文章编号:1000-5404(2012)22-2297-05

论著

miR-34a 靶向调控 NOTCH1 基因对 SW480 细胞增殖的影响

邵新宏,于 游,张才全 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院胃肠外科)

[摘要] **目的** 探讨 miR-34a 靶向调控 NOTCH1 基因表达而对结肠癌 SW480 细胞增殖的影响。**方法** 通过生物信息学预测,NOTCH1 为 miR-34a 特异性靶基因。构建含 miR-34a 结合位点的 NOTCH1 基因 3′-UTR 域荧光素酶报告载体。通过荧光素酶报告载体系统检测 miR-34a 与 NOTCH1 的 3′-UTR 相互作用对荧光素酶活性的影响;免疫印迹技术检测 miR-34a 对 NOTCH1 蛋白表达的影响。采用 MTT 法及流式细胞检测转染 miR-34a 对 SW480 细胞增殖的影响。**结果** 经过酶切及基因测序鉴定,NOTCH1 基因 3′-UTR 序列的双荧光素酶报告重组质粒构建成功;荧光素酶结果显示在 SW480 细胞中加入 miR-34a 的类似物和重组载体,荧光素酶的活性是只加入空载体的 SW480 组 53.4%($P=0.003\ 8$);而在 HEK293 细胞中加入 miR-34a 的抑制物和重组载体,荧光素酶的活性是只加入空载体的 HEK293 组 145%($P=0.002\ 1$),说明 miR-34a 有与 NOTCH1 的 3′-UTR 位点相结合。免疫印迹结果显示在 SW480 细胞中加入 miR-34a 的类似物,NOTCH1 蛋白的表达水平是未处理 SW480 组下降 53.6%($P<0.05$);而在 HEK293 细胞中加入 miR-34a 的抑制物,NOTCH1 蛋白的表达水平较未处理 HEK293 组升高 78.9%($P=0.03$),说明 miR-34a 负性调控 NOTCH1 蛋白的表达。miR-34a 过表达的 SW480 细胞较未处理的 SW480 的生长速度明显减慢($P<0.05$),且阻滞在 $G_0\sim G_1$ 期,说明 miR-34a 过表达后能抑制 SW480 细胞增殖。**结论** miR-34a 负性靶向调控 NOTCH1 基因的表达而抑制 SW480 细胞的增殖。

[关键词] 微小 RNA;NOTCH1 基因;靶向调节;细胞增殖;结直肠癌
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R735.35 [文献标志码] A

Inhibitory effects of miR-34a on NOTCH1 gene expression and SW480 cell proliferation

Shao Xinhong, Yu You, Zhang Caiquan (Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To analyze the effect of miR-34a on NOTCH1 gene expression and SW480 cell proliferation. **Methods** NOTCH1 was predicted to be the specific target gene of miR-34a by bioinformatics. The dual luciferase vector containing 3′-UTR of NOTCH1 gene was constructed, and the 3′-UTR was regarded as the binding site of miR-34a. The effect of miR-34a interaction with the 3′-UTR of NOTCH1 on luciferase activity was detected with a dual luciferase assay system. The expression level of NOTCH1 protein affected by miR-34a was detected by Western blotting. The proliferation of SW480 cells transfected with miR-34a was measured by MTT assay and flow cytometry. **Results** The dual luciferase recombinant vector containing the 3′-UTR of NOTCH1 gene was successfully constructed and verified by enzyme digestion and gene sequencing. The luciferase activity significantly reduced to 53.4% in the SW480 cells co-transfected with the recombinant vectors and miR-34a mimics as compared with the SW480 cells transfected with empty vectors ($P=0.003\ 8$), while the luciferase activity significantly was enhanced to 145% in the HEK293 cells co-transfected with the recombinant vectors and miR-34a inhibitors as compared with the HEK293 cells transfected with empty vectors ($P=0.002\ 1$). The results of the luciferase assay revealed that miR-34a could negatively regulate the luciferase activity by interacting with the 3′-UTR of NOTCH1. Western blotting results demonstrated that the NOTCH1 protein level in the SW480 cells transfected with miR-34a mimics decreased by 53.6% as compared with the untreated SW480 cells ($P<0.05$), while the NOTCH1 protein level in the HEK 293 cells transfected with miR-34a inhibitors increased by 78.9% as compared with the untreated HEK293 cells ($P=0.03$). NOTCH1 protein expression was negatively regulated by miR-34a. The growth of SW480 cells transfected with miR-34a was much slower than that of the untreated SW480 cells, and the cells were arrested at G_0-G_1 phase, suggesting miR-34a overexpression could inhibit the proliferation of SW480 cells. **Conclusion** miR-34a negatively target-

[通信作者] 张才全,E-mail:zhangyu0323@21cn.com

edly regulates the expression of NOTCH1 and inhibits the proliferation of SW480 cells.

[**Key words**] miRNA; NOTCH1 gene; targeted regulation; cell proliferation; colorectal cancer

Corresponding author: Zhang Caiquan, E-mail: zhangyu0323@21cn.com

目前,研究[1-3]表明微小RNA(microRNA, miRNA)通过与靶基因的3′端非编码区结合负性调节靶基因的翻译,从而影响肿瘤的生物学行为。miR-34a在结肠癌发生、发展中起到非常重要的作用。为证明miR-34a的靶向基因及其对结肠癌发生、发展中所起的作用,我们利用生物信息学方法预测miR-34a的靶向基因并筛选出与细胞增殖密切相关的NOTCH1基因。构建含NOTCH1基因3′端非编码区域(3′-untranslatedregion,3′-UTR)重组双荧光素酶报告质粒,以研究miR-34a是否通过靶向调控NOTCH1基因的表达而影响SW480细胞的增殖。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒pmiR-RB-REPORTTM(广州锐博公司产品),has-miR-34a mimics、has-miR-34a mimics对照、has-miR-34a inhibitor、has-miR-34a inhibitor对照均购自江苏百奥公司;荧光素酶检测系Dual-Luciferase Reporter Assay System为Genecopoeia公司产品;T_4 DNA连接酶、DNA提取试剂盒Wizard Genomic DNA Purification Kit为天根生化科技有限公司产品;限制性内切酶*Eco*RⅠ和*Pst*Ⅰ、LA-*Taq* DNA聚合酶、dNTP购自TaKaRa公司;PCR产物回收试剂盒(QIA quick GelExtraction Kit)、质粒提取试剂盒(QIAprep Spin Miniprep Kit)购自OMGA公司;Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;DMEM培养基购自Gibco公司;PCR引物合成由广州锐博公司合成,测序由北京六合华大基因科技股份公司完成;荧光检测仪为Promega公司产品;DH5α感受态大肠杆菌购自北京鼎国生物科技有限公司;兔抗人NOTCH1购自Cell Signaling公司;兔抗人β-actin、辣根过氧化物酶标记二抗及ECL发光试剂盒均购自Santa Cruz公司。细胞株人肾上皮细胞系HEK293及结肠癌细胞株SW480均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 运用Targetscan软件在线分析预测出miR-34a特异性靶向基因[4] 将miR-34a作为检索词输入Targetscan(www.targetscan.org)在线分析软件中,并通过软件提供的注释将靶基因按功能分类。

1.2.2 PCR扩增 根据GenBank中NOTCH1(NM_017617)基因序列信息设计其3′-UTR扩增引物,以HEK293细胞基因组DNA为模板PCR扩增NOTCH1基因的3′-UTR序列,将其克隆到pmiR-RB-REPORT™双荧光素酶报告载体中,所用载体的报告荧光为hRluc(萤火虫荧光素),校正荧光为hluc(海肾素荧光素做内参校正)。荧光素酶报告载体的构建根据NOTCH1基因3′-UTR序列设计合成引物,上下游引物分别引入限制性内切酶*Xba*Ⅰ和*Pst*Ⅰ识别位点(下划线),引物序列上游:5′-CCGCTCGAGACGGCGCGCCCCACGAGA-3′;下游:5′-GAAT-GCGGCCGCTCACCATCAGTATCATTTTTATTGCAAATC-3′。以DNA为模板进行PCR扩增,总体系为30 μl,反应条件(降落PCR)为95 ℃预变性5 min,98 ℃10 s,从65 ℃每个循环降1 ℃退火,72 ℃延伸100 s,共10个循环;在55 ℃退火,进行18个循环;PCR反应循环后72 ℃继续延伸7 min。取扩增产物2 μl琼脂糖电泳检测,切胶纯化回收,回收产物及pmiR-RB-REPORT™载体经限制性内切酶*Xba*Ⅰ和*Pst*Ⅰ双酶切,酶切产物再次纯化回收,二者经T_4 DNA连接酶连接,转化DH5α感受态大肠杆菌,提取质粒。经*Xba*Ⅰ和*Pst*Ⅰ双酶切后经琼脂糖电泳鉴定,测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

1.2.3 细胞转染及荧光素酶活性测定 将对数生长期的SW480细胞及HEK293细胞种于96孔培养板中,在37 ℃,5% CO_2孵箱中培养24 h后,使用Lipofectamine 2000将pmiR-RB-REPORT™-NOTCH1-3′-UTR或pmiR-RB-REPORT™及miR-34a mimics或mimics对照共转染SW480细胞。实验分6组:①转染pmiR-RB-REPORT™组;②共转染pmiR-RB-REPORT™及mimics的对照组;③共转染pmiR-RB-REPORT™及miR-34a mimics组;④转染pmiR-RB-REPORT™- NOTCH1-3′-UTR组;⑤共转染pmiR-RB-REPORT™-NOTCH1-3′-UTR及mimics对照组;⑥共转染pmiR-RB-REPORT™-NOTCH1-3′-UTR及miR-34a mimics组。同法用pmiR-RB-REPORT™-NOTCH1-3′-UTR或pmiR-RB-REPORT™及miR-34a inhibitor或inhibitor对照共转染HEK293细胞。每组设3个平行孔,实验重复3次。

按双荧光素酶检测试剂盒所提供的检测方法:转染24 h后吸出细胞培养基,用PBS洗3次。在室温22 ℃条件下,每孔加入细胞裂解液及萤火虫荧光素酶检测剂100 μl,摇床摇15 min后,检测萤火虫荧光素酶活性;继续加入海肾素荧光素酶检测试剂100 μl,检测海肾素荧光素酶活性。荧光素酶活性(C)为萤火虫荧光素酶活性与海肾素荧光素酶活性的比值。以pmiR-RB-REPORT™组的荧光素酶活性为100%,分别计算各组的相对荧光素酶活性。

1.2.4 Western blot检测基因NOTCH1蛋白表达 利用Lipofectamine 2000将miR-34a mimics或mimics的对照转染至SW480细胞;同法将miR-34a inhibitor或inhibitor的对照转染HEK293细胞。3 d后收集各组细胞,用PBS洗涤细胞2次,加入RIPA强细胞裂解液裂解细胞。BCA法蛋白定量后以每孔20 μg总蛋白上样,以8%聚丙烯酰胺凝胶跑胶分离,转膜,兔抗人多克隆NOTCH1一抗(1∶1 000)4 ℃孵育过夜,TBST洗膜,二抗37 ℃孵育2 h,ECL法显色,用凝胶成像仪照相保存。

1.2.5 MTT法检测miR-34a对SW480细胞增殖的作用 取SW480细胞及SW480-control细胞、SW480-miR-34a细胞分别接种于96孔板中培养,每组设3个复孔。每孔加入MTT(5.0 g/L)20 μl后置于孵箱孵育4 h后,弃去上清后再加入二甲基亚砜150 μl。30 min后用酶标仪检测570 nm处的光密度值[*D*(570)],连续6 d。

1.2.6 流式细胞仪检测 miR-34a 对 SW480 细胞周期的影响

取生长对数期的 SW480 细胞以及 SW480-control 细胞、SW480-miR-34a 细胞用 70% 乙醇 4 ℃固定 24 h，加入 RNA 酶（50 μg/ml），37 ℃孵育 1 h，碘化丙啶溶液（100 μg/ml）染色 30 min 后，流式细胞仪检测细胞周期的分布，实验重复 3 次。

增殖指数 = $G_2 + S/G_1 + G_2 + S$

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 统计软件行 t 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 miR-34a 预测特异性靶基因

通过生物软件预测，共得到 54 个 miR-34a 特异性靶基因。其中与细胞增殖密切相关的基因为：NOTCH1、DBC1、STRT1、PEA15、CBF2T3、RARG、JAG1 及 BCL2。其中由于 NOTCH1 与细胞增殖有密切相关联系。因此，我们将 NOTCH1 挑选出来作为研究的重点。

2.2 含 NOTCH1 基因 3′-UTR 序列双荧光素酶报告载体成功构建

将 NOTCH1 基因 3′-UTR 序列（1 648 bp）将该片段连入双荧光素酶报告载体（pmiR-RB-REPORT™），双酶切后再琼脂糖凝胶电泳得到 1 648 bp 的 NOTCH1 基因 3′-UTR 片段（图 1），与 GenBank 中提供的 CDS 段的碱基长度相符。测序结果再次证实所插入的片段与预期的 NOTCH1 基因 3′-UTR 即 GenBank 中提供的 CDS 段的碱基序列完全一致，没有点突变等现象发生（图 2）。重组质粒命名为 pmiR-RB-REPORT™-NOTCH1-3′-UTR。

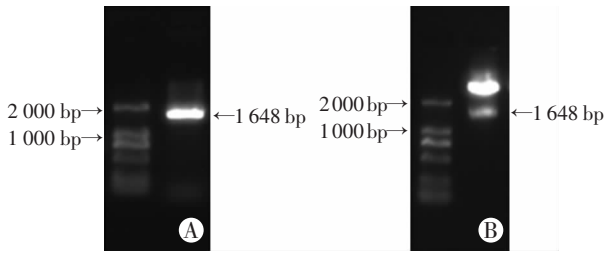
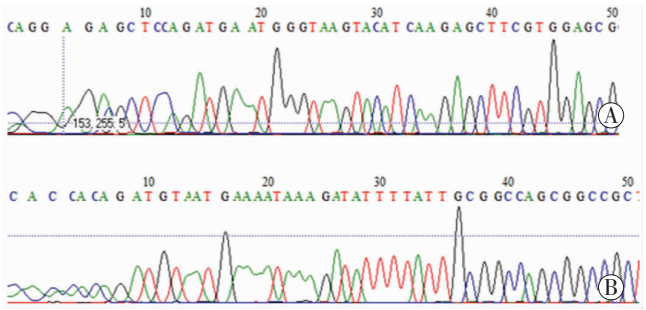


图 1 PCR 扩增产物（A）和重组质粒（B）经双酶切后凝胶电泳结果

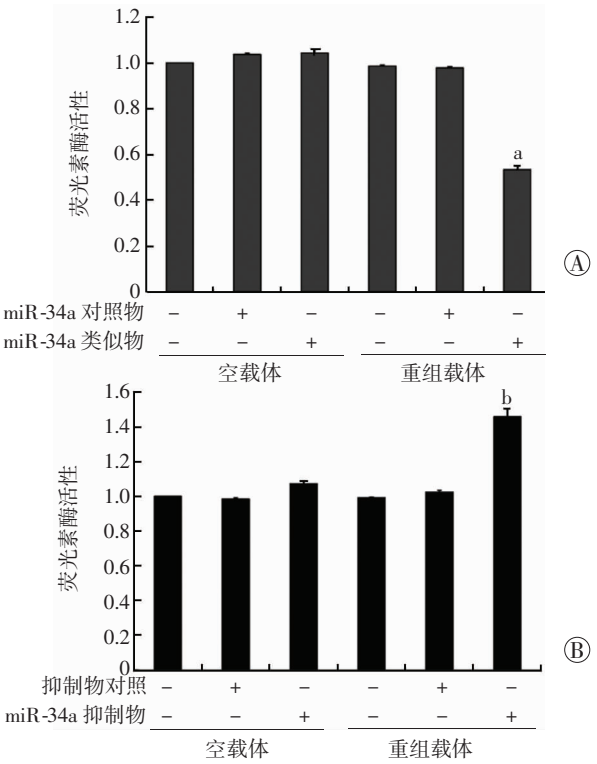


A：重组载体正向测序结果；B：重组载体反向测序结果

图 2 重组质粒基因测序结果

2.3 荧光素酶活性检测结果

将各组的荧光素酶活性与对照组即转染 pmiR-RB-REPORT™ 组进行比较。结果：共转染 pmiR-RB-REPORT™-NOTCH1-3′-UTR 及 miR-34a mimics 的 SW480 细胞组荧光素酶值是转染 pmiR-RB-REPORT™ 的 SW480 细胞组荧光素酶值的 53.4%，两组比较差异有统计学意义（$F = 34.52$，$P = 0.003\ 8$）；其余 4 组与转染 pmiR-RB-REPORT™ 的 SW480 细胞组之间差异没有统计学意义（$P > 0.05$）。共转染 pmiR-RB-REPORT™-NOTCH1-3′-UTR 及 miR-34a inhibitor 的 HEK293 细胞组荧光素酶值是只转染 pmiR-RB-REPORT™ 的 HEK293 细胞组荧光素酶值的 145%，两组之间的差异有统计学意义（$F = 75.32$，$P = 0.002\ 1$），其余 4 组与 pmiR-RB-REPORT™ 的 HEK293 细胞组之间的差异没有统计学意义（$P > 0.05$）。结果表明 miR-34a 与 NOTCH1 基因的 3′-UTR 有特异的结合位点。见图 3。



A：SW480 细胞中 miR-34a 对荧光素酶表达的影响；B：HEK293 细胞中 miR-34a 对荧光素酶表达的影响 a：$P = 0.003\ 8$，与加入空载体的 SW480 组比较；b：$P = 0.002\ 1$，与加入空载体的 HEK293 组比较

图 3 miR-34a 影响不同细胞的荧光素酶表达

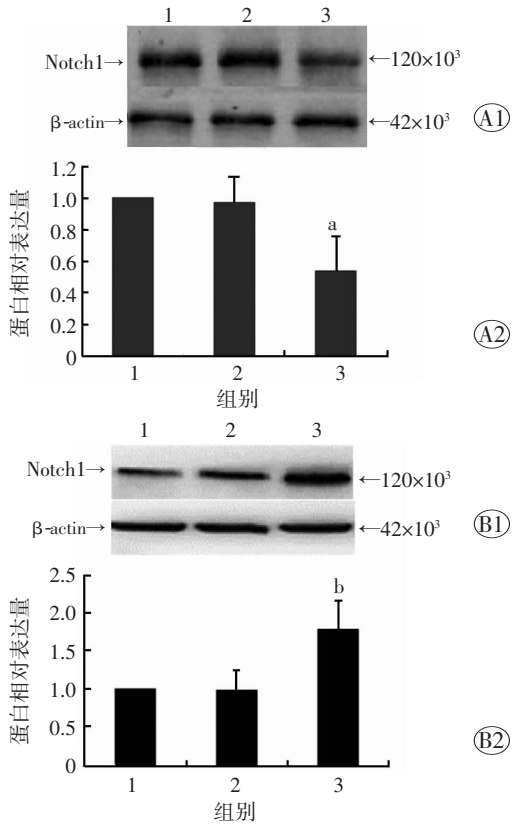
2.4 miR-34a 负性调控 NOTCH1 蛋白的表达

Western blot 检测结果显示：与对照组相比较，经 miR-34a mimics 转染的 SW480 组的 NOTCH1 基因蛋白水平下降 53.6%，两者比较差异有统计学意义（$F = 15.95$，$P < 0.05$）。而各组 HEK293 细胞中 NOTCH1 蛋白表达显示：与对照组相比较，经 miR-34a inhabitor 转染的 HEK293 组 NOTCH1 基因蛋白水平上升 78.9%，两组比较差异有统计学意义（$F = 11.884$，$P = 0.003$）。结果表明 miR-34a 负性调控 NOTCH1 蛋白的表达。见图 4。

2.5 miR-34a 通过负性抑制 NOTCH1 的表达而阻滞 SW480 细胞的增殖

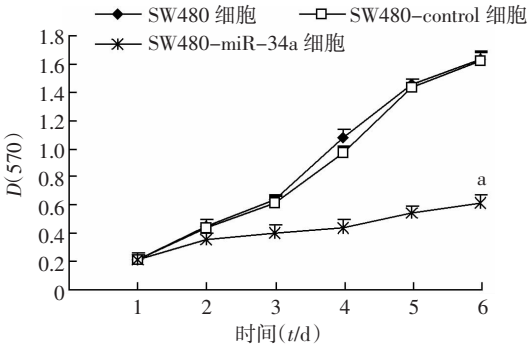
细胞生长曲线显示：SW480-miR-34a 细胞与 SW480 细胞相

比,生长速度明显减慢,而SW480-control细胞与SW480细胞相比,生长速度无明显差别。在接种1、2、3、4、5、6 d,SW480-miR-34a细胞对SW480细胞的抑制率分别为0、20.75%、37.08%、55.63%、62.54%、62.36%(图5)。结果说明miR-34a靶向负性调控NOTCH1的表达而抑制SW480细胞的增殖。



1:未处理组;2:对照组;3:实验组;A1、B1:Western blot检测结果;A2、B2:半定量分析结果 A1、A2:miR-34a对SW480细胞NOTCH1蛋白表达的影响;B1、B2:miR-34a对HEK293细胞NOTCH1蛋白表达的影响;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与未处理组比较

图4 Western blot检测miR-34a对各组细胞NOTCH1蛋白的表达

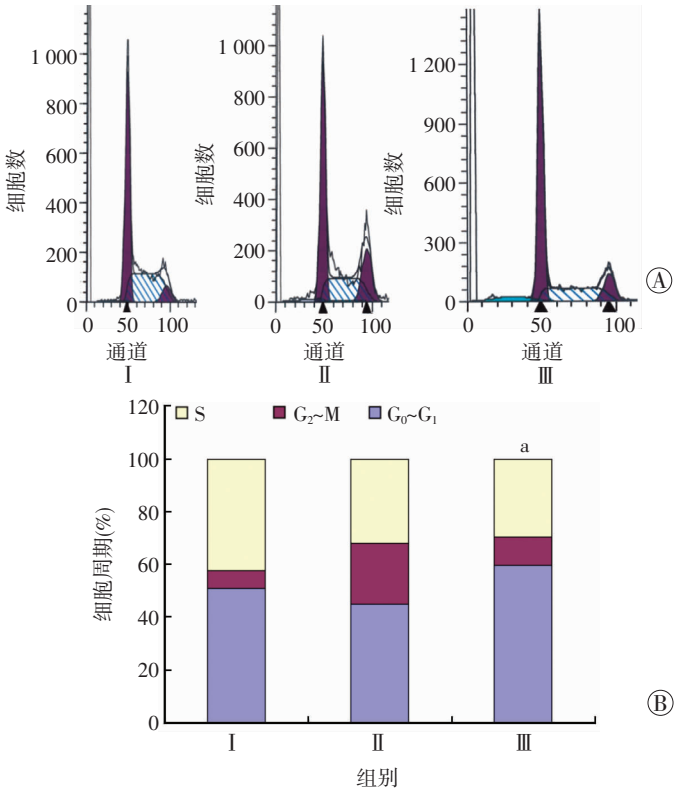


a:$P<0.05$,与SW480细胞组比较

图5 miR-34a阻滞SW480细胞的增殖变化

2.6 流式细胞仪检测细胞周期的结果

流式细胞仪检测细胞周期结果显示,SW480-miR-34a细胞与SW480-control细胞和SW480细胞相比,增殖指数分别为0.40、0.49、0.54。$G_0 \sim G_1$期分别增加了14%、5%、0%($P<0.01$),表明miR-34a通过对SW480细胞的$G_0 \sim G_1$期阻滞,从而抑制其细胞的增殖。见图6。



A:流式细胞仪检测结果;B:3组细胞周期变化 Ⅰ-Ⅲ:未处理组、对照组、实验组;a:$P<0.01$,与未处理组比较

图6 流式细胞仪检测miR-34a影响SW480细胞周期的变化

3 讨论

目前研究认为miRNA是一类长度为18~25个核苷酸的单链非编码RNA。其中在肿瘤学领域,关于miRNA的研究主要集中在肿瘤的发生、发展和分子靶向治疗[5]。主要通过对各种恶性肿瘤miRNA表达谱的鉴定和miRNA功能的阐明,我们可以了解miRNA与肿瘤之间的关系,同时也为肿瘤的诊断、治疗和预后提供了新的方向。大量研究提示通过对miRNA功能深入了解,将为人类认识和攻克肿瘤提供广阔的前景,特别对于miRNA靶基因的确定是研究其生物学功能的关键[6-7]。人miR-34家族包含4个成员(miR-34a,b,c,s),主要通过对其靶基因的负向调控来影响胚胎的发育及细胞的分化,增殖[8]。目前研究[9-10]发现,NOTCH1基因在视网膜母细胞瘤及淋巴瘤中高表达,而且随细胞分化程度越高而其表达水平下降,主要功能是参与调控细胞跨膜蛋白质转运。研究[11]显示miR-34a在结直肠肿瘤中低表达,而NOTCH1蛋白高表达[12]。小鼠模型证实miR-34a的低表达可以导致结直肠肿瘤及胃癌的发生[13]。因此通过对miR-34a

的靶向调控机制进一步阐明,对于挖掘结直肠癌新的治疗靶点及有效改善结直肠癌的预后有重要的意义。

miRNA主要通过与靶基因3′-UTR区的互补序列完全或不完全结合,导致靶基因的降解发挥负性调控作用[14]。因此我们首先以miR-34a作为实验切入点,通过生物信息学预测出miR-34a特异性靶向基因NOTCH1;利用双荧光素酶报告实验来检测NOTCH1基因的3′-UTR段是否有miR-34a的结合位点,并且可以提供miR-34a是否靶向调控NOTCH1基因的结构学证据。我们分别应用miR-34a类似物(mimics)上调SW480细胞和抑制物(inhibitor)下调HEK293细胞miR-34a的水平的方法,将荧光素酶活性明显恢复。结果提示miR-34a通过与NOTCH1基因3′-UTRs区的结合位点相结合来发挥负性调控作用。从而我们得出miR-34a通过负向调控含NOTCH1基因3′-UTR双荧光素酶载体的荧光素酶活性,初步证实NOTCH1基因是miR-34a的目标靶基因。

miRNA调控基因表达的主要方式是部分miRNA以完全互补或不完全互补结合到目的基因mRNA靶的3′-UTR,通过一种未知方式诱发蛋白质翻译抑制从而抑制蛋白质合成[15-16]。因此我们利用免疫印迹的方法对各处理组NOTCH1基因蛋白质水平进行检测,发现转染miR-34a mimics的SW480细胞组NOTCH1基因蛋白水平较SW480组明显减低,而转染miR-34a inhibit HEK293组的NOTCH1基因蛋白水平比HEK293组明显上升。说明miR-34a可以负向调控NOTCH1基因的降解发挥作用,从而为miR-34a调控NOTCH1提供了功能学证据。

通过MTT法和流式细胞仪检测发现过表达miR-34a后,SW480细胞的增殖速度明显减慢,这可能与miR-34a负向调控NOTCH1基因后引起下游基因变化有关,这也与大量文献报道miR-34a作为肿瘤抑癌基因而存在相吻合。但其具体的机制仍不清楚,需要我们进一步的探索。

综上所述,miR-34a通过调控含NOTCH1的3′-UTR段的双荧光素酶载体的荧光素酶活性,同时负性调控NOTCH1蛋白的水平进而影响SW480的细胞增殖。因此,我们认为miR-34a靶向调控NOTCH1阻滞SW480细胞的增殖,从而为进一步研究miR-34a在结直肠癌中的作用奠定基础。

参考文献:

[1] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein C J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(36): 13421-13426.

[2] Dutta K K, Zhong Y, Liu Y T, *et al*. Association of microRNA-34a overexpression with proliferation is cell type-dependent[J]. Cancer, 2007, 98(12): 1845-1852.

[3] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, *et al*. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(39): 15472-15477.

[4] Koscianska E, Baev V, Skreka K, *et al*. Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs[J]. BMC Mol Biol, 2001, 8: 79.

[5] Hummel R, Hussey D J, Haier J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(2): 298-311.

[6] Lu J, Getz G, Miska E A, *et al*. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838.

[7] Cho W C. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers[J]. Mol Cancer, 2007, 6: 60.

[8] Chang T C, Wentzel E A, Kent O A, *et al*. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis[J]. Mol Cell, 2007, 26(5): 745-752.

[9] Dalgard C L, Gonzalez M, deNiro J E, *et al*. Differential microRNA-34a expression and tumor suppressor function in retinoblastoma cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(10): 4542-4551.

[10] Palomero T, Lim W K, Odom D T, *et al*. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(48): 18261-18266.

[11] Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 193-199.

[12] Koduru S, Kumar R, Srinivasan S, *et al*. NOTCH-1 inhibition by withaferin-a: a therapeutic target against colon carcinogenesis[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(1): 202-210.

[13] Ji Q, Hao X, Meng Y, *et al*. Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres[J]. BMC cancer, 2008, 8: 266.

[14] Hsu P W, Huang H D, Hsu S D, *et al*. MiRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(Database issue): D135-D139.

[15] Orom U A, Lund A H. Experimental identification of microRNA targets[J]. Gene, 2010, 451(1/2): 1-5.

[16] Wahid F, Shehzad A, Khan T, *et al*. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1803(11): 1231-1243.

(**收稿**:2012-07-16;**修回**:2012-09-13)

(编辑 汪勤俭)