

胃癌相关转录因子 11 与胃癌细胞恶性表型关系的探究

孙中尚, 谢睿, 周传文, 沈鹏, 施琦, 许凌云

南京医科大学附属淮安第一医院消化内科, 江苏 淮安 223300

【摘要】 目的 探讨长链非编码核糖核酸(LncRNA)胃癌相关转录因子 11(STCAT11)与胃癌患者临床特征及胃癌细胞生物学行为的关系。**方法** 在 39 份胃癌及其癌旁组织中分别利用实时荧光定量 PCR 法检测 STCAT11 表达量,并分析表达量与临床特征的关系。在 STCAT11 低表达及高表达胃癌细胞株中分别转染表达及干扰质粒,应用克隆形成及细胞计数试剂盒 8(CCK-8)实验检测细胞增殖能力,通过 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力、划痕试验检测细胞迁移能力及裸鼠成瘤实验检测成瘤能力。**结果** 研究发现与癌旁组织相比,胃癌组织中 STCAT11 显著低表达,并且表达量与 TNM 分期、浸润深度及淋巴结转移呈负相关(P 均 <0.05)。体外和体内实验均证实上调 STCAT11 表达可限制胃癌细胞的增殖及侵袭能力,下调 STCAT11 表达则起促进作用(P 均 <0.05)。**结论** LncRNA STCAT11 在胃癌组织中表达下调,其表达失调可能参与了胃癌发生、发展的过程,提示 STCAT11 有可能作为胃癌早期诊断和治疗的分子靶点。

【关键词】 长链非编码 RNA; 胃癌相关转录因子 11; 胃癌; 恶性表型

Study on the relationship between the Stomach cancer associated transcript 11 and the malignant phenotype of gastric cancer

SUN Zhong-shang, XIE Rui, ZHOU Chuan-wen, SHEN Peng, SHI Qi, XU Ling-yun

Department of Gastroenterology, The Affiliated Huaian NO.1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huaian 223300, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between LncRNA STCAT11 and clinical characteristics of gastric cancer patients and biological behavior of gastric cancer cells. **Methods** Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was applied to detect the STCAT11 expression in 39 gastric cancer tissues and gastric cancer cell lines, while analyzing the relationship between the expression and the clinical significance. Low and high STCAT11 expression gastric cancer cell lines were transfected separately with expression and interference plasmid, then the colony formation and CCK-8 assays were applied to detect the Cell proliferation, the scratch assay for migration, the Transwell migration assay for invasion. Detection of tumorigenicity by nude mice tumorigenicity test. **Results** The expression of STCAT11 was down-regulated in gastric cancer tissues compared with the adjacent tissues, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The age and gender are not associated with STCAT11 expression level (both $P>0.05$), while positively correlated with TNM stage ($P<0.05$), depth of invasion ($P<0.05$) and lymph node metastasis ($P<0.05$). In vitro and in vivo experiments have confirmed that up-regulation of STCAT11 expression can inhibit the proliferation and invasion of gastric cancer cells, while down-regulation of STCAT11 expression plays a promotive role. (both $P<0.05$). **Conclusions** The expression of STCAT11 is down-regulated in gastric cancer tissues, and its imbalance may be involved in the occurrence and development of gastric cancer, suggesting that STCAT11 may be a molecular target for early diagnosis and therapy in gastric cancer.

【Key words】 Long noncoding RNA; STCAT11; Gastric cancer; Malignant phenotype

作者简介: 孙中尚, 住院医师, E-mail: nice22_hh@163.com

通讯作者: 谢睿, 副主任医师 E-mail: kxpt_03@163.com

在东亚、东欧和美洲部分地区,胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤,在肿瘤致死疾病中排名第二^[1]。近年来得益于在肿瘤诊断和治疗上的进步,使得肿瘤患者生存率显著提高,但由于癌细胞的侵袭和转移仍然使得进展期肿瘤患者预后差^[2]。因此,研究肿瘤发生发展的分子机制,会对肿瘤的早期诊断和靶向治疗提供重要支持^[3]。LncRNA 通常以特定于疾病、组织或发育阶段的方式表达,这使得其有潜力成为疾病特别是恶性肿瘤的早期诊断及治疗靶点^[4,5]。研究证实,胃癌中 LncRNA,例如 STCAT3 在胃癌中具有促癌效应,而 MEG3 则表现为抑癌效应^[6,7]。虽然 LncRNA 研究成果众多,但其在胃癌中病理生理学机制仍不清楚。本研究选择 LncRNA 新分子(STCTA11),此前国外学者应用高通量 RNA 测序技术发现该分子在胃癌组织中异常低表达^[8]。本次研究通过分析组织中 STCAT11 表达量与胃癌患者临床特征的关系,应用体内及体外实验验证 STCAT11 表达量与胃癌细胞恶性表型的关系。研究结果表明 STCAT11 有可能作为胃癌患者预后不良的一个指标,并且有潜力成为胃癌早期诊断和基因治疗的靶点。

1 资料与方法

1.1 标本和材料

(1)组织标本:39例胃癌患者(男21例,女18例,年龄32~84岁)均选取于淮安市第一人民医院胃外科,离体手术标本在20 min内进行液氮速冻,然后转至-80℃冰箱保存备用。入组标准:①术前经病理组织学检查证实为胃癌,且术前无放疗或其他治疗史;②无长期服用糖皮质激素及非甾体类抗炎药药物史;③未合并其他恶性肿瘤;④术前一般状态良好,未合并消化道出血、消化道梗阻等并发症。设定癌组织为胃癌组,癌组织5 cm以外的正常组织为癌旁组。应用世界卫生组织胃癌病理标准进行组织学分类及分级,术后临床及病理分期均采用国际抗癌联盟和美国癌症联合委员会(UICC/AJCC)制定的第七版胃癌分期标准;通过查阅患者术前及术后病历资料和电话随访方式获得所需患者数据信息。本研究经过淮安市第一人民医院医学伦理委员会批准及患者知情同意。

(2)细胞:于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心采购6种人胃癌细胞株 SGC-7901、BGC-823、MKN-45、MGC-803、AGS、MKN-28 和

人正常胃黏膜细胞 GES-1。

(3)主要试剂:短发夹核糖核酸(shRNA)质粒及 STCAT11 表达质粒均由上海吉玛制药技术有限公司构建。STCAT11 的 qRT-PCR 引物上海睿安生物科技有限公司构建。Transwell 小室购自美国 Corning 公司。脂质体 Lipofectamine 购自美国 Invitrogen 公司。质粒提取试剂盒室购自 Omega 公司。Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司。

1.2 方法

(1)细胞培养:6种胃癌细胞株和人正常胃黏膜细胞使用 RPMI 1640 或 DMEM 培养基,于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。选取对数生长期的细胞用于实验。

(2)RNA 提取和 qRT-PCR:按照 TRIzol 说明书提取总 RNA,利用紫外分光光度仪检测 RNA 浓度及纯度,并逆转录成 cDNA,再应用 qRT-PCR 检测 STCAT11 的表达量,应用 GAPDH 标定并测算出相对定量值(RQ 值)。反应体系:SYBR Green qRT-PCR 混合液 10 μL,上下游引物各 2 μL,其中包括 STCAT11 特异引物,上游序列为 5'TAA GTGAGGCTGCATGGGA3',下游为 5'ATGCCCC GATGAAGC TG3';内参照 GAPDH 引物,上游序列为 5'CTGGTCGATGAGGTCC3',下游为 5'ATTGA GGTCGTCTGAGTCGAG3'。

(3)质粒转染:质粒载体均由 DNA Midiprep kit 提取,于六孔板中每孔接种 5×10⁵ 个细胞,严格按照 Lipofectamine 2000 说明书进行转染,48 小时后通过 qRT-PCR 验证转染效果。

(4)细胞计数试剂盒-8(CCK-8)增殖实验:于 96 孔板接种 5×10⁴ 个细胞,通过 Lipofectamine 2000 介导转染,设定转染后 4 小时为 0 h,分别应用酶标仪检测 0、24、48、72、96 小时 5 个时间点细胞增殖吸光度值(A450 值)。

(5)克隆形成实验:接种 100 个细胞于 6 孔板中,常规条件下培养 2~3 周,待肉眼可见细胞菌落时,吸尽孔中培养基,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗干净,每孔滴加结晶紫染液 500 μL,染色 10 分钟后计数。

(6)划痕实验:于六孔板中每孔接种 5×10⁵ 个转染 24 小时的细胞,设定接种 4 小时后为 0 h,用移液器枪头比着直尺划痕,PBS 冲洗,常规培养,分别在 0、24、48、72 h 时间点进行观察拍照,划痕修复率等于起始划痕宽度减去目前划痕宽度除以

起始划痕宽度。

(7)侵袭实验:将 30 μ L Matrigel 人工基底膜基质加入 Transwell 小室内,放置于 37℃环境中 1 小时,等待凝固。水化基底膜:将 100 μ L RPMI 1640 培养基加入每孔,放置于 37℃环境水化 10 分钟,吸取转染后细胞悬液(1×10^5 个/ml)放入 Transwell 小室的上室,于下室内加入含 20%胎牛血清培养基 600 μ L,常规培养 24 小时,PBS 冲洗干净,500 μ L 0.1%结晶紫染液进行染色 5 分钟,PBS 冲洗干净,倒置显微镜下拍照并计数。

(8)裸鼠成瘤实验:选择 SPF 级别 BALB/c 裸小鼠,随机数字法分为 2 组,每组 5 只,培养得到转染 STCAT11 表达载体及空载体的 SGC-7901 细胞以 1×10^8 个/ml 混悬液,抽取 100 μ L 细胞混悬液注射于每只实验鼠同侧后肋相同部位,每三天观察并记录裸鼠的一般状况及瘤体大小,每周测量瘤体长径(a)、短径(b),根据体积= $0.5\times a\times b^2$,算出瘤体体积绘制肿瘤生长曲线。6 周时脱颈处死裸鼠,瘤体标本以 4%甲醛固定,并切片以 HE 染色观察细胞结构变化。本实验严格按照国家实验动物管理要求执行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据统计学分析。应用 *t* 检验或卡方检验分析统计学意义,用 $\bar{X}\pm S$ 表示呈正态分布的计量资料。

2 结果

2.1 STCAT11 在胃癌组织中表达下调 39 例胃癌患者 qRT-PCR 结果示:胃癌组与癌旁组相比,在 37 例样本中 STCAT11 表达量明显下调(图 1A)。将各样本中 STCAT11 表达量与胃癌组织中平均表达量(5.87 ± 2.80)比较,分为 STCAT11 高表达组和 STCAT11 低表达组,提供分析高表达组与低表达组临床病理特征,发现 STCAT11 表达量与胃癌临床分期($P<0.05$)、浸润深度($P<0.05$)及淋巴结转移($P<0.05$)呈正相关,但是与性别($P>0.05$)、年龄($P>0.05$)、肿瘤大小($P>0.05$)、分化程度($P>0.05$)均无关。见表 1

2.2 细胞中 STCAT11 表达水平及模拟 STCAT11 功能获得与缺失

(1)qRT-PCR 检测结果示 STCAT11 在胃癌细胞株(SGC-7901、BGC-823、MGC-803、MKN-45、AGS、MKN-28)中相对表达量均低于 GES-1,其中 BGC-823 相对表达量最高,MGC-803 相对表达量

表 1 组织中 STCAT11 表达水平与胃癌患者临床特征的关系

临床特征	总数	STCAT11		
		高表达组	低表达组	P 值
年龄				
<60	19	9	10	0.163
≥ 60	20	8	12	
性别				
男	20	11	9	0.172
女	19	7	12	
大小				
<5 cm	20	8	12	0.113
≥ 5 cm	19	12	7	
浸润深度				
T1	6	4	2	0.031
T2	9	7	2	
T3	10	3	7	
T4	14	3	11	
临床分期				
I、II	12	8	4	0.023
III、IV	27	7	20	
分化程度				
高中分化	20	13	7	0.155
低分化	19	8	11	
淋巴结转移				
有	20	5	15	0.002
无	19	14	5	

最低,差异均有统计学意义($P<0.05$) (图 1B)。在 STCAT11 高表达的胃癌细胞株 BGC-823 及低表达细胞株 SGC-7901 中分别转染干扰(shRNA3#)及表达质粒载体,qRT-PCR 检测出 STCAT11 表达水平分别下降 3.8 倍(图 1C)和提高 61.7 倍(图 1D)。

(2)CCK-8 实验:酶标仪检测转染后 0、24、48、72 和 96 小时的空载体 A 值分别为(1.02 ± 0.13 、 1.52 ± 0.20 、 2.24 ± 0.21 、 2.87 ± 0.22 和 3.47 ± 0.20),表达载体组 A 值分别为(0.96 ± 0.237 、 1.11 ± 0.19 、 1.34 ± 0.17 、 1.62 ± 0.163 、 1.99 ± 0.14)。与空载体组相比较,BGC-823 细胞转染干扰载体后各时段 A 值均低,分别为(0.90 ± 0.01 、 1.42 ± 0.20 、 2.01 ± 0.26 、 2.76 ± 0.21 和 3.49 ± 0.20),差异均有统计学意义($P<0.05$),说明 STCAT11 对细胞增殖能力有抑制作用。见图 2。

(3)克隆形成实验:与空载体组相比,转染表达载体后胃癌细胞 SGC-7901 增殖能力减弱(95 ± 12.75),转染干扰载体后,胃癌细胞 BGC-823 增殖能力较空载体组提高(261.67 ± 15.52),差异均

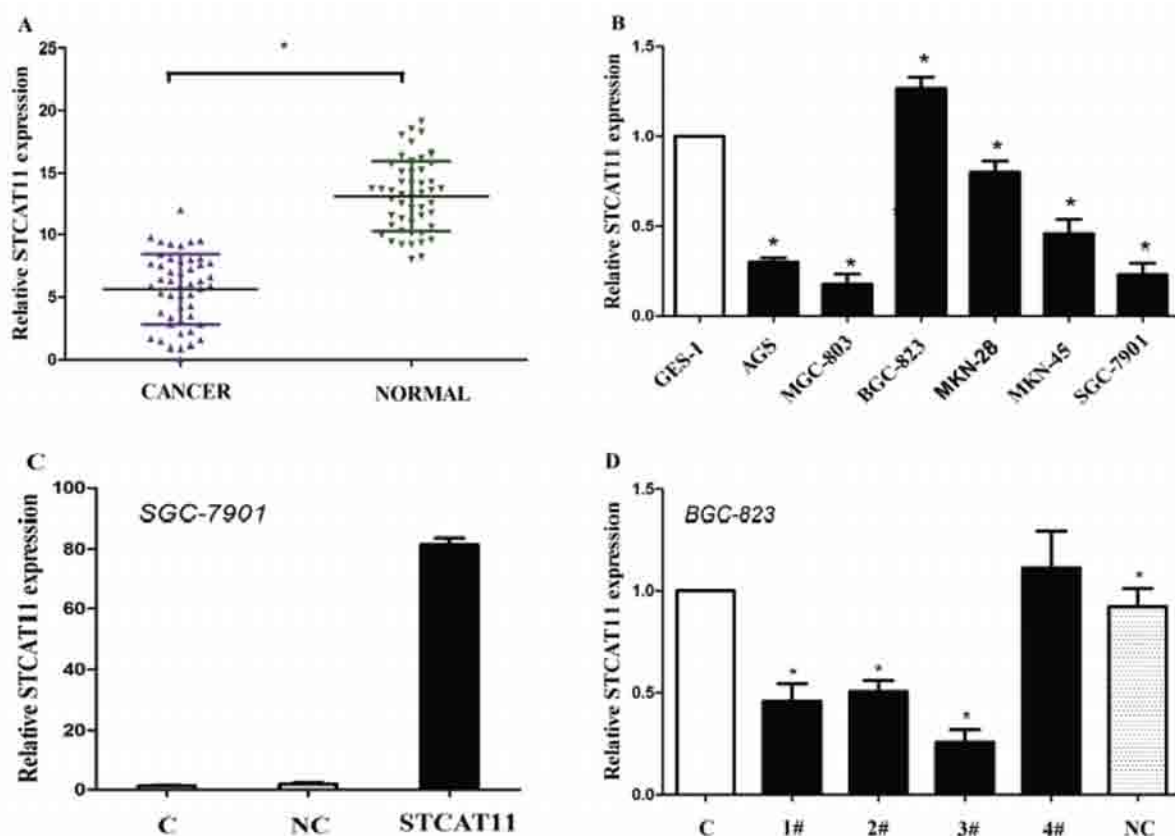


图1 (A)胃癌组织与癌旁组织 STCAT11 表达水平;(B) qRT-PCR 检测六种胃癌细胞株及胃正常粘膜上皮细胞中 STCAT11 表达水平;(C) qRT-PCR 检测 SGC-7901 转染表达载体后 STCAT11 表达水平;(D) qRT-PCR 检测 BGC-823 分别转染四个干扰载体后 STCAT11 表达水平。 $^{**}P<0.01$, $^{*}P<0.05$ 。注:CANCER 为胃癌组,NORMAL 为癌旁组;C 为空载体组,NC 为空白对照组,STCAT11 为表达载体组。1#、2#、3#、4# 分别为四组 shRNA。

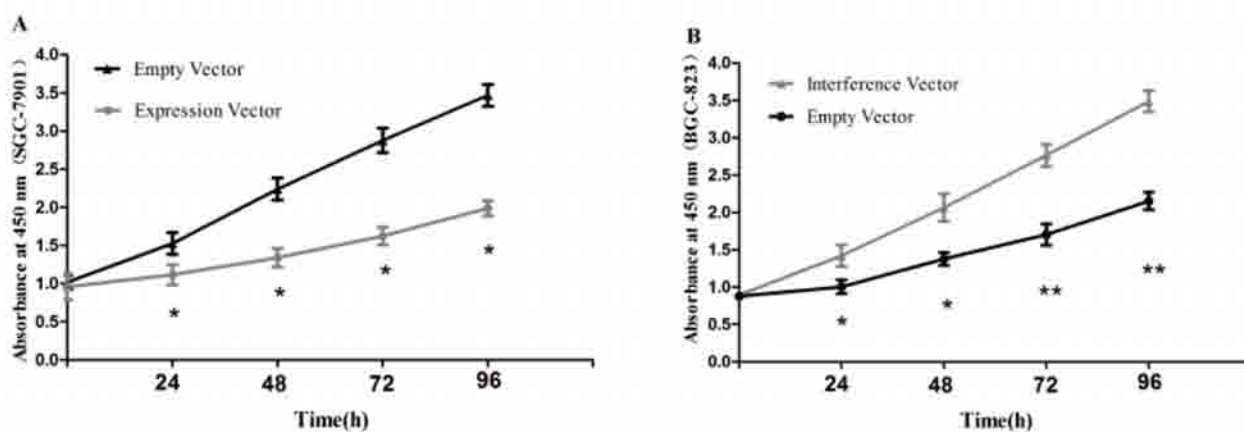


图2 (A)SGC-7901 转染表达载体后各时间点 A 值;(B)BGC-823 转染干扰载体后各时间点 A 值。注:Empty Vector 为空载体组,Expression Vector 为表达载体组,Interference Vector 为干扰载体组。

有统计学意义(P 均 <0.05)。见图3

(4)侵袭实验:与空载体组(171.67 ± 11.15)相比,转染表达载体后胃癌细胞 SGC-7901 侵袭能力减弱(73.33 ± 12.68),转染干扰载体后,胃癌细胞 BGC-823 (386.0 ± 11.22) 侵袭能力较空载体 (160.67 ± 16.68) 组提高,差异均有统计学意义(P

均 <0.05),表明 STCAT11 可限制细胞侵袭能力。见图4

(5)划痕实验:在转染 24、48 和 72 小时各时间点,空载体组划痕修复率分别为 (34.27 ± 3.13)%、(60.63 ± 7.31)%、(94.56 ± 7.32)%,与空载体组相比,表达载体组细胞迁移能力明显受限,各

时间点划痕修复率分别为 $(11.63 \pm 2.51)\%$ 、 $(23.91 \pm 6.37)\%$ 、 $(33.85 \pm 3.76)\%$ ，差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见图 5

(6)裸鼠成瘤实验:表达载体组在第1、2、3、4、5、6周时间点上,皮下移植瘤体积 $[(0.23 \pm 0.06)\text{cm}^3$ 、 $(0.63 \pm 0.23)\text{cm}^3$ 、 $(1.00 \pm 0.32)\text{cm}^3$ 、 $(1.42 \pm 0.20)\text{cm}^3$ 、

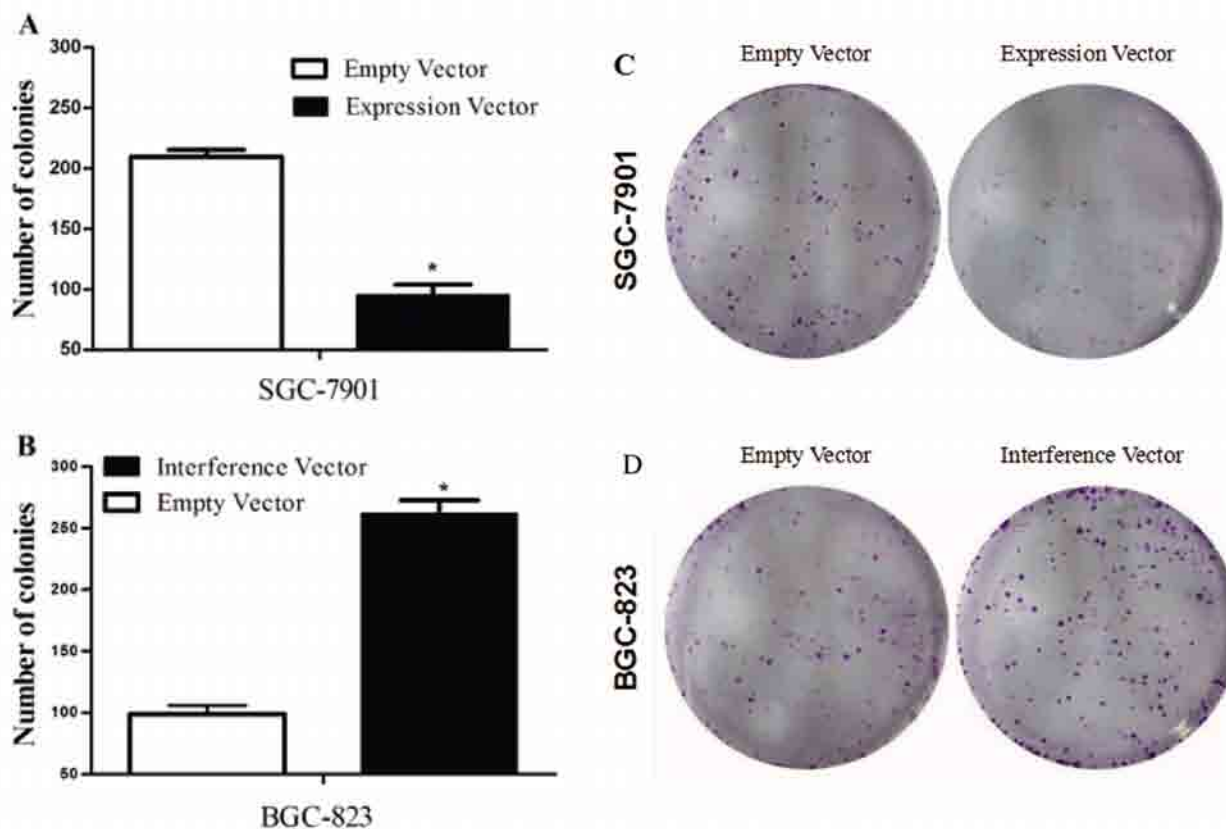


图3 (A)与(C)SGC-7901 转染表达载体后克隆形成能力,(B)与(D)BGC-823 转染干扰载体后克隆形成能力

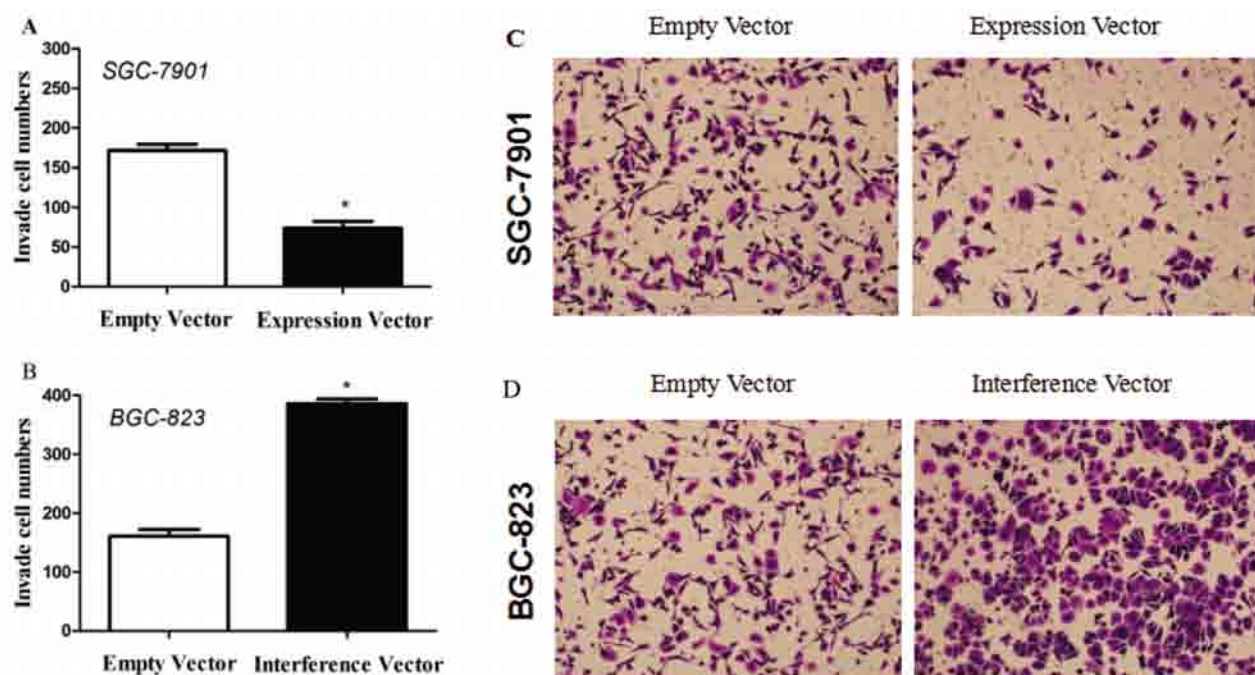


图4 (A)与(C)SGC-7901 转染表达载体后侵袭能力,(B)与(D)BGC-823 转染干扰载体后侵袭能力

(1.92 ± 0.22) cm^3 、(2.39 ± 0.36) cm^3] 均小于空载体组 [(0.34 ± 0.09) cm^3 、(0.92 ± 0.13) cm^3 、(1.70 ± 0.26) cm^3 、(2.51 ± 0.27) cm^3 、(3.58 ± 0.39) cm^3 、(4.99 ± 0.32) cm^3], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HE 染色结果: 表达载体组较空载体组, 镜下见细胞坏死少, 核分裂相少见。见图 6

3 讨论

目前虽得益于肿瘤血标志物、内镜及影像学检查技术的进步, 使得肿瘤早期诊断较之前取得长足进展, 但胃癌早期诊断率仍不理想, 同时由于

胃癌细胞的恶性增殖及高度侵袭性等特征使得进展期胃癌患者 5 年生存率仍低下^[9, 10]。近年来, 大量研究发现 LncRNA 可通过表观遗传学及转录后调控等多种机制介导 DNA 甲基化、组蛋白修饰或染色质重构调控基因沉默或激活, 从而影响癌症的进展和转移^[11, 12]。因此, 对 LncRNA 功能及其与人体临床特征关系的探究将为肿瘤早期诊断及靶向治疗提供新思路。目前已有大量研究证实, LncRNA 表达失调参与多种肿瘤的发展进程, 并且部分可作为判断患者预后的标志物。例如, 上调 HOTAIR 表达可促进肿瘤细胞转移, 并且组织中

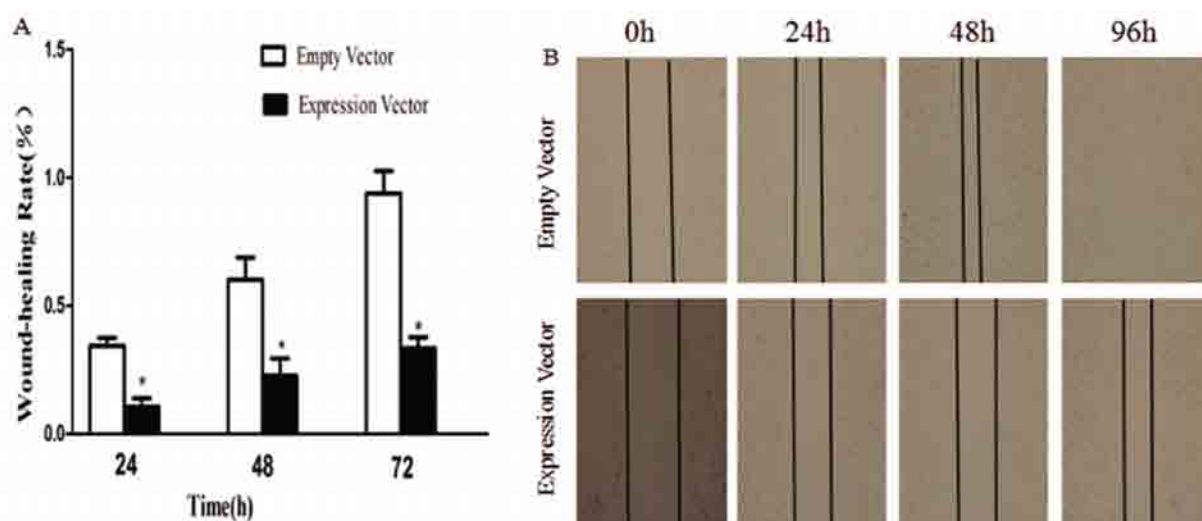


图 5 SGC-7901 转染表达载体后检测细胞迁移能力

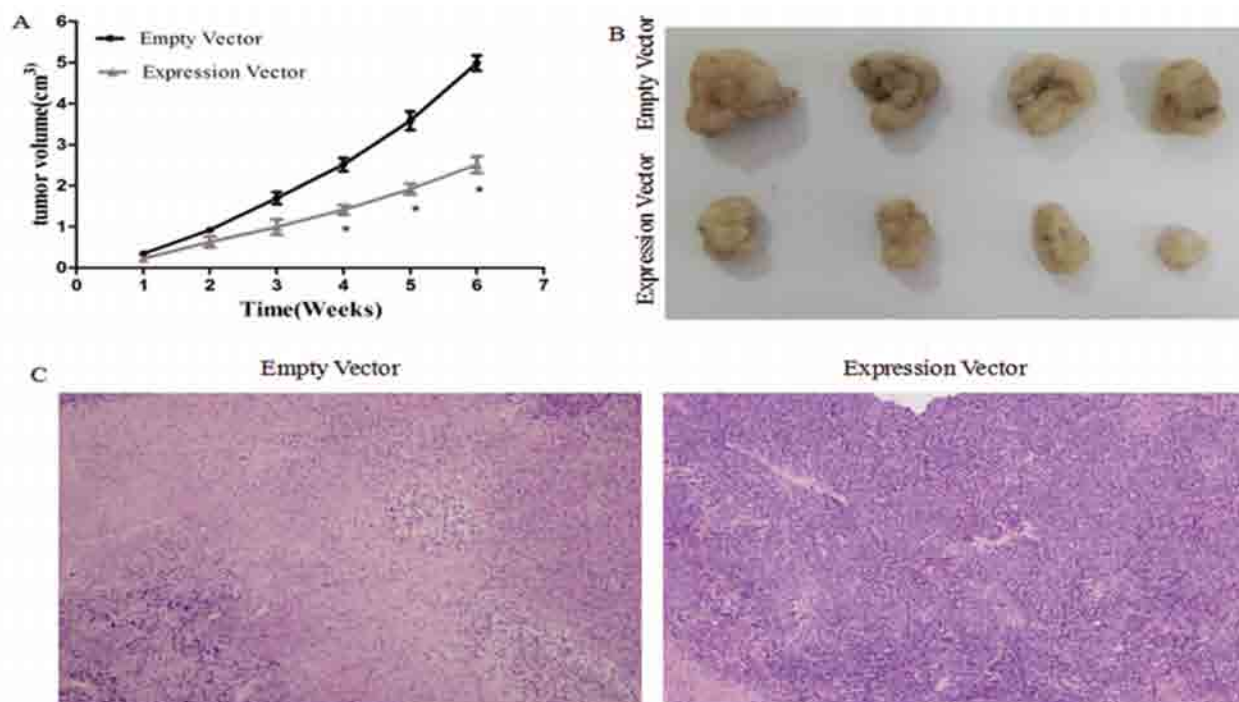


图 6 (A)、(B)裸鼠成瘤实验示, SGC-7901 转染 STCAT11 表达载体后, 体外成瘤能力; (C)显微镜下移植瘤组织 HE 染色

HOTAIR 高表达提示乳腺癌患者预后差^[13]。肺癌转移生物标志物 MALAT1, 可通过调控肿瘤转移相关基因进而影响肺癌体内转移^[14]。ANRIL 则作为促癌基因参与了胃癌发生发展的过程^[15]。

LncRNA 和 microRNA(miRNA)是人体重要的两类非编码 RNA, 二者之间的相互作用已被证实存在于多种人类疾病中^[16]。LncRNA 可作为一种内源竞争性 RNA(ceRNA)与 miRNA 相互作用, 参与靶基因的表达调控, 由于多数 LncRNA 的分子结构与 mRNA(信使 RNA)结构存在有一定的相似性, 使得 miRNA 可通过类似于干扰 mRNA 的作用机制负性调控 LncRNA, 进而发挥一系列生物学作用, 同时, miRNA 对 LncRNA 的表达也可起促进作用, 这也表明表观遗传学调控不仅仅涉及 mRNA, 同时也包括多种 miRNA^[17, 18]。

研究发现, LncRNA TUG1 可通过抑制 miR-144 介导 c-met(原癌基因)的修复及激活, 进而促进肿瘤细胞增殖和侵袭^[19]。LncRNA TINCR 可被转录因子 SP1 激活, 过表达 TINCR 可相应使 STAU1 蛋白表达增加, 促进胃癌细胞增殖, 相反, LncRNA TINCR 通过调控 mRNA KLF2 使抑癌基因(P21 和 P15)表达下调, 从而使细胞逃避凋亡^[20]。PTENP1 是具有抑癌作用的胃癌相关 LncRNA, 其作用机制是 PTENP1 在体内可作为 ceRNA 来抑制肿瘤促进因子 miRNA 106B 和 miRNA-93, 进而激活 PTEN(抑癌基因)的表达, 最终使胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力受限^[21]。此外, PTENP1 和 LSINCT-5 已被证实可作为胃癌早期诊断和预后的血生物标志物^[22]。

国外学者应用高通量测序技术(RNA-Seq)发现与癌旁组织相比较, LncRNA STCAT11 在对应癌组织中显著低表达, STCAT11 长度为 523 bp, 其内包含 2 个外显子, 染色体位置: chr21:35743100-35747699 [-]^[8]。据我们查阅文献所知, 这是对 STCAT11 的首次研究报道。本研究旨在通过 qRT-PCR 检测胃癌组织及对应癌旁组织中表达量, 并分析其表达水平与胃癌患者临床特征的关系, 结果表明 STCAT11 在胃癌组织中显著低表达, 且其表达量与胃癌 TNM 分期等级、浸润深度及淋巴结转移呈负相关(表 1)。此外, 我们通过体内及体外实验模拟 STCAT11 功能缺失及功能获得, 结果证实下调胃癌细胞中 STCAT11 表达量, 可显著提高胃癌细胞增殖、侵袭等恶性生物学行为能力, 上调

STCAT11 表达量则可抑制胃癌细胞的恶性表型。由此我们认为其可能作为抑制因子参与胃癌发生发展过程, 这些发现提示我们 STCAT11 有潜力成为胃癌的早期诊断及治疗靶点。虽然本次研究证实了胃癌中 STCAT11 的抑制作用, 但其作用的信号通路、调控靶点等分子机制尚未探明。

我们下一步将从 LncRNA 顺式(cis)作用模式着手, 分析 STCAT11 是在转录时或者转录后水平进行基因调控, 预测其潜在相关联的转录因子, 利用 RNA pull-down 和 RNA 免疫共沉淀法验证二者之间的相互作用。然后通过 GO 分析和 GSEA 分析共同寻找其所调控的细胞增殖相关基因, 并应用 ChIP 实验验证其潜在基因调控位点。总之, 本研究发现 STCAT11 可能作为胃癌抑制因子, 其缺失或表达下调可促进胃癌发生发展的过程, 但其作用的分子机制仍需进一步探究。

参考文献

- [1] Herszenyi L, Tulassay Z. Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2010, 14(4): 249-258.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] Pinheiro H, Bordeira-Carrico R, Seixas S, et al. Allele-specific CDH1 downregulation and hereditary diffuse gastric cancer[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(5): 943-952.
- [4] Louro R, Smirnova AS, Verjovski-Almeida S. Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice?[J]. Genomics, 2009, 93(4): 291-298.
- [5] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3): 155-159.
- [6] 张健锋, 孙中尚, 张钱峰. 胃癌组织中长链非编码 RNA STCAT3 的表达及其对胃癌细胞恶性表型的作用[J]. 中华医学杂志. 2016, 96(46): 3735.
- [7] Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor[J]. J Mol Endocrinol, 2012, 48(3): R45-53.
- [8] Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome [J]. Nat Genet, 2015, 47(3): 199-208.
- [9] Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(3): 354-362.
- [10] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries[J]. Lancet, 2018, 391(10125): 1023-1075.
- [11] Shi X, Sun M, Liu H, et al. Long non-coding RNAs: a new

- frontier in the study of human diseases [J]. Cancer Lett, 2013, 339(2): 159-166.
- [12] Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, et al. Upregulation of miR-196 a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors[J]. Cancer Res, 2012, 72(5): 1126-1136.
- [13] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. Nature, 2010, 464(7291): 1071-1076.
- [14] Gutschner T, Hammerle M, Eissmann M, et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells[J]. Cancer Res, 2013, 73(3): 1180-1189.
- [15] Zhang EB, Kong R, Yin DD, et al. Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99 a/miR-449 a[J]. Oncotarget, 2014, 5(8): 2276-2292.
- [16] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. Cell, 2011, 147(2): 358-369.
- [17] Zhang L, Volinia S, Bonome T, et al. Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(19): 7004-7009.
- [18] Lu H, Sun J, Wang F, et al. Enhancer of zeste homolog 2 activates wnt signaling through downregulating CXXC finger protein 4[J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e776.
- [19] Ji TT, Huang X, Jin J, et al. Inhibition of long non-coding RNA TUG1 on gastric cancer cell transference and invasion through regulating and controlling the expression of miR-144/c-Met axis[J]. Asian Pac J Trop Med, 2016, 9(5): 508-512.
- [20] Xu TP, Liu XX, Xia R, et al. SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer [J]. Oncogene, 2015, 34(45): 5648-5661.
- [21] Hernandez-Prieto S, Romera A, Ferrer M, et al. A 50-gene signature is a novel scoring system for tumor-infiltrating immune cells with strong correlation with clinical outcome of stage I/II non-small cell lung cancer [J]. Clin Transl Oncol, 2015, 17(4): 330-338.
- [22] Dong L, Qi P, Xu MD, et al. Circulating CUDR, LSINCT-5 and PTENP1 long noncoding RNAs in sera distinguish patients with gastric cancer from healthy controls[J]. Int J Cancer, 2015, 137(5): 1128-1135.

·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.г.д.”(俄文);作者姓名一律姓氏在前,名字在后。外国人名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。