

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.03.002

下调 microRNA-34a 增强对人脂肪干细胞成骨诱导分化作用的初步探索*

李鹏飞¹ 吴佳君¹ 李余² 张静¹ 吴慧玲^{1△}

(1 浙江大学附属第一医院 整形美容中心 浙江 杭州 310000; 2 浙江大学医学院 浙江 杭州 310000)

摘要 目的: 颅颌面临界骨缺损是整复外科常见疾患, 常常给患者的身心带来障碍和压力。为解决骨形成不足这一难题, 我们拟通过表观遗传修饰的手段, 调节 microRNA-34a 在人脂肪干细胞中的表达, 来探讨 microRNA-34a 对人脂肪干细胞成骨诱导分化的影响。**方法:** 分离培养原代人脂肪干细胞, 以慢病毒为转染载体, 分三组对其进行上调、下调 microRNA-34a 的表达及阴性对照。然后对其进行成骨诱导培养, 于诱导的第 7 天行碱性磷酸酶(ALP)染色, 第 14 天行茜素红(Alizarin Red)染色, 定性比较转染后人脂肪干细胞成骨诱导分化的效果。**结果:** 成功分离和培养原代人脂肪干细胞, 并以慢病毒高效率转染调控 microRNA-34a 的表达。对比碱性磷酸酶和茜素红染色可见下调 microRNA-34a 组成骨效率最高, 其次是阴性对照组, 上调组效率最低。**结论:** 1. 人脂肪干细胞通过慢病毒转染获得高效率的表观遗传修饰; 2. 下调 microRNA-34a 的表达对人脂肪干细胞成骨的诱导分化有一定的促进作用。

关键词: 下调 microRNA-34a; 人脂肪干细胞; 成骨诱导分化

中图分类号: R-33; R329; R651 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)03-406-05

Primary Exploration of Promotion Effect of microRNA-34a Knockdown on Human Adipose-Derived Stem Cells in Osteoinduction Differentiation*

LI Peng-fei¹, WU Jia-jun¹, LI Yu², ZHANG Jing¹, WU Hui-ling^{1△}

(1 The First Affiliated Hospital, Zhejiang University, Aesthetic Plastic Center, Hangzhou, Zhejiang, 310000, China;

2 Zhejiang University, School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang, 310000, China)

ABSTRACT Objective: Cranial critical-sized bone defect is commonly seen in plastic and reconstructive surgery causing dysfunctions and pressure on patients both physically and psychologically. In order to solve the difficulty, we regulated the expression of microRNA-34a in human adipose-derived stem cells (hADSCs) by epigenetic modification to evaluate the effect of microRNA-34a on hADSCs in osteoinduction differentiation. **Methods:** Extract and culture primary hADSCs. Transfect hADSCs with lentivirus respectively in three groups: microRNA-34a up-regulation, knockdown and negative control. And then induce them to differentiate into osteoblasts. The osteogenic efficiency was qualitatively detected by ALP staining at day 7 and alizarin red staining at day 14 after osteoinduction. **Results:** hADSCs were successfully extracted and cultured; microRNA-34a expression was regulated by means of high efficient transfection of lentivirus; staining results showed that microRNA-34a knockdown group was most efficient in osteoinduction differentiation, control group came as the second, up-regulation group was the least efficient. **Conclusion:** 1. By transfecting with lentivirus, hADSCs acquired high efficiency of epigenetic modification; 2. microRNA-34a knockdown to some extent can promote osteoinduction differentiation in hADSCs.

Key words: microRNA-34a Knockdown; hADSCs; Osteoinduction Differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R329; R651 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)03-406-05

前言

作为整复外科的常见疾患, 颅颌面临界骨缺损(Cranial Critical-sized Bone Defect) 是导致颅颌面部畸形和功能障碍的主要原因^[1-4]。由于解剖位置的特殊, 缺损不仅给患者造成外形和功能上的障碍, 而且在心理上也给患者带来巨大的压力^[3-4]。为恢复正常协调的头颅颌面的功能和外观, 亟需进行骨缺损的修复。人脂肪干细胞(Human Adipose-derived Stem Cells, hASCs)

是具有自我更新和多系分化能力的多能干细胞, 因其来源充足、采集简单和供区副作用小等优点^[5-7], 具有良好的临床应用前景, 而成为整复外科研究的热点。以诱导人脂肪干细胞成骨来修复缺损的骨组织工程技术是近年来的热点和研究趋势^[8]。

microRNA 是一群长约 19-22 个核苷酸的内源性非编码单链小 RNA, 通过转录后水平对干细胞的增殖和分化起调控作用^[9-11], 已有研究报道, microRNA 可参与调节干细胞向脂肪、心肌、神经和骨组织等分化^[12]。microRNA-34a 作为 microRNA 的

* 基金项目: 传染病诊治国家重点实验室(浙江大学)国家自然科学基金面上项目(81671926)

作者简介: 李鹏飞(1990-), 硕士, 住院医师, 研究方向: 再生医学、组织工程, E-mail: 1515095@zju.edu.cn

△ 通讯作者: 吴慧玲, 博士, 主任医师, 研究方向: 再生医学、组织工程, E-mail: whl1616@126.com

(收稿日期: 2018-06-06 接受日期: 2018-06-30)

一种,对细胞的增殖、分化、凋亡等具有广泛的调节功能^[13]。LI CHEN 等^[14]前期研究发现 microRNA-34a 能够抑制成骨细胞的分化及人基质干细胞在体内的骨形成。本研究应用人脂肪干细胞,采用慢病毒转染的方式分别上调、下调人脂肪干细胞 miR-34a 的表达,再行成骨诱导,定性检测转染后的成骨效能,初步探索下调 miR-34a 对人脂肪干细胞诱导成骨分化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

试剂:胎牛血清(Gibco 公司);DMEM 高糖培养基、I 型胶原酶、胰酶(Hyclone 公司); β -磷酸甘油钠、地塞米松、维生素 C、茜素红染料(Sigma 公司);碱性磷酸酶染色试剂盒(碧云天);分别含 miR-34a、antimiR-34a 目的基因和阴性对照序列的慢病毒(上海吉凯基因化学技术有限公司)。

材料:实验作用脂肪组织均取自浙江大学附属第一医院整形美容中心 8 名手术患者。女性,年龄 21-28 岁,中位年龄 24 岁,体质量指数 19-22 kg/m²,无全身代谢及内分泌疾病,无吸烟、饮酒史,近 1 月内无用药史。均于重睑术中取眶隔内脂肪组织。实验经浙江大学附属第一医院科研伦理委员会批准,并与患者签署相关知情同意书。

1.2 原代人脂肪干细胞的分离和培养

无菌条件下取脂肪组织,PBS(含青霉素 100 mU/L,链霉素 100 ng/L)反复冲洗,剪去肉眼可见的血管及结缔组织,剪成直径约 1 mm 大小的颗粒。0.2% I 型胶原蛋白酶 37℃ 摇床消化 30 min 后加入等体积培养基,200 目筛网过滤,收集滤液并 1500 r/min 室温离心 8 min,弃上清。PBS 重悬,洗涤 1 次,在 DMEM 培养基(体积分数为 10%胎牛血清、1%青链霉素)中重悬细胞,以 1×10^6 mL 的浓度接种至培养皿中,37℃ 培养箱内孵育。48 h 后首次半量换液,以后每 3d 更换培养液。当细胞生长至 80-90%融合时用 0.25%胰蛋白酶进行消化,按 1:2 传代培养。

1.3 实验分组及慢病毒转染

人脂肪干细胞的转染分为三组:1.阴性对照组:阴性病毒(LV-miR-NC);2.上调组:miR-34a 病毒(LV-mir-34a);3.下调

组:antimiR-34a 病毒(LV-mir-34a-5p-inhibition)。依据说明书进行人脂肪干细胞慢病毒转染预实验,经多组不同转染复数(MOI)转染后比较,以 MOI 为 100 时转染效率最高。再以 MOI 为 100 进行病毒转染,16 小时后更换为完全培养基。以荧光显微镜观察转染后细胞的荧光评估转染效果,Image-Pro Plus 6.0 分别分析检测各组转染后镜下荧光细胞数占细胞总数的比例及荧光强度,并作统计学分析。

1.4 成骨诱导

对数生长到第 3 代的人脂肪干细胞待接触抑制 3-5 d 后,将培养基改为成骨诱导培养基(完全培养基加入 10 mmol/L β -磷酸甘油钠、0.1 μ mol/L 地塞米松、50 μ mol/L 维生素 C),每 3 d 换液。

1.5 碱性磷酸酶和茜素红染色

三组人脂肪干细胞在体外诱导的第 7 天按照碱性磷酸酶染色试剂盒中的步骤操作进行碱性磷酸酶染色,镜下观察胞质内出现蓝色沉淀为阳性结果。

三组人脂肪干细胞在体外诱导的第 14 天行茜素红染色:PBS 冲洗 2 次,100 g/L 多聚甲醛固定后,蒸馏水冲洗,加入 1% 茜素红-Tris-HCl(pH8.3)染色,再蒸馏水反复冲洗后镜下观察。细胞外基质中被染成橘红色的矿化结节为阳性结果。

1.6 主要观察指标

- 1)原代人脂肪干细胞形态及生长情况;
- 2)各组人脂肪干细胞慢病毒转染效率;
- 3)成骨诱导后各组人脂肪干细胞的成骨分化程度。

1.7 统计学分析

转染后各组细胞荧光强度以均数 $\pm$ 标准差表示,以方差分析进行组间比较。采用 SPSS V21.0 统计软件数据处理,双侧检验, $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 原代人脂肪干细胞形态及生长情况

细胞在培养 12 h 即可贴壁,细胞体积较小、数量较少,呈细长梭形;72 h 细胞增加明显;96 h 细胞体积增大,大量增殖,局部融合排列紧密(图 1)。

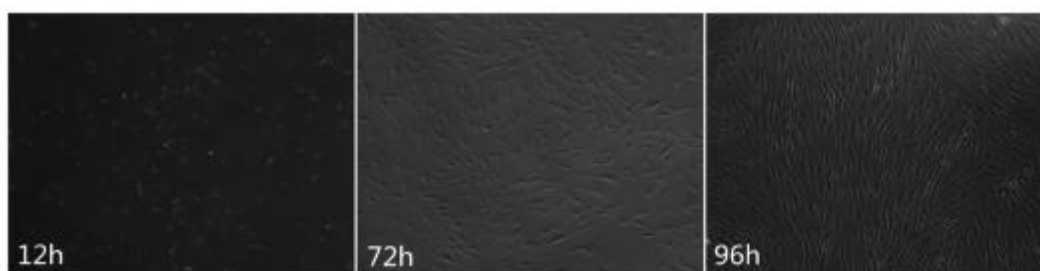


图 1 提取后不同时间点人脂肪干细胞的形态($\times 40$)

Fig.1 The morphology of human adipose-derived stem cells at different time points after extraction($\times 40$)

2.2 慢病毒转染效率

转染慢病毒 24 h 后,在荧光显微镜下,大多数细胞内可见绿色荧光,各组平均转染效率均 $>80\%$ (对照组 88.44%,上调组 84.12%,下调组 80.31%)(图 2)。统计学分析荧光强度,各组间比较 $P>0.05$,提示各组间无统计学差异(图 3)。

2.3 人脂肪干细胞成骨分化程度

成骨诱导第 7 天,细胞胞体增大呈多角形,并出现复层生长。14 天,细胞出现密集重叠生长,呈岛状分布。诱导 7 天行碱性磷酸酶染色的定性对比可以看出,下调 miR-34a 组成骨效率最高,其次是阴性对照组,上调 miR-34a 组成骨效率最低(图

4)。诱导 14 天行茜素红染色的对比中,组间差距较小,但可见 相似趋势,以下调 miR-34a 组的成骨效率最高(图 5)。

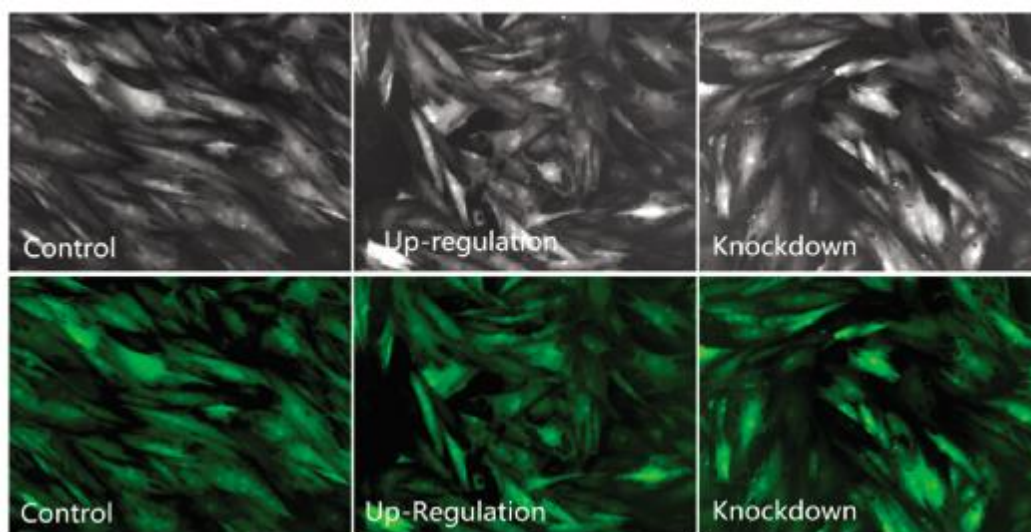


图 2 转染后镜下的绿色荧光提示高效率转染($\times 100$)

Fig.2 Green fluorescence after the transfection which indicated high efficiency($\times 100$)

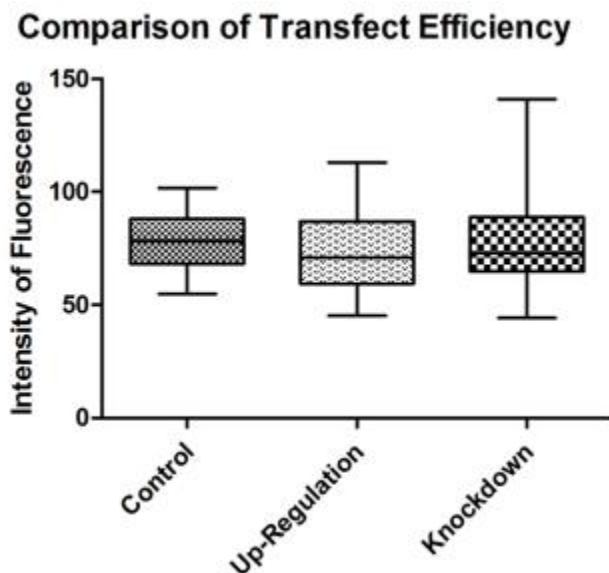


图 3 各组间转染效率的比较

Fig.3 The comparison of transfect efficiency ($p>0.05$)

3 讨论

颅颌面临界骨缺损是整复外科中颅颌面外科的常见疾患,因骨缺损超过一定范围及距离后而无法自行愈合^[1-3]。临床上多由创伤、肿瘤、烧伤、先天性畸形等引起^[4]。由于解剖位置的特殊性,缺损不仅给患者带来功能和外观上的障碍,也极大地影响着患者的心理健康。当前临床上常用的修复方法主要有两种^[15]:自体骨移植修复^[16];生物材料的替代修复^[17,18]。自体骨移植修复颅颌面缺损需要于供区取骨,如颅骨外板、肩胛骨、肋骨、髂骨等,常因缺损较大,需骨较多,而造成供区形态和功能上的缺陷^[19]。生物材料虽然来源充足,现临床常用修复材料,如 Medpor、钛板、硅橡胶假体、羟基磷灰石等,尚存在生物相容性、化学稳定性、强度、热传导等应用问题^[18]。1995 年由 Crane 等^[20]提

出的骨组织工程学,即通过分离自体或异体组织细胞,经体外培养诱导分化为成骨细胞,再随着可降解生物材料支架植入缺损区以修复相对较大的临界骨缺损,为解决这一临床难题提供了良好的前景。

干细胞(Stem Cells),作为具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞群体,是组织再生的源泉和基础,是再生医学的重要组成部分。来源于中胚层间充质的人脂肪干细胞,以其供应量充足、采集简单和供区创伤小等优点^[5-7]成为整复外科和组织工程领域的研究热点。近年来有很多关于诱导干细胞成骨分化以期促进成骨来修复骨缺损的研究,然而大多选择使用人骨髓来源间充质干细胞(human Bone Marrow-derived Stem Cells)^[21-23]。人骨髓干细胞的获取需要从患者深部组织——骨髓中抽取培养,而人脂肪干细胞仅需从表浅的皮下组织中获取,因而获取起来更简单方便、创伤更小,是一种有望以较小供区损伤来解决颅颌面临界骨缺损的多能干细胞。表观遗传学是研究除 DNA 序列变化外的其他机制引起的细胞表型和基因表达的可遗传的改变^[24]。microRNA 作为一类非编码功能的小 RNA,能够通过转录后水平对干细胞的增殖和分化起调控作用^[10,11,25],是表观遗传修饰的重要工具。近年来研究发现,一些 microRNA,如 microRNA-100, microRNA-154-5p 等,能够调控间充质干细胞成骨分化^[26,27],而针对人脂肪干细胞的研究尚不足。miR-34a 是一个近期受到广泛研究和关注的 microRNA,有关它的研究主要集中在肿瘤的发生和发展上。有很多报道它的异常表达与大肠癌、肝癌、骨肉瘤等肿瘤的发生、转移以及预后有关^[28-30]。而 miR-34a 在调控干细胞分化,促进干细胞成骨来进行缺损修复的研究较少。最近 LI CHEN 等^[14]发现 microRNA-34a 能够抑制成骨细胞的分化及人骨髓来源干细胞在体内的骨形成。而 miR-34a 是否对人脂肪干细胞诱导成骨分化的有类似的影响尚有待探究,因此我们在此研究中初步探索下调 miR-34a 的表达对人脂肪干细胞诱导成骨分化的影响作用,为将来临床上应用修复颅颌面临界骨缺损提供理论依据。

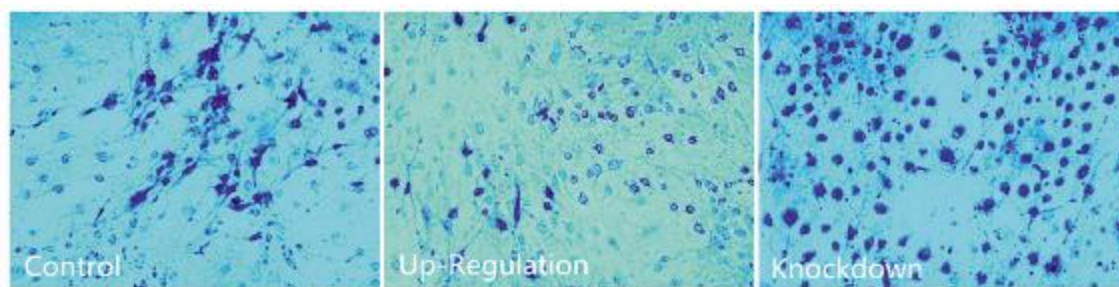


图4第7天人脂肪干细胞诱导的成骨细胞碱性磷酸酶染色,提示下调 miR-34a 组诱导成骨分化效率最高(× 40)

Fig.4 ALP staining of osteoblasts induced from hADSCs on day 7 which showed microRNA-34a knockdown group was most efficient in osteoinduction differentiation(× 40)

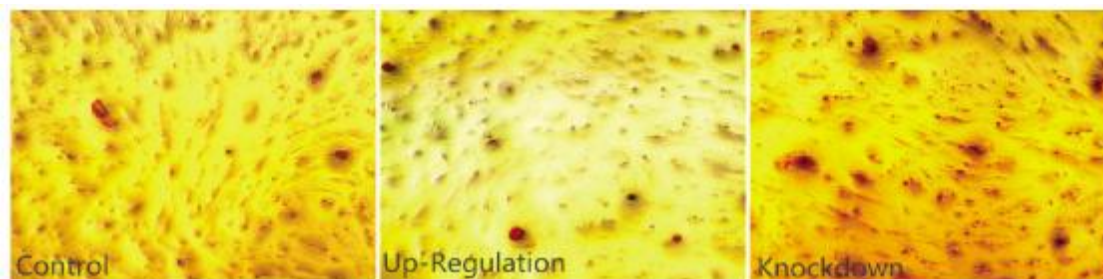


图5第14天人脂肪干细胞诱导的成骨细胞茜素红染色,表现出和碱性磷酸酶相似的成骨趋势(× 40)

Fig.5 Alizarin red staining of osteoblasts induced from hADSCs on day 14 which showed the similar trend with ALP staining(× 40)

在本实验研究中,我们成功分离和培养了原代人脂肪干细胞,在分离培养早期(12 h),干细胞体积较小、数量较少,活力相对较差;2-3 d后细胞体积增大、增殖较快,细胞活力逐渐提升。经过多次培养后我们选择了活力较好的第3代人脂肪干细胞作为转染实验的对象。各组所用转染的慢病毒包含有目的基因与绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)基因的融合基因,因此通过分析比较平均细胞绿色荧光的强度,可以对应地得知细胞中目的基因的表达量。各组人脂肪干细胞转染慢病毒24 h后,在荧光显微镜下,大多数细胞内可见高强度绿色荧光,转染效率高。通过 Image-Pro Plus 6.0 软件分别检测各组转染后细胞的平均荧光强度,并作统计学分析后发现各组间无统计学差异,表明各组细胞的目的基因表达量无明显差异。因此各组间人脂肪干细胞的诱导成骨差异仅因表观遗传调控 miR-34a 表达量的不同而有差异。而后的成骨诱导,早期细胞体积增大呈多角形,并出现复层生长。后期细胞出现密集重叠生长,呈岛状分布。成骨诱导后的第7天行碱性磷酸酶染色的对比中可以看出,下调 miR-34a 组胞质染成蓝色的细胞比例较高,大多数细胞的胞质都被染成蓝色,且颜色较深;对照组部分细胞胞质染成蓝色,成簇状分布;而上调组细胞质染成蓝色的细胞比例较低,仅少数细胞胞质被染成蓝色,颜色也较浅。提示下调 miR-34a 组在诱导成骨后第7天时成骨效率最高,阴性对照组次之,上调组最低。在成骨诱导第14天行茜素红染色的对比中,可见下调 miR-34a 组被染成红色的矿化结节相对较多,颜色较深,结节呈岛状分布;对照组次之,矿化结节较少,散在分布;上调组红色矿化结节最少,颜色较浅。虽然各组间差别较小,但成骨趋势与碱性磷酸酶染色相同。

目前临床上对于颅颌面临界骨缺损的修复尚多局限于自体移植和生物替代材料的填充,利用再生医学结合组织工程可

望更好地解决临床上成骨不足的难题,具有广阔的前景。在本次初步探索中,我们立足于整复外科热门的多能人脂肪干细胞,通过 microRNA 表观遗传修饰的手段来达到促进成骨的目的,不仅紧密结合临床需求,且富有创新性。然而实验中各组间比较仅局限于定性染色,虽然结果体现出人脂肪干细胞诱导成骨分化的趋势,然而尚未从分子学的水平分析检测潜在分子的机制。且所选取染色时间点较单一,未能动态反映诱导成骨分化的过程。因此在接下来的实验研究中,可采取更多检测指标,动态定量地检测调控 MicroRNA-34a 的表达量对人脂肪干细胞诱导成骨分化的影响及分子机制。

4 结论

1. 人脂肪干细胞通过慢病毒转染获得高效率的表观遗传修饰;
2. 下调 microRNA-34a 的表达对人脂肪干细胞成骨的诱导分化有一定的促进作用。

参考文献(References)

- [1] Aur Gan J C, B Gu T. Induced membrane for treatment of critical sized bone defect: a review of experimental and clinical experiences [J]. International Orthopaedics, 2014, 38(9): 1971-1978
- [2] Totir M, Ciuluvica R, Dinu I, et al. Biomaterials for orbital fractures repair[J]. J Med Life, 2015, 7(Spec Iss 4): 41-43
- [3] Schmitz J P, Hollinger J O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions[J]. Clinical Orthopaedics & Related Research, 1986, 205(205): 299-308
- [4] Mishra R, Goel S K, Gupta K C, et al. Biocomposite cryo gels as tissue-engineered biomaterials for regeneration of critical-sized cranial bone defects [J]. Tissue Engineering Part A, 2014, 20(3-4): 751-762

- [5] Boeloni J N, Ocarino N M, Goes A M, et al. Comparative study of osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue of osteoporotic female rats[J]. *Connective Tissue Research*, 2014, 55(2): 103-114
- [6] Banyard D A, Salibian A A, Widgerow A D, et al. Implications for human adipose-derived stem cells in plastic surgery [J]. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2015, 19(1): 21-30
- [7] Feisst V, Meidinger S, Locke M B. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells [J]. *Stem Cells & Cloning Advances & Applications*, 2015, 8(default): 149-162
- [8] Behr B, Tang C, Germann G, et al. Locally Applied Vascular Endothelial Growth Factor A Increases the Osteogenic Healing Capacity of Human Adipose Derived Stem Cells by Promoting Osteogenic and Endothelial Differentiation [J]. *Stem Cells*, 2015, 29 (2): 286-296
- [9] Mohr A M, Mott J L. Overview of microRNA biology [J]. *Seminars in liver disease*, 2015, 35(1): 3-11
- [10] Simonson B, Das S. MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet? [J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2015, 15 (6): 467-474
- [11] Hammond S M. An overview of microRNAs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 87: 3-14
- [12] Hu R, Li H, Liu W, et al. Targeting miRNAs in osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(10): 1109-1120
- [13] Farooqi A A, Tabassum S, Ahmad A. MicroRNA-34a: A Versatile Regulator of Myriads of Targets in Different Cancers[J]. *International journal of molecular sciences*, 2017, 18(10)
- [14] Li C, Holmstr M K, Qiu W, et al. MicroRNA 34a Inhibits Osteoblast Differentiation and In Vivo Bone Formation of Human Stromal Stem Cells[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(4): 902-912
- [15] Al-nawas B, Schiegnitz E. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone - a systematic review and meta-analysis [J]. *European Journal of Oral Implantology*, 2014, 7 Suppl 2(2): S219-S234
- [16] Myeroff C, Archdeacon M. Autogenous bone graft: donor sites and techniques [J]. *Journal of Bone & Joint Surgery American Volume*, 2011, 93(23): 2227-2236
- [17] Smith B, Goldstein T, Ekstein C. Biologic adjuvants and bone: current use in orthopedic surgery [J]. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 2015, 8(2): 193-199
- [18] Jr D L W, Einhorn T A, Koval K, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis [J]. *Journal of Bone & Joint Surgery-american Volume*, 2007, 89 (3): 649-658
- [19] Dimitriou R, Mataliotakis G I, Angoules A G, et al. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review[J]. *Injury-international Journal of the Care of the Injured*, 2011, 42(5): S3-S15
- [20] Crane G M, Ishaug S L, Mikos A G. Bone tissue engineering [J]. *Nature medicine*, 1995, 1(12): 1322-1324
- [21] Hu N, Feng C, Jiang Y, et al. Regulatory Effect of Mir-205 on Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells (BMSCs): Possible Role of SATB2/Runx2 and ERK/MAPK Pathway [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16 (5): 10491-10506
- [22] Sun J, Jieyun L, Chichi L, et al. Role of bone morphogenetic protein-2 in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(3): 4230-4237
- [23] Zhuang W, Ge X, Yang S, et al. Upregulation of lncRNA MEG3 Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Multiple Myeloma Patients By Targeting BMP4 Transcription [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6): 1985-1997
- [24] 丁勇, 许超, 吴季辉, 等. 表观遗传学研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47: 3-15
- [25] Mohr A M, Mott J L. Overview of microRNA biology[J]. *Seminars in liver disease*, 2015, 35(1): 3-11
- [26] Yang Z, Qu X, Li H, et al. MicroRNA-100 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting BMP2[J]. *Febs Letters*, 2012, 586(16): 2375-2381
- [27] Li J, Hu C, Han L, et al. MiR-154-5p regulates osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells under tensile stress through the Wnt/PCP pathway by targeting Wnt11 [J]. *Bone*, 2015, 78: 130-141
- [28] Gao J, Li N, Dong Y, et al. miR-34a-5p suppresses colorectal cancer metastasis and predicts recurrence in patients with stage II/III colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2015, 34(31): 4142-4152
- [29] Xu X, Chen W, Miao R, et al. miR-34a induces cellular senescence via modulation of telomerase activity in human hepatocellular carcinoma by targeting FoxM1/c-Myc pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 3988-4004
- [30] Wang Y, Jia L S, Yuan W, et al. Low miR-34a and miR-192 are associated with unfavorable prognosis in patients suffering from osteosarcoma [J]. *American Journal of Translational Research*, 2015, 7(1): 111-119