

血清外泌体 mir-17 联合 mir-23a 检测对结肠癌的诊断价值

李斯靖, 李晓枫

珠海市中西医结合医院外科, 珠海 510000

【摘要】 目的 观察血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平, 探究其对结肠癌的诊断价值。方法 收集 2017 年 12 月-2018 年 12 月本院收治结肠癌患者 65 例为研究对象, 另取正常健康体检者 65 例为对照组, 采集所有受试者外周血血清, 提取血清外泌体, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平; 分析血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平与结肠癌患者临床病理参数的关系; 绘制 ROC 曲线分析 mir-17、mir-23a 联合检测对结肠癌的诊断价值; Logistic 回归分析影响结肠癌患者发生的危险因素。**结果** 与对照组比较, 结肠癌患者血清外泌体中 mir-17、mir-23a 表达水平显著升高; mir-17、mir-23a 表达水平结肠癌患者年龄、性别、病理类型、脉管浸润、CEA 水平无关, 与 TNM 分期、分化程度、淋巴结转移有关 ($P < 0.05$); 血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平诊断结肠癌患者的 AUC 为 0.775、0.802, 特异度为 76.90%、81.50%, 灵敏度为 75.40%、80.00%; 二者联合诊断结肠癌患者的 AUC 为 0.884, 特异度为 65.50%, 灵敏度为 93.80%。Logistic 分析结果显示, 淋巴结转移、mir-17、mir-23a 表达水平是影响结肠癌发生的独立危险因素。**结论** mir-17、mir-23a 在结肠癌患者血清外泌体中显著高表达, 与结肠癌分化程度及淋巴转移有关, 二者联合检测可提高对结肠癌诊断的准确度及灵敏度, 可能对结肠癌早期诊断有一定参考意义。

【关键词】 MicroRNA-17; MicroRNA-23a; 结肠癌; 外泌体; 诊断价值

Diagnostic value of serum exosome mir-17 combined with mir-23a in colon cancer

LI Si-jing, LI Xiao-feng

Department of Surgery, Zhuhai Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Zhuhai, 510000, China

【Abstract】 Objective To observe the expression levels of mir-17 and mir-23a in serum exosomes and explore their diagnostic values for colon cancer. **Methods** 65 patients with colon cancer admitted to our hospital from December 2017 to December 2018 were selected as the study subjects, and 65 healthy people as the control group. Peripheral blood serum was collected from all subjects and serum exosomes were extracted. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of mir-17 and mir-23a in serum exosomes, the relationships between the expressions of mir-17 and mir-23a in serum and the clinicopathological parameters of patients with colon cancer were analyzed, the ROC curve was drawn to analyze the diagnostic value of combined detection of mir-17 and mir-23a for colon cancer, Logistic regression analysis was used to analyze the risk factors of colon cancer. **Results** Compared with the control group, the levels of mir-17 and mir-23a in serum exosomes of patients with colon cancer were significantly increased ($P < 0.05$). The expression levels of mir-17 and mir-23a were not related to age, sex, pathological type, vascular invasion and CEA level ($P > 0.05$), but were related to TNM stage, differentiation degree and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The AUC of serum exosome mir-17 and mir-23a was 0.775 and 0.802, the cut-off value was 3.523 and 3.615, the specificity was 76.90% and 81.50%, and the sensitivity was 75.40% and 80.00%. The AUC of colon cancer patients diagnosed by the combination of the two was 0.884, the specificity of 65.50% and the sensitivity of 93.80%. Logistic regression analysis showed that lymph node metastasis, mir-17 and mir-23a expression levels were independent risk factors for colon cancer ($OR = 1.764$, 95% $CI: 1.452-2.143$; $OR = 1.598$, 95% $CI: 1.275-2.003$; $OR = 1.685$, 95% $CI: 1.428-1.988$; $P <$

0.05). **Conclusion** Mir-17 and mir-23a are highly expressed in serum exosomes of patients with colon cancer, which are related to the degree of differentiation and lymphatic metastasis of colon cancer. The combined detection of the two methods can improve the AUC and sensitivity in the diagnosis of colon cancer, which may have some reference significance for early diagnosis of colon cancer.

【Key words】 MicroRNA-17; MicroRNA-23a; Colon cancer; Exosome; Diagnostic value

结肠癌是一种常见消化道恶性肿瘤, 主要指结肠黏膜上皮细胞恶性增殖。调查发现, 结肠癌在全球癌症发病率和病死率中均排第3位, 然而我国结肠癌发病率和死亡率占世界发病率和死亡率的18.6%和20.1%, 均占世界第1位, 且呈继续上升趋势^[1]。尽管随着现代医疗水平的提高已经对结肠癌的发生发展及治疗有较多认识, 但结肠癌早期诊断仍缺乏特异性指标, 发现时多数患者已进入中晚期, 晚期侵袭、转移性患者5年生存率不到10%, 病死率很高, 严重威胁人类健康^[2]。因此寻找结肠癌早期诊断的新型生物标志至关重要。微小RNA(MicroRNA, miRNA)是一种长度为18-22个核苷酸的内源性非编码小RNA, 研究发现, miRNA在肿瘤的发生发展过程中扮演重要作用^[3]。外泌体(exosomes)是一种50-100 nm的双层囊泡, 由多种动物活细胞分泌, 在人体血液、唾液、乳汁、尿液等液体中均有分布^[4]。研究发现, 循环miRNA可被包裹在外泌体中, 癌症患者血浆中外泌体含量较正常人显著升高, 可作为肿瘤重要诊断标志物和治疗靶点^[5]。本研究拟观察结肠癌患者血清外泌体mir-17、mir-23a表达水平, 探究其对结肠癌的诊断价值, 以期对结肠癌早期诊断提高一定参考依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2017年12月~2018年12月本院消化内科收治的65例确诊为结肠癌患者为疾病组研究对象, 男性41例, 女性24例, 年龄为35-70岁, 平均年龄为(50.58±15.76)岁。另收集同期健康体检者65例为对照组, 其中男性40例, 女性25例, 年龄36-72岁, 平均年龄为(52.48±16.55)岁。依据2002年国际抗癌协会公布的TNM分期:I+II期24例;III+IV期41例。根据组织学病理类型不同, 将结肠癌患者分为管状腺癌33例, 患者癌细胞主要形成腺管状结构; 粘液腺癌32例, 主要特征为癌细胞分泌大量黏液, 粘液成分大于50%。根据患者有无脉管浸润, 分为有脉管浸润

29例, 无脉管浸润36例。根据患者癌胚抗原(CEA)表达水平, 将患者分为≥5 μg/L 34例, <5 μg/L 31例。根据患者结肠癌分化程度, 低分化14例, 中、高分化51例。根据患者有无淋巴转移, 分为有淋巴转移43例, 无淋巴转移22例。收集受试者所有临检查床资料及血清标本。本研究经过院道德伦理委员会批准通过, 所有样品采集均取得患者及家属知情同意并签字。

1.2 纳入排除标准 关于结肠癌的诊断均经手术病理确诊。纳入标准:(1)被确诊为结肠癌患者;(2)术前未进行放、化学治疗及其他药物治疗患者;(3)自愿接受治疗研究, 并能完成临床记录者;(4)无其他免疫或血液系统疾病者。排除标准:(1)有其他肠道疾病患者;(2)患有其他肿瘤者;(3)有心、肝、肾等脏器功能障碍或其他恶性肿瘤患者;(4)不愿接受治疗调查研究者。

1.3 主要试剂与仪器 RNA提取试剂盒(编号:R0011)购自上海碧云天有限公司;Exosome Isolation Reagent(货号:EX010)购自上海歌凡生物科技有限公司;PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(编号6210A)、microRNA定量(qRT-PCR)试剂盒(编号:638315)购自TaKaRa生物公司;引物由上海生工生物公司合成。MODEL550型酶标,qRT-PCR仪购自美国Bio-Rad公司等。

1.4 研究方法

1.4.1 血清外泌体提取 采集对照组结疾病组患者晨起(8:00-10:00)空腹外周静脉血10 mL, 3000 rpm/min 4℃离心5 min, 收集血清。采用血清外泌体提取试剂盒提取血清中外泌体, 具体步骤严格按照说明书进行。采用透射电镜观察鉴定提取物中外泌体。

1.4.2 RT-qPCR法血清外泌体中mir-17、mir-23a表达水平 所有受试者均分别取50 μL外泌体样本, 采用RNA提取试剂盒提取外泌体总RNA, 试验于RNA无菌操作室进行。采用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录得cDNA。采用定量PCR仪(Bio-Rad)对mir-17、mir-23a进

行扩增。qRT-PCR反应体系共25 μ L:TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(2X)12.5 μ L, cDNA (50 ng/ μ L)2 μ L, 上下游引物 (10 μ M)各1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。反应采用两步法, 条件设置为:95 $^{\circ}$ C, 5 s;95 $^{\circ}$ C, 30 s;60 $^{\circ}$ C, 30 s;72 $^{\circ}$ C, 15 s;40个循环;添加溶解曲线。mir-17、mir-23a及内参U6的引物序列见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对对照组及结肠癌患者血清外泌体 mir-17、mir-23a 相对表达水平进行定量分析。

1.5 统计学分析 利用SPSS 20.0进行统计学分析,计数资料采用“例[%]”表示,进行 χ^2 检验;计量资料符合正态分布者以均数标准差($\bar{x}\pm s$)表示,进行t检验;绘制受试者工作特征曲线(ROC),根据ROC曲线下面积(AUC)比较 mir-17、mir-23a 及二者联合检测对结肠癌的诊断价值,并计算各项指标的最佳截断值、敏感度、特异度,以衡量各项指标的诊断效能,AUC间的比较参考 DeLong 等^[6]方法。采用 Logistic 回归分析影响结肠癌发生的危险因素。 $P<0.05$,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组及疾病组患者血清外泌体中 mir-17、mir-23a 表达水平比较 与对照组比较,疾病组血

清外泌体中 mir-17、mir-23a 表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。详见表2。

2.2 血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平与结肠癌临床病理参数的关系 血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平与结肠癌患者年龄、性别、病理类型、脉管浸润、CEA水平无关($P>0.05$),与TNM分期、分化程度、淋巴结转移有关($P<0.05$)。详见表3。

2.3 血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平对结肠癌的诊断价值分析 分别以血清外泌体 mir-

表1 qRT-PCR引物序列

miRNA	引物 5'-3'
mir-17	F: TGTCAAAGTGCTTACAGTG R: CACAGCTCGTAGAACAGGAGG
mir-23a	F: CCAGATCAGGCATCCTATTTG R: TATCATTGTCGAATTC-CACTGT
U6	F: GCTTCGCCAATTTGGGGTTG R: GTTG-GTTCGAGCGGTATCA

表2 对照组及疾病组中 mir-17、mir-23a 表达水平比较

组别	例数	mir-17	mir-23a
对照组	65	1.02 \pm 0.43	0.99 \pm 0.23
疾病组	65	3.28 \pm 0.74	3.53 \pm 0.62
<i>t</i>		21.289	30.967
<i>P</i>		<0.001	<0.001

表3 血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平与结肠癌患者病理参数的关系

病理参数	例数	mir-17	<i>t</i>	<i>P</i>	mir-23a	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄			1.873	0.066		1.798	0.077
<50	35	2.98 \pm 0.63			3.25 \pm 0.65		
\geq 50	30	3.31 \pm 0.79			3.56 \pm 0.74		
性别			0.525	0.601		0.175	0.862
男	41	3.19 \pm 0.57			3.48 \pm 0.84		
女	24	3.27 \pm 0.63			3.52 \pm 0.97		
TNM分期			2.529	0.014		2.662	0.010
I+II期	24	2.85 \pm 0.54			3.04 \pm 0.77		
III+IV期	41	3.32 \pm 0.81			3.58 \pm 0.80		
脉管浸润			0.727	0.470		0.580	0.564
无	36	3.16 \pm 0.67			3.47 \pm 0.63		
有	29	3.28 \pm 0.65			3.57 \pm 0.76		
CEA(g/L)			0.697	0.489		0.561	0.577
\leq 5	34	3.19 \pm 0.56			3.48 \pm 0.54		
>5	31	3.30 \pm 0.71			3.56 \pm 0.61		
分化程度			2.078	0.042		2.275	0.026
低	14	3.05 \pm 0.51			3.17 \pm 0.58		
中、高	51	3.35 \pm 0.47			3.59 \pm 0.62		
淋巴结转移			2.274	0.026		3.389	0.001
无	22	3.02 \pm 0.58			3.01 \pm 0.59		
有	43	3.39 \pm 0.64			3.54 \pm 0.60		

17、mir-23a 表达水平及二者联合预测值为检验变量绘制 ROC 曲线,结果显示,血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平诊断结肠癌患者的 AUC 为 0.775、0.802,截断值为 3.523、3.615,特异度为 76.90%、81.50%,灵敏度为 75.40%、80.00%;二者联合诊断结肠癌患者的 AUC 为 0.884,显著高于二者单独检测时,差异有统计学意义($P<0.05$),血清外泌体 mir-17、mir-23a 联合检测诊断结肠癌的特异度为 65.50%,灵敏度为 93.80%。详见图 4,表 2。

2.4 Logistic 回归分析影响结肠癌发生的危险因素 为了确定影响结肠癌发生的危险因素,以结肠癌是否发生为因变量,以年龄、性别、TNM 分期、分化程度、淋巴结转移、mir-17、mir-23a 表达

表 4 血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平对结肠癌诊断价值分析

检测项目	截断值	AUC	灵敏度(%)	特异度(%)
mir-17	3.523	0.775	75.40	76.90
mir-23a	3.615	0.802	80.00	81.50
mir-17+ mir-23a		0.884 ^{ab}	93.80	65.50

注: AUC 与 mir-17 比较, ^a $P<0.05$; 与 mir-23a 比较, ^b $P<0.05$ 。

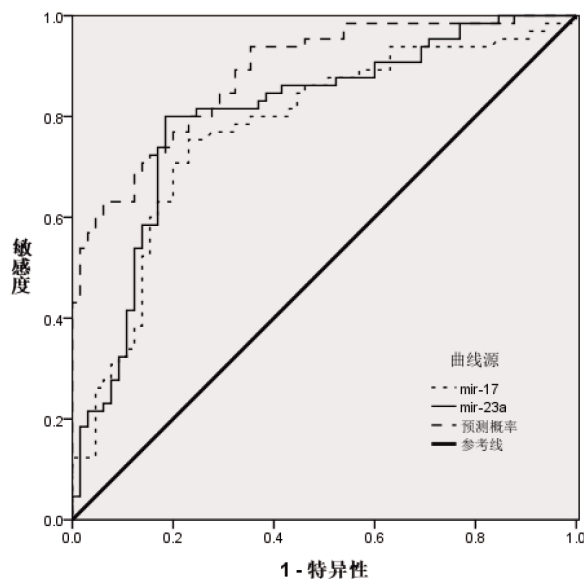


图 2 血清外泌体 mir-17、mir-23a 诊断结肠癌的 ROC 曲线

水平为自变量,采用 Logistic 回归分析影响结肠癌发生的危险因素,研究结果显示,淋巴结转移、mir-17、mir-23a 表达水平是影响结肠癌发生的独立危险因素($OR=1.764, 95\%CI: 1.452-2.143$; $OR=1.598, 95\%CI: 1.275-2.003$; $OR=1.685, 95\%CI: 1.428-1.988$; P 均 <0.05)。详见表 5。

3 讨论

结肠癌是常见消化道恶性肿瘤,在我国发病率和死亡率均逐渐升高,严重威胁人类健康^[7-8]。结肠癌早期发展过程缓慢,一般最早由结肠粘膜病变逐渐发展为腺瘤状息肉,中晚期演变成有侵袭性和转移性的癌症,其中侵袭、转移是结肠癌患者死亡的主要原因^[9-10]。因此,提高早期诊断效能可提高结肠癌患者生存率。外泌体是一种小囊泡体,由多种动物活细胞分泌,可包裹大量蛋白质、DNA、RNA、miRNA 等成分,并将其传递给周围或远处细胞,介导一系列生物学反应发生^[11]。外泌体不仅可促进细胞代谢过程中代谢废物的排出,也可介导细胞间物质、信息交流,其中来源于肿瘤细胞的外泌体参与肿瘤侵袭转移等病理过程^[12-13]。近来随着 miRNA 研究深入,结肠癌与 miRNA 关系逐渐成为研究热点^[14]。

mir-17-92 簇最早发现在 B 淋巴细胞瘤和肺癌中高表达,近来有报道指出, mir-17 在结肠癌组织中上调表达,通过抑制 Par4 基因表达调控结肠癌细胞增殖和存活^[15]。mir-23a 广泛参与细胞增殖、凋亡及变异等过程, mir-23a 在多种癌症细胞中高表达,比如结肠癌^[16]、胃癌^[17]、乳腺癌^[18]等,可促进肿瘤细胞转移。李晓东等^[19]研究发现, mir-23a 在结肠癌患者血清显著高于结肠息肉和健康对照组,手术后结肠癌患者血清 mir-23a 水平较手术前降低。但至今关于血清外泌体 mir-17 联合 mir-23a 对结肠癌诊断价值效能评价的报道尚不多见。本研究首先在透射电镜下观察到血清分离

表 5 Logistic 回归分析影响结肠癌发生的危险因素

变量	β	χ^2/wald	SE	OR	95%CI	P
年龄	0.305	1.112	0.289	1.357	0.928-1.984	0.404
性别	0.238	1.185	0.219	1.269	0.994-1.615	0.356
TNM 分期	0.380	1.246	0.341	1.463	0.979-2.186	0.183
分化程度	0.203	1.152	0.189	1.225	0.893-1.680	0.341
淋巴转移	0.568	3.781	0.292	1.764	1.452-2.143	0.001
mir-17	0.469	3.692	0.244	1.598	1.275-2.003	0.021
mir-23a	0.522	4.879	0.236	1.685	1.428-1.988	0.033

物中外泌体呈典型圆形或椭圆形囊泡结构,直径约 50–150 nm,大小不等,与文献报道一致^[4],提示外泌体分离成功,可用于下游试验。本研究结果发现,结肠癌患者血清外泌体中 mir-17、mir-23a 表达水平均显著高于对照组,与上述研究结果一致,提示血清外泌体中 mir-17、mir-23a 高表达可能与结肠癌发生有关。连娇燕等^[20]研究报道,mir-17-5p 在结肠癌组织中高表达且与结肠癌患者不良预后有关,mir-17-5p 可通过抑制其靶基因 E2F1 参与调控结肠癌的发生并促进癌细胞增殖。李晓东等^[19]研究报道,mir-23a 上调与结肠癌分期、浸润深度增加及肠粘膜恶性转化显著相关,mir-23a 可直接靶向抑制主演以抑制因子 1 蛋白,从而促进结肠癌细胞的增值、侵袭及转移。本研究结果显示血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平与结肠癌患者年龄、性别、病理类型、脉管浸润、CEA 水平无关,与 TNM 分期、分化程度、淋巴结转移有关,提示血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平可能与结肠癌病情发展及严重程度有关。

本研究 ROC 曲线结果显示,血清外泌体 mir-17、mir-23a 表达水平诊断结肠癌患者的 AUC 分别为 0.775、0.802,截断值分别为 0.523、0.615,特异度为分别 76.90%、81.50%,灵敏度分别为 75.40%、80.00%;二者联合诊断结肠癌患者的 AUC 为 0.884,显著高于二者单独检测时,血清外泌体 mir-17、mir-23a 联合检测诊断结肠癌的特异度为 65.50%,灵敏度为 93.80,提示血清外泌体 mir-17 联合 mir-23a 有助于提高对结肠癌诊断的 AUC 和灵敏度,有潜力成为结肠癌早期诊断标志分子。Logistic 回归分析影响结肠癌发生的危险因素结果显示,淋巴结转移、mir-17、mir-23a 表达水平是影响结肠癌发生的独立危险因素,与 Zhou^[9]、李晓东^[19]等研究结果一致,提示 mir-17、mir-23a 表达水平影响结肠癌的发生发展。

综上所述,mir-17、mir-23a 在结肠癌患者血清外泌体中显著高表达,与结肠癌分化程度及淋巴转移有关,二者联合检测可提高对结肠癌诊断的 AUC 及灵敏度,可能对结肠癌早期诊断有一定参考意义。但由于本研究样本量少,结果具有一定局限性,有待加大样本量进一步深入研究。

参考文献

[1] McWhirter J E, Hoffman-Goetz L. Coverage of skin cancer and recreational tanning in North American magazines before and

after the landmark 2006 International Agency for Research on Cancer report[J]. BMC Public Health, 2015,15(1):169–180.

- [2] 胡阿锦,张畅,龚苗子,王云帆,王跃,王淑芳,张雨,缪琦,崔朝丽,张晋夏.结直肠 CAR-T 细胞治疗相关肿瘤靶点的筛选:CEA、EGFR、HER2、Mesothelin、MUC1 和 EpCAM 的表达及共表达状况[J].消化肿瘤杂志(电子版),2019,11(03):225–230.
- [3] Qu A, Sun M, Xu L, et al. Quantitative zeptomolar imaging of miRNA cancer markers with nanoparticle assemblies [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019,116(9):3391–3400.
- [4] Huang J, Ding Z, Luo Q, et al. Cancer cell-derived exosomes promote cell proliferation and inhibit cell apoptosis of both normal lung fibroblasts and non-small cell lung cancer cell through delivering alpha-smooth muscle actin [J]. Am J Transl Res, 2019,11(3):1711–1723.
- [5] Bigagli E, Cinci L, D'Ambrosio M, et al. Transcriptomic Characterization, Chemosensitivity and Regulatory Effects of Exosomes in Spontaneous EMT/MET Transitions of Breast Cancer Cells [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2019,16(3):163–173.
- [6] DeLong E R, DeLong D M, Clarke-Pearson D L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach[J]. Biometrics, 1988,44(3):837–845.
- [7] Piao S S, Shang B. Pizotifen Inhibits the Proliferation and Migration of Colon Cancer HCT116 Cells by Down-regulating Wnt Signaling Pathway [J]. Ann Clin Lab Sci, 2019,49(2):183–188.
- [8] Lou Q, Liu R, Yang X, et al. miR-448 targets IDO1 and regulates CD8+ T cell response in human colon cancer [J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1):210.
- [9] Zhou J Y, Chen M, Wu C E, et al. The modified Si-Jun-Zi Decoction attenuates colon cancer liver metastasis by increasing macrophage cells [J]. BMC Complement Altern Med, 2019,19(1):86–94.
- [10] 罗锦文,李新春,雷强,陈淮,胡文清.结直肠癌 MRI、CT 诊断及与其 IGFBP-3、APE1-AAbs 联合诊断的价值研究 [J].消化肿瘤杂志(电子版),2018,10(04):224–230.
- [11] 洪永刚,郑浩,黄智平,刘启志,张卫,郝立强.MicroRNA-875-5p 在结直肠癌组织的表达及其对结直肠癌细胞增殖、凋亡能力的影响[J].消化肿瘤杂志(电子版),2019,11(02):94–99.
- [12] Hou J, Wang F, Liu X, et al. Tumor-derived exosomes enhance invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma cells[J]. J Oral Pathol Med, 2018, 47(2):144–151.
- [13] Beach A, Zhang H G, Ratajczak M Z, et al. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer [J]. J Ovarian Res, 2014,7(1):14–24.
- [14] Chen W, Cai G, Liao Z, et al. miRNA-766 induces apoptosis of human colon cancer cells through the p53/Bax signaling pathway by MDM4 [J]. Exp Ther Med, 2019,17(5):4100–

- 4108.
- [15] Lu D, Tang L, Zhuang Y, et al. miR-17-3P regulates the proliferation and survival of colon cancer cells by targeting Par4 [J]. Mol Med Rep, 2018,17(1):618-623.
- [16] 唐海林, 邓敏, 廖前进, 等. miR-23a 与转移抑制因子 1 在结肠癌中的表达及其临床意义[J]. 中华病理学杂志, 2012, 41(1):28-32.
- [17] 王燕东, 张品南, 王忠泉, 等. 胃腺癌组织中 miR-23a 与转移抑制因子 1 的表达及意义[J]. 放射免疫学杂志, 2013,26(6):785-787.
- [18] 金科, 朱剑梅, 邱发麒. 微小 RNA-23a 对乳腺癌细胞增殖和侵袭的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017,33(16):1568-1571.
- [19] 李晓东, 吴钢, 刘永军, 等. 结肠癌患者血清 miR-192 和 miR-23a 水平的变化及其临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2018,27(2):246-251.
- [20] 连娇燕, 金海, 文国容, 等. miR-17-5p 与消化系统肿瘤关系的研究进展[J]. 山东医药, 2016, 56(24):101-103.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对参考文献撰写的最新要求

针对多数作者来稿中参考文献书写不规范的情况,本刊在此将文稿书写要求刊登出来,烦请各位作者注意。本刊文稿引用参考文献时,必须与其原文核对无误,请按采用顺序编码著录,依照其在正文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。未发表的观察资料一般不作为参考文献,确定需要引用时,可将其在正文相应处注明。2次文献不适宜作为参考文献。尽量避免引用摘要作为参考文献。文献作者在3位以内者,姓名均予以列出;3位以上者,只列出前3位,后加“等”、“et al”(西文)、“他”(日文)、“и.т.д.”(俄文);作者姓名一律姓氏在前,名字在后。外国人名字采用首字母缩写形式,缩写名后不加缩写点;日文汉字请按规定书写,勿与我国汉字及简化字混淆。不同作者姓名之间用“,”隔开,不用“和”、“and”等连词。文献类型和电子文献载体标志代码参照 GB 3469《文献类型与文献载体代码》,题名后标注文献类型标志,电子文献必须标注著录项目。外文期刊名称用缩写,以美国国立医学图书馆编辑的 *Index Medicus* 格式为准。每条参考文献必须著录完整的起止页码。