

胃癌中靶向E2F1基因的miR-331真核表达载体的构建及功能

程力, 李乐平, 张黎, 靖昌庆, 徐韬, 李辰生, 郭晓波

程力, 李乐平, 张黎, 靖昌庆, 徐韬, 李辰生, 郭晓波, 山东大学附属山东省立医院胃肠外科 山东省济南市 250021

程力, 副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤发生机制的研究。

作者贡献分布: 程力与李乐平对此文所作贡献均等; 此课题由郭晓波、程力及李乐平设计; 实验过程由郭晓波、徐韬及李辰生操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由靖昌庆与张黎提供; 数据分析由郭晓波与徐韬完成; 本论文写作由郭晓波与程力完成。

通讯作者: 郭晓波, 250021, 山东省济南市, 山东大学附属山东省立医院胃肠外科. guo992352@hotmail.com

电话: 0531-85187117

收稿日期: 2011-02-07 修回日期: 2010-03-25

接受日期: 2011-04-11 在线出版日期: 2011-05-18

Construction of a eukaryotic expression vector carrying the miR-331 gene

Li Cheng, Le-Ping Li, Li Zhang, Chang-Qing Jing, Tao Xu, Chen-Sheng Li, Xiao-Bo Guo

Li Cheng, Le-Ping Li, Li Zhang, Chang-Qing Jing, Tao Xu, Chen-Sheng Li, Xiao-Bo Guo, Department of Gastrointestinal Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Correspondence to: Xiao-Bo Guo, Department of Gastrointestinal Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China. guo992352@hotmail.com

Received: 2011-02-07 Revised: 2011-03-25

Accepted: 2011-04-11 Published online: 2011-05-18

Abstract

AIM: To explore the potential role of miR-331 in gastric carcinogenesis by constructing a eukaryotic expression vector carrying the miR-331 gene and investigating the impact of transfection with this vector on the expression of E2F1, a direct target of miR-331.

METHODS: A recombinant plasmid carrying miR-331 (pSuper/miR-331) was transfected into SGC-7901 cells by Lipofectin-mediated method. Cells stably expressing miR-331 were selected using G418. Untransfected SGC-7901 cells and those transfected with empty pSuper plasmid were used as controls. The expression of miR-331 was detected by TaqMan real-time PCR, while the expression of E2F1 protein was

detected by Western blot.

RESULTS: Compared with untransfected SGC-7901 cells, the expression level of E2F1 protein exhibited a 4.27-fold decrease in cells stably expressing miR-331 (0.206 ± 0.037 vs 0.879 ± 0.082 , $P < 0.05$). The rate of colony formation on soft agar significantly decreased in cells stably transfected with the recombinant vector when compared to control cells (1.863 ± 0.098 vs 7.074 ± 0.182 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: A eukaryotic expression vector stably expressing miR-331 has been successfully constructed and can be used to study the functions of miR-331 in human gastric cancer.

Key Words: Gastric carcinoma; MiR-331; Expression vector; SGC-7901 cells

Cheng L, Li LP, Zhang L, Jing CQ, Xu T, Li CS, Guo XB. Construction of a eukaryotic expression vector carrying the miR-331 gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(14): 1451-1456

摘要

目的: 研究构建靶向E2F1基因的miR-331真核表达载体, 评估其转染人胃癌细胞株SGC-7901细胞后对E2F1基因的干扰效果及其功能, 探讨miR-331在胃癌中可能的作用机制。

方法: 将外源性重组真核表达载体pSuper/miR-331转染到人胃癌细胞株SGC-7901内, 经G418筛选并建立高表达miR-331的稳定转染细胞株。稳定表达该miR-331的细胞为SGC-7901-pSuper/miR-331组, 转染空质粒细胞及未处理细胞SGC-7901-pSuper组和SGC-7901组作为对照, 采用实时荧光定量PCR验证miR-331在稳定转染细胞的表达, 蛋白印迹检测其对E2F1基因表达的干扰效果和SGC-7901细胞的功能。

结果: 与SGC-7901-pSuper组相比, 转染了pSuper/miR-331高表达质粒的SGC-7901细胞中

■背景资料

胃癌在世界范围内仍是引起高死亡率的肿瘤之一, 其发生发展非常复杂, 涉及到多种免疫与分子机制, 与多种基因有关, 包括癌基因激活和抑癌基因失活。迄今, 有关胃癌的发生与发展的机制尚未取得突破性的进展。

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

■ 研发前沿

近年来, microRNA的相关研究属研究领域的热点问题.

E2F1蛋白表达明显减少, 降低了4.27倍(0.206 ± 0.037 vs 0.879 ± 0.082 , $P < 0.05$); 与SGC-7901-pSuper组相比, 转染了pSuper/miR-331高表达质粒的SGC-7901细胞的克隆形成明显减少, 降低了3.80倍(1.863 ± 0.098 vs 7.074 ± 0.182 , $P < 0.05$), 而SGC-7901-pSuper组与SGC-7901组组间无统计学意义.

结论: miR-331真核表达载体构建和稳定表达胃癌细胞筛选成功, 为继续深入的研究miR-331在胃癌中的功能奠定了基础.

关键词: 胃癌; 微小RNA-331; 表达载体; SGC-7901细胞

程力, 李乐平, 张黎, 靖昌庆, 徐韬, 李辰生, 郭晓波. 胃癌中靶向E2F1基因的miR-331真核表达载体的构建及功能. 世界华人消化杂志 2011; 19(14): 1451-1456

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1451.asp>

0 引言

近年来, microRNA的相关研究属研究领域的热点问题. 人的miR-331(MI0000812)定位于12号染色体长臂12q22, 与人的miR-3685属于同一个家族, miR-331前体长度为94 bp, 其成熟体分为miR-331-5p和miR-331-3p. 我们前期在对miR-331-3p的研究发现miR-331-3p直接靶向细胞周期相关基因E2F1, 上调miR-331-3p的表达具有抑制胃癌细胞生长和克隆形成的能力^[1]. 本研究首先通过PCR技术扩增miR-331前体357 bp扩增后, 定向克隆到microRNA真核表达载体pSUPER.neo+GFP上, 并将其转染至SGC-7901细胞株中, 筛选稳定表达miR-331胃癌细胞株SGC-7901细胞后, 采用实时荧光定量PCR和蛋白印迹检测其对E2F1基因表达的干扰效果和SGC-7901细胞的功能. 以初步探讨miR-331在胃癌细胞的作用, 为今后深入研究该microRNA在胃癌发生发展中的作用奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株SGC-7901购自中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所细胞库. 反转录酶、限制性内切酶、LA-Taq DNA聚合酶购自TaKaRa公司; Transwell小室、Taq DNA聚合酶购自Promega公司; T4连接酶购自天根公司; 小量质粒抽提试剂盒购自上海申能博采公司; 大量质粒抽提试剂盒购自Qiagen公司; 低分子量标准蛋白质购自华美公司; DNA Marker、琼脂糖购自Gibco BRL公司; 蛋白Marker购自天

根公司; Lipofectamine脂质体购自Invitrogen公司; microRNA抽提、逆转、定量分析购自Qiagen公司; miR-331前体引物试剂均购自Ambion公司; E2F1、GAPDH蛋白单克隆抗体购自Abcam公司; pSuper.gfp/neo空载体由本实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 miR-331真核表达载体的构建: 以人胃癌细胞株SGC-7901基因组为模板扩增miR-331前体. 引物设计Pre-microRNA-331(上海生工公司合成)上游引物5'-GCGAGATCTCCTGGTACAGTCGTGGAGGT-3'. 下游引物5'-GCGCTCGAGTATAATGCCAAAGGCTGGGA-3'. 其中引入*Bgl* II和*Xho* I两个酶切位点. PCR扩增条件94 °C预变性5 min, 95 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 35个循环, 最后72 °C延长10 min. 凝胶电泳鉴定可见约357 bp目的条带. 用上海申能博采公司纯化试剂盒纯化PCR产物. *Bgl* II和*Xho* I (购于TaKaRa公司)双酶切后再次纯化得到miR-331前体目的片段. pSuper.gfp/neo载体用*Bgl* II和*Xho* I双酶切并纯化后, 插入miR-331前体目的片段, 载体构建成功后即pSuper/miR-331送博尚生物有限公司测序鉴定.

1.2.2 稳定转染胃癌细胞SGC-7901的筛选: 胃癌细胞SGC-7901用RPMI-1640(10% HYCLONE 血清)培养, 转染前1 d种6孔板, 每孔细胞数为 1×10^5 个, 细胞生长至90%融合时用Lipofectamine2000脂质体进行转染. 将pSuper.gfp/neo空载体和pSuper/miR-331载体转染胃癌细胞SGC-7901转染24 h后, 加入含G418(1 000 mg/L)的培养液筛选稳定转染细胞株, 3-4 wk克隆形成后, 荧光显微镜下观察克隆的荧光显示情况, 若克隆集中显示荧光, 则挑出克隆继续扩群培养, G418改为400 mg/L的维持浓度. 最后通过定量PCR验证miR-331的表达.

1.2.3 Western blot检测E2F1蛋白表达水平: 提取细胞总蛋白, 定量, 与上样缓冲液按比例混匀, 100 °C煮5 min, 8% SDS-PAGE电泳后电转移至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 加入一抗, 4 °C孵育过夜, TBST洗涤3次, 每10 min换液1次. 加入二抗, 37 °C孵育45 min, TBST洗涤3次, 每15 min换液1次, 在暗室中压片, 然后显影、定影. 图像应用AlphaImager 2200软件进行分析. 以GAPDH(单抗工作浓度为1:4 000)为内参照.

1.2.4 软琼脂克隆的形成: PBS配1.2%软琼脂, 均匀铺在6孔板底层, 待其凝固, 4 °C保存备用,

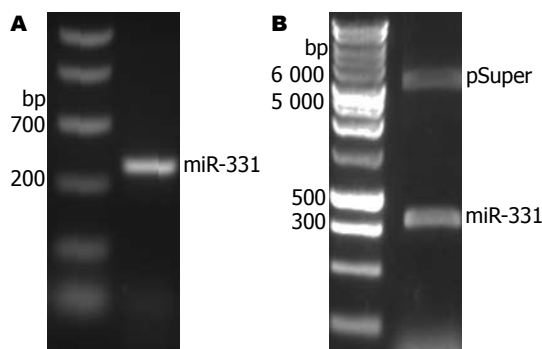


图1 miR-331真核表达载体的构建. A: PCR扩增miR-331前体, 大小约357 bp; B: pSuper/miR-331真核表达载体双酶切鉴定, 片段大小完全正确.

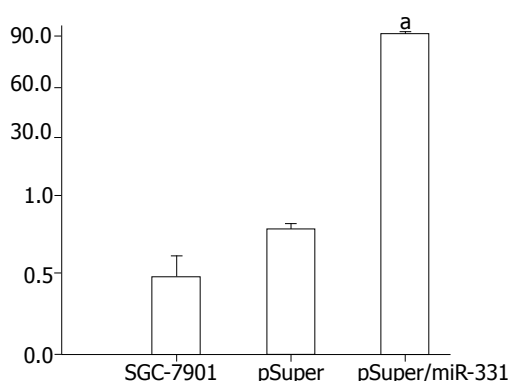


图2 稳定转染胃癌细胞SGC-7901中miR-331定量分析. ^a $P < 0.05$ vs pSuper.

将0.6%软琼脂与含血清培养基按1:1稀释(至0.3%软琼脂), 37℃恒温保存. 收集细胞并计数, 取 1×10^2 的细胞数与适量的0.3%软琼脂充分混合, 平铺于0.6%软琼脂层之上. 细胞培养箱培养(37℃, 50 mL/L CO₂), 直至见到克隆形成(约3-4 wk). 用染色液染色并在显微镜下分别计数10个不同视野含50个细胞以上的克隆数. 实验重复3次, 取均值.

1.2.5 体外Matrigel侵袭实验: 用Transwell小室作为胃癌细胞侵袭模型, 在上室面铺一层基质胶Matrigel Matrix(50 μ g/cm²), 加入 1×10^8 /L浓度的稳定转染胃癌细胞SGC-7901, 下室加入培养液, 观察两组细胞的侵袭能力.

统计学处理 用医用SPSS15.0统计软件进行分析、处理. 数据以mean \pm SD表示. 组间均数的比较采用单因素方差分析. 行*列表资料的率差别采用 χ^2 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 miR-331重组质粒表达载体的构建 以人胃癌细胞株SGC-7901基因组为模板扩增miR-331前体, 可得到约357 bp目的条带(图1A). 将目的

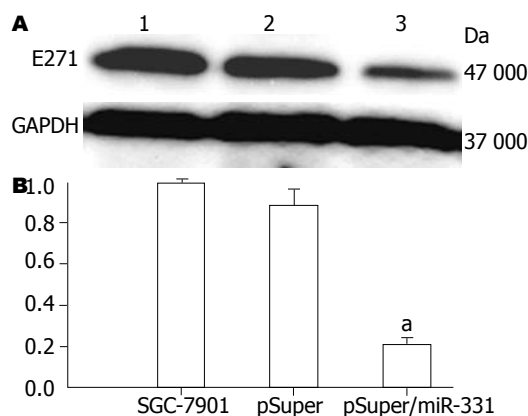


图3 miR-331对E2F1基因表达的影响. A: miR-331高表达抑制E2F1基因表达; B: E2F1基因mRNA相对表达量降低. 1: SGC-7901; 2: pSuper; 3: pSuper/miR-331. ^a $P < 0.05$ vs pSuper.

条带纯化后并经过*Bgl* II和*Xho* I双酶切克隆入microRNA表达载体pSuper.gfp/neo载体, 挑选阳性克隆鉴定(图1B), DNA测序表明miR-331真核表达载体构建成功.

2.2 RT-PCR验证miR-331的表达 在人胃癌细胞SGC-7901、转染pSuper空载体组和转染pSuper/miR-331载体组定量值分别是: 0.469 ± 0.138 、 0.769 ± 0.043 和 91.583 ± 0.865 , 与对照组pSuper空载体组相比较, 转染了pSuper/miR-331载体组miR-331表达量具有显著差异($P < 0.05$, 图2), 表明稳转细胞筛选成功.

2.3 Western blot检测E2F1蛋白表达水平 与pSuper空载体组相比, 转染了pSuper/miR-331高表达质粒的SGC-7901细胞中E2F1蛋白表达明显减少, 降低了4.27倍(0.206 ± 0.037 vs 0.879 ± 0.082 , $P < 0.05$). 而转染了pSuper空载体组的SGC-7901细胞组与正常组间无统计学意义($P > 0.05$). 结果表明转染了miR-331的SGC-7901细胞E2F1蛋白的表达水平明显减少(图3). 实验结果表明E2F1蛋白是miR-331靶向之一.

2.4 miR-331高表达对克隆形成和侵袭的影响 与转染pSuper空载体的SGC-7901细胞对照组相比, 转染了pSuper/miR-331高表达质粒的SGC-7901细胞的克隆形成明显减少, 降低了3.80倍(1.863 ± 0.098 vs 7.074 ± 0.182 , $P < 0.05$, 图4), 而转染了pSuper空载体的SGC-7901细胞组与正常组间无统计学意义($P > 0.05$), 实验结果提示miR-331高表达抑制胃癌细胞SGC-7901克隆形成; 同样miR-331高表达抑制胃癌细胞SGC-7901侵袭.

3 讨论

胃癌是全球高发的恶性肿瘤之一, 但目前我们

■ 相关报道

Epis等在前列腺癌细胞中研究发现miR-331-3p在前列腺组织中低表达, 转染miR-331-3p前体能抑制ERBB-2基因的表达并能阻止下游PI3K/AKT雄激素受体信号通路, 通过降低雄激素刺激前列腺特异性抗原启动子活性, 抑制前列腺特异性抗原的表达.

■应用要点

本文构建了pSuper/miR-331真核表达载体,通过实验证明其可在胃癌SGC-7901细胞中有效表达并转变为成熟的miR-331发挥生物学作用。

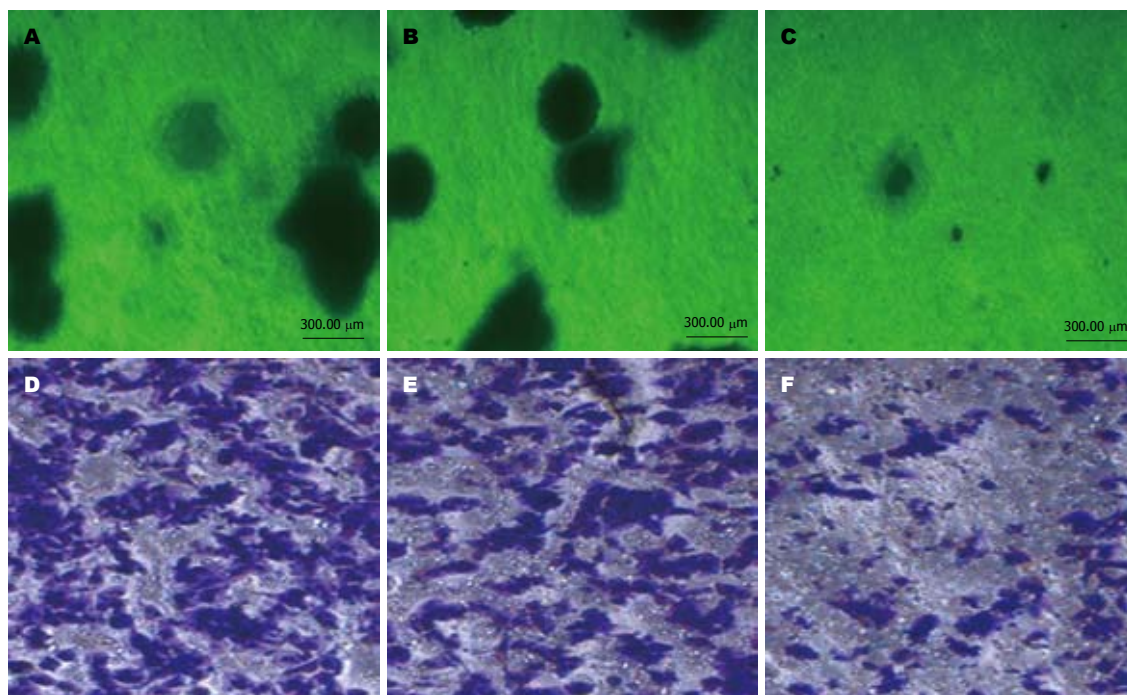


图4 miR-331抑制胃癌细胞克隆形成和侵袭($\times 100$)。A-C: 克隆形成; D-F: 侵袭。A, D: SGC-7901; B, E: pSuper; C, F: pSuper/miR-331。

对胃癌的发病机制尚缺乏全面和深入的了解。已有研究报道,胃癌中也存在广泛的microRNA表达失调^[2-6]。miRNA是近年才被发现的一类小分子单链RNA,长度通常21-25 nt,具有发夹样茎-环二级结构,他主要通过成熟mRNA的3'-UTR序列相结合,抑制mRNA的翻译或使mRNA降解,从而抑制基因的表达^[7-10]。成熟microRNA通过与靶基因完全(植物内)或不完全(动物内)互补结合,促进靶基因mRNA降解或者抑制翻译,调控基因表达,广泛参与生命过程中一系列重要进程,包括早期发育、细胞增殖、细胞凋亡、脂肪代谢和细胞分化^[7,8,11-13]。目前,对于microRNA功能研究主要通过真核表达载体、体外转录以及直接合成3种方法为主。由于RNA本身容易受RNA酶污染而降解,合成价格昂贵、使用次数有限,使得后两种方法的应用有限,而采用真核表达载体,却有独特的优势^[3,14-16]。在本研究中我们首先通过生物信息学的方法分析了miR-331,人的miR-331(MI0000812)定位于12号染色体长臂12q22,与人的miR-3685属于同一个家族,miR-331前体长度为94 bp,其成熟体分为miR-331-5p和miR-331-3p。Epis等^[17]在前列腺癌细胞中研究发现miR-331-3p在前列腺癌组织中低表达,转染miR-331-3p前体能抑制ERBB-2基因的表达并能阻止下游PI3K/Akt雄激素受体信号通路,通过降低雄激素刺激前列腺特异性

抗原启动子活性,抑制前列腺特异性抗原的表达;Wang等^[18]通过对90个永生化淋巴瘤细胞系366种miRNAs和14 174 mRNAs之间关联分析研究发现,miR-331与细胞周期相关。为了更好地研究miR-331在胃癌中的作用,本研究采用microRNA表达载体pSuper.gfp/neo载体,此载体具有H1型启动子和绿色荧光蛋白,当microRNA插入此载体多克隆位点时被宿主细胞Dicer酶切割,成为成熟的microRNA。构建的miR-331真核表达载体转染到SGC-7901细胞,该细胞本身低表达miR-331^[1],转染进的miR-331前体能被宿主细胞Dicer酶切割,成为成熟的miR-331,本实验为构建microRNA表达载体提出新的思路与方法。其次,构建的质粒转染入细胞后可整合到细胞基因组中,稳定表达并与绿色荧光蛋白融合表达,绿色荧光蛋白的表达可以间接反映microRNA表达情况,并可以衡量质粒导入细胞过程中的转染效率以及表达情况。通过越来越多的证据显示,人类的一些恶性肿瘤组织中microRNA基因的表达发生改变,如肺癌^[8,14]、肝癌^[19]、结肠癌^[15]、乳腺癌^[12]、食管癌^[20]。microRNA在胃癌中的调节作用也被越来越多的实验证实^[3,21-25],Wan等^[26]发现miR-9在人类胃癌中下调,过表达的miR-9抑制人胃癌MGC-803细胞的生长,miR-9打靶NF- κ B1,并且调节胃癌细胞的生长。miR-150在胃癌细胞系和组织中高表达,异位表

达的miR-150促进肿瘤和胃癌细胞扩散. 荧光素酶报告基因分析表明, EGR2是miR-150的直接靶位点^[27]. 人类结肠癌细胞系中, miR-200b表达上调, 加入5-氟尿嘧啶处理之后miR-200b表达下调. miR-200b抑制络氨酸磷酸酶蛋白-PTPN12, 从而使c-Abl、Src和Ras等癌基因失活^[28]. 为了更好阐明miR-331在胃癌发生发展中的作用, 我们通过蛋白印迹实验显示miR-331高表达抑制细胞周期相关基因E2F1的表达, 并通过克隆形成和侵袭实验对其进行了初步探讨, 本实验发现, miR-331高表达对胃癌SGC-7901细胞的克隆形成具有明显的抑制作用, 过表达的miR-331能够抑制胃癌SGC-7901细胞的侵袭. 目前, 虽然已经鉴定出了大量的microRNA, 但其作用机理以及许多microRNA的生理功能还不是很清楚. 本实验构建了pSuper/miR-331真核表达载体, 通过实验证明其可在胃癌SGC-7901细胞中有效表达并转变为成熟的miR-331发挥生物学作用, 表明真核表达载体pSuper/miR-331转染细胞可用于其功能研究. 此结果为进一步研究miR-331在胃癌发生发展中的作用提供了实验基础.

4 参考文献

- Guo X, Guo L, Ji J, Zhang J, Zhang J, Chen X, Cai Q, Li J, Gu Q, Liu B, Zhu Z, Yu Y. miRNA-331-3p directly targets E2F1 and induces growth arrest in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 398: 1-6
- Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, Ogawa R, Harata K, Fujii Y. microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int J Oncol* 2009; 34: 537-542
- Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. MicroRNA-125a-5p Is an Independent Prognostic Factor in Gastric Cancer and Inhibits the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells in Combination with Trastuzumab. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2725-2733
- Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, Iliopoulos D, Piloizzi E, Liu CG, Negrini M, Cavazzini L, Volinia S, Alder H, Ruco LP, Baldassarre G, Croce CM, Vecchione A. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 272-286
- Zeng Y, Sun QM, Liu NN, Dong GH, Chen J, Yang L, Wang B. Correlation between pre-miR-146a C/G polymorphism and gastric cancer risk in Chinese population. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3578-3583
- Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2883-2888
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628-9632
- Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* 2006; 25: 6176-6187
- Zhang B, Pan X, Anderson TA. MicroRNA: a new player in stem cells. *J Cell Physiol* 2006; 209: 266-269
- Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem* 2010; 148: 381-392
- Kondo N, Toyama T, Sugiura H, Fujii Y, Yamashita H. miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 5004-5008
- Laios A, O'Toole S, Flavin R, Martin C, Kelly L, Ring M, Finn SP, Barrett C, Loda M, Gleeson N, D'Arcy T, McGuinness E, Sheils O, Sheppard B, O'Leary J. Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Mol Cancer* 2008; 7: 35
- Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, Gefen N, Izraeli S, Rechavi G, Pass H, Nonaka D, Li J, Spector Y, Rosenfeld N, Chajut A, Cohen D, Aharonov R, Mansukhani M. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2030-2037
- Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891
- 严辉, 陈卫昌, 岑建农, 沈宏杰, 郭凌川, 顾冬梅, 谢学顺. 转染GKLF基因对人胃癌细胞SGC-7901裸鼠移植瘤的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 7-12
- Epis MR, Giles KM, Barker A, Kendrick TS, Leedman PJ. miR-331-3p regulates ERBB-2 expression and androgen receptor signaling in prostate cancer. *J Biol Chem* 2009; 284: 24696-24704
- Wang L, Oberg AL, Asmann YW, Sicotte H, McDonnell SK, Riska SM, Liu W, Steer CJ, Subramanian S, Cunningham JM, Cerhan JR, Thibodeau SN. Genome-wide transcriptional profiling reveals microRNA-correlated genes and biological processes in human lymphoblastoid cell lines. *PLoS One* 2009; 4: e5878
- Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009; 69: 1135-1142
- Zhou SL, Wang LD. Circulating microRNAs: novel biomarkers for esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2348-2354
- Jin Z, Selaru FM, Cheng Y, Kan T, Agarwal R, Mori Y, Olaru AV, Yang J, David S, Hamilton JP, Abraham JM, Harmon J, Duncan M, Montgomery EA, Meltzer SJ. MicroRNA-192 and -215 are upregulated in human gastric cancer in vivo and suppress ALCAM expression in vitro. *Oncogene* 2011; 30: 1577-1585
- Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K, Mochizuki T. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 2010; 5: e13247
- Song YX, Yue ZY, Wang ZN, Xu YY, Luo Y, Xu HM,

■同行评价

本文方法先进, 设计合理, 对胃癌的治疗有重要的指导意义.

- Zhang X, Jiang L, Xing CZ, Zhang Y. MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Mol Cancer* 2011; 10: 1
- 24 Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Kudo T, Harada E, Sugai T, Takamaru H, Niinuma T, Maruyama R, Yamamoto H, Tokino T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. *Carcinogenesis* 2010; 31: 2066-2073
- 25 Takei Y, Takigahira M, Mihara K, Tarumi Y, Yanagihara K. The metastasis-associated microRNA miR-516a-3p is a novel therapeutic target for inhibiting peritoneal dissemination of human scirrhous gastric cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 1442-1453
- 26 Wan HY, Guo LM, Liu T, Liu M, Li X, Tang H. Regulation of the transcription factor NF-kappaB1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 16
- 27 Wu Q, Jin H, Yang Z, Luo G, Lu Y, Li K, Ren G, Su T, Pan Y, Feng B, Xue Z, Wang X, Fan D. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 392: 340-345
- 28 Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol Res* 2007; 56: 248-253

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。