

miR-26b 对结直肠癌侵袭和转移的影响

范德军 戎煜明 邹一丰 张凤 林绪涛 吴小剑

【摘要】 目的 探讨 miR-26b 在结直肠癌侵袭与转移中的作用。方法 提取公共芯片数据库数据,分析 miR-26b 表达水平与淋巴结转移的关系。选用 Caco2 和 DLD1 两种结直肠癌细胞系,应用慢病毒感染的方法,构建 miR-26b 高表达结直肠癌细胞系。通过 Transwell 迁移和侵袭实验及划痕愈合实验分析上调 miR-26b 表达对结直肠癌细胞侵袭和转移能力的影响。通过成球实验分析上调 miR-26b 表达对结直肠癌细胞干细胞表型的影响。结果 芯片检测结果显示,有淋巴结转移的结直肠癌患者肿瘤组织中 miR-26b 表达水平较无淋巴结转移的患者明显升高 [(12.04±0.20)比 (11.31±0.19), $t=2.646, P=0.010$]。体外实验部分,Transwell 实验发现,miR-26b 高表达的结直肠癌细胞的侵袭细胞数 [(16.40±1.36)比 (3.80±0.86), $t=7.814, P=0.000$]和迁移细胞数 [(33.40±2.93)比 (8.80±2.40), $t=6.505, P=0.000$]较 miR-26b 低表达的细胞系显著增多。划痕愈合实验也证实,miR-26b 高表达的结直肠癌细胞迁移速度明显加快。miR-26b 高表达的结直肠癌细胞在成球速度及成球密度方面均高于 miR-26b 低表达的细胞系,实验第 10 天前者球囊内的肿瘤细胞数量显著多于后者 [Caco2 细胞系:(168.3±11.7)比 (54.2±10.8), $t=7.185, P=0.002$;DLD1 细胞系:(4 076.0±409.8)比 (1 613.0±210.1), $t=5.349, P=0.006$]。结论 miR-26b 可促进结直肠癌细胞的迁移及侵袭能力,并增强肿瘤细胞的干细胞表型,从而促进结直肠癌的浸润与转移。

【关键词】 miR-26b; 结直肠肿瘤; 肿瘤侵袭; 肿瘤转移; 干细胞表型

基金项目:国家自然科学基金(81402412)

Effect of miR-26b on the invasion and metastasis of colorectal cancer Fan Dejun, Rong Yuming, Zou Yifeng, Zhang Feng, Lin Xutao, Wu Xiaojian

Department of Colorectal Surgery (Fan DJ, Zou YF, Lin XT, Wu XJ), Department of Rheumatology (Zhang F), The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China; Department of General Diseases, Sun Yat-sen University Cancer Hospital, Guangzhou 510060, China (Rong YM)

Corresponding author: Wu Xiaojian, Email: wuxjian@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of miR-26b in the invasion and metastasis of colorectal cancer. **Methods** Data of public chip databases were extracted to analyze the relationship between miR-26b expression and lymph node metastasis. Two types of colorectal cancer cell lines, Caco2 and DLD1, were selected, and the miR-26b-high colorectal cancer cell line was constructed using the method of lentivirus infection. The effects of up-regulating miR-26b expression on the invasion and metastasis of colorectal cancer cells were analyzed by Transwell migration and invasion experiment and wound healing assay. The effect of up-regulating miR-26b expression on stem cell phenotype of colorectal cancer cells was analyzed by sphere-formation assay. **Results** The microarray detection results showed that the expression of miR-26b in tumor tissues of patients with lymph node metastasis was significantly higher than those without lymph node metastasis [(12.04±0.20) vs. (11.31±0.19), $t=$

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2018.07.017

作者单位:510655 广州,中山大学附属第六医院消化结直肠肛门外科 广东省结直肠盆底疾病研究重点实验室(范德军、邹一丰、林绪涛、吴小剑),风湿免疫科(张凤);510060 广州,中山大学附属肿瘤医院综合科(戎煜明)

通信作者:吴小剑, Email: wuxjian@mail.sysu.edu.cn

作者简介:范德军,男,1989年8月出生,医学硕士,医师,Email: fandejun@mail2.sysu.edu.cn;吴小剑,男,1975年3月出生,医学博士,主任医师,教授,博士生导师

2.646, $P=0.010$]. In the *in vitro* experiment section, the Transwell experiment results showed that the number of invasive cells [(16.40±1.36) vs. (3.80±0.86), $t=7.814$, $P=0.000$] and migrating cells [(33.40±2.93) vs. (8.80±2.40), $t=6.505$, $P=0.000$] in miR-26b-high colorectal cancer cells was significantly higher as compared to miR-26b-low cells (all $P<0.05$). Wound healing assay also confirmed that the migration speed of miR-26b-high colorectal cancer cells was significantly accelerated. Both the rate and the density of sphere formation were higher in miR-26b-high colorectal cancer cells than those in miR-26b-low colorectal cancer cells [Caco2: (168.3±11.7) vs. (54.2±10.8), $t=7.185$, $P=0.002$; DLD1: (4 076.0±409.8) vs. (1 613.0±210.1), $t=5.349$, $P=0.006$]. **Conclusion** miR-26b may promote the invasion and metastasis of colorectal cancer by accelerating the migration and invasion of colorectal cancer cells and enhancing the stem cell phenotype of tumor cells.

【Key words】 miR-26b; Colorectal neoplasms; Tumor invasion; Tumor metastasis; Stem cell-like phenotype

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81402412)

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一。近几十年来,我国结直肠癌发病率和死亡率呈现逐年上升的趋势,尤其是在经济比较发达的东部及沿海地区,这一趋势尤为明显^[1]。尽管结直肠癌诊疗技术有了长足的发展,早期无淋巴结转移的结直肠癌患者5年总生存率将近90%,但是伴有远处转移的晚期结直肠癌患者的5年总生存率仅为10%左右^[2]。因此,深入研究结直肠癌侵袭与转移的机制,有利于结直肠癌防治手段的更新与发展,减轻社会医疗负担,并给结直肠癌患者带来最直接的获益。

局部侵袭及远处转移是恶性肿瘤最主要的生物学特征。肿瘤引起的患者死亡90%是由肿瘤的侵袭与远处转移所致^[3]。肿瘤的侵袭转移是一个复杂的多步骤的过程^[4]。其中,上皮间质转化是肿瘤早期获得转移能力的一个重要步骤^[5]。上皮间质转化涉及肿瘤细胞间黏附能力降低、细胞迁移及侵袭能力增强等过程^[6]。另外,大量研究表明,肿瘤细胞的干细胞表型与肿瘤的发生和发展密切相关,肿瘤细胞干性特征的增强在一定程度上对肿瘤的存活、增殖、转移及复发有着重要作用^[7-8]。

微小RNA(microRNA, miRNA, miR)是一类内源性具有调控功能的单链小分子RNA^[9]。miRNA能够调节各种类型的基因,其中包括一些在肿瘤增殖、侵袭及转移中起重要作用的因子^[10]。既往在头颈部鳞状细胞癌的研究中发现,预后良好患者血液中miR-26b水平相对较低^[11]。有研究显示,结直肠癌患者肿瘤组织中miR-26b表达水平较正常组织低,提示miR-26b缺失可能在结直肠癌的发生过程中起着作用^[12]。但也有研究发现炎性肠病癌变过程中,miR-26b表达水平随病变程度加深而上升^[13]。

因此,miR-26b在结直肠癌发生后的侵袭转移中到底发挥何种作用及其具体作用机制至今尚存在争议。本研究假设miR-26b与结直肠癌的侵袭与转移相关,而且这种侵袭转移能力的变化可能与结直肠癌细胞的迁移侵袭及肿瘤的干细胞特性有关。

资料与方法

一、实验材料

结直肠癌细胞系Caco2及DLD1(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心),HEK293T细胞(美国ATCC公司),DMEM培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素溶液(美国Gibco公司)。慢病毒载体pSin-EF2-Sox2-Pur(美国Addgene公司),普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司),限制性核酸内切酶(英国New England Biolabs公司),KOD Plus Neo PCR酶(KOD-401)和DNA连接酶(Ligation High)(日本TOYOBO公司),Trans10化学感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司),EndoFree Plasmid Maxi kit质粒大提试剂盒(德国QIAGEN公司),慢病毒包装质粒pMD2.G及psPAX2(美国Addgene公司)。TRIzol试剂盒(美国Invitrogen公司),microRNA反转录试剂盒(RIBOBIO Bulge-Loop,锐博生物科技有限公司,中国广州),实时荧光定量PCR试剂盒(Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems,美国)。

二、实验方法

1. 细胞培养: 结直肠癌细胞系Caco2与DLD1使用完全培养液(含DMEM培养基、10%胎牛血清、100 U/ml青霉素及100 μg/ml链霉素)培养于37℃含5%CO₂的恒温恒湿培养箱中。

2. 质粒构建: 使用 PubMed 网站查询 miR-26b 及其上下游序列, 根据拟插入的载体酶切位点设计得到 miR-26b 克隆所需的上下游引物, 正向引物 GCCGAATTCGCCGTCTCGGGGGGCATCCCC; 反向引物 GCGGATCCTCACGAGGCTAGCAGTGAA CAGC。以正常肠上皮细胞基因组 DNA 为模板, 使用 KOD Plus Neo PCR 酶按照说明书进行 PCR 扩增目的基因; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的扩增产物; 使用酶切酶对扩增产物及载体进行双酶切, DNA 连接酶对酶切后载体及扩增产物进行连接反应; 将连接产物转化至感受态细胞并进行小摇扩增; 经过鉴定目的基因无突变后, 按 QIAGEN 质粒大提试剂盒要求容量进行菌液的大摇扩增; 最后使用 QIAGEN 质粒大提试剂盒按照说明书要求从大摇菌液中提取构建的质粒并测量浓度。

3. 慢病毒的包装及感染: 复苏 HEK293T 细胞及拟感染的目的细胞, 传代并培养至状态良好; 应用磷酸钙转染法^[14]将前述构建的 miR-26b 高表达待质粒转染至 HEK293T 细胞中; 转染后 48 h 即回收病毒液; 每 4 h 回收一次病毒液, 并感染一次目的结直肠癌细胞。以上病毒包装及感染操作均在生物安全防护三级实验室进行。

4. 稳定过表达细胞株筛选: 上述慢病毒感染目的细胞 2 d 后, 培养液换成含 puro (预实验确定相应细胞的最佳药物筛选浓度) 的培养基进行筛选 1 周, 即可得到 miR-26b 稳定高表达的结直肠癌细胞株。

5. 实时荧光定量 PCR: 使用 TRIzol 试剂提取细胞中全基因组 RNA; 使用氯仿及异丙醇纯化全基因组 RNA; 应用 RIBOBIO Bulge-Loop 试剂盒按照说明书对 microRNA 进行反转录。采用 ABI Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒按照说明书检测 miR-26b 的相对表达量 (以 U6 为内参基因)。 $\Delta CT_{\text{mean}} = CT_{\text{目的基因}} - CT_{\text{内参}} - \text{mean}$; $\Delta\Delta CT_{\text{mean}} = \Delta CT_{\text{目的基因}} - \Delta CT_{\text{对照}} - \text{mean}$; 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

6. Transwell 侵袭实验: 将 Matrigel 置于冰上完全融化后与无血清培养基以 1:9 充分混合, 每个 transwell 小室加 50 μl 混合物, 并铺满孔底, 置于超净台内常温通风过夜; 每个 transwell 小室加入 2×10^4 个细胞及 200 μl 无血清培养基, 小室外加含 10% 胎牛血清的完全培养基 500 μl , 培养 24 h 后取出 transwell 小室, 洗净 transwell 小室内的细胞和

Matrigel, 使用甲醇与冰乙酸混合液 (3:1) 固定小室外细胞, 结晶紫复染后在显微镜下观察透过 transwell 小室膜的细胞, 拍照取图, 统计比较不同处理后细胞的侵袭能力变化情况。

7. Transwell 迁移实验: transwell 小室中无需加入 Matrigel, 其余实验步骤同 transwell 侵袭实验。

8. 划痕实验: 在 6 孔板中每孔接种 1×10^6 个细胞, 待细胞贴壁长满后, 用 200 μl 移液枪枪头尖端划“十”字; 划线后静置培育 1 h 后选取适当位置拍照并标记, 随后每隔 8 h 拍照 1 次, 直到实验组和对照组有明显差异为止。

9. 成球实验: 配置悬浮培养基: DMEM/F12 培养基 49 ml、B27 1 ml、表皮生长因子 (EGF) 1 μg 、成纤维细胞生长因子 (FGF) 1 μg ; 以实验要求密度将细胞悬液接种于悬浮培养板中。24 孔板 (观察成球速度): 每孔接种 10 ~ 20 个细胞每孔, 设置 3 个复孔, 分别在第 4、6、8、10 天拍照。6 孔板 (观察成球密度): 每孔接种 5000、500 和 200 个细胞, 分别在第 4、6、8、10 天拍照。

三、统计学方法

本研究所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并应用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析。采用独立样本 t 检验比较连续型变量之间的差异; 采用 Pearson 相关分析评估淋巴结转移与 miR-26b 表达水平之间的相关性。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、miR-26b 与结直肠癌的淋巴结转移的关系
提取公共芯片数据库中的 64 例结直肠癌 microRNAs 表达谱数据 (GSE29623), 分析发现, 在有淋巴结转移的结直肠癌患者肿瘤组织中, 其 miR-26b 相对表达水平较无淋巴结转移者明显升高 (11.31 ± 0.19 比 12.04 ± 2.20 , $t = 2.646$, $P = 0.010$), 见图 1。

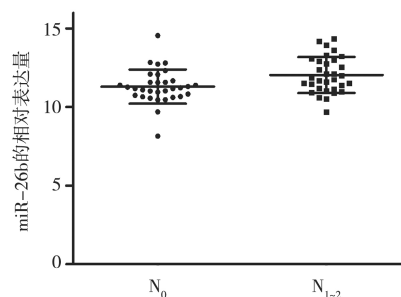


图 1 公共芯片 GSE29623 (64 例结直肠癌) 有淋巴结转移 (N_{1-2}) 与无淋巴结转移 (N_0) 患者 miR-26b 表达水平的比较

二、miR-26b 对结直肠癌细胞迁移及侵袭能力的影响

通过携带 pSin-puro-miR-26b 载体及对应空载体的慢病毒感染结直肠癌细胞系 Caco2 及 DLD1, 构建出 miR-26b 高表达结直肠癌细胞系 (Caco2-miR-26b 及 DLD1-miR-26b) 及相应空白对照 (Caco2-vector 及 DLD1-vector), 并应用荧光定量 PCR 验证了 miR-26b 表达增高 (Caco2: 12.09 ± 1.64 比 1.04 ± 0.13 ; DLD1: 12.21 ± 3.11 比 1.00 ± 0.24 ; 均 $P < 0.05$), 见图 2。Transwell 迁移实验及侵袭实验发现, miR-26b 高表达的结直肠癌细胞 DLD1 无论是迁移能力 (33.40 ± 2.93 比 8.80 ± 2.40 , $t=6.505$, $P=0.000$) 还是侵袭能力 (16.40 ± 1.36 比 3.80 ± 0.86 , $t=7.814$, $P=0.000$) 都较正常表达的细胞明显增强 (均 $P < 0.05$), 见图 3。划痕愈合实验也发现, miR-26b 高表达结直肠癌细胞的迁移速度明显加快, 见图 4。

三、miR-26b 对结直肠癌细胞干细胞表型

肿瘤球囊形成实验 (成球实验) 结果显示, miR-26b 高表达的结直肠癌细胞在成球速度及成球密度方面均高于 miR-26b 低表达的细胞系。见图 5a 和图 5b。随后在成球密度实验第 10 天计算每个球囊中肿瘤细胞的数量, miR-26b 高表达结直肠癌细

胞明显多于低表达的细胞系 (Caco2: 168.3 ± 11.7 比 54.2 ± 10.8 , $t=7.185$, $P=0.002$; DLD1: 4076.0 ± 409.8 比 1613.0 ± 210.1 , $t=5.349$, $P=0.006$), 见图 5c。

讨 论

恶性肿瘤的侵袭与转移是一个复杂的进程, 其可能起源于原发肿瘤中几个或几群细胞在基因或表观遗传学上的改变^[15]。其过程包括肿瘤细胞黏附性降低、降解细胞外基质、诱导血管生成、穿透血管壁进入血液循环、血液循环中逃避免疫攻击、渗出血管、远处器官组织的定植、形成转移灶等^[4]。这样一个巨大的调节网络至今尚未完全阐明。既往学者们致力于研究肿瘤发生转移相关改变的上游调节机制, 期待发现治疗恶性肿瘤的潜在靶点。由于 miRNA 具有可以同时调节多个目的基因表达的能力, 因此其可能在肿瘤侵袭转移相关过程中起着至关重要的调节作用^[16]。通过调控 miRNA 的表达水平, 有望直接调控一系列侵袭转移相关因子的表达, 从而寻找到抑制肿瘤转移的新治疗方法。目前, miRNA 在恶性肿瘤治疗中发挥的作用日益显著, 不仅可以作为诊断癌症的生物标记物, 还可以作为治疗癌症的靶基因^[17]。

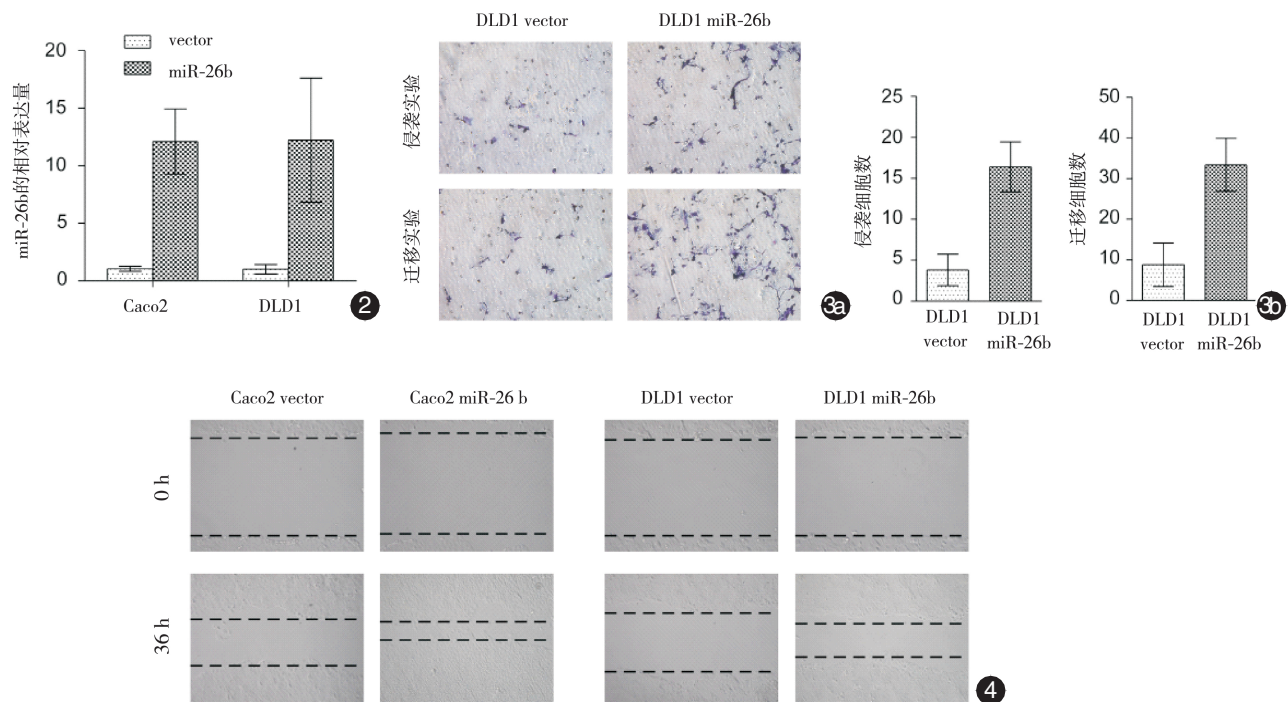


图 2 实时荧光定量 PCR 验证微小 RNA(miR)-26b 表达增高(Caco2 和 DLD1 为结直肠癌细胞系, vector 为空白对照, 均 $P < 0.05$) 图 3 Transwell 侵袭和迁移实验 (DLD1 为结直肠癌细胞系, vector 为空白对照) 3a. 侵袭实验和迁移实验图片 ($\times 200$); 3b. 侵袭实验和迁移实验随机 5 个高倍镜视野中细胞数平均值, miR-26b 高表达的细胞系侵袭细胞数和迁移细胞数均高于对照组 (均 $P < 0.05$) 图 4 划痕愈合实验图片 ($\times 100$, Caco2 和 DLD1 为结直肠癌细胞系, vector 为空白对照)

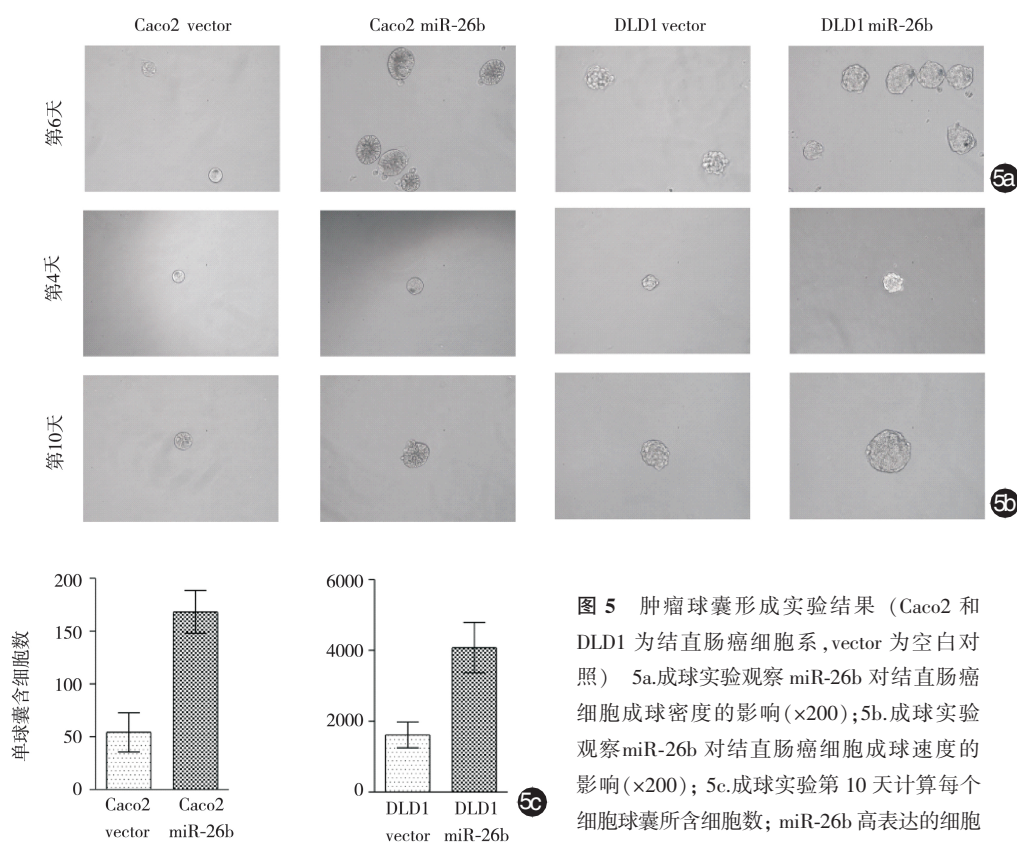


图5 肿瘤球囊形成实验结果 (Caco2 和 DLD1 为结直肠癌细胞系, vector 为空白对照) 5a. 成球实验观察 miR-26b 对结直肠癌细胞成球密度的影响 ($\times 200$); 5b. 成球实验观察 miR-26b 对结直肠癌细胞成球速度的影响 ($\times 200$); 5c. 成球实验第 10 天计算每个细胞球囊所含细胞数; miR-26b 高表达的细胞系单球囊含细胞数均高于对照组 (均 $P < 0.05$)

miRNA 具有高度的时序性、细胞特异性和组织特异性,在特定的时间和特定的组织中才会表达^[18]。虽然在散发型结直肠癌患者中,miR-26b 在正常结直肠黏膜组织的表达水平比结直肠癌组织中表达水平更高^[12],但这可能是 miRNA 组织特异性的表现之一。目前缺乏相关的研究探讨 miR-26b 在同一来源结直肠癌细胞的侵袭与转移能力中所发挥的作用及机制。

本研究中,我们首先通过对公共数据库中 miRNA 芯片数据深入分析发现,miR-26b 表达水平与结直肠癌淋巴结转移存在明显的关联,提示 miR-26b 表达较高的结直肠癌组织早期转移能力更强。通过 transwell 迁移实验、侵袭实验及划痕愈合实验发现,miR-26b 能够明显增强结直肠癌细胞系的迁移和侵袭能力。另外,肿瘤成球实验结果显示,miR-26b 能显著增强结直肠癌细胞的干细胞表型。以上实验结果证明,miR-26b 在已发生癌变的结直肠癌细胞中起到促进迁移及侵袭能力的作用。

既往已有大量的针对结直肠癌远处转移分子机制的研究,如 Wnt/ β -catenin, mTOR 及 PI3K/Akt 等信号通路^[19-20]。而 Wnt/ β -catenin 通路在结直肠

癌细胞转移早期的上皮间质转化(EMT)过程中起着至关重要的作用^[21]。本研究结果提示,miR-26b 在增强结直肠癌迁移侵袭能力中发挥重要作用。因此,后续进一步深入探讨在结直肠癌细胞中 miR-26b 是否以及如何与 Wnt/ β -catenin 信号通路的多个调节因子同时相互作用,可能为结直肠癌侵袭和转移的分子机制提供新的思路,并有助于发现新的抗肿瘤靶点。虽然 miR-26b 通过何种信号通路发挥促进结直肠癌转移的能力仍有待进一步阐明,我们目前的研究结果为 miR-26b 作为抗结直肠癌转移的靶点提供了生物学基础。

本课题研究存在以下不足:虽然在体外实验已证明 miR-26b 在结直肠癌细胞侵袭迁移及干细胞表型中的作用,同时公共芯片数据库分析结果也提示 miR-26b 上调与结直肠癌的淋巴结转移相关,但是其具体作用机制尚有待深入研究,并且缺乏充足的组织标本及临床随访数据印证这一结论。

参 考 文 献

- [1] 陈万青,郑荣寿,曾红梅,等. 2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(1): 1-10. DOI: 10.11735/j.issn.

- 1004-0242.2015.01.A001.
- [2] Coget J, Borrini F, Susman S, et al. Colorectal carcinomas in 2013: the search for powerful prognostic markers is still on the go! [J]. *Cancer Biomark*, 2014, 14 (2-3):145-150. DOI:10.3233/CBM-130378.
- [3] Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis [J]. *Science*, 2011, 331 (6024):1559-1564. DOI: 10.1126/science.1203543.
- [4] Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges[J]. *Nat Med*, 2006, 12(8):895-904. DOI:10.1038/nm1469.
- [5] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5):871-890. DOI:10.1016/j.cell.2009.11.007.
- [6] Sleeman JP, Thiery JP. SnapShot: The epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cell*, 2011, 145(1):162.e1. DOI:10.1016/j.cell.2011.03.029.
- [7] Chi Y, Zhou D. MicroRNAs in colorectal carcinoma—from pathogenesis to therapy[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 43. DOI:10.1186/s13046-016-0320-4.
- [8] Lu J, Ye X, Fan F, et al. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1 [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23 (2):171-185. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.12.021.
- [9] Djuranovic S, Nahvi A, Green R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs [J]. *Science*, 2011, 331 (6017): 550-553. DOI:10.1126/science.1191138.
- [10] Liu X, Chen Z, Yu J, et al. MicroRNA profiling and head and neck cancer [J]. *Comp Funct Genomics*, 2009:837514. DOI: 10.1155/2009/837514.
- [11] Hsu CM, Lin PM, Wang YM, et al. Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33 (6):1933-1942. DOI:10.1007/s13277-012-0454-8.
- [12] Zhang C, Tong J, Huang G. Nicotinamide phosphoribosyl transferase (Nampt) is a target of microRNA-26b in colorectal cancer cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (7):e69963. DOI:10.1371/journal.pone.0069963.
- [13] Benderska N, Dittrich AL, Knaup S, et al. miRNA-26b Overexpression in Ulcerative Colitis-associated Carcinogenesis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21 (9):2039-2051. DOI:10.1097/MIB.0000000000000453.
- [14] Hahn WC, Dessain SK, Brooks MW, et al. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(7):2111-2123.
- [15] Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies [J]. *Lancet*, 2007, 369(9574):1742-1757. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60781-8.
- [16] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [17] Solomides CC, Evans BJ, Navenot JM, et al. MicroRNA profiling in lung cancer reveals new molecular markers for diagnosis[J]. *Acta Cytol*, 2012, 56(6):645-654. DOI:10.1159/000343473.
- [18] Sood P, Krek A, Zavolan M, et al. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8):2746-2751. DOI:10.1073/pnas.0511045103.
- [19] Yuan G, Zhang B, Yang S, et al. Novel role of STRAP in progression and metastasis of colorectal cancer through Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13):16023-16037. DOI: 10.18632/oncotarget.7532.
- [20] Li W, Chang J, Wang S, et al. miRNA-99b-5p suppresses liver metastasis of colorectal cancer by down-regulating mTOR [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27):24448-24462. DOI: 10.18632/oncotarget.4423.
- [21] Qi J, Yu Y, Akilli ÖÖ, et al. New Wnt/ β -catenin target genes promote experimental metastasis and migration of colorectal cancer cells through different signals[J]. *Gut*, 2016, 65(10):1690-1701. DOI:10.1136/gutjnl-2014-307900.

(收稿日期:2017-05-24)

(本文编辑:汪挺)

·读者·作者·编者·

本刊对文稿中统计结果的解释和表达的要求

当 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 时,应说对比组之间的差异具有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所用统计分析方法的具体名称(如成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等)和统计量的具体值(如 $t = 3.45$, $\chi^2 = 4.68$, $F = 6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 三种表达方式即可满足需要,无须再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 可信区间。