1. 重庆医科大学附属永川医院 骨科, 重庆 402160; 2. 南昌大学附属第一医院 骨科, 江西南昌 330000)

**[摘要]** **目的:**探讨 miR-186 对骨肉瘤细胞增殖、凋亡及侵袭能力的影响, 并探讨其可能机制。 **方法:**实时荧光定量 PCR 检测骨肉瘤细胞 HOS、U2-OS、Saos-2 及成骨细胞 NHOst 中 miR-186 表达, 并运用人工合成的 miR-186 模拟片段及对照 scramble mimic 转染至人骨肉瘤 HOS 及 U2-OS 细胞内, 运用实时荧光定量 PCR 检测转染后细胞中 miR-186 的表达水平; 分别运用 CCK-8 法、流式细胞检测技术及 Transwell 体外侵袭实验检测过表达 miR-186 对 HOS 及 U2-OS 细胞增殖、凋亡及侵袭能力的影响; 运用 Western blotting 及实时荧光定量 PCR 检测 miR-186 过表达对细胞中垂体瘤转化基因 1 (pituitary tumor transforming gene 1, *PTTG1*) 的蛋白及 mRNA 表达水平的影响。 **结果:**骨肉瘤细胞中 miR-186 呈现低表达; 转染人工合成的 miR-186 片段可上调 HOS 及 U2-OS 细胞中 miR-186 的表达; miR-186 过表达组细胞的增殖能力较 scramble 组明显下降 ( $P < 0.01$ ), 转染组 HOS [(16.9±2.1)% vs (10.4±1.6)%],  $P < 0.05$  及 U2-OS [(22.6±2.9)% vs (14.1±2.2)%],  $P < 0.05$  细胞的凋亡比例明显高于 scramble 组, 转染组 HOS 及 U2-OS 细胞的穿膜数明显低于 scramble 组 ( $P < 0.01$ ); 转染组细胞中 *PTTG1* 的蛋白及 mRNA 表达水平均明显下降 ( $P < 0.01$ ), 而 scramble 组无明显变化 ( $P > 0.05$ ); **结论:** miR-186 能够抑制骨肉瘤细胞的增殖及侵袭并促进细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制 *PTTG1* 表达相关。

**[关键词]** miR-186; 骨肉瘤; 垂体瘤转化基因 1

**[中图分类号]** R730.59; R736.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)08-0864-06

## miR-186 suppresses the proliferation and invasion and promotes apoptosis of osteosarcoma cells partially through targeting *PTTG1*

LI Qian<sup>1</sup>, WEI Zhihui<sup>1</sup>, XIAO Qianren<sup>2</sup>, CHEN Jiajun<sup>1</sup>, ZHOU Xin<sup>1</sup>, WANG Tengyu<sup>1</sup>, ZHANG Zhongzu<sup>1</sup>, ZHANG Minghua<sup>1</sup> (1. Department of Orthopedics, Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; 2. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi, China)

**[Abstracts] Objective:** To explore the effects of miR-186 on the cell proliferation, apoptosis and invasion of human osteosarcoma cells, and identify its putative mechanisms. **Methods:** The expression of miR-186 in osteosarcoma cell lines (HOS, U2-OS and Saos-2) and osteoblast NHOst cells was detected using RT-PCR assays. Artificially synthesized miR-186 mimic and relative control scramble mimic was transfected into osteosarcoma HOS and U2-OS cell lines, and the expression of miR-186 in OS cells was detected using the RT-PCR assays upon transfection. Then, the effects of miR-186 over-expression on cell proliferation, apoptosis and invasion of OS cells were explored using the CCK-8, FCSE and transwell invasion assays, respectively. The effects of miR-186 over-expression on mRNA and protein expression of *PTTG1* (pituitary tumor transforming gene1) were explored using the Western blotting and RT-PCR assays. **Results:** miR-186 was low expressed in OS cell lines; Transfection with artificially synthesized miR-186 mimic significantly up-regulated the expression of miR-186 in HOS and U2-OS cells; the proliferation rate of cells transfected with miR-186 mimic was much lower than those transfected with scramble mimic

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No. 81502329); 重庆医科大学附属永川医院院内课题资助项目 (No. YCZQN201514)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81502329), and the Foundation of the Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University Grants (No. YCZQN201514)。

**[作者简介]** 李乾 (1983-), 男, 本科, 住院医师, 主要从事骨与软组织肿瘤研究, E-mail: liqian\_oste@126.com

**[通信作者]** 张铭华 (ZHANG Minghua, corresponding author), 硕士, 教授, 硕士生导师, 主要从事骨关节损伤、骨与软组织肿瘤研究, E-mail: zhangminghua023@126.com

**[优先发表]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170731.1051.004.html>

[HOS: (16.9±2.1)% vs (10.4±1.6)%; U2-OS: (22.6±2.9)% vs (14.1±2.2)%; ( $P<0.01$ ); the apoptotic rates of HOS and U2-OS cells transfected with miR-186 mimic were higher than those transfected with scramble mimic [HOS: (16.9±2.1)% vs (10.4±1.6)%; U2-OS: (22.6±2.9)% vs (14.1±2.2)%; all  $P<0.05$ ], and the number of cells passing through the chambers in miR-186 mimic transfection group was less than those of scramble transfection group ( $P<0.01$ ). The expression levels of PTTG1 at protein and mRNA level were both suppressed in cells transfected with miR-186 mimic ( $P<0.01$ ); however, scramble transfection group showed no statistical difference ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** Overexpression of miR-186 significantly inhibited cell proliferation and invasion, and promoted the apoptosis of OS cells, which might be related with PTTG1 suppression.

**[Key words]** miR-186; osteosarcoma; pituitary tumor transforming gene 1(PTTG1)

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(8): 864-869. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.008]

微小RNA(microRNAs, miRNA/miR)是一类内源性、非编码的小RNA分子。通过与靶基因的3'-UTR区完全或不完整的结合,miRNAs能够参与靶基因的表达调控,而miRNA/mRNA作用轴的失衡参与包括肿瘤形成在内的多个生物学过程<sup>[1-2]</sup>。骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是儿童及青少年最常见的恶性原发性骨肿瘤,其恶性程度高、预后极差<sup>[3]</sup>,因此对于其发病机制及治疗的研究一直是学界关注的热点。其中miRNAs在骨肉瘤的发生、发展、诊断及治疗中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。miR-186是最新报道的miRNAs之一,其在多个肿瘤组织中担当抑癌基因的功能,但是其在骨肉瘤中的作用尚不明确,本研究主要探讨miR-186在多种骨肉瘤细胞系中的表达及其对骨肉瘤细胞HOS及U2-OS的增殖、凋亡及侵袭能力的影响,并探讨其可能机制,为骨肉瘤的发病机制和基因治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人骨肉瘤细胞系HOS、U2-OS、Saos-2及NHOst细胞株均购买于中国医学科学院细胞中心。研究所用引物由上海生工生物科技有限公司合成。新生胎牛血清购自美国PAA有限公司;RPMI 1640培养基、0.25%胰酶(Trypsin-EDTA)、RIPA裂解液和脂质体2000转染试剂(Lipofectamine 2000)均购自美国Invitrogen公司;化学合成的miR-186 mimic片段及对照片段(scramble mimic)及Dhamafect 1转染试剂购自美国Thermo Fisher公司;8.0 μm孔径Transwell小室购自美国Minipore公司;基质胶购自美国Sigma公司;兔抗人垂体瘤转化基因1(pituitary tumor transforming gene1, PTTG1)蛋白抗体购自美国Cell signal technology公司;兔抗人GAPDH多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence system, ECL)购自美国Millipore公司。

### 1.2 细胞培养与转染

HOS、U2-OS及Saos-2细胞株用RPMI 1640完全培养基(含有10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素),5% CO<sub>2</sub>及90%饱和湿度的条件下培养。细胞贴壁生长,加入适量0.25%的胰酶(Trypsin-EDTA)消化传代。将细胞提前1 d铺入细胞培养板中,次日转染时细胞单层密度约为50%,处于对数生长期。

将人工合成的miR-186 mimic及对应的scramble mimic按照Dhamafect转染试剂说明书分别转染至HOS及U2-OS细胞株中,根据所转染质粒的不同分为2组:转染组(即转染miR-186的HOS及U2-OS细胞)和对照组(即转染scramble的HOS及U2-OS细胞)。因预实验中证实转染scramble组与未转染组细胞内的miR-186的表达无明显表达差异,同时为了排除转染试剂引起的误差,所以实验中仅设计了转染试剂公司配对的无义片段(scramble片段)作为实验的对照组。

### 1.3 实时荧光定量PCR检测骨肉瘤细胞中miR-186的表达

转染后48 h,运用TRIzol法分别提取实验及对照组骨肉瘤细胞的总RNA、未经转染的人骨肉瘤细胞系HOS、U2-OS、Saos-2细胞及成骨细胞NHOst的总RNA,根据逆转录试剂盒将RNA逆转录成cDNA,以cDNA为模板,应用PRISM 7000型定量PCR仪(Applied Biosystemss)进行定量PCR检测,以U6作为内参。PCR扩增结束后绘制熔解曲线,对目的基因的表达采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法行相对定量分析。PCR反应引物及反应条件如表1。

### 1.4 CCK-8法检测miR-186过表达对骨肉瘤细胞增殖的影响

将转染24 h的HOS及U2-OS细胞按5×10<sup>3</sup>个/孔接种于96孔培养板中(100 μl/孔)。待细胞贴壁后,加入CCK-8液10 μl,37 °C、5% CO<sub>2</sub>孵育2 h,用自动酶标平板阅读仪于450 nm波长处读取光密度(D)值。每孔设置3个复孔,并设置空白对照组。实验重复3次,取平均值。

表1 RT-PCR引物序列  
Tab. 1 Primer sequences of RT-PCR

Gene	Primer sequence
Reverse transcription	
miR-186	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGAGAGCCCAA-3'
U6	5'-AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG-3'
Real time-PCR	
miR-186-F	5'-GCGCTAAGGCACGCGGT-3'
miR-186-R	5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6-F	5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3'
U6-R	5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTGTC-3'
PTTG1-F	5'-TTTGACCTGCCTGAAGAGC-3'
PTTG1-R	5'-CGACAGAATGCTTGAAGGAG-3'

### 1.5 流式细胞术检测 miR-186 过表达对骨肉瘤细胞凋亡的影响

细胞转染换液后用 3% 低浓度血清继续培养细胞 48 h, 用不含 EDTA 的胰酶消化贴壁细胞, PBS 洗涤细胞 2 次。细胞重新计数, 将细胞沉淀 ( $4 \times 10^5$  个) 重悬于 100  $\mu$ l 结合缓冲液 (1 $\times$ ), 分别加入 5  $\mu$ l PE 标记的 Annexin V 和 5  $\mu$ l 7-AAD, 两个单阳对照组为分别单独加入 5  $\mu$ l Annexin V 或 5  $\mu$ l 7-AAD, 阴性对照组为不加任何染料, 混匀后室温避光孵育 15 min。补加 200  $\mu$ l 结合缓冲液 (1 $\times$ ), 1 h 内进行流式细胞仪检测; 本实验中, Annexin V (+)/7-AAD (-) 的细胞被划定为凋亡细胞, 即早期凋亡细胞。

### 1.6 Transwell 体外侵袭实验检测 miR-186 过表达对骨肉瘤细胞侵袭能力的影响

将 Matrigel 基质胶用无血清培养基稀释至 1 mg/ml 备用, 冰上操作。将稀释的 Matrigel 基质胶 40  $\mu$ l 缓慢加入至 Transwell 小室, 避免产生气泡, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1~2 h 后基质胶凝固; 细胞转染后 24 h 消化离心, 将  $4 \times 10^5$  个细胞重悬于不含血清的 200  $\mu$ l 培养基中, 细胞混合液沿 Transwell 小室侧壁加入到 Matrigel 胶上; 600  $\mu$ l 含有 20% FBS 的培养基作为趋化因子加入 Transwell 小室的下层中。5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 条件下培养 16 h 后取出小室, 吸出下室中 MEM 培养基, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 0.05% 结晶紫染色 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。将膜撕下, 中性树脂封片, 镜下观察, 随机计数 6 个视野, 计算结晶紫染色细胞数, 即为穿膜细胞。实验重复 3 次, 取平均值。

### 1.7 Western blotting 检测 miR-186 过表达对骨肉瘤细胞中 PTTG1 蛋白水平的影响

细胞转染 48 h 后消化离心, RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度;

将 20~30  $\mu$ g 蛋白样品行 10% SDS-PAGE 分离蛋白后电转至 PVDF 膜, 置于含 5% 脱脂奶粉的封闭液中, 室温封闭 1 h, 分别加入 PTTG1 (1:1 000) 及 GAPDH (1:20 000) 一抗稀释液孵育, 4  $^{\circ}$ C 过夜, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 分别加入的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 化学发光剂反应显影。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间数据比较采用 *t* 检验分析, 两组以上数据比较采用方差分析, 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-186 在骨肉瘤细胞中呈低表达

RT-PCR 检测 miR-186 在骨肉瘤细胞 (HOS、U2-OS 及 Saos-2) 中的表达, 结果 (图 1) 表明, 相比于正常成骨细胞 (NHOst), miR-186 在骨肉瘤细胞中呈低表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

### 2.2 人工合成的 miR-186 片段在 HOS 及 U2-OS 细胞中表达成功

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 转染 miR-186 模拟片段 48 h 后 HOS 及 U2-OS 细胞中 miR-186 表达水平与转染 scramble 片段组相比, 分别增加约 15 倍及 18 倍 (HOS:  $15.3 \pm 2.5$  vs  $1.1 \pm 0.1$ , U2-OS:  $18.1 \pm 2.8$  vs  $1.0 \pm 0.1$ ; 均  $P < 0.01$ )。

### 2.3 过表达 miR-186 抑制 HOS 及 U2-OS 细胞的增殖能力

运用 CCK-8 法, 检测了细胞 0、24、48 h 及 72 h 各组细胞的增殖状态, 结果 (图 2) 显示, 转染 24 h 内, 转染 miR-186 组细胞与 scramble 组细胞相比较, 增殖能力无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 而 48 h 后, miR-186 组细胞的

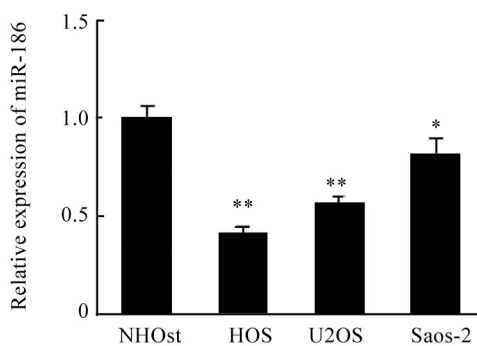
增殖能力均较 scramble 组明显下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

#### 2.4 过表达 miR-186 促进 HOS 及 U2-OS 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图3)显示,HOS及U2-OS转染 miR-186 组细胞中早期凋亡细胞比例分别为(16.9±2.1)%和(22.6±2.9)%,较对应的 scramble 组[分别为(10.4±1.6)%及(14.1±2.2)%]均明显增加(均  $P < 0.05$ )。

#### 2.5 过表达 miR-186 抑制 HOS 及 U2-OS 细胞的侵袭

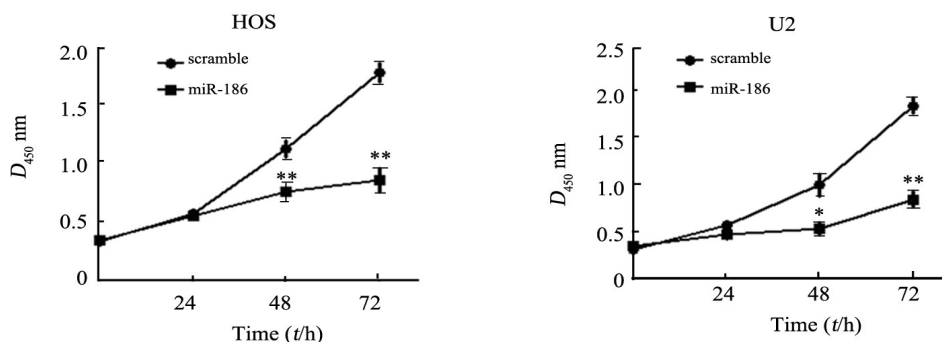
Transwell小室侵袭实验检测结果(图4)显示,在趋化因子的作用下,HOS[(38±14) vs (112±21)个,  $P < 0.01$ ]及U2-OS[(47±21) vs (137±19)个,  $P < 0.01$ ]细胞过表达 miR-186 组穿透基质胶的细胞数均显著少于对应的 scramble 组。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NHOst cell group

图1 骨肉瘤细胞中 miR-186 表达显著低于成骨细胞

Fig. 1 Expression of miR-186 in osteosarcoma cells were significantly lower than that in osteoblast



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs scramble group

图2 转染 miR-186 抑制 HOS 及 U2-OS 细胞的增殖

Fig. 2 Transfection with miR-186 significantly inhibited the cell proliferation of HOS and U2-OS cells

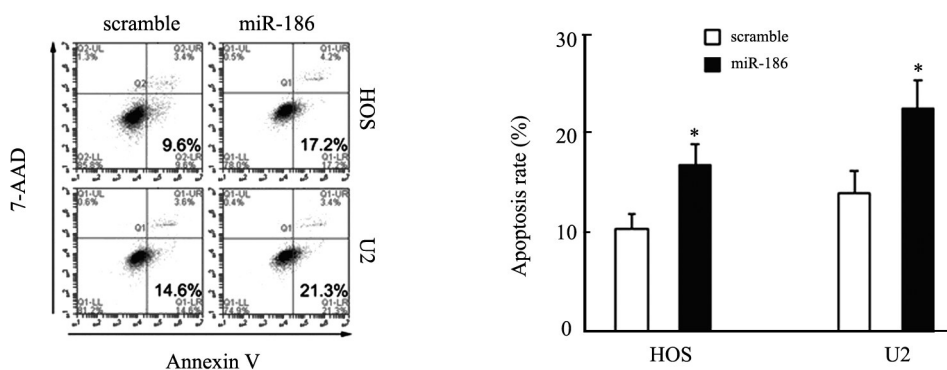


图3 转染 miR-186 mimics 促进 HOS 及 U2-OS 细胞凋亡;

Fig.3 Transfection with miR-186 mimics significantly promoted the cell apoptosis of HOS and U2-OS cells

#### 2.6 miR-186 对骨肉瘤中 PTTG1 表达的影响

PTTG1 是新近研究发现的原癌基因,研究<sup>[9]</sup>发现 miR-186 能够与 PTTG1 的 3-UTR 区靶向结合,抑制 PTTG1 的表达,参与非小细胞肺癌细胞的恶性生物学表型的调控,但是其在骨肉瘤中的作用尚不清

楚。检测过表达 miR-186 对骨肉瘤细胞中 PTTG1 表达的影响,结果(图5)显示,转染 miR-186 组 HOS 及 U2-OS 细胞中 PTTG1 的蛋白及 mRNA 表达水平均较对应 scramble 组明显下降。



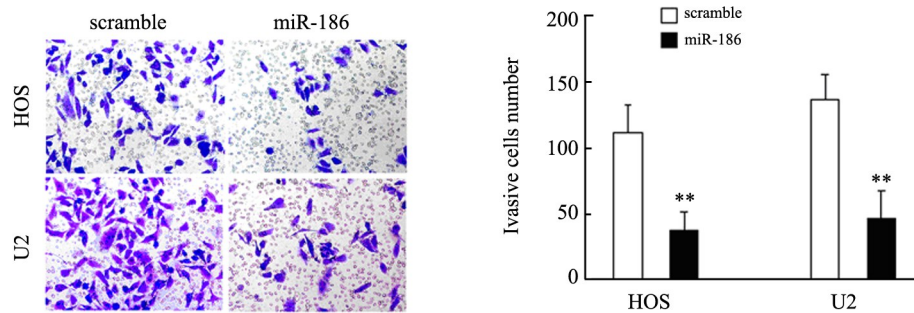


图4 转染miR-186抑制HOS及U2-OS细胞侵袭(×100)

Fig. 4 Transfection with miR-186 significantly suppressed cell invasion of HOS and U2-OS cells(×100)

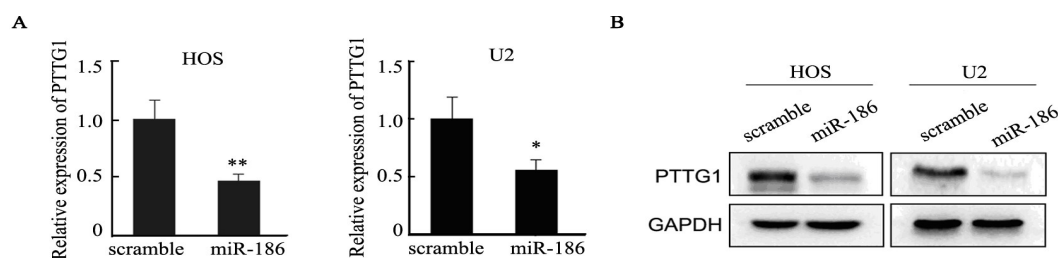


图5 转染miR-186下调HOS及U2-OS细胞中PTTG1的蛋白(图A左,图B)和mRNA(图A右)水平

Fig. 5 Transfection with miR-186 significantly suppressed the protein (right channel of Figure A, Figure B) and mRNA (left channel of Figure A) level of HOS and U2-OS cells

### 3 讨论

目前对于骨肉瘤发病机制的研究仍十分有限, 尽管多种 miRNAs 参与了骨肉瘤的发生、发展过程, 但是 miR-186 在骨肉瘤中的作用尚不清楚。

miRNA 是一类内源性可调控基因表达的非编码单链小 RNA 片段, 约由 18~24 个核苷酸构成。其通过与靶基因 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR) 特异的碱基配对结合, 引起靶基因 mRNA 降解或者翻译抑制, 从而在转录后水平调控基因的表达<sup>[6-7]</sup>。编码 miR-186 的基因位于锌指 RAN 结合蛋白 2 (zinc finger RAN-binding domain containing 2, ZRANB2) 基因的外显子区域, 具有高度保守性<sup>[8]</sup>。miR-186 最早被发现参与肌肉组织分化过程, 通过抑制肌细胞生成素 (myogenin) 的表达, miR-186 抑制了肌细胞的分化<sup>[9]</sup>。而最近 miR-186 在肿瘤组织中的作用正在逐渐被认识, 研究发现其在多种肿瘤组织中担当抑癌基因的功能, 如在前列腺癌中, miR-186 表达较对照正常组织明显下降, 并且其通过靶向调控 VEGF 表达抑制前列腺癌细胞荷瘤小鼠的生长<sup>[10]</sup>; 此外, 在胃癌细胞中, 过表达 miR-186 能够明显抑制细胞的增殖、迁移及侵袭, 并且抑制 *Twist1* 的表达<sup>[11]</sup>。本研究检测了 miR-186 在骨肉瘤细胞中的表达, 结果表明相对于成骨细胞 NHOS, miR-186 在骨肉瘤细胞中呈现低表达, 提示其可能担当抑癌基因的功能。

通过瞬时转染 miR-186 的人工合成片段, 提高其在骨肉瘤细胞 HOS 及 U2-OS 中的表达。通过转染 miR-186 人工合成片段, HOS 及 U2-OS 细胞中 miR-186 的表达均明显升高, 表明转染成功。通过进一步的生物学功能实验分析发现, 转染 miR-186 组细胞增殖及侵袭能力减弱、凋亡比例增加, 表明恢复 miR-186 将抑制骨肉瘤细胞增殖及侵袭, 促进其发生凋亡, 进一步提示 miR-186 在骨肉瘤中担当抑癌基因的功能。

为了解 miR-186 担当抑癌基因功能的机制, 运用靶基因预测网站 (TargetScan: <http://www.targetscan.org>; miRDB: <http://mirdb.org/mirdb/index.html>)<sup>[12]</sup>, 本课题组搜索了 miR-186 的潜在靶基因, 其中 *PTTG1* 吸引了我们的注意。*PTTG1* 是新近研究发现的原癌基因, 最早发现于垂体瘤组织中, 但是随着研究的深入发现其在多种正常组织及肿瘤组织中均表达<sup>[13]</sup>。在骨肉瘤细胞中, 过表达 *PTTG1* 能够诱导细胞发生 p53 依赖性 & p53 非依赖性的凋亡, 中止细胞周期的进程从而抑制细胞的生长<sup>[8]</sup>, 而 *PTTG1* 在骨肉瘤细胞中担当原癌基因, 抑制其表达能够明显抑制骨肉瘤细胞的增殖及侵袭<sup>[14]</sup>。研究证实 miR-186 能够与 *PTTG1* 基因的 3'-UTR 区靶向结合, 抑制 *PTTG1* 的表达, 参与非小细胞肺癌细胞的恶性生物学表型的调控<sup>[5]</sup>, 因此猜测其可能参与了 miR-186 在骨肉瘤中的抑癌功能。本研究证实, 在骨肉瘤细胞中过表达

miR-186将同时抑制 *PTTG1* mRNA及蛋白的表达,提示 *PTTG1* 同时可能参与了miR-186介导的对骨肉瘤细胞的抑癌作用中。

综上所述,miR-186能够抑制骨肉瘤细胞的增殖及侵袭并促进细胞凋亡,其作用机制可能与抑制 *PTTG1* 表达相关。这将为骨肉瘤的发病机制研究,及基因治疗提供新的思路及理论依据。

### [参考文献]

- [1] OLIVIERI F, CAPRI M, BONAFE M, et al. Circulating miRNAs and miRNA shuttles as biomarkers: perspective trajectories of healthy and unhealthy aging[J]. *Mech Ageing Dev*, 2016, 6374(16): 30185-30183. DOI: 10.1016/j.mad.2016.12.004.
- [2] CAO Q, LI Y Y, HE W F, et al. Interplay between microRNAs and the STAT3 signaling pathway in human cancers[J]. *Physiol Genomics*, 2013, 45(24): 1206-1214. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00122.2013.
- [3] KIM H J, CHALMERS P N, MORRIS C D. Pediatric osteogenic sarcoma[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2010, 22(1): 61-66. DOI: 10.1097/MOP.0b013e328334581f.
- [4] RAM R M, BORO A, FUCHS B. Involvement and clinical aspects of microRNA in osteosarcoma[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): E877[2017-02-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4926411/>. DOI: 10.3390/ijms17060877.
- [5] LI H, YIN C, ZHANG B, et al. PTTG1 promotes migration and invasion of human non-small cell lung cancer cells and is modulated by miR-186 [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(9): 2145-2155. DOI: 10.1093/carcin/bgt158.
- [6] MATSUDA A, YAN I K, FOYE C, et al. microRNAs as paracrine signaling mediators in cancers and metabolic diseases [J/OL]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2016, 30 (5): 577-590 [2017-02-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27923452>. DOI:10.1016/j.beem.2016.07.005.
- [7] NASSAR F J, NASR R, TALHOUK R. MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction [J/OL]. *Pharmacol Ther*, 2017, 172 (4): 172-174[2017-02-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27916656>. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.11.012.
- [8] YU R, HEANEY A P, LU W, et al. Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(47): 36502-36505.
- [9] Antoniou A, Mastroiannopoulos N P, Uney J B, et al. miR-186 inhibits muscle cell differentiation through myogenin regulation [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(7): 3923-3935. DOI: 10.1074/jbc.C000546200.
- [10] TERZUOLI E, DONNINI S, FINETTI F, et al. Linking microsomal prostaglandin E Synthase-1/PGE-2 pathway with miR-15a and -186 expression: novel mechanism of VEGF modulation in prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44350-44364. DOI: 10.18632/oncotarget.10051.
- [11] CAO C, SUN D, ZHANG L, et al. miR-186 affects the proliferation, invasion and migration of human gastric cancer by inhibition of Twist1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 79956-79963. DOI: 10.18632/oncotarget.13182.
- [12] RIFFO A L, RIQUELME L, BREBI M P. Tools for sequence-based mirna target prediction: what to choose? [J/OL] *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): E1987[2017-02-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27941681>. DOI:10.3390/ijms17121987
- [13] HAJI M R, SABETKISH N, HESHMAT R, et al. Expression of the pituitary tumor transforming genes (PTTG1) in pheochromocytoma as a potential marker for distinguishing benign versus malignant tumors [J/OL]. *Acta Med Iran*, 2015, 53(4): 236-241[2017-02-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25871022>.
- [14] 吴大鹏, 夏永华, 徐海斌, 等. 垂体肿瘤转化基因1表达下调对骨肉瘤细胞增殖、细胞周期和细胞侵袭能力的影响及其分子机制[J/OL]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(10): 695-698[2017-02-11]. [http://www.e pathology.org.cn/CN112151201410/87489.htm?locale=zh\\_CN](http://www.e pathology.org.cn/CN112151201410/87489.htm?locale=zh_CN). DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2014.10.011.

[收稿日期] 2017-03-15

[修回日期] 2017-07-05

[本文编辑] 黄静怡

· 读者·作者·编者·

## 文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》,文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。(1)公历世纪、年代、年、月、日和时、时刻必须使用阿拉伯数字,如20世纪90年代、2006-02-15、5 h、30 min、30 s、14:36:08等;年份不能用简称,“1998年”不能写作“98年”。(2)物理量量值必须使用阿拉伯数字。(3)非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字,如3支、5根等。(4)数值范围的表达要求:5万至10万应写成5万~10万,不能写成5~10万; $3 \times 10^9$ 至 $5 \times 10^9$ 应写成 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ ,或 $(3 \sim 5) \times 10^9$ ,不能写成 $3 \sim 5 \times 10^9$ ;60%至70%不能写成60~70%,应写成60%~70%; $25.5 \pm 0.5$  mg应写成 $(25.5 \pm 0.5)$ mg。(5)带单位的量值相乘时,每个数值后单位不能省略,如4 mm×2 mm×3 mm,不能写成4×2×3 mm或 $4 \times 2 \times 3 \text{ mm}^3$ 。

(本刊编辑部)