文章编号:1000-5404(2014)01-0033-05

论著

真核表达载体 pEGFP-C2-miR-126-sponge 的构建及其表达活性研究

胡 燕[1],廖珍媛[1],李永菊[1],陈 超[1],朱顺飞[1],熊思东[2],徐 林[1] (563000 贵州 遵义,遵义医学院免疫学教研室[1];215000 江苏 苏州,苏州大学医学部基础医学与生物科学学院[2])

[摘要] **目的** 构建靶向 miR-126 的真核表达载体 pEGFP-C2-miR-126-海绵体(sponge),并探讨其下调 miR-126 的表达对肝癌 HepG2 细胞体外生长的影响,为后续深入研究 miR-126 在肝癌发生中的作用提供前期实验基础。**方法** 合成 miR-126-sponge,构建 pEGFP-C2-miR-126-sponge 真核表达载体,体外瞬时转染肝癌细胞 HepG2,荧光显微镜下观察 EGFP 的表达情况;Real-time PCR 检测细胞中 miR-126 的表达水平;MTT 法和克隆形成实验检测细胞的增殖变化;划痕实验观察细胞的体外迁移能力改变。**结果** 成功构建 pEGFP-C2-miR-126-sponge 真核表达载体(命名为 p-miR-126-sp);Real-time PCR 结果显示,与对照组(p-Cont)相比,p-miR-126-sp 组中 miR-126 表达水平显著降低($P<0.05$);MTT 检测发现,p-miR-126-sp 组中细胞增殖数目明显减少($P<0.05$);此外,p-miR-126-sp 组的克隆形成数和细胞迁移数均明显减少($P<0.05$)。**结论** miR-126-sponge 可显著下调 miR-126 的表达水平进而抑制肝癌细胞 HepG2 的体外增殖及迁移能力。

[关键词] miR-126-sponge;肝癌;HepG2 细胞;细胞增殖
[中图法分类号] R394-33; R394.3; R735.7 [文献标志码] A

Construction of pEGFP-C2-miR-126-sponge eukaryotic expression vector and its expression activity

Hu Yan[1], Liao Zhenyuan[1], Li Yongju[1], Chen Chao[1], Zhu Shunfei[1], Xiong Sidong[2], Xu Lin[1] ([1]Department of Immunology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563000; [2]College of Biology & Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu Province, 215000, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct an eukaryotic expression vector of pEGFP-C2-miR-126-sponge targeting to miR-126 and investigate its effect on the expression of miR-126 and growth of hepatocellular carcinoma cell line HepG2, in order to provide preliminary experimental fundament for study on the role of miR-126 in the pathogenesis of the cancer. **Methods** The sequence of miR-126-sponge was designed and synthesized. The pEGFP-C2-miR-126-sponge eukaryotic expression vector was constructed and then transiently transfected into HepG2 cells *in vitro*. The proportion of EGFP-positive cells was observed under the fluorescence microscope. Then, the expression level of miR-126 was detected by real-time PCR. Moreover, the proliferation of HepG2 cells was observed by MTT assay and colony formation assay. Finally, the migration of HepG2 cells was also determined by Scratch assay. **Results** The pEGFP-C2-miR-126-sponge eukaryotic expression vector (termed as p-miR-126-sp) was successfully constructed. Compared with control group (p-Cont), the expression level of miR-126 was significantly decreased in p-miR-126-sp transfected HepG2 cells ($P<0.05$). MTT assay showed that the proliferation of HepG2 cells was dramatically reduced in p-miR-126-sp transfected cells ($P<0.05$); Furthermore, the number of both colony forming and migrating cells were also remarkably reduced in p-miR-126-sp transfected cells ($P<0.05$). **Conclusion** The miR-126-sponge can significantly reduce the expression of miR-126 and inhibit the proliferation and migration of the HepG2 cells.

[**Key words**] miR-126-sponge; hepatocellular carcinoma; HepG2 cells; cell proliferation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81260398) and the International Cooperation Project of Guizhou Province (10C315). Corresponding author: Xu Lin, E-mail: xulinzhouya@163.com

肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是我国常见的恶性肿瘤之一,恶性死亡率居第2位,严重危害人们健康[1-2]。近年的研究[3-4]表明,微小 RNA(microRNA,miRNA)的表达异常与肝癌的发生、发展密切相关,其

[基金项目] 国家自然科学基金(81260398);贵州省国际合作项目(10C315)
[通信作者] 徐 林,E-mail:xulinzhouya@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131104.1627.013.html(2013-11-04)

可发挥癌基因或抑癌基因的作用,促进或抑制肿瘤的生长、侵袭和转移。miR-126是miRNAs家族中的重要成员,位于EGFL7基因7号内含子中,其在血管和心脏、肺等组织的内皮细胞中高表达[5]。有研究报道,与正常肝组织相比,miR-126在肝癌组织中表达异常,与肝癌的发生、预后尤其是肝移植后的再复发相关[6]。但目前关于miR-126与肝癌具体关系及作用机制仍待深入研究阐明。

目前,改变特定miRNAs的表达,从而研究其生物学功能的技术主要有miRNA的反义核酸(Antisense oligonucleotides, ASO)[7-8]、抑制剂(Inhibitor)和Antagomir[9]。miRNA海绵体(miRNA-sponge)是新近报道的一种长效抑制特定miRNA表达或功能的方法,其实质是一条在3′非翻译区(3′UTR)含若干个特定miRNAs分子结合位点的非编码mRNA序列,可与特定miRNAs分子稳定结合,从而抑制该miRNAs分子的后续降解和释放[10-12]。已有研究显示[13-14],miRNA-sponge可有效下调特定miRNAs的水平或使其丧失功能,成为miRNAs生物学功能研究的重要手段。因此,本研究中我们拟利用分子生物学技术,构建靶向miR-126的miR-126-sponge真核表达载体,观察其下调肝癌细胞HepG2中miR-126表达的效率和细胞体外生长及迁移的改变,为后续深入研究miR-126在肝癌发生、发展中的作用和机制提供前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂和仪器

肝癌细胞株HepG2、大肠杆菌DH5α感受态细胞由本实验室保存,质粒抽提试剂盒购自天根生化科技有限公司,限制性内切酶*Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、T_4 DNA连接酶和SYBR Premix Ex *Taq* Real-time PCR试剂盒购自TaKaRa公司;MTT、DMSO试剂购自Sigma公司;RPMI1640培养基购自Hyclone公司;优质胎牛血清购自Solarbio公司;pEGFP-C2真核表达载体和Lipofectamine™ 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司;二氧化碳培养箱购自Thermo公司;C1000™ Thermal cycler real-time PCR仪、S1000™ Thermal cycler PCR仪购自Bio-Rad公司;IX-51倒置显微镜、IX-71倒置荧光显微镜购自Olympus公司。

1.2 miR-126-sponge的合成

在miRBase数据库中检索出hsa-miR-126的序列,miR-126正义序列:5′-CATTATTACTTTTGGTACGCGCTGTGACACTTCAAACTCGTACCG TGAGTAATAATGCG-3′;miR-126反义序列:5′-CGCATTATTACTCACGGTACGAGTTTGAAGTGTCACAGCGCGTACCAAAAGTAATAATG-3′。把miR-126反义序列中CTCA转换成GGT;GTTT突变成CGCG,截取5′-CGCATTATTAGGTCGGTACGACGCG-3′,把6个这样的相同片段串联起来,最终miR-126-sponge序列为5′-CGCATTATTAGGTCGGTACGACGCGCGCATTATTAGGTCGGTACGACGCGCGCATTATTAGGTCGGTACGACGCGCGCATTATTAGGTCGGTACGACGCGCGCATTATTAGGTCGGTACGACGCGCGCATTATTAGGTCGGTACGA-3′。最后在5′端加上*Hind* Ⅲ 酶切位点,3′端加上*Kpn* Ⅰ酶切位点。miR-126-sponge序列由上海生工生物有限公司合成。

1.3 pEGFP-C2-miR-126-sponge重组质粒的构建

用*Hind* Ⅲ/*Kpn* Ⅰ双酶切骨架载体pEGFP-C2、目的片段miR-126-sponge,回收片段,16 ℃过夜连接。连接反应体系:10×T^4 Ligase buffer、2 μL,miR-126-sponge、0.03 pmol,pEGFP-C2、0.3 pmol,T_4 DNA Ligase、1 μL,ddH_2O,总20 μL。连接后转化,挑取6个菌落,接种到含10 μg/mL卡那霉素的LB培养基中。质粒小抽法抽提质粒,并用*Hind* Ⅲ和*Kpn* Ⅰ双酶切鉴定。重组质粒命名为pEGFP-C2-miR-126-sponge(p-miR-126-sp),送上海生物工程有限公司测序。

1.4 细胞培养和转染

肝癌细胞株HepG2在含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素及2 mmol/L谷氨酰胺的RPMI1640的培养基中,37 ℃、5% CO_2全湿度培养。当细胞贴壁达80%~90%时,按3×10^5/mL的细胞密度接种于6孔板中。细胞转染试验分组:①阴性对照组(p-Cont组):转染pEGFP-C2空白质粒;②实验组(p-miR-126-sp组):转染pEGFP-C2-miR-126-sponge重组质粒。转染方法按照Invitrogen公司Lipofectamine™ 2000转染试剂说明书操作。转染48 h后,倒置荧光显微镜下观察EGFP的表达量进而估算转染效率。

1.5 RT-PCR检测miR-126的表达

收集转染后细胞,用TRIzol试剂抽提总RNA,再用miR-126逆转录引物对RNA样品进行逆转录,RT-PCR法对样品中miR-126表达量进行检测。miR-126的表达量以GAPDH为内参,用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算,比较miR-126的相对表达水平。miR-126逆转录条件:16 ℃、30 min;42 ℃、30 min;85 ℃、30 min;4 ℃保存。GAPDH反应条件:42 ℃、1 h;70 ℃、10 min;4 ℃保存。实验步骤:取EP管,依次加入RNA样品7.5 μL、寡核苷酸1 μL、DEPC处理后的水3.5 μL,轻轻混匀,置于PCR仪上65 ℃ 5 min,之后立即取出,冰浴2 min以上;再加缓冲液3 μL、10 mmol/L dNTP 2 μL,混匀,冰浴5 min后,于PCR仪上进行逆转录。分别利用探针和SYBR-Green荧光染料于RT-PCR仪检测miR-126和GAPDH的表达,miR-126上游引物:5′-ACGTAAACGGCCACAAGTTC-3′,下游引物:5′-GATCTTGAAGTTCACCTTGATGC-3′。GAPDH上游引物:5′-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3′,下游引物:5′-ATGGGTGGAATCATATTGGAA-3′。miR-126反应条件:95 ℃、5 min,95 ℃、15 s,60 ℃、15 s,共40个循环。GAPDH反应条件:95 ℃、10 min, 95 ℃、15 s,60 ℃、1 min,共50个循环。

1.6 MTT实验检测转染后HepG2细胞的增殖

分别收集上述转染后各组细胞制备成单细胞悬液,调整细胞密度至1×10^4/mL,每孔200 μL接种于96孔培养板,每组细胞设10个复孔。37 ℃、5% CO_2全湿度培养72 h后,每孔加入5 mg/mL的MTT 20 μL,继续孵育4 h,弃孔内培养液,每孔加入150 μL二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),振荡10 min,待结晶物充分溶解后,酶标仪检测570 nm处各孔光密度[*D*(570)]值。

1.7 克隆形成实验检测转染后HepG2细胞的体外增殖

分别收集上述转染后各组细胞制备成单细胞悬液,6孔板中

每孔接种 2 mL,保持每孔细胞数目依次为 400 和 800 个;置 37 ℃、5% CO_2 中培养 10 d,当出现肉眼可见克隆时,弃去培养液,终止培养。PBS 洗涤 2 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,置空气中干燥,用 1% 结晶紫染液染色 30 min,用 PBS 洗去染液,干燥后拍照。

1.8 划痕实验检测转染后 HepG2 细胞的体外迁移

培养 HepG2 细胞,按细胞密度 3×10^5 接种于 12 孔板,培养 12 h;分别转染 pEGFP-C2 空白质粒和 p-miR-126-sp 重组质粒,每组设 6 个复孔;用 200 μL 枪头沿板中线刮出 1 mm 刮痕,PBS 洗涤 3 次,显微镜下观察刮痕内无细胞,加上无血清培养液,继续培养 60 h;吸去培养上清液,加入新的培养液;光学显微镜下计算刮痕内细胞总数,并拍照;弃去培养液,每孔加入 4% 多聚甲醛 0.5 mL,固定 30 min,弃甲醛后干燥,用 1% 结晶紫染液染色 30 min;用 PBS 洗去染液,干燥后拍照。

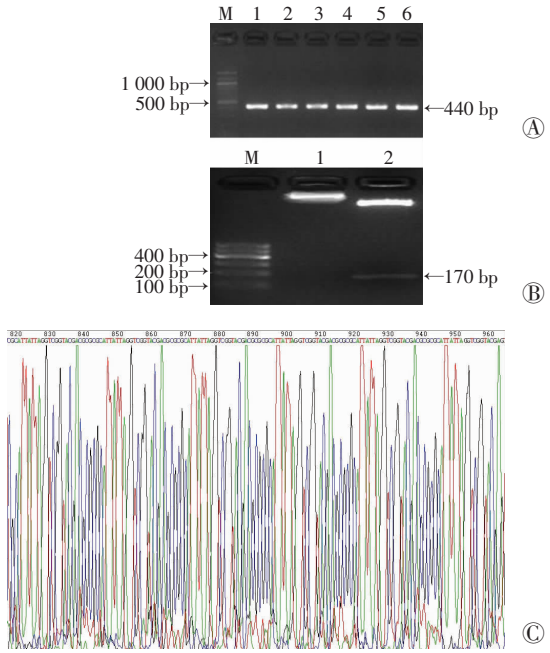
1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism™ 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本资料的 t 检验或单因素方差分析。

2 结果

2.1 p-miR-126-sp 重组质粒阳性克隆的 PCR 鉴定和双酶切、测序鉴定

连接产物转化 DH5α 感受态细胞,Kan 抗性筛选培养 12 h 后随机挑取 6 个克隆,培养 16 h,菌液经 PCR 后,电泳鉴定,结果显示均可见 440 bp 大小的目的条带(图 1A),提示所挑取的 6 个克隆均为阳性克隆;进一步提取 p-miR-126-sp 重组质粒,经 *Hind*Ⅲ 和 *Kpn* Ⅰ 双酶切,2.0% 琼脂糖凝胶电泳后,可见约 4.8 kb 的线性化 pEGFP-C2 及 170 bp 大小的目的条带(图 1B)。DNA 测序结果(图 1C)显示,插入片段与 miR-126-sponge 序列保持一致。这些结果表明,成功构建重组载体 pEGFP-C2-miR-126-sponge。



A:PCR 鉴定 M:标准;1~6:大肠杆菌菌落克隆;B:双酶切鉴定 M:标准;1:p-miR-126-sp 重组质粒;2:双酶切后 miR-126-sponge 目的条带;C:测序结果

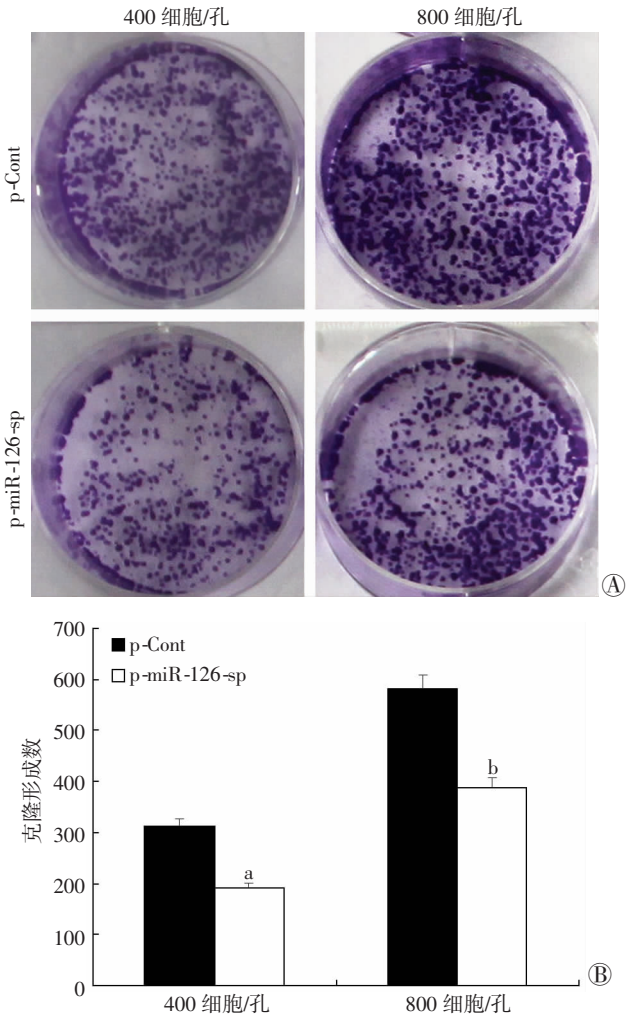
图 1 pEGFP-C2-miR-126-sponge 质粒克隆的鉴定

2.2 p-miR-126-sp 转染后下调 HepG2 细胞 miR-126 的表达

p-miR-126-sp 转染肝癌 HepG2 细胞后,48h 后倒置荧光显微镜观察转染效率,结果可见约 35% 的细胞为 EGFP 阳性;进一步利用 Real-time PCR 特异探针检测各组细胞中 miR-126 成熟体的表达水平,结果显示,与 p-Cont 组相比,p-miR-126-sp 组细胞中 miR-126 成熟体的表达水平显著减少[(28.67 ± 0.61) *vs* (1.05 ± 0.12),$P<0.05$],表明 miR-126-sponge 可显著抑制 HepG2 细胞 miR-126 的表达水平。

2.3 瞬时转染 p-miR-126-sp 抑制 HepG2 细胞的增殖

MTT 结果显示,对照组 D(570)为(0.71 ± 0.03),而 p-miR-126-sp 组为(0.48 ± 0.02)($P<0.05$);此外,克隆形成试验也显示,与 p-Cont 组相比, p-miR-126-sp 组的克隆形成数明显减少($P<0.05$,图 2A、B)。这表明,转染 p-miR-126-sp 后,HepG2 细胞的增殖能力显著减弱。



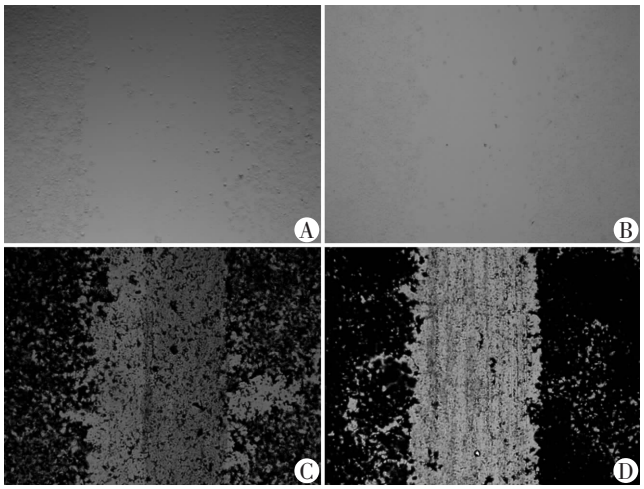
A:克隆形成实验;B:克隆形成数分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 p-Cont 组比较

图 2 瞬时转染 p-miR-126-sp 对肝癌 HepG2 细胞体外增殖的影响

2.4 瞬时转染 p-miR-126-sp 抑制 HepG2 细胞的体外迁移

进一步观察了 HepG2 细胞体外迁移能力的变化。划痕实

验结果显示,与 p-Cont 组相比,p-miR-126-sp 组细胞的体外迁移能力也受到显著抑制[(26.12 ± 3.56) *vs* (7.17 ± 1.29),$P < 0.05$,图 3]。提示下调 miR-126 后可明显抑制 HepG2 细胞的体外迁移能力。



A:p-Cont 组光镜下观察细胞迁移数;B:p-miR-126-sp 组光镜下观察细胞迁移数;C:p-Cont 组结晶紫染色;D:p-miR-126-sp 组结晶紫染色

图 3 划痕实验检测转染 p-miR-126-sp 后抑制 HepG2 细胞的体外迁移 (×100)

3 讨论

miRNA-sponge 技术首先是由 2007 年麻省理工大学 Phillip Sharp 等开发出的一种长效抑制 miRNA 活性的方法[11]。其实质是一条在 3′非翻译区含 4~7 个特定 miRNAs 分子结合位点的非编码 mRNA 序列。miRNA-sponge 与反义核酸、抑制剂、Antagomir 和基因敲除等技术相比有一定优势[10-12]。首先,自然界中本身就存在 miRNA-sponge 结构,在动物细胞应用上具有天然优势;其次,miRNA 种子区域(seed region)编码多个不同的基因,功能复杂,因而基因敲除技术上比较困难;再次,体内外的细胞对反义核酸、抑制剂和 Antagomir 具有强烈的抵抗性,难以达到最佳抑制效果。因此,本研究也利用了 sponge 原理选择 6 个针对 miR-126 结合位点的重复序列的海绵体结构,利用分子生物学技术成功构建了 pEGFP-C2-miR-126-sponge 真核表达载体。结果显示,转染该载体后,人肝癌细胞 HepG2 中 miR-126 的表达明显降低。更重要的是,我们还观察到 miR-126 下调后,肝癌细胞增殖和迁移能力都明显削弱。这些结果提示,基于 sponge 原理的真核表达载体技术可以用于探讨 miR-126 在肿瘤细胞中的生物学功能,这为我们后续深入研究特定 miRNA 分子的生物学功能提供了重要的实验基础。

大量研究显示,miRNAs 在肝癌发生、发展中起了重要的调控作用[15]。如,Bae 等[16]最新发现,miR-29c 在 HCC 中明显下调,其通过与癌基因 SIRT1 的 3′UTR 端结合,下调 SIRT1 的表达,进而阻止细胞周期蛋白的翻译,从而抑制肝癌细胞的生长;Fan 等[17]研究也表明,miR-20a 在 HCC 中的表达量明显下降,其与肝移植后 HCC 的再复发和预后不良密切相关。他们进一步发现,miR-20a 可通过下调抗凋亡基因 Mcl-1 的表达,进而抑制细胞周期进程和诱导细胞凋亡,从而抑制肝癌细胞的增值;相反的,Ma 等[18]则发现,miR-224 在 HCC 中显著升高,其可通过下调靶基因 PPP2R1B 的表达,促进 AKT 磷酸化进而激活 AKT 信号途径,从而促进 HCC 细胞的增殖、侵袭和迁移;Chen 等[19]还报道,miR-216a 在早期肝癌形成过程中显著升高,其可通过下调 TSLC1,从而刺激肝癌细胞的增值和迁移。此外,还有大量报道[20-21] miRNAs 具有组织特异性,其在血浆中的水平变化可用来作为肿瘤组织分类和鉴定的一种新型生物学标记。这些研究均表明,miRNAs 与肝癌的发生、发展密切相关。因此,深入探讨特定 miRNAs 分子在肝癌发生、发展中的功能不仅对于阐明肝癌的发生机制,而且对于今后肝癌的临床诊断和基因治疗新靶标开发均具有重要意义。

已有的研究显示 miR-126 的表达水平变化与多种肿瘤密切相关。如,Snowdon 等[22]最新报道,在原发性膀胱癌中 miR-126 高表达,发挥了癌基因的作用;Zhang 等[23]则报道乳腺癌中 miR-126 低表达,抑制乳腺癌细胞向肺转移,起抑癌基因的作用。本课题组在研究中也发现过表达 miR-126 可抑制乳腺癌的体外生长[24]。然而,目前 miR-126 在肝癌发生、发展过程中的确切功能和机制仍不清楚。新近 Barshack 等[25]报道,miR-126 在临床肝细胞癌中高表达,提示 miR-126 可能发挥了癌基因的作用,联合检测 miR-126 和 miR-200,可用来鉴别诊断原发性肝癌和转移性肝癌。本研究将 pEGFP-C2-miR-126-sponge 真核表达载体体外转染肝癌 HepG2 细胞后,观察下调 miR-126 表达对肝癌细胞生长的影响。MTT 实验和克隆形成实验显示下调 miR-126 表达后,肝癌细胞的体外生长受到明显抑制。此外,划痕实验进一步发现下调 miR-126 表达也显著抑制了 HepG2 细胞的体外侵袭能力,提示 miR-126 在肝癌的发生、发展中起癌基因的作用。值得一提的是,新近 Chen 等[26]报道,肝移植后肝癌的再复发与 miR-126 的低表达密切相关,且他们发现过表达 miR-126 可抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的体外增殖和

迁移。据此结合已有的研究进展,我们推测,miR-126 在肝癌发生中的作用可能与肝癌细胞的种类或病理学类型等密切相关。此外,本研究未进一步检测 miR-126 相关靶分子表达的改变。因此,肝癌发生、发展中 miR-126 的确切功能及机制仍待后续深入研究阐明。

总之,本研究利用 miRNA-sponge 原理,成功构建 pEGFP-C2-miR-126-sponge 真核表达载体,并发现下调 miR-126 可抑制人肝癌 HepG2 细胞的体外生长和转移。这为我们在后续研究中,深入探讨 miR-126 在肝癌细胞生长中的作用机制,以及基于 miRNAs 的肝癌生物治疗靶标开发提供了前期实验基础。

参考文献:

[1] Hsu S H, Yeh M L, Wang S N. New insights in recurrent HCV infection after liver transplantation [J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 890517.

[2] Hu Z, Zhou J, Wang H, *et al*. Survival in liver transplant recipients with hepatitis B- or hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma: the Chinese experience from 1999 to 2010 [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61620.

[3] Voorhoeve P M. MicroRNAs: Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity? [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1805(1): 72 - 86.

[4] Garzon R, Calin G A, Croce C M. MicroRNAs in Cancer [J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 167 - 179.

[5] Saito Y, Friedman J M, Chihara Y, *et al*. Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(3): 726 - 731.

[6] Han Z B, Zhong L, Teng M J, *et al*. Identi? cation of recurrence-related microRNAs in hepatocellular carcinoma following liver transplantation [J]. Mol Oncol, 2012, 6(4): 445 - 457.

[7] Xu L, Wen Z, Zhou Y, *et al*. MicroRNA-7-regulated TLR9 signaling-enhanced growth and metastatic potential of human lung cancer cells by altering the phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3/Akt pathway [J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(1): 42 - 55.

[8] Qin A, Wen Z, Zhou Y, *et al*. MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway [J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(2): 252 - 264.

[9] Collison A, Herbert C, Siegle J S, *et al*. Altered expression of microRNA in the airway wall in chronic asthma: miR-126 as a potential therapeutic target [J]. BMC Pulm Med, 2011, 11: 29.

[10] Ebert M S, Sharp P A. MicroRNA sponges: progress and possibilities [J]. RNA, 2010, 16(11): 2043 - 2050.

[11] Ebert M S, Neilson J R, Sharp P A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells [J]. Nat Methods, 2007, 4(9): 721 - 726.

[12] Ebert M S, Sharp P A. Emerging roles for natural microRNA sponges [J]. Curr Biol, 2010, 20(19): R858 - R861.

[13] Kluiver J, Gibcus J H, Hettinga C, *et al*. Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition [J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29275.

[14] Otaegi G, Pollock A, Sun T. An optimized sponge for microRNA miR-9 affects spinal motor neuron development *in vivo* [J]. Front Neurosci, 2011, 5: 146.

[15] Gailhouste L, Ochiya T. Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular carcinoma [J]. Histol Histopathol, 2013, 28(4): 437 - 451.

[16] Bae H J, Noh J H, Kim J K, *et al*. MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma [J]. Oncogene, 2013, [Epub ahead of print].

[17] Fan M Q, Huang C B, Gu Y, *et al*. Decrease expression of microRNA-20a promotes cancer cell proliferation and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2013, 32(1): 21.

[18] Ma D, Tao X, Gao F, *et al*. miR-224 functions as an onco-miRNA in hepatocellular carcinoma cells by activating AKT signaling [J]. Oncol Lett, 2012, 4(3): 483 - 488.

[19] Chen P J, Yeh S H, Liu W H, *et al*. Androgen pathway stimulates microRNA-216a transcription to suppress the tumor suppressor in lung cancer-1 gene in early hepatocarcinogenesis[J]. Hepatology, 2012, 56(2): 632 - 643.

[20] Schee K, Fodstad O, Flatmark K. MicroRNAs as biomarkers in colorectal cancer [J]. Am J Pathol, 2010, 177(4): 1592 - 1599.

[21] 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 - 1006.

[22] Snowdon J, Boag S, Feilotter H, *et al*. A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer [J]. Can Urol Assoc J, 2012, 15: 1 - 5.

[23] Zhang Y, Yang P, Sun T, *et al*. miR-126 and miR-126 * repress recruitment of mesenchymal stem cells and inflammatory monocytes to inhibit breast cancer metastasis [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(3): 284 - 294.

[24] 廖珍媛, 秦娜琳, 李永菊, 等. miRNA-126 真核表达载体的构建及其对乳腺癌细胞增殖和迁移的抑制作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(3): 295 - 300.

[25] Barshack I, Meiri E, Rosenwald S, *et al*. Differential diagnosis of hepatocellular carcinoma from metastatic tumors in the liver using microRNA expression [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(8): 1355 - 1362.

[26] Chen H, Miao R, Fan J, *et al*. Decreased expression of miR-126 correlates with metastatic recurrence of hepatocellular carcinoma [J]. Clin Exp Metastasis, 2013, 30(5): 651 - 658.

(**收稿**:2013-06-19;**修回**:2013-09-13)

(编辑 吴培红)