

急性缺血性脑卒中患者血清 miRNA-335 表达水平及临床意义

袁梅¹, 周成芳¹, 汤永红¹, 袁海军²

(南华大学附属第二医院 1. 神经内科, 2. 急诊科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 急性缺血性脑卒中; miRNA-335; 生物学标记物

[摘要] **目的** 检测 miRNA-335(miR-335)在急性缺血性脑卒中(AIS)患者血清中的表达,探讨其与 AIS 发病的相关性。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应法测定 106 例 AIS 患者及 98 例健康对照者血清 miR-335 表达情况,卒中患者病情评估采用美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)进行评分,并比较病程为 3 天内、4~7 天和 8~14 天的 AIS 患者血清 miR-335 表达水平,分析患者血清 miR-335 水平与 NIHSS 评分的相关性。运用生物学数据库预测 miR-335 的靶基因,采用 DAVID 数据库对靶基因集合进行功能注释分析。**结果** ①与健康对照组相比较,AIS 组患者血清 miR-335 表达明显下调($P < 0.01$),病程为 3 天内、4~7 天和 8~14 天的 AIS 患者血清中 miR-335 水平均低于健康对照组($P < 0.01$);②血清 miR-335 水平与 NIHSS 评分呈负相关($r = -0.28, P < 0.01$),NIHSS > 5 分组患者血清 miR-335 水平明显低于 NIHSS ≤ 5 分组($P < 0.01$);③数据库分析显示:miR-335 预测靶基因功能分析主要富集在核酸代谢、转录调控、细胞增殖、神经元发育与分化、血管形成的生物学过程,并富集在通道活性的调节、钙离子结合活性、阳离子金属离子结合活性和转录调节的活性等分子功能,定位于细胞核质成分,并富集于 MAPK 信号转导、氧化应激和血管形成的信号通路中。**结论** AIS 患者血清 miR-335 表达明显下降,与卒中后患者病情密切相关,是其可能的血清生物学标志之一。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Expression and Significance of Serum miR-335 in Patients with Acute Ischemic Stroke

YUAN Mei¹, ZHOU Cheng-Fang¹, TANG Yong-Hong¹, and YUAN Hai-Jun²

(1. Department of Neurology, 2. Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Acute Ischemic Stroke; miR-335; Biomarker

[ABSTRACT] **Aim** To explore the association and role of serum miR-335 in patients with acute ischemic stroke (AIS). **Methods** Blood samples were obtained from AIS patients ($n = 106$) and healthy controls ($n = 98$). miR-335 was measured by using a quantitative real-time PCR technique. Stroke severity was evaluated by the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). The correlation between serum miR-335 and NIHSS scores was performed by Pearson correlations analysis. Bioinformatics database assay was used to predict comprehensively target genes, Gene ontology and enriched pathway of target genes were analyzed with DAVID database. **Results** Compared with healthy controls, serum miR-335 was significantly decreased in stroke patients ($P < 0.01$), especially at 3 days ($P < 0.01$). The level of serum miR-335 was significantly lower in NIHSS > 5 group compared with NIHSS ≤ 5 group ($P < 0.01$), the level of miR-335 was closely negatively correlated to NIHSS ($r = -0.28, P < 0.01$). The predicted target genes of miR-335 were mainly involved in biological processes including metabolism of nucleic acid, regulation of transcription, growth and differentiation of neurons, angiogenesis, molecular function including regulation of channel activity, calcium ion binding activity, cationic metal ion binding activity and transcriptional activity, and cellular components including nucleoplasm, pathways including oxidative stress response, angiogenesis and MAPK signaling pathway. **Conclusions** The level of miR-335 was significantly reduced in serum of patients with acute ischemic stroke, and serum miR-335 may be a novel sensitive biomarker for

[收稿日期] 2014-09-14

[修回日期] 2015-02-01

[基金项目] 衡阳市科技计划项目(2014KJ40)

[作者简介] 袁梅, 博士, 主治医师, 研究方向为脑血管病防治, E-mail 为 meimeihaijun@163.com。通讯作者周成芳, 副主任医师, 研究方向为脑血管病防治, E-mail 为 55584552@qq.com。汤永红, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病防治。

clinical diagnosis in acute cerebral ischemia.

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是调节基因在转录后表达的重要非编码小分子 RNA, 参与了细胞的增殖、分化和凋亡, 以及神经元的发育和损伤后的修复等生命过程的调控, 并与脑卒中密切相关^[1-2]。脑组织特定的 miRNA 水平的变化能在其血液中 miRNA 水平的变化中表现, 血液中 miRNA 变化情况可反映大脑缺血性损伤和修复^[2-3]。miRNA 作为疾病和健康的重要生物标志物, 可在外周血检测^[4-5]。miR-335 在调节神经元的生长、分化和发育中起到重要作用^[6]。有研究表明 miR-335 在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型中有表达下调^[7], 但 miR-335 在脑卒中患者中的表达水平和调节机制尚未见报道。本研究旨在探讨血清 miR-335 是否可以作为急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 患者病情判断和评估的指标。

1 对象与方法

1.1 一般资料

本研究连续收集 2013 年 6 月至 2013 年 12 月南华大学附属第二医院神经内科和急诊科就诊的发病 14 天内 (≤ 14 天) 的 AIS 患者, 共 106 例。所有入选患者均根据病史、神经功能缺损、临床辅助检查、核磁共振 (MRI + DWI) 和磁共振血管成像 (MRA) 结果, 符合我国 1995 年第四次全国脑血管病会议制定的脑卒中诊断标准和国际公认的 TOAST (Trial of Org10172 in acute stroke treatment) 卒中分类标准, 最终被确诊为大动脉粥样硬化性卒中。根据起病至入组时间, AIS 患者分为 3 天内 (≤ 3 天)、4~7 天和 8~14 天亚组。对患者进行美国国立卫生研究院卒中量表 (National Institute of Health stroke scale, NIHSS) 评分, 并根据 NIHSS 评分将患者分为 NIHSS ≤ 5 分组和 > 5 分组。健康对照组来自同期本院体检中心健康普查的健康随机个体, 共 98 例。入选和排除标准参考前期研究^[8]。所有研究对象或家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 血清 miR-335 表达水平的测定

所有受测者均采用普通生化管抽取静脉血 5 mL, 常温下 3000 r/min 离心 10 min, 收集上层血清 1 mL, 于 -20°C 保存备用。采用 Trizol (Trizol 抽提试剂由美国 Invitrogen 公司提供) 法提取血清中总 RNA, 并用分光光度计检测所提取 RNA 的质量。采用 qRT-PCR 法检测各标本 miR-335 浓度。逆转录

和 PCR 扩增 (逆转录试剂盒由日本 TOYOBO 公司提供, 染料法实时荧光定量试剂盒由大连 TAKARA 公司提供) 均严格按照相应说明书进行操作。以 cel-miR-39 为内参。miR-335 茎环引物 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TCG CAC T - GGA TAC GAC ACA TTT-3', 上游引物 5'-CTC CAG CTG TCA AGA G -CAA TAA CGA A-3', 下游引物 5'-TCC AGT GCA GGG TCC GAG GT-3'。cel-miR-39 茎环引物 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT AC -GAC AAA GC - 3', 上游引物 5'-CAC TCC GTC ACC GGG TGT AAA TC-3', 下游引物 5'-TCC AGT GCA GGG TCC GAG GT-3'。PCR 反应条件: 95°C 预变性 2 min; 再进行 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各样本 miR-335 的相对表达量。实验重复 3 次。

1.3 使用生物信息学软件数据库分析 miR-335 功能

使用 TargetScan 和 Pictar 两种生物信息学软件数据库分别预测 miR-335 可能的靶基因, 取其二者数据库共有交集作为 miR-335 靶基因的集合, 并通过 DAVID 基因注释软件数据库对靶基因集合的功能进行富集分析。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS13.0 进行统计分析。计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用 *t* 检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

AIS 组患者与健康对照组在性别结构、年龄和体质指数 (body mass index, BMI) 方面差异无统计学意义。而 AIS 组在高血压史、吸烟、糖尿病史和血脂异常方面明显高于健康对照组 ($P < 0.05$; 表 1)。其中 106 例 AIS 患者, 根据病程入组时间分为: ≤ 3 天组患者 58 例, 4~7 天组患者 30 例, 8~14 天组患者 18 例, 各时间阶段亚组患者在性别、年龄上无统计学差异。根据神经功能缺损严重程度, 将 AIS 患者分为病情较轻组 (NIHSS ≤ 5 分组) 和病情较重组 (NIHSS > 5 分组), 其中 NIHSS ≤ 5 分组 64 例, NIHSS > 5 分组 42 例, 两组在性别、年龄上也无统计学

差异。

表 1. AIS 组与健康对照组一般临床资料比较

Table 1. Clinical characteristics of patients with acute ischemic stroke and normal controls

临床资料	健康对照组 (n = 98)	AIS 组 (n = 106)
年龄(岁)	65.9 ± 6.8	67.6 ± 6.2
男/女(例)	56/42	60/46
BMI (kg/m ²)	23.9 ± 1.9	24.1 ± 2.1
高血压史(例)	33(33.7%)	48(45.3%) ^a
吸烟史(例)	27(27.6%)	42(39.6%) ^a
糖尿病(例)	12(12.2%)	26(24.5%) ^a
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.39 ± 0.81	2.68 ± 0.76 ^a
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.46 ± 0.45	1.22 ± 0.41 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与健康对照组比较。

2.2 血清 miR-335 表达水平

运用 qRT-PCR 检测 AIS 组和健康对照组血清 miR-335 水平, 结果示 AIS 组血清 miR-335 相对表达量(0.35 ± 0.26) 明显低于健康对照组(1.21 ± 0.32), 差异有显著性($P < 0.01$)。对 AIS 患者按不同病程分组, 发现 ≤ 3 天组、4~7 天组和 8~14 天组 AIS 患者血清中 miR-335 水平均低于健康对照组(均 $P < 0.01$), 且 AIS 三个不同病程组比较 miR-335 水平呈上升趋势, 8~14 天组 miR-335 水平高于 ≤ 3 天组($P < 0.05$), 但与 4~7 天组比较差异无显著性(表 2)。

表 2. AIS 三个不同病程组患者与健康对照者血清 miR-335 表达水平

Table 2. miR-335 expression in healthy normal controls and acute ischemic stroke subgroup

分 组	miR-335 表达水平
健康对照组	1.21 ± 0.32
≤ 3 天组	0.31 ± 0.26 ^a
4~7 天组	0.38 ± 0.25 ^a
8~14 天组	0.46 ± 0.25 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与健康对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ≤ 3 天组比较。

2.3 AIS 患者血清 miR-335 表达水平与 NIHSS 评分的相关性

对所有 AIS 患者入组时 NIHSS 评分与 miR-335 表达水平进行 Pearson 相关分析, 发现二者呈明显负相关($r = -0.28, P < 0.01$)。NIHSS ≤ 5 分组 miR-335 水平(0.42 ± 0.28) 明显高于 NIHSS > 5 分

组(0.25 ± 0.18), 差异有显著性($P < 0.01$)。

2.4 生物信息学软件对 miR-335 功能的预测及分析

使用 TargetScan 和 Pictar 两种生物信息学软件数据库分别预测 miR-335 可能的靶基因, 取其二者数据库共有交集靶基因集合, 共包含 71 个基因。基因本体论富集分析结果显示, miR-335 预测靶基因集合的生物学过程主要富集在核酸代谢、转录调控、细胞增殖、神经元发育与分化、血管形成等(表 3), 靶基因集合的分子功能主要富集在通道活性的调节、钙离子结合活性、阳离子金属离子结合活性和转录调节的活性等(表 4), miR-335 预测靶基因的基因本体论分析细胞组成定位为细胞核质成分, 有 CHFR、CCNT2、FMR1 等 7 个基因。生物通路富集分析结果显示富集于 MAPK 信号转导、氧化应激和血管形成的信号通路(表 5)。以上数据库分析提示 miR-335 可能参与缺血性卒中的早期钙超载、氧化应激等损伤过程和随后的血管生成、神经元修复等过程相关靶基因调控。

表 3. miR-335 预测靶基因的基因本体论分析生物学过程结果

Table 3. Biological process analysis of the predicted target genes of miR-335 based on gene ontology

生物学过程	靶基因	基因数量
RNA 聚合酶 II 转录启动子的正调控	BCL11B, ISL1, SPI 等	7
DNA 依赖转录的正调控	BCL11B, ISL1, SPI 等	7
核酸、含氮化合物代谢的正向调控	BCL11B, ISL1, SPI 等	7
RNA 代谢过程调控	BCL11B, ISL1, RASA1 等	14
DNA 依赖的转录调控	BCL11B, ISL1, SNIP1 等	12
转录、基因表达的正向调控	BCL11B, ISL1, SPI 等	7
转录调控	BCL11B, ISL1, MAX 等	16
生物合成过程正向调节	BCL11B, ISL1, SPI 等	7
细胞分裂	CCNT2, CHFR, RASA1 等	5
外胚层细胞分化	SPI, HAND1	2
轴突生成	BCL11B, EPHA4, ISL1 等	4
神经元的发育	BCL11B, MAP2, NRXN1 等	5
神经元的分化	BCL11B, ISL1, NRXN1 等	4
神经元突触形成	BCL11B, EPHA4, ISL1 等	4
微管的发育	SPI, HAND1, PGF 等	4
轴突导向	EPHA4, ISL1, NRXN1	3
微管的形成	HAND1, NR4A3, PGF	3
神经元投射发育	BCL11B, EPHA4, ISL1 等	5
血管、脉管系统的发育	RASA1, HAND1, PGF 等	4
子宫内胚胎的发育	SPI, HAND1, MED21 等	4
囊胚发育	SPI, HAND1, MED21	3

表 4. miR-335 预测靶基因的基因本体论分析分子功能结果

Table 4. Molecular function analysis of the predicted target genes of miR-335 based on gene ontology

分子功能	靶基因	基因数量
通道活性的调节	RASA1, HPCAL4, NRXN1 等	4
钙离子通道活性的调节	HPCAL4, NRXN1, STIM2	3
钙调蛋白结合	ADCD3, EEF2K, MAP2 等	4
转录激活活性	MAX, SP1, HAND1 等	6
蛋白异二聚体活性	MAX, HAND1, NPAS4 等	4
转录辅因子活性	MAX, SETD8, HAND1 等	4
钙离子结合	CDH11, CALU, F13A1 等	8
金属离子结合	ADAM19, ATP1B1, BCL11B 等	23
阳离子结合	ADAM19, ATP1B1, BCL11B 等	23

表 5. miR-335 预测靶基因的调节通路富集分析结果

Table 5. Pathway analysis of the predicted target genes of miR-335 based on enrichment analysis

通路名称	靶基因	基因数量
MAPK 信号转导通路	MAX, RASA1, MAP3K2 等	4
氧化应激通路	MAX, EEF2K, MAP3K2	3
血管形成通路	EPHA4, RASA1, PRKD1 等	4

3 讨论

本研究通过病例-对照研究发现 AIS 患者血清 miR-335 表达水平明显下降, 下调表达的 miR-335 与脑卒中呈明显负相关, 并进一步通过生物信息学数据库分析了其可能的靶基因功能, 探讨其在缺血性脑卒中的意义。

微小 RNA (miRNA) 的“种子序列”通过碱基互补配对原则与靶基因 mRNA 分子 3' UTR 特异性识别结合, 抑制靶基因的翻译或降低其稳定性而沉默靶基因, 是基因转录后水平的重要调控方式, 在细胞增殖、组织分化、器官形成、疾病的损伤与修复等过程中起重要作用。一些研究表明 miRNA 参与了神经系统的发生、发育、病理损伤和修复过程^[2,6]。某些 miRNA 表达水平的变化与神经系统疾病如缺血性脑卒中有密切相关性, 能反映其病情的严重程度。Dharap 等^[7]对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤 3 h 至 3 天内模型的研究中, 发现有包括 miR-335 在内的 12 种 miRNA 表达水平明显下降, 其降低发生在第 1 天和第 3 天。本研究通过病例-对照研究发现 AIS 患者血清 miR-335 水平明显下降, 低于健康对照组。miRNA 分子可通过血-脑屏障^[9], 脑组织 miRNA 水平和血中 miRNA 水平变化是平行、一致

的^[10]。由此推断本研究结果与先前的动物实验结果是相吻合的。为进一步探讨 miR-335 与脑卒中病情严重程度相关性, 本研究对 AIS 患者 NIHSS 评分及通过 Pearson 相关分析, 发现 AIS 患者血清 miR-335 表达水平与 NIHSS 评分呈明显负相关 ($r = -0.28, P < 0.01$), 同时发现 NIHSS > 5 分组患者血清 miR-335 水平明显低于 ≤ 5 分组 ($P < 0.01$), 这表明脑卒中患者病情越重, 其血清 miR-335 水平越低, 血清 miR-335 水平能够反映患者病情严重程度。

缺血性脑卒中是脑卒中的最常见类型。传统的危险如不健康的生活方式、高血压、血脂异常和糖尿病等通过促进动脉硬化影响脑卒中的发病。在本研究中, 我们也发现吸烟、高血压、糖尿病、血脂异常是 AIS 的重要危险因素, 与先前的报道^[11]是一致的。AIS 发病后不同时间阶段其发病的病理生理过程有差异。在 AIS 发生后数小时开始, 脑缺血导致相应供血区域脑组织缺血、缺氧, 脑组织继发性软化、坏死; 随后的缺血后再灌注损伤, 加重脑组织的进一步损害。这一损伤过程机制非常复杂, 包括氧自由基生成、细胞内钙超载、一氧化氮大量释放、凋亡基因的激活等, 进一步导致血脑屏障破坏, 脑水肿, 这些因素互为因果, 相互影响, 最终导致神经元细胞坏死、凋亡。而在脑卒中发生后 7 天左右是脑血管再生、神经再生修复和神经血管重塑的开始, 在随后至 14 天均可检测到^[12]。

脑卒中发生后不同时间其 miRNA 表达谱不一样^[7], 同一种 miRNA 在发病后不同时间阶段表达水平也有差异。本研究根据发病后采血时间分为 ≤ 3 天组, 4 ~ 7 天组和 8 ~ 14 天组, 发现与健康对照组比较, 3 个不同时间段 miR-335 均有下降 (均 $P < 0.01$)。随病程发展呈上升恢复趋势, ≤ 3 天组最低, 而 4 ~ 7 天组稍高于 ≤ 3 天组, 8 ~ 14 天组最高。这提示 miR-335 不仅参与了早期损伤, 而且在起病后的修复过程中也可能起到重要作用。

有关 miR-335 是否参与及如何参与 AIS 发病后损伤和损伤后修复的相关研究目前尚未见报道。值得注意的是, miR-335 最初是在酒精影响脑发育模型鼠中发现的, 报道认为 miR-335 表达下调影响脑发育^[13]。还有研究发现 miR-335 通过靶向调控 HAND1 和 JAG1 基因影响神经元生长、分化^[6]。体外细胞实验发现, 使用 miR-335 拮抗剂 (antagomir-335) 转染大鼠神经胶质瘤细胞 C6, 可诱导该细胞凋亡^[14]。miR-335 可能是一种脑组织中特异性 miRNA。虽然这些研究可以从侧面一定程度上提示

miR-335 可能影响神经元的凋亡和生长、修复等参与脑卒中后损伤及修复病理生理过程,但不全面。我们通过运用 TargetScan 和 Pictar 两种 miRNA 数据库预测 miR-335 的靶基因,并最终选取两数据库结果的公共交集,最终得到 71 个基因,并采用 DAVID 基因注释软件数据库对靶基因集合进行基因本体论注释描述和代谢通途功能富集分析。基因本体论描述预测靶基因的功能,主要有核酸代谢、转录调控、细胞增殖、神经元发育与分化、血管形成等代谢过程,通道活性的调节、钙离子结合活性、阳离子及金属离子结合活性和转录调节的活性等分子功能及细胞核质成分细胞组成。生物通路富集分析结果显示富集于 MAPK 信号转导、氧化应激和血管形成的信号通路。这提示 miR-335 可能调节相应的靶基因参与缺血性卒中的早期损伤过程和随后的血管生成、神经元修复等过程,是 AIS 发病的重要调控核酸分子。通过检测患者血清中 miR-335 表达水平可监测脑组织 miR-335 的变化和评估损伤的脑组织及修复情况。

总之,血清 miR-335 与 AIS 有密切相关性,其水平能反映 AIS 病情严重程度,对 AIS 的调控可能贯穿了发病早期的损伤和随后修复的不同阶段的病理生理过程,可能是 AIS 核酸水平重要的血清标记物之一。本研究对开展 AIS 血清学诊断和治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Jickling GC, Ander BP, Zhan X, et al. microRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99 283.
- [2] 王丽,王媛媛,刘海莉,等. MicroRNA 与神经系统发育的研究进展[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2013, 38(3): 323-328.
- [3] Liu DZ, Tian Y, Ander BP, et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracere-

- bral hemorrhage, and kainate seizures[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(1): 92-101.
- [4] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1 006.
- [5] 杨中保,彭军. 血液循环和植物来源 miRNA 的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(3): 271-274.
- [6] Samaraweera L, Grandinetti KB, Huang R, et al. MicroRNAs define distinct human neuroblastoma cell phenotypes and regulate their differentiation and tumorigenicity [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 309.
- [7] Dharap A, Bowen K, Place R, et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(4): 675-687.
- [8] 袁梅,周成芳,夏健,等. 急性缺血性脑卒中患者血清钙调蛋白水平检测及意义[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 30(7): 645-647.
- [9] Pardridge WM. shRNA and siRNA delivery to the brain [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59 (2-3): 141-152.
- [10] Zeng L, Liu J, Wang Y, et al. MicroRNA-210 as a novel blood biomarker in acute cerebral ischemia [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3: 1 265-272.
- [11] 王振威,苏杨维. 缺血性进展性脑卒中的相关危险因素分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(4): 336-338.
- [12] Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(5): 779-789.
- [13] Sathyan P, Golden HB, Miranda RC. Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(32): 8 546-557.
- [14] Shu M, Zheng X, Wu S, et al. Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 59.

(此文编辑 许雪梅)