

miR-497 抑制肝癌细胞的侵袭与转移

丁文周, 卢叶挺, 谭龙威, 于建军, 孔连宝*

(南京医科大学第一附属医院肝脏外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:检测 miR-497/IGF-1R 在肝癌中的表达并探讨其在肝癌侵袭与转移中的作用。方法:定量 PCR(real-time PCR)检测肝癌及癌旁组织中 miR-497 的表达,同时检测肝癌细胞系及正常人肝细胞中 miR-497/IGF-1R mRNA 的表达水平,免疫组织化学及 Western blot 检测肝癌与肝癌细胞系中 IGF-1R 蛋白表达,通过过表达或干扰肝癌细胞系中 miR-497 的表达,分析其对肝癌细胞侵袭与转移的作用。结果:肝癌组织中 miR-497 表达水平低于癌旁组织。与无脉管转移组相比,有脉管转移组降低更为明显。同时在肝癌细胞系也有相似的结果,高侵袭性肝癌细胞系 MHCC-97H 中降低最为明显。IGF-1R 在肝癌组织及肝癌细胞系中表达增加。过表达 miR-497 能降低 MHCC-97H 中 IGF-1R 的表达,抑制其侵袭和转移;干扰 miR-497 表达能增加 IGF-1R 表达,促进 SMMC-7721 细胞的侵袭和转移。结论:miR-497 在肝癌组织中表达降低,过表达 miR-497 能下调 IGF-1R,抑制肝癌的侵袭与转移,miR-497 可能为治疗肝细胞肝癌提供新的靶点。

[关键词] miR-497;IGF-1R;肝细胞肝癌;肿瘤侵袭

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)07-955-07

doi:10.7655/NYDXBNS20150712

miR-497 reduces invasion and migration of hepatocellular carcinoma

Ding Wenzhou, Lu Yeting, Tan Longwei, Yu Jianjun, Kong Lianbao*

(Department of Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To detect the expression and explore the role of miR-497/IGF-1R in hepatocellular carcinoma (HCC) invasion and migration. **Methods:** The expressions of miR-497/IGF-1R in HCC samples and cell lines were detected by real-time PCR. Meanwhile, IGF-1R protein in HCC tissues and cell lines was assessed by immunohistochemistry and Western blot. In addition, the invasion and migration of HCC cells were analyzed by overexpressing or suppressing miR-497. **Results:** The expression of miR-497 was decreased in HCC samples compared with the adjacent non-cancer tissues, especially in HCC samples with vascular metastasis. The same results were observed in HCC cell line, the expression level of miR-497 decreased much more significantly in MHCC-97H than other cell lines. IGF-1R expression was significantly increased in HCC and HCC-derived cells. MiR-497 overexpression decreased the expression of IGF-1R and suppressed the invasion and migration of MHCC-97H. MiR-497 silenced SMMC-7721 cellular invasion and migration, which were enhanced with a boost in IGF-1R. **Conclusion:** This study indicates that miR-497 is downregulated in hepatocellular carcinoma, and miR-497 overexpression suppresses tumor cell invasion and migration with a decreased expression of IGF-1R. The study of miR-497 may provide a new therapeutic option for HCC.

[Keywords] miR-497; IGF-1R; hepatocellular carcinoma; tumor invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07):955-961]

原发性肝癌是世界范围内第五大最常见的恶性肿瘤^[1]。近年来,肝癌的发病率在亚洲和非洲均呈现上升趋势^[2]。由于早期缺乏特异性症状,临床上肝癌患者常伴有肝内外转移,预后不佳^[3]。当前人们普遍认识

到,探索肝癌发生和发展的分子机制,以获得潜在的分子治疗靶点可能为肝癌的治疗提供一种新方法。

微小 RNA(microRNA, miR)是一群内源性非编码 RNA,它们通过与靶基因 mRNA 的 3'非编码区(3'UTR)结合,导致靶基因 mRNA 降解或翻译受阻,从而参与靶基因的转录后调节^[4]。有研究表明 miR-497 在多种肿瘤中表达降低,对肿瘤的发生、发展起抑

[基金项目] 卫生部医药发展项目(W2012Fz058)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:lbkong@njmu.edu.cn

制作用^[5-8]。然而,miR-497 是否通过调节其他靶基因表达以抑制肝癌的侵袭与转移仍未可知。

胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R)是受体酪氨酸激酶家族的成员,有研究证实 miR-497 通过直接调节 IGF-1R 对结直肠癌起抑制作用^[9]。然而,miR-497/IGF-1R 在肝癌侵袭与转移中的作用并没有深入研究。本文通过相关实验证实了 miR-497 对IGF-1R 的表达及肝癌细胞侵袭力的影响,为阐明肝癌的侵袭转移机制及治疗提供了新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

于南京医科大学第一附属医院收集 2011 年 12 月~2013 年 12 月间手术切除的 55 对肝癌及癌旁组织标本,患者临床指标见表 1。所有标本由本院病理科通过常规切片及免疫组化确认,均为肝细胞肝癌,其中有病理或免疫组化证实的脉管癌栓或门静脉癌栓为脉管转移组,否则视为非脉管转移组。标本均通过液氮保存,实验得到患者本人及南京医科大学第一附属医院伦理委员会的同意。

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞培养

人类肝癌细胞系(YY-8103、MHCC-97H、SMMC-

表 1 临床指标

Table 1 Clinical indicators

临床指标	总体	脉管转移组	非脉管转移组	P 值
例数	55	24	31	-
性别				0.430
男	46	19	27	
女	9	5	4	
年龄(岁)				0.944
≥50	32	15	17	
<50	23	11	12	
肿块大小(cm)				0.201
≥5	31	17	14	
<5	24	9	15	
乙肝病史				0.831
HBV(+)	43	23	20	
HBV(-)	12	6	6	
肝功能 Child 分级				0.070
A~B	41	26	15	
C	14	5	9	
AFP(ng/mL)				0.732
≥100	32	18	14	
<100	23	14	9	
肿瘤转移				0.027
是	32	20	12	
否	23	7	15	

7721、HepG2、Hep3B)及正常人肝细胞系 LO2 均为本实验室冻存。所有细胞都在恒温 37℃,含 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养,培养基为添加了 10%胎牛血清、50 U/mL 青霉素和 50 μg/mL 庆大霉素的 DMEM。

1.2.2 RNA 的提取及 real-time PCR

所有组织及细胞系的 RNA 通过 TRIzol(Invitrogen 公司,美国)提取,具体步骤参照试剂盒说明书。通过 microRNA 反转录试剂盒(Applied Biosystems 公司,美国)将 RNA 反转录成 cDNA,然后应用 microRNA 特异性 TaqMan 探针和 TaqMan Universal PCR Master Mix(ABI 公司,美国)进行 miR-497 的实时定量 PCR 检测,反应在 ABI StepOne Plus Detection system(ABI 公司,美国)上进行,反应条件为:95℃ 10 min 预变性;95℃ 15 s 变性,60℃ 1 min 退火延伸,40 个循环。内参为 RNU6B,每个反应设置 3 个复孔,miR-497 的相对表达量用 2^{-ΔΔCt} 法计算,转染效率用 2^{-ΔΔCt} 法计算。进行 IGF-1R 定量 PCR 时,IGF-1R 上游引物序列为 5'-AGTATGGAGGGC-CAAGCTA-3',下游引物 5'-GGCCTGGACATAGAA-GAACACA-3';β-actin 上游引物 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3';下游引物 5'-TAGCACAGCCTG-GATAGCAA-3',反应条件为:95℃ 30 s 预变性;95℃ 5 s 变性,60℃ 30 s 延伸,40 个循环。

1.2.3 免疫组织化学染色

55 对肝癌及癌旁组织经固定、石蜡包埋,切成 4 μm 的石蜡切片,采用免疫组化染色(SP 法)检测组织中 IGF-1R 表达。具体的步骤参照免疫组化试剂盒的说明书(ZSGB-BIO)。

结果判读:采用染色强度结合阳性细胞百分率来判断 IGF-1R 蛋白表达。染色强度分类:显微镜下观察在良好组织结构及清晰背景上,细胞内出现棕黄色颗粒为阳性,阴性或者基本无显色 0 分,淡黄色 1 分,黄或深黄色 2 分,褐或棕褐色 3 分。在低倍镜下(×100)观察选择有代表性的区域,然后在高倍镜下(×400)计数 500 个左右肿瘤细胞,采用半定量积分法判断结果。阳性细胞<5%计 0 分,5%~10%计 1 分,10%~50%计 2 分,>50%计 3 分。阳性信号评分与阳性细胞数评分的乘积:(-)0~3 分;(+)3~9 分。

1.2.4 细胞转染

取对数生长期的肝癌细胞种植于 6 孔板中培养 24 h,miR-497 mimic 或 miR-497 inhibitor (上海吉玛公司)及其各自阴性对照通过 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国)进行转染,具体的转染步骤参照试剂盒说明书。转染后 24 h 收集细胞或进

行后续实验。miR-497 mimic 序列:5'-CAGCAGCA-CACUGUGGUUUGU-3',NC 序列:5'-UUCUCC-GAACGUGUCACGUTT-3',miR-497 inhibitor 序列:5'-ACAAACCACAGUGUGCUGCUG-3',inhibitor NC 序列:5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3'。

1.2.5 Western blot

通过 25 mmol/L Tris-Cl (pH7.5),5 mmol/L EDTA, 1%SDS 和 1%蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液将细胞及组织裂解,检测所获得样品的蛋白浓度,于 10% SDS-PAGE 中电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉常温封闭 1 h,加一抗 4℃过夜,随后加二抗孵育 1 h。一抗包括兔抗 IGF-1R (1:100;Abcam 公司,美国),兔抗 GAPDH(1:1 000;Abcam 公司,美国),常规 ECL 曝光、扫描成像。

1.2.6 Transwell 侵袭实验

Transwell(BD Biosciences 公司,美国)小室纤维膜孔径为 8 mm,下室中加入含 10%胎牛血清的 DMEM 750 μL,上室中加入 200 μL 含 5×10⁴ 个细胞的无血清 DMEM 悬液,放置于恒温 37℃,含 5%CO₂

的细胞培养箱中培养 48 h。48 h 后取出小室,用棉棒小心拭去上室残留基质胶及细胞,小室下表面穿膜的细胞经 4%多聚甲醛固定,0.5%结晶紫染色,PBS 洗去残留结晶紫溶液,小室室温晾干后置于显微镜下随机观察 6 个视野并拍照,计数穿膜细胞数。

1.2.7 划痕迁移实验

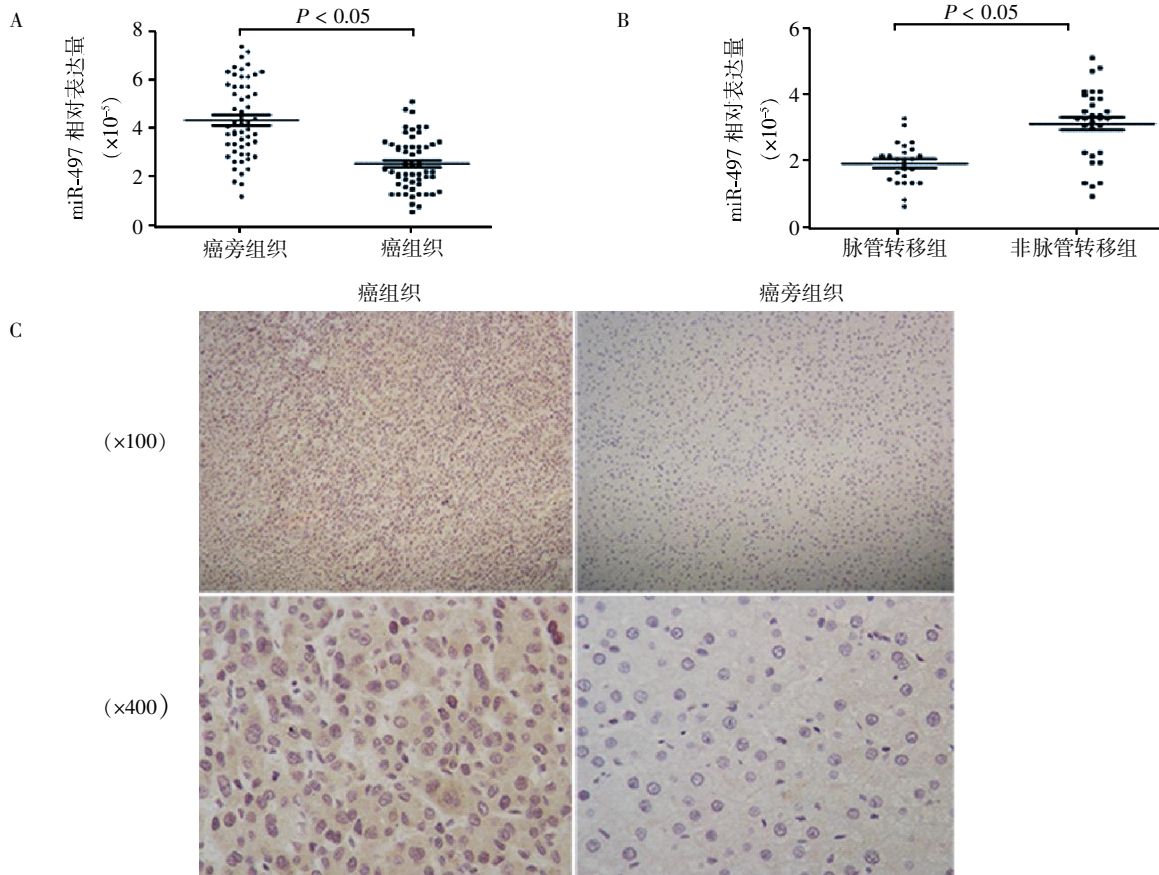
将转染好的细胞均匀铺于 6 孔板继续培养,每孔细胞数约为 5×10⁵ 个。待细胞 90%贴壁后,撤血清饥饿 24 h,用 200 μL 黄色枪头在 6 孔板中均匀划痕,PBS 洗涤除去漂浮细胞,加入无血清培养基,显微镜下观察并拍照,随后于 12、24、48 h 后再次观察并拍照记录。

1.3 统计学方法

应用 SPSS18.0 软件进行统计分析,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,分类资料比较采用卡方检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-497/IGF-1R 在肝癌组织中的表达



A:探针法定量 PCR 检测肝癌组织中 miR-497 表达低于癌旁组织;B:肝癌组织中脉管转移组 miR-497 表达低于非脉管转移组;C:免疫组织化学染色示癌组织中 IGF-1R 表达高于癌旁组织。

图 1 miR-497/IGF-1R 在肝癌组织中的表达

Figure 1 The expression of miR-497/IGF-1R in hepatocellular carcinoma(HCC)

通过探针法定量 PCR 检测 55 对肝癌及癌旁组织,发现与癌旁组织相比,肝癌组织中 miR-497 的表达水平明显降低 $[(4.37 \pm 1.54) \times 10^{-5} \text{ vs } (2.61 \pm 1.07) \times 10^{-5}, P < 0.05, n=55]$,图 1A],进一步分析发现脉管转移组中 miR-497 的表达低于非脉管转移组 $[(1.97 \pm 6.31) \times 10^{-5} \text{ vs } (3.15 \pm 1.06) \times 10^{-5}, n=55, P < 0.05]$,图 1B],然而,对 55 对肝癌及癌旁组织进行免疫组织化学染色结果显示:IGF-1R 表达阳性率在肝癌组织为 78.18%(43/55),癌旁组织为 16.36%(9/55),IGF-1R 表达与 miR-497 呈现相反趋势(图 1C)。这些结果提示 miR-497 表达降低与 IGF-1R 表达增高可能有助于肝癌的脉管转移。

2.2 miR-497/IGF-1R 在肝癌细胞系中的表达

检测肝癌细胞系 (YY-8103、HepG2、Hep3B、SMMC-7721、MHCC-97H)和正常人肝细胞系 LO2 中 miR-497 及 IGF-1R 的表达水平,结果证实肝癌细胞系中 miR-497 表达低于正常肝细胞系,其中在高侵袭性肝癌细胞系 MHCC-97H 中表达降低最为明显 $[(4.67 \pm 1.77) \times 10^{-6}, (7.06 \pm 2.47) \times 10^{-6}, (4.59 \pm 1.45) \times 10^{-6}, (11.90 \pm 4.69) \times 10^{-6}, (2.20 \pm 1.36) \times 10^{-6} \text{ vs } (31.50 \pm 6.15) \times 10^{-6}, P < 0.05, n=3]$,图 2A]。然而,IGF-1R 在肝癌细胞系尤其在 MHCC-97H 中表达升高 $[(4.23 \pm 0.45) \times 10^{-3}, (1.70 \pm 0.10) \times 10^{-3}, (1.40 \pm 0.10) \times 10^{-3}, (1.13 \pm 0.15) \times 10^{-3}, (0.90 \pm 0.20) \text{ vs } (0.50 \pm 0.10) \times 10^{-3}, P < 0.05, n=3]$,图 2B]。这些数据进一步提示 miR-497/IGF-1R 在肝癌侵袭中的作用。

2.3 miR-497 在肝癌细胞系中调控 IGF-1R 的表达

为了验证 miR-497 对 IGF-1R 表达的调控作用,miR-497 mimic 或 miR-497 inhibitor 及其各自空白对照分别转染入 MHCC-97H 或 SMMC-7721 系中。探针法定量 PCR 检测发现 MHCC-97H 在转入 miR-497 mimic 后 miR-497 表达量明显增加 $(1.000 \pm 0.265 \text{ vs } 562.000 \pm 117.000, P < 0.05)$,图 3A],而 SMMC-7721 转入 miR-497 inhibitor 后 miR-497 表达量明显降低 $(1.000 \pm 0.200 \text{ vs } 0.467 \pm 0.153, P < 0.05)$,图 3B]。通过 Western blot 分析发现 MHCC-97H 中转染 miR-497 mimic 能抑制 IGF-1R 表达 $(0.851 \pm 0.068 \text{ vs } 0.370 \pm 0.056, P < 0.05)$,图 3C],而在 SMMC-7721 转染 miR-497 inhibitor 后 IGF-1R 表达增加 $(0.355 \pm 0.028 \text{ vs } 0.649 \pm 0.028, P < 0.05)$,图 3D]。以上结果表明,在肝癌细胞中 miR-497 可靶向 IGF-1R 使其表达减少。

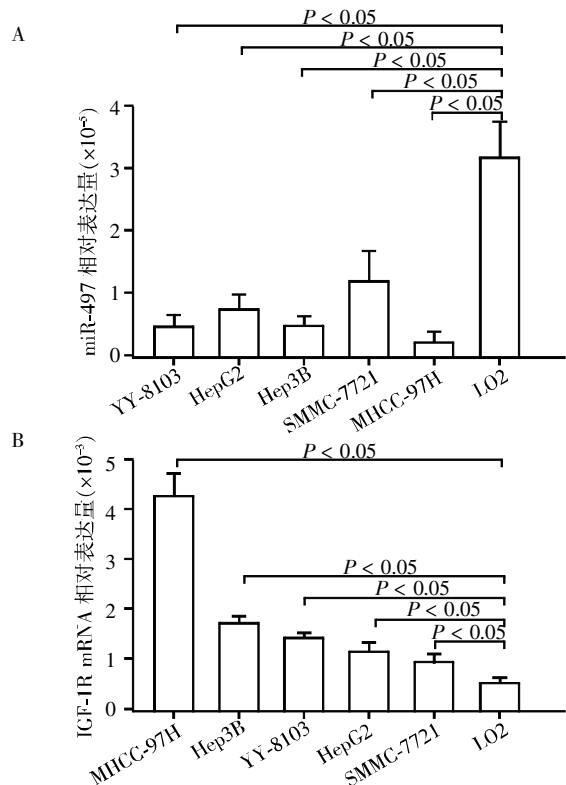
2.4 miR-497 抑制肝癌细胞的侵袭和转移

过表达或干扰 miR-497 在肝癌细胞中的表达,

通过小室侵袭实验及细胞划痕实验检测 miR-497 对 MHCC-97H 和 SMMC-7721 侵袭转移的影响。与空白对照相比,转染 miR-497 mimic 后 MHCC-97H 细胞穿过小室基底膜数目明显减少,转染 miR-497 inhibitor 的 SMMC-7721 细胞穿过小室基底膜数目增多 $(225 \pm 26 \text{ vs } 425 \pm 28, 232 \pm 28 \text{ vs } 148 \pm 24, P < 0.05, n=3)$,图 4]。细胞划痕实验显示过表达 miR-497 后 MHCC-97H 细胞迁移能力受到抑制,干扰 miR-497 表达后 SMMC-7721 细胞迁移能力增强 $(n=3)$,图 5]。

3 讨论

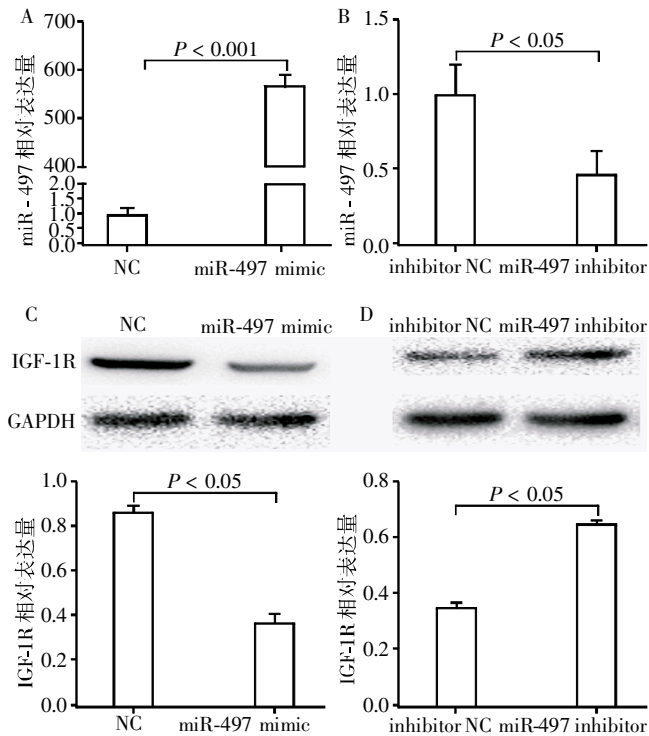
肿瘤细胞的侵袭与转移是影响肝癌治疗预后的关键因素之一。对于肝癌的治疗,传统的放化疗效果较差,肝部分切除术和肝移植术仍然是治疗原发性肝癌的主要手段,然而肝癌的手术治疗目前仅适用于相对早期的患者,由于术后较高的复发率和远处转移率,患者术后的 5 年生存率仍只有 30%~40%^[9],因此研究肝癌侵袭与转移的分子机制以探索新的治疗方法显得十分重要。当前,越来越多的证据表明



A: 探针法定量 PCR 检测肝癌细胞系中 miR-497 表达均低于正常人肝细胞系 LO2, 其中在 MHCC-97H 降低最为明显, SMMC-7721 相对表达较高; B: 定量 PCR 检测肝癌细胞系中 IGF-1R mRNA 表达高于正常人肝细胞系 LO2, 其中在 MHCC-97H 中升高最为明显。

图 2 miR-497/IGF-1R mRNA 在肝癌细胞系中的表达
Figure 2 The expression of miR-497/IGF-1R mRNA in HCC cell lines

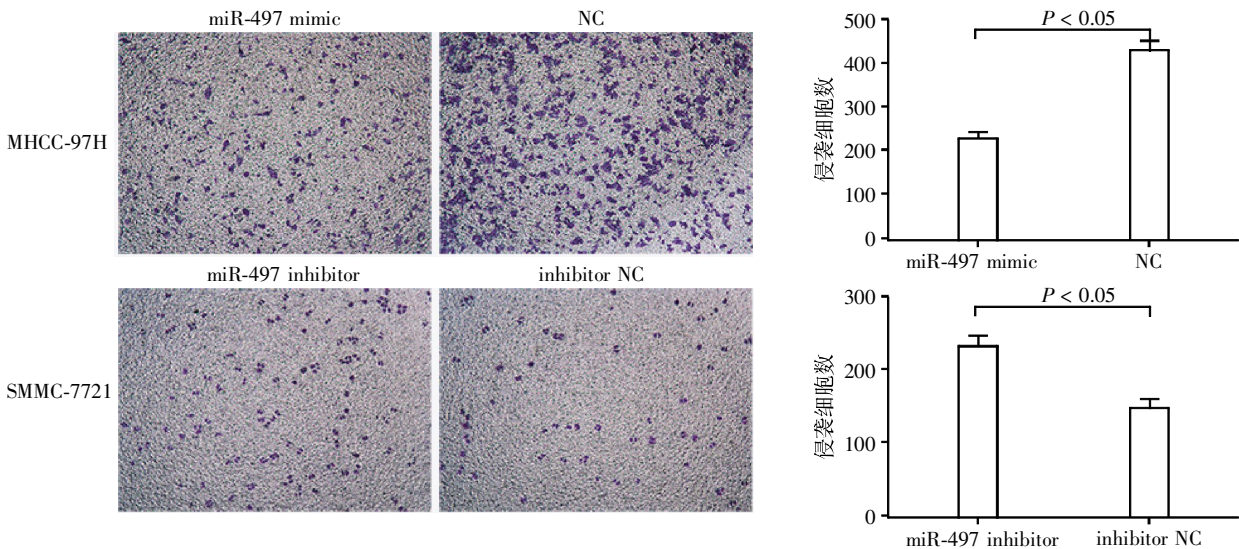
miRNAs 在包括肝癌在内的多种肿瘤的发生发展中扮演重要角色,这为揭示肝癌发生发展的分子机制及分子靶向治疗提供了新的路径^[10]。



A: 相比于对照组(NC),MHCC-97H 在转入 miR-497 mimic 后 miR-497 表达量明显增加;B: 相比于对照组 (inhibitor NC),SMMC-7721 在转入 miR-497 inhibitor 后 miR-497 表达量降低;C:MHCC-97H 在转染 miR-497 mimic 后 IGF-1R 蛋白表达减少;D:SMMC-7721 在转染 miR-497 inhibitor 后 IGF-1R 蛋白表达增加。

图 3 miR-497 在肝癌细胞系中调控 IGF-1R 的表达

Figure 3 miR-497 control the expression of IGF-1R in HCC cell lines



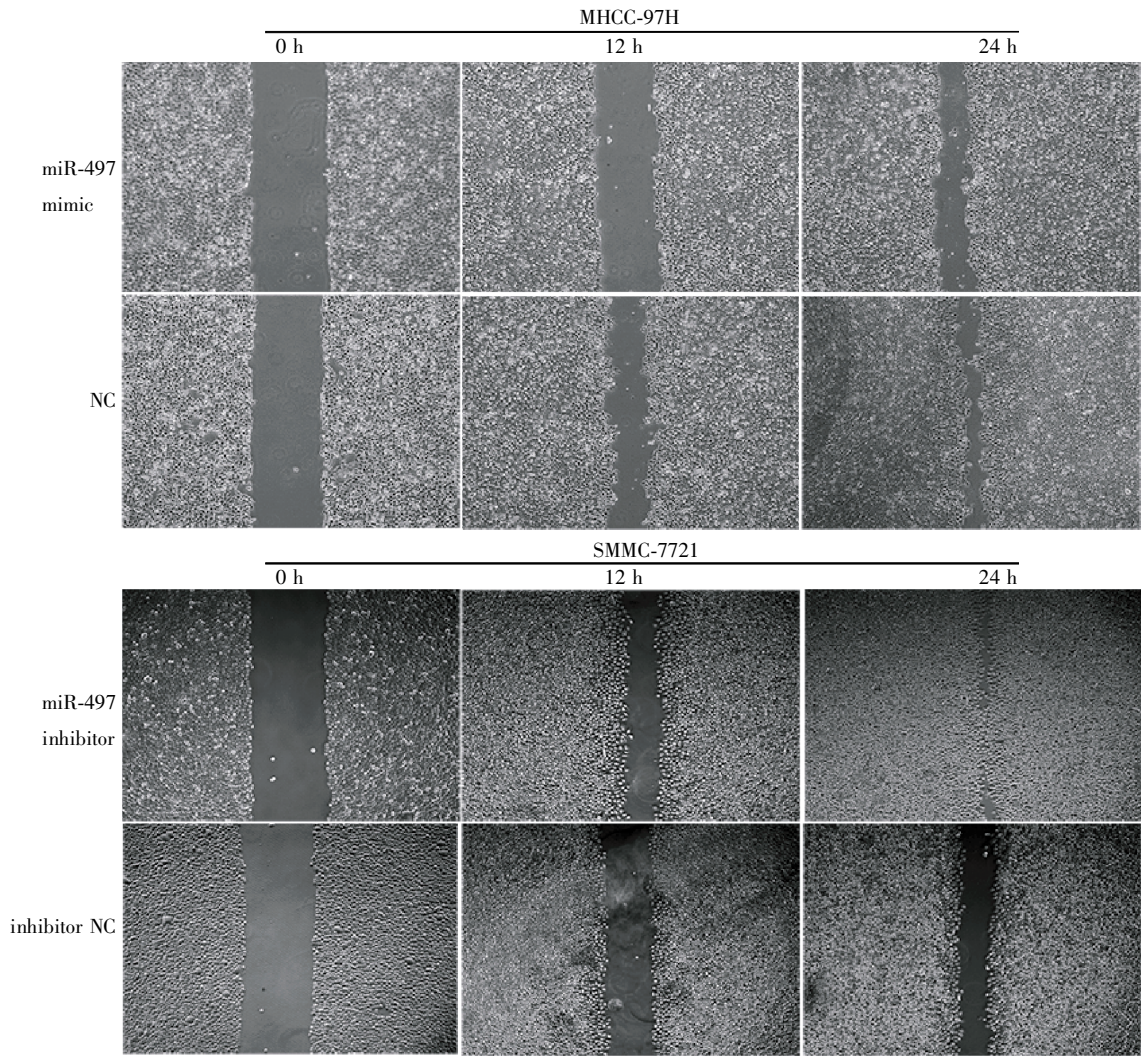
A:MHCC-97H 细胞在转染 miR-497 mimic 后侵袭能力减弱;B:SMMC-7721 细胞在转染 miR-497 inhibitor 后侵袭能力增强(n=3)。

图 4 miR-497 对肝癌细胞侵袭的影响

Figure 4 The influence of miR-497 on HCC cell invasion

miRNA 是一种约 23 个核苷酸序列的非编码小 RNA,参与包括细胞增殖、凋亡、侵袭、转移等在内的几乎所有生物过程,可作为癌基因或抑癌基因对肿瘤的发生、发展产生重大影响^[11-12]。近来,有研究表明 miR-497 对多种肿瘤的发生、发展起抑制作用^[5-8],但尚未有 miR-497 与肝癌侵袭与转移的相关性研究。本次研究证实 miR-497 在肝癌组织及多种肝癌细胞系中表达降低,进一步分析发现在脉管转移组和高侵袭性肝癌细胞系中 miR-497 表达降低更为明显。体外实验证实过表达 miR-497 降低了 MHCC-97H 细胞的侵袭与转移能力,而抑制 miR-497 则增强了 SMMC-7721 细胞的侵袭与转移能力。这些结果表明 miR-497 可抑制肝癌细胞的侵袭与转移。

由于一种 miRNA 常可通过调节多种 mRNA 而发挥不同生理作用,几种在线数据库(miRanda、miRbase 等)提示 IGF-1R mRNA 含 miR-497 的结合位点。已有研究证实结直肠癌中 miR-497 可直接结合于 IGF-1R mRNA 而抑制肿瘤的发生发展^[5]。IGF-1R 由 2 个位于胞外的配体结合部位(α 亚基)和 2 个位于胞内的酪氨酸激酶区域(β 亚基)组成^[13],在体内可通过 IGF 轴、PI3K/Akt 等通路促进肿瘤细胞的增殖与侵袭^[14-16]。IGF-1R 在肝癌中已被证实表达增高,促进了肝癌的发生发展^[17-18]。本研究验证了 IGF-1R 在肝癌组织中的表达,同时进一步的研究发现在 MHCC-97H 过表达 miR-497 后可降低 IGF-1R 表达,而抑制 miR-497 则增加了 SMMC-7721 细胞中 IGF-1R 表达。以上实验表明 miR-497 可通过调节



A:MHCC-97H 在转染 miR-497 mimic 后迁移能力减弱;B:SMMC-7721 在转染 miR-497 inhibitor 后迁移能力增强(n=3)。

图5 miR-497 对肝癌细胞迁移的影响

Figure 5 The influence of miR-497 on HCC migration

IGF-1R mRNA 而发挥抑制肝癌侵袭、转移作用。

综上所述,miR-497 在肝癌的侵袭与转移中发挥重要作用,其可能是通过抑制 IGF-1R 的表达,从而降低肝癌细胞的侵袭与转移能力。针对 IGF 轴现已研究出多种靶向治疗药物用于包括肝癌在内的多种肿瘤的治疗^[19]。因此进一步研究 miR-497 通过调节 IGF-1R 抑制肿瘤侵袭及转移的具体机制,可能为肝癌的治疗提供新思路。

[参考文献]

[1] Cabrera R,Nelson DR. Review article:the management of hepatocellular carcinoma[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2010,31(4):461-476

[2] Caldwell S,Park SH. The epidemiology of hepatocellular cancer:from the perspectives of public health problem to tumor biology [J]. J Gastroenterol,2009,44 (Suppl 19):

96-101

[3] Poon RT,Fan ST,Wong J. Risk factors,prevention and management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg,2000,232 (1): 10-24

[4] Winter J,Jung S,Keller S,et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation [J]. Nat Cell Biol,2009,11(3):228-234

[5] Guo ST,Jiang CC,Wang GP,et al. MicroRNA-497 targets insulin-like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer[J]. Oncogene,2013,32(15):1910-1920

[6] Luo Q,Li X,Gao Y,et al. miR-497 regulates cell growth and invasion by targeting cyclin E1 in breast cancer [J]. Cancer Cell Int,2013,13(1):95

[7] Zhu W,Zhu D,Lu S,et al. miR-497 modulates multidrug

- resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(1): 384-391
- [8] Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, et al. The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60155
- [9] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2005, 42(5): 1208-1236
- [10] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(3): 143-159
- [11] Mazar J, De Young K, Khaitan D, et al. The regulation of miRNA-211 expression and its role in melanoma cell invasiveness [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13779
- [12] Adam L, Zhong M, Choi W, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5060-5072
- [13] LeRoith D, Helman L. The new kid on the block (ade) of the IGF-1 receptor [J]. *Cancer Cell*, 2004, 5(3): 201-202
- [14] Tomizawa M, Shinozaki F, Sugiyama T, et al. Insulin-like growth factor-I receptor in proliferation and motility of pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(15): 1854-1858
- [15] Kornprat P, Rehak P, Ruschoff J, et al. Expression of IGF-I, IGF-II, and IGF-IR in gallbladder carcinoma. A systematic analysis including primary and corresponding metastatic tumours [J]. *J Clin Pathol*, 2006, 59(2): 202-206
- [16] Sekharam M, Zhao H, Sun M, et al. Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of colon cancer cells through the Akt/Bcl-x (L) pathway [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 7708-7716
- [17] Scharf JG, Schmidt-Sandte W, Pahernik SA, et al. Characterization of the insulin-like growth factor axis in a human hepatoma cell line (PLC) [J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19(12): 2121-2128
- [18] Zhang YC, Wang XP, Zhang LY, et al. Effect of blocking IGF-I receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(25): 3977-3982
- [19] Wu J, Zhu AX. Targeting insulin-like growth factor axis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2011, 4: 30
- [收稿日期] 2015-03-23

参考文献的著录格式

1. 期刊

[顺序号] 作者. 题名 [J]. 刊名, 年份, 卷号(期号): 起止页码

示例:

[1] 徐春阳, 杨 荣, 张 浩, 等. NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 32(6): 728-731

[2] Li JZ, Bunney BG, Meng F, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(24): 9950-9955

2. 专著

[顺序号] 作者. 书名 [M]. 版本. 出版地: 出版者, 年份: 起止页码

示例:

[3] 何 维. *医学免疫学* [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 136

3. 析出文献

[顺序号] 析出文献责任者. 析出文献题名 [M] // 析出文献其他责任者或专著主要责任者. 专著题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 年份: 析出文献起止页码

示例:

[4] 林穗芳. 美国出版业概况 [M] // 陆本瑞. *世界出版概况*. 北京: 中国书籍出版社, 1991: 1-23

[5] 钟文发. 非线性规划在可燃毒物配置中的应用 [C] // 赵 玮. *运筹学的理论与应用: 中国运筹学会第五届大会论文集*. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 468-471

(本刊编辑: 接雅俐)