论著

文章编号:1000-5404(2013)12-1200-05

mmu-miR-294 调控 MMP3 靶基因对 LLC 细胞侵袭迁移的影响

金俊余[1],孙建国[1],张岸梅[1],王欣欣[1],廖荣霞[2],邱 钧[3],马 虎[4],陈正堂[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部医学英语教研室[2];361003 厦门,解放军第174医院肿瘤科[3];563003 贵州遵义,遵义医学院附属医院肿瘤科[4])

[摘要] **目的** 预测并验证小鼠 mmu-miR-294 调控的靶基因,探讨其在肺癌发生发展中的生物学功能。**方法** 生物信息学预测 mmu-miR-294 可能调控的靶基因金属蛋白酶(MMP3),双荧光素酶检测验证 mmu-miR-294 调控 MMP3 的真实性;脂质体 2000 介导转染 mmu-miR-294 模拟物进入 Lewis(LLC)细胞株,通过 Transwell 实验检测细胞侵袭、迁移能力的改变。**结果** 重组质粒经 *Xba* Ⅰ单酶切能获得约 5 000 bp 和 100 bp 的酶切片段,阳性克隆测序,双荧光素酶报告基因检测证明合成寡核苷酸链序列插入正确;脂质体 2000 介导转染 mmu-miR-294 模拟物,过表达实验组 MMP3 蛋白水平较对照组明显降低。转染 mmu-miR-294 模拟物后 LLC 细胞的侵袭迁移能力显著降低($P<0.01$)。**结论** 低表达 mmu-miR-294 有助于维持 LLC 的侵袭转移特性,增加其表达水平可以有效抑制 LLC 的侵袭迁移能力。mmu-miR-294 可能通过调控其靶基因 MMP3 表达而发挥功能。

[关键词] mmu-miR-294;肺癌干细胞;肺癌;MMP3

[中图法分类号] R394.3;R730.23;R734.2 [文献标志码] A

Effect of mmu-miR-294 regulating its target gene MMP3 on invasion and migration in mouse lung cancer stem cells

Jin Junyu[1], Sun Jianguo[1], Zhang Anmei[1], Wang Xinxin[1], Liao Rongxia[2], Qiu Jun[3], Ma Hu[4], Chen Zhengtang[1] ([1]Institute of Cancer Diagnosis and Treatment, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University; [2]Department of Medical English, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Department of Oncology, No. 174 Hospital of PLA, Xiamen, Fujian Province, 361003; [4]Department of Oncology, Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563003, China)

[**Abstract**] **Objective** To predict and validate mmu-miR-294 target gene in mouse lung cancer stem cells, and to investigate its biological functions in the carcinogenesis and development of lung cancer. **Methods** Bioinformatics analysis predicted that mmu-miR-294 might regulate targeted genes like matrix metalloproteinase 3 (MMP3). The sequence of MMP3 was artificially synthesized, and the seed sequence containing 3′-UTR was directly inserted to an eukaryotic expression plasmid pGL3-promoter by *Xba* Ⅰ digestion. *E. coli* DH5 alpha was transformed. Positive clones were identified by enzyme digestion and DNA sequencing, and dual luciferase report assay was applied for validation. mmu-miR-294 mimics was transferred into Lewis cells mediated by Liposome 2000. The expression level of miR-294 was measured by real-time quantitative PCR, and Western blotting was used to detect the expression level of MMP3 protein. **Results** The 5 000 bp and 100 bp restriction fragments were obtained after the recombinant plasmids were digested by *Xba* Ⅰ. The positive clones were identified by sequencing and dual luciferase report assay. Compared with the control group, the expression level of MMP3 protein was significantly decreased in the mmu-miR-294 mimics transfection group, and the invasion and migra-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30772108);重庆市科委重点攻关项目(CSTC 2011AB5032)

[通信作者] 孙建国,电话:(023)68774490,E-mail:sunjg09@yahoo.com.cn

陈正堂,电话:(023)68755625,E-mail:zhengtangchen@yahoo.com.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1706.010.html(2013-01-31)

tion abilities of the Lewis cells was reduced significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** Up-regulation of mmu-miR-294 can effectively inhibit the invasion and migration of Lewis cells through down-regulating the expression of its target gene MMP3.

[**Key words**] miR-294; lung cancer stem cells; lung neoplasms; MMP3

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30772108) and the Key Tackling Project of Chongqing Commission of Science and Technology (CSTC 2011AB5032). Corresponding author: Sun Jianguo, Tel: 86-23-68774490; E-mail: sunjg09@yahoo.com.cn; Chen Zhengtang, Tel: 86-23-68755625; E-mail: zhengtangchen@yahoo.com.cn

目前通过高通量技术筛选的肿瘤相关差异微小RNA(microRNAs,miRNA)已经成为研究热点。越来越多的研究证实microRNAs在肿瘤发生、发展中发挥重要作用[1]。研究表明microRNAs大多是以癌基因为靶标,起着抑制或者促进肿瘤发生、发展的作用,所以对microRNAs靶基因的研究是探索microRNAs生物学功能的基础[2]。mmu-miR-294属于mmu-miR-290簇的成员。mmu-miR-290簇通过抑制G_1/S期促进肿瘤细胞分化成熟。最近研究发现的mmu-miR-290簇表达在更丰富的内细胞团囊胚的滋养层,表明mmu-miR-290簇在肿瘤细胞干性的维持中起重要作用[3]。mmu-miR-294在小鼠胚胎发育中起重要作用,在小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)的作用较为突出,且其功能涉及肿瘤侵袭迁移能力的改变[4]。我们以mmu-miR-294为研究对象,通过TargetScan,Microcosm在线分析软件,预测出3′-UTR区潜在靶基因有MMP3、Smad6、Wee1、Gpr34、Cdca4、Hsp110、Rab7l1、Wnt7b、Notch4等。其中,金属蛋白酶(MMP3)是调控侵袭迁移重要靶基因[5]。本研究旨在对mmu-miR-294靶基因进行预测及验证,为进一步探索microRNAs参与肺癌发生发展的生物功能及分子机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Amp购于华北制药集团有限责任公司,限制性内切酶*Xba* Ⅰ,质粒抽提试剂盒,胶回收及PCR纯化试剂盒,DNA连接试剂盒Supercoiled DNA Ladder Marker,5′脱磷酸基团试剂盒,λ-*Hind* Ⅲ digest Marker均购自大连TaKaRa公司,胎牛血清,DMEM培养基购于美国Gibco公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于美国Promega公司;Lipofectamine2000购自美国Invitrogen公司;miR-294模拟物mmu-miR-294mimics,miR-294模拟物阴性对照mmu-miR-294 mimics negative control购于广州锐博公司,microRNAs提取试剂盒mirVana RNA Isolation Kit,反转录试剂盒microRNAs Reverse Transcription Kit,荧光实时定量PCR试剂盒SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit Ⅱ(Perfect Real time)均购自大连TaKaRa公司;MMP3,β-actin一抗购于Abcam公司,HRP标记的二抗购于北京中杉金桥生物科技有限公司。质粒、菌株及细胞pGL3-promoter,pRL-TK对照载体均购自美国Promega公司。菌种大肠杆菌*E. coli* DH5α,转染所用细胞株LLC由全军免疫研究所黄泽明博士馈赠。

1.2 实验方法

1.2.1 miR-294靶基因预测 通过microRNAs常用的生物信息学分析和靶点预测软件在网络上共享:miRanda(http://microRNAs.sanger.ac.uk),TargetScan(http://www.targetscan.org)上根据生物信息学预测mmu-miR-294的靶分子。

1.2.2 miRNA靶基因荧光报告基因载体的构建 根据GenBank中查找靶基因3′-UTR的基因序列。在CDS 3′-UTR区选择包括种子序列在内的长70~110 nt的核苷酸序列作为目的基因片段,设计引物将目的序列重组入荧光素酶报告基因载体中,并以种子序列反向和缺失作为对照。由大连TaKaRa公司人工合成以下基因片段:①MMP3基因3′-UTR区(5′→3′)含正向种子序列片段,两端悬垂添加*Xba* Ⅰ酶切位点。5′-TCTAGACTGTGTTTTAACTGATGCTTATAGTTCTTCATCTGAGTCTTTGTGAAAGGAAGTGCTTTGTTCAGCATGTGCTATGGCAGAACCAAACAGGAGCTCTAGA-3′;②MMP3基因3′-UTR区(3′→5′)含反向种子序列片段,两端悬垂添加*Xba* Ⅰ酶切位点。5′-TCTAGAGCTCCTGTTTGGTTCTGCCATAGCACATGCTGAACAAAGCACTTCCTTTCACAAAGACTCAGATGAAGAACTATAAGCATCAGTTAAAACACAGTCTAGA-3′;③MMP3基因3′-UTR区(5′→3′)缺失种子序列目的片段,两端悬垂添加*Xba* Ⅰ酶切位点。5′-TCTAGACTGTGTTTTAACTGATGCTTATAGTTCTTCATCTGAGTCTTGTTCAGCATGTGCTATGGCAGAACCAAACAGGAGCTCTAGA-3′。以总RNA为模板,用Invitrogen反转录试剂盒进行反转录,合成cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增,扩增条件为:94 ℃ 30 s,55 ℃ 35 s,72 ℃ 45 s,30个循环,纯化PCR产物并用*Xba* Ⅰ单酶切后连接入真核表达载体pGL3-promoter,转化大肠杆菌DH5α,挑取单克隆,提取质粒并用*Xba* Ⅰ酶切鉴定。挑取酶切鉴定正确的克隆进行序列测定,测序正确的质粒分别命名为:pGL3-pro-miR294-MMP3(正向序列),pGL3-pro-miR294-MMP3(反向序列),△pGL3-pro-miR294-MMP3(缺失序列)。

1.2.3 双荧光素酶检测实验分组 实验组:重组质粒pGL3-pro-miR294-靶基因(正向序列)、对照质粒pRL-TK和相应的pre-microRNAs共转染LLC细胞。对照组1:重组质粒pGL3-

pro-miR294-靶基因(反向序列)、对照质粒 pRL-TK 和相应的 pre-microRNAs 共转染 LLC 细胞。对照组 2:重组质粒 pGL3-pro-miR294-靶基因(缺失序列)、对照质粒 pRL-TK 和相应的 pre-microRNAs 共转染 LLC 细胞。对照组 3:重组质粒 pGL3-pro-miR294-靶基因(正向序列)和对照质粒 pRL-TK 共转染 LLC 细胞。

1.2.4 双荧光素酶法验证 基因转染按照美国 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 转染试剂盒进行,双荧光素酶活性检测严格按照 Promega 提供的方法。数据分析:取各样品的相对荧光素酶活性,以 pRL-TK 为内参照。相对荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶比值(Firefly luciferase/Renilla luciferase)。比较分析 microRNAs 对荧光素酶活性的影响,判断 microRNAs 对靶基因的调控能力,验证 microRNAs 作用靶点的真实性,采用各组相对荧光素酶活性作直方图。

1.2.5 测序及酶切鉴定 根据 pGL3-promoter 载体的序列,测序引物序列为:5′-TGCGCGGAGGAGTTGTGTTT-3′。将阳性克隆菌液穿刺接种于含氨苄西林的固体 LB 培养基中,阳性重组质粒送大连 TaKaRa 公司测序。酶切反应体系:10 × Buffer 2 μL,*Xba* Ⅰ 0.5 μL,重组 pGL3-promoter 3 μL,ddH_2O 14.5 μL,Total 20 μL,37 ℃酶切 2 h;取反应产物 10 μL,1% 琼脂糖电泳,紫外灯下观察及凝胶成像。

1.2.6 转染分组 转染 mmu-miR-294 mimics 的细胞为实验组,转染非特异 mmu-miR-294 mimics negative control 细胞为阴性对照组(为了排除 mmu-miR-294 mimics 的脱靶效应),以单加脂质体载体的细胞作为空白对照组。

1.2.7 Real time PCR 定量检测 在转染后 48 h 收获的细胞样品,RNA 的提取、采用琼脂糖凝胶电泳进行检测,根据电泳结果初步判断样品的质量。实时荧光定量 RT-PCR 反应体系为 20 μL,37 ℃,15 min,95 ℃,5 s 变性;95 ℃,30 s;95 ℃,5 s;60 ℃,34 s,40 个循环 mmu-miR-294mimics,U6-snRNA;MMP3-F:5′-CACATCACCTACAGGATTGTGAATTA-3′;R:5′-CATGAGCCAAGACTGTTCCA-3′; β-actin-F: 5′-TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAG-3′;R:5′-ACATCTGCTGGAAGGTGGACA-3′由广州锐博公司设计合成。mmu-miR-294 在各组细胞中的表达变化倍数通过公式 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算。其中盒,Ct 值为反应管内荧光信号强度到达设定阈值所经历的循环数,△△Ct = (Ct 目的基因 − Ct 管家基因)实验组 − 对照组(Ct 目的基因 − Ct 管家基因),可计算出实验组 mmu-miR-294 表达相对于对照组的变化倍数。反转录和 PCR 反应均严格按照 TaKaRa 公司提供的 SYBR PrimeScript®RT-PCR Kit Ⅱ (Perfect Real time)方法,以 U6-snRNA 作为内参进行相对定量,每组设置 3 个复孔,在 ABI7500 实时定量荧光 PCR 仪机器检测。

1.2.8 Western blot 蛋白水平检测 收获转染后 48 h 细胞,分别将实验组、阴性对照组、空白对照组以及未做任何转染处理的 LLC 细胞进行裂解,抽提蛋白质并定量。10% SDS-PAGE 电泳分离,每孔上样量为 25 μg 蛋白,湿转法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,4 ℃、5% 脱脂奶粉封闭过夜,室温下一抗孵育 1 h,酶标二抗孵育 1 h,加入发光液,曝光。以 β-actin 为内参,用 Image J 软件对条带的灰度值进行分析。

1.2.9 侵袭实验 将浓度为 13.7 mg/mL 的 Matrigel 胶按照 1∶10 比例稀释后包被 Transwell 小室膜的上室面,4℃冰箱过夜后,每孔加入 50 μL 无血清培养液,水化基底膜,37 ℃,放置 30 min。制备细胞悬液前无血清培养 6 ~ 8 h,去除血清的影响。消化细胞,PBS 洗 2 次,无血清培养基重悬,调整细胞数至 10×10^5/mL,取细胞悬液 200 μL 加入 Transwell 小室,下室加入 500 μL 含 8% FBS 的培养基。常规培养 24 h,用棉签擦去基质胶和上室内的细胞。采用 0.05% 结晶紫染色,200 倍光镜下随机取 10 个视野进行计数,取平均值。

1.2.10 迁移实验 制备细胞悬液前无血清培养 6 ~ 8 h,去除血清的影响。消化细胞,PBS 洗 2 次,无血清培养基重悬,调整细胞数至 5×10^5/mL,取细胞悬液 200 μL 加入 FN 裱衬的 Transwell 小室,下室加入 500 μL 含 5% FBS 的培养基。常规培养 24 h,用湿棉棒小心擦去上室底部表面上的细胞。采用 0.05% 结晶紫染色,200 倍光镜下随机取 10 个视野进行计数,取平均值。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析,组间比较用单因素方差分析。数据图表制作采用 GraphPad Prism 5 软件。

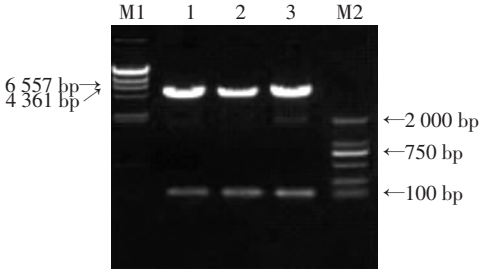
2 结果

2.1 靶基因预测

选取 miRanda、TargetScan 这两种方法均能预测到的基因作为其潜在靶基因。MMP3、Smad6、Wee1、Gpr34、Cdca4、Hsp110、Rab7l1、Wnt7b、Notch4 等基因均具有可能是 mmu-miR-294 的靶位点。

2.2 测序及酶切鉴定

重组载体 pGL3-pro-miR294-MMP3,用 *Xba* Ⅰ单酶切鉴定后电泳观察酶切的结果,*Xba* Ⅰ单酶切能获得约 5 000 bp 和 100 bp的酶切片段,表明重组载体构建成功(图 1)。



M1:λ-*Hind*Ⅲ digest;M2: DNA 标准(DL2 000);1:MMP3 正向序列;2:MMP3 反向序列;3:MMP3 缺失序列

图 1 不同序列质粒酶切电泳结果

2.3 双荧光素酶法检测

重组载体与 pre-miR-294 共转染 LLC 细胞后 48 h 后,分别检测每组的萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。结果显

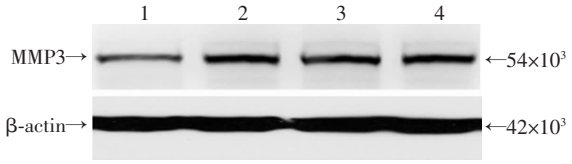
示,实验组较对照组的相对荧光素酶活性有显著性的下降[实验组和对照组的 Firefly/Renilla 比值分别为(6.43 ± 1.03)、(13.75 ± 2.61)、(13.59 ± 1.67)、(11.90 ± 1.49)],差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 Real time PCR 检测 MMP3 基因水平

各组 mmu-miR-294 的表达水平,mmu-miR-294 模拟物实验组、阴性对照组、空白对照组分别为(22.59 ± 7.26)、(7.90 ± 0.31)、(3.01 ± 0.74),实验组较对照组表达明显上调,而对照组间无明显统计学差异($P>0.05$)。mmu-miR-294 靶基因 MMP3 的表达水平,mmu-miR-294 模拟物实验组、阴性对照组、空白对照组分别为(1.87 ± 0.40)、(2.63 ± 0.83)、(1.72 ± 0.53),实验组较对照组无明显统计学差异($P>0.05$)。表明 mmu-miR-294 模拟物明显促进了 LLC 细胞中 mmu-miR-294 的表达,而对靶基因 MMP3 的表达无影响。

2.5 Western blot 检测 MMP3 蛋白水平

mmu-miR-294 模拟物实验组、阴性对照组、空白对照组、LLC 对照组,MMP3 蛋白水平分别为(0.16 ± 0.09)、(0.60 ± 0.15)、(0.60 ± 0.24)、(0.69 ± 0.25),MMP3 蛋白在模拟物转染组中表达明显下调($P<0.05$),表明 mmu-miR-294 能下调靶基因 MMP3 蛋白的表达水平。见图 2。



1:miR-294 模拟物实验组;2:阴性对照组;3:空白对照组;4:LLC 对照组

图 2 Western blot 检测各组 MMP3 蛋白的表达

2.6 转染 miR-294 模拟物后 LLC 细胞侵袭和迁移能力的变化

转染 48 h 后,与阴性对照组、空白对照组比较实验组穿过人工基底膜的细胞数均显著减少($P<0.01$),空白对照组与阴性对照相比无显著差异($P>0.05$)。说明转染 miR-294mimics 后 LLC 细胞穿过铺有 Matrigel 胶和 FN 的 transwell 细胞数明显减少,LLC 细胞侵袭和迁移能力下降(表 1、图 3)。

表 1 转染 miR-294 模拟物侵袭和迁移细胞数的变化 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	侵袭细胞数	迁移细胞数
实验组	108.33 ± 3.51	109.00 ± 3.00
阴性对照组	165.00 ± 2.65[a]	177.33 ± 2.08[a]
空对照白组	168.67 ± 1.53[a]	190.33 ± 3.05[a]

a: $P<0.01$,与实验组比较

3 讨论

microRNAs 是一类在诸多生理过程中起重要调节作用的非编码 RNA 分子,在多数动物中 microRNAs 是通过与靶基因 3′-UTR 区不完全互补结合来抑制 mRNA的翻译,参与细胞周期、转录调控、干细胞分化、物质转运代谢(肿瘤的多药耐药)等途径的调控[6]。近年来,国内外的研究表明 microRNAs 与人类肿瘤的发生、诊断、分期和预后等密切相关,涉及肿瘤细胞的分化、增殖凋亡和侵袭迁移等多个环节,在肿瘤形成和治疗的过程中扮演着重要的角色[7]。而且,microRNAs 不但通过复杂网络调控对未来肿瘤治疗产生重要

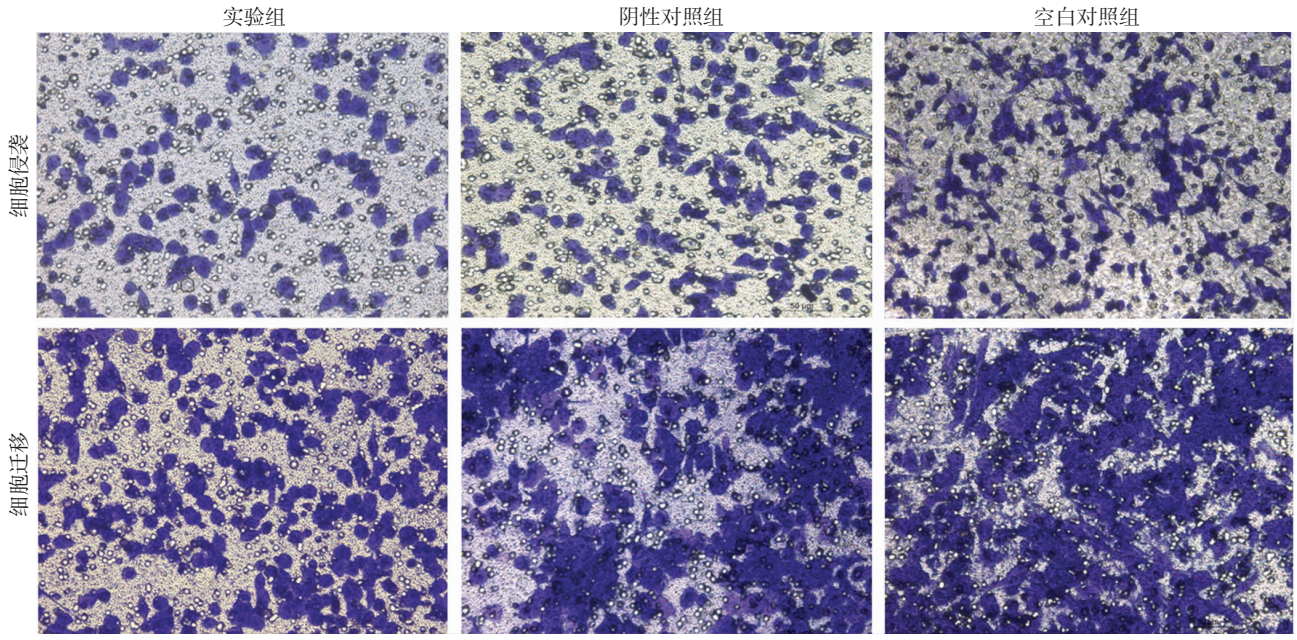


图 3 miR-294 模拟物转染对 LLC 细胞侵袭及迁移能力的影响 (结晶紫 ×200)

影响,同时也是一个受多因素调控、复杂连续的生物学过程[8]。有研究表明,在肿瘤细胞内起到编码癌基因和抑癌基因的非编码 microRNAs 明显增多,可见在生物进化中的高度保守性使其成为更稳定有效的抗癌靶点[9]。随着对 microRNAs 研究的不断深入,目前与肺癌相关的 microRNAs 靶基因研究仍在不断挖掘之中。

有研究表明,miRNAs 参与了细胞基质蛋白及基质金属蛋白酶的调控[10],基质金属蛋白酶(MMPs)通过对 ECM 的降解而促进癌细胞对周围组织的浸润,是降解 ECM 诸成分的关键酶[11]。基质金属蛋白酶-3(MMP-3)在包括肺癌在内的许多恶性肿瘤中过度表达,而侵袭转移是肺癌患者治疗失败和死亡的主要原因[12]。MMP3 及其抑制物组织基质金属蛋白酶抑制剂-3(TIMP-3)的表达与 NSCLC 淋巴结转移密切相关,且转移灶癌细胞 MMP-3 的表达明显强,TIMP-3 的表达明显下降,MMP3 可作为临床判断 NSCLC 恶性程度、淋巴结转移的重要参考指标[13]。同时,我们采用生物信息学技术预测 mmu-miR-294 可能调控 MMP3 表达。因此,若能进一步探明 microRNAs 是否可通过调控 MMP3 表达而影响肿瘤细胞的侵袭迁移等细胞生物学行为,则可为临床肿瘤治疗提供一种新策略。

Hanina 等[14]研究证实 miR-294 通过调节 c-Myc 靶基因的子集和多能性相关基因的上调可以促进多能性,进而在肿瘤细胞干性的维持和分化中起重要作用。在本实验中,我们将具有 mmu-miR-294 结合位点的 MMP3 基因 3'-UTR 种子序列定向克隆至真核表达质粒 pGL3-promoter 中,构建真核表达重组质粒 pGL3-pro-miR- 294 -MMP3,转化大肠杆菌后双荧光素酶检测结果 mmu-miR-294 与 MMP3 的 3-UTR 序列结合,导致荧光素酶编码区翻译受阻,实验组相对荧光强度明显下降。这一结果提示 mmu-miR-294 可靶向调控 MMP3。利用体外生长的 LLC 肺癌细胞株进行 microRNAs 模拟物的转染,运用 Real time PCR 及 Western blot 检测技术,分别从基因和蛋白两个水平来验证两者之间靶向调节作用,结果表明 mmu-miR-294 可以直接调控 MMP3 基因,使蛋白的表达水平下调。同时,通过 Transwell 实验证实过表达 miR- 294 能有效抑制的 LLC 侵袭迁移能力。本研究结果提示,mmu-miR-294 可通过调控 MMP3 基因和蛋白的表达水平而调节肿瘤细胞的侵袭迁移能力,因此可作为肺癌的生物靶向治疗一个新靶标。

参考文献:

[1] Zammiti W, Mtiraoui N, Finan R R, *et al*. Tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha haplotypes in idiopathic recurrent pregnancy loss [J]. Fertil Steril, 2009, 91(5): 1903 - 1908.

[2] Scherf D B, Dally H, Muller P, *et al*. Single nucleotide polymorphisms in matrix metalloproteinase genes and lung cancer chemotherapy response and prognosis [J]. Eur Respir J, 2010, 35(2): 381 - 390.

[3] Moller H D, Ralfkj r U, Cremers N, *et al*. Role of fibulin-5 in metastatic organ colonization [J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(5): 553 - 563.

[4] Asangani I A, Rasheed S A, Nikolova D A, *et al*. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(15): 2128 - 2136.

[5] Qian S, Ding J Y, Xie R, *et al*. MicroRNA expression profile of bronchioalveolar stem cells from mouse lung[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(2): 668 - 673.

[6] Li N, Fu H, Tie Y, *et al*. miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 2009, 275(1): 44 - 53.

[7] Bourguignon L Y, Spevak C C, Wong G, *et al*. Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C (epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(39): 26533 - 26546.

[8] Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, *et al*. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(2): 202 - 210.

[9] Yeh D, Chen C, Sun M Z, *et al*. Caveolin-1 is an important factor for the metastasis and proliferation of human small cell lung cancer NCI-H446 cell[J]. Anat Rec (Hoboken), 2009, 292(10): 1584 - 1592.

[10] Liang L, Li X, Zhang X, *et al*. MicroRNA-137, an HMGA1 target, suppresses colorectal cancer cell invasion and metastasis in mice by directly targeting FMNL2 [J]. Gastroenterology, 2013, 144(3): 624 - 635.

[11] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer[J]. Nature, 2007, 449(7163): 682 - 688.

[12] Zhu S, Wu H, Wu F, *et al*. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis [J]. Cell Res, 2008, 18(3): 350 - 359.

[13] Dangi-Garimella S, Yun J, Eves E M, *et al*. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7[J]. EMBO J, 2009, 28(4): 347 - 358.

[14] Hanina S A, Mifsud W, Down T A, *et al*. Genome-wide identification of targets and function of individual MicroRNAs in mouse embryonic stem cells[J]. PLoS Genet, 2010, 6(10): e1001163.

(**收稿**:2012-11-23;**修回**:2012-12-31)

(编辑 汪勤俭)