DOI:10.16016/j.1000-5404.201601070

miR-185 对肝癌细胞生长增殖及侵袭迁移的影响

王密斯[1],张荣花[1],王 琳[1],孔艺璇[1],冯雪研[1],刘志勇[2],甄永占[3],章广玲[1,4] (063000 河北 唐山,华北理工大学:基础医学院病原生物学与免疫学教研室[1],附属医院胸心外科[2],基础医学院组织学与胚胎学教研室[3],基础医学院河北省慢性疾病重点实验室,唐山市慢性病临床基础研究重点实验室[4])

[摘要] **目的** 探讨 miR-185 对人肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 生长增殖、侵袭迁移能力的影响。**方法** 构建 miR-185 过表达载体、合成 miR-185 反义寡聚核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO),经脂质体转染肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721。利用 CCK-8 和 Transwell 小室实验检测细胞的增殖、侵袭和迁移能力;生物信息学数据库预测结合基因芯片结果确定 miR-185 的候选靶基因 NR1D1;利用实时荧光定量 PCR 技术和 Western blot 检测 miR-185 对细胞中 NR1D1 基因表达水平的影响;荧光报告载体实验验证 miR-185 对靶基因的调控作用。**结果** miR-185 在人肝癌细胞中的 mRNA 表达水平显著低于正常肝细胞($P<0.01$);过表达 miR-185 使人肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力降低,下调肝癌细胞中 NR1D1 基因的 mRNA 和蛋白的表达水平($P<0.01$);荧光报告载体实验证明 miR-185 可以通过作用于 NR1D1 mRNA 的 3′端非翻译区(untranslated region, UTR)下调其表达水平($P<0.05$)。**结论** miR-185 能抑制肝癌细胞的增殖、侵袭迁移能力,NR1D1 是 miR-185 的直接靶基因。

[关键词] miR-185;肝癌细胞;细胞增殖;肿瘤浸润;细胞运动
[中图法分类号] R394.2; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Effect of miR-185 on proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells

Wang Misi[1], Zhang Ronghua[1], Wang Lin[1], Kong Yixuan[1], Feng Xueyan[1], Liu Zhiyong[2], Zhen Yongzhan[3], Zhang Guangling[1,4] ([1]Department of Pathogen Biology and Immunology, [3]Department of Histology and Embryology, [4]Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan Key Laboratory for Preclinical and Basic Research on Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences; [2]Department of Chest Cardiac Surgery, Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei Province, 063000, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of miR-185 on the proliferation, invasion and migration in human hepatic carcinoma cell lines HepG2 and SMMC-7721. Methods After miR-185 expression vector was constructed and miR-185 antisense oligonucleotide (ASO) was synthesized, they were used to transfect the HepG2 and SMMC-7721 cells. Cell counting kit-8 assay and Transwell chamber test were employed to detect cell proliferation, invasion and migration. Bioinformatics database combined with gene chip results indicated that NR1D1 may be the candidate target gene of miR-185. So real-time quantitative PCR and Western blotting were adopted to detect the mRNA and protein levels of NR1D1. Fluorescent report carrier experiment was adopted to detect the regulation function of miR-185 with its target gene. Results The mRNA level of miR-185 was significantly lower in human hepatic carcinoma cells than that of normal liver cells ($P<0.05$). Over-expression of miR-185 resulted in the decreases in proliferation, invasion and migration of

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81201281);河北省自然科学基金(C2012401037);华北理工大学研究生创新项目(2015S17);国家级省级大学生创新项目(201410081021)

[通信作者] 章广玲,E-mail: zhguangling@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160322.1459.002.html(2016-03-22)

the hepatic carcinoma cells, and the down-regulation of NR1D1 at mRNA and protein levels ($P<0.01$). Fluorescent report carrier experiment proved that miR-185 acted on the 3′ untranslated region of NR1D1 mRNA to down-regulate its expression level ($P<0.05$). **Conclusion** Over-expression of miR-185 may inhibit the proliferation, invasion and migration in hepatic carcinoma cells. NR1D1 may be a target gene of miR-185.

[**Key words**] miR-185; hepatoma carcinoma cells; proliferation; invasion; migration

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81201281), the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2012401037), the Postgraduate Student Innovation Project of North China University of Science and Technology (2015S17) and the National and Provincial College Student Innovative Project (201410081021). Corresponding author: Zhang Guangling, E-mail: zhguangling@126.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在男性中居第5位,在女性中居第9位[1],严重威胁人类的身体健康。由于肝癌的发病隐匿、复发率高、侵袭性强等特点给临床治疗带来了极大困难,往往在诊断时肿瘤已无法根治切除[2-3]。miRNA影响肿瘤发生与发展的病理学机制已经很清晰,即其可在肿瘤发生与发展的过程中表现为抑癌基因或癌基因,而这有赖于其所调控靶基因的生物学功能。miR-148b可以通过靶定DUSP1抑制肝癌细胞的生长、侵袭和迁移[4-5]。研究表明miR-185在人肝癌细胞中呈低表达,且其高表达能诱导肝癌细胞凋亡、抑制细胞增殖及侵袭[6]。肝脏是维持机体代谢平衡的中枢器官,在肝细胞中NR1D1(又名Rev-erbα或EAR-1)调节核心时钟基因BMAL1(brain and muscle arnt-like protein 1)的表达[7]。NR1D1是一大类转录调节因子之一。涉及遗传、基因组、生物化学和药理技术的研究表明,NR1D1在昼夜节律调节中扮演着非常重要的角色[8],其可直接将细胞外激素信号和核内基因转录联系起来,也可调节机体各种生理代谢过程[9-11]。本研究旨在探讨miR-185过表达对人肝癌细胞中NR1D1蛋白表达的调控作用及对HCC侵袭行为的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器

人肝癌细胞系HepG2和SMMC-7721、人正常肝细胞系(LO2)购自上海复祥生物公司,pcDNA3购自美国Clontech公司,pcDNA3/EGFP本室构建,胎牛血清购自美国BI公司,DMEM培养基、青霉素和链霉素购自美国Gibco公司,CCK-8试剂盒购自日本同仁公司,Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司,Transwell小室(8 μm孔径聚碳酸酯膜)和Matrigel购自美国Corning Costar公司,miRNA第1链cDNA合成试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,兔抗人NR1D1单克隆抗体由Abcam公司提供,兔抗人GAPDH单克隆抗体和抗兔二抗由美国KPL公司提供,BX63全自动显微镜扫描系统购自日本Olympus公司,CO_2细胞培养箱和1300 SERIES A2超净工作台购自美国Thermo公司,SpectraMax190全波长读数仪购自美国Molecular Devices公司,伯乐电泳转印系统、凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司,实时荧光定量PCR仪Mastercycler ep Realplex4购自德国Eppendorf公司。

1.2 HepG2、SMMC-7721和LO2细胞培养

用含10%胎牛血清的DMEM培养基于37 ℃、5% CO_2饱和湿度条件下培养细胞,每2~3天消化传代。实验分组:miR-185组,转染pcDNA3/pri-miR-185质粒;pcDNA3组,转染pcDNA3空载质粒;反义寡聚核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)-185组,转染miR-185 ASO寡聚核苷酸;ASO-NC组,转染乱序寡聚核苷酸。转染前1 d将细胞按需接种于细胞培养板,次日按Lipofectamine 2000转染试剂说明书进行质粒的转染,转染时细胞达到70%~90%的板底面积。ASO-185是miR-185的反义寡聚苷酸序列,可以经脂质体转染肝癌细胞,通过碱基互补配对与miR-185结合封闭其功能。用CCK-8和Transwell小室检测方法确定miR-185对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响,确定miR-185在肝癌细胞中起到的作用。

1.3 miR-185对HepG2和SMMC-7721细胞增殖的影响

用CCK-8试剂盒检测miR-185对HepG2和SMMC-7721细胞增殖的影响。将两种细胞分别接种于96孔板,次日进行转染。实验分为4组:miR-185组、pcDNA3组、ASO-185组和ASO-NC组,每组重复3次。分别于24、48 h和72 h加CCK-8试剂10 μL/孔,孵育3 h后用酶标仪测定波长为450 nm的光密度值[$D(450)$]。

1.4 miR-185对SMMC-7721细胞侵袭的影响

在Transwell小室中进行,在聚碳酸酯膜上室面铺

Matrigel 胶,整个操作在冰上和无菌条件下进行,37 ℃固化 1 h 备用。实验分为 miR-185 组、pcDNA3 组、ASO-185 组和 ASO-NC 组,每组重复 3 次。48 h 后用含 1% 血清的 DMEM 培养基洗涤 SMMC-7721 细胞,调整细胞浓度,在上室接种 5×10^4/100 μL,下室加入含 10% 血清的完全培养基作为趋化剂。37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h 后,擦掉上室的细胞,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 20 min,PBS 洗 3 次,然后在显微镜下计数 5 个不重复视野的穿膜细胞数。细胞侵袭抑制率 =[(对照组侵袭细胞数 - 实验组侵袭细胞数)/对照组侵袭细胞数]×100%。

1.5 miR-185 对 SMMC-7721 细胞迁移的影响

方法同 1.4,但 Transwell 小室的聚碳酸酯膜上不铺 Matrigel 胶,细胞迁移抑制率 =[(对照组迁移细胞数 - 实验组迁移细胞数)/对照组迁移细胞数]×100%。

1.6 生物信息学预测结合基因芯片结果确定 miR-185 的功能靶基因

TargetScan 和 PicTar 数据库预测结合基因芯片结果确定 miR-185 的候选靶基因 NR1D1,数据库预测结果显示在 NR1D1 基因 mRNA 的 3′端非翻译区(untranslated region, UTR)有与 miR-185 互补结合的位点(图 1)。

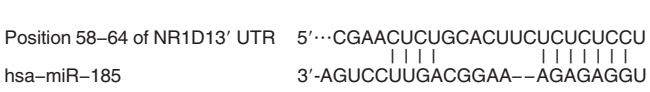


图 1 NR1D1 3′UTR 区 miR-185 的结合位点

1.7 实时荧光定量 PCR 检测细胞中 miR-185 和 NR1D1 mRNA 水平

①检测过表达 miR-185 后 HepG2 细胞中 miR-185 mRNA 水平。将细胞接种于 6 孔板,实验分为 miR-185 组和 pcDNA3 组,重复 3 次。转染 48 h 时用 TRIzol 提取总 RNA,检测浓度及纯度,并用琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性,然后以总 RNA 为模板,miRNA 第 1 链 cDNA 合成试剂盒进行第 1 链 cDNA 的合成,以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 检测,以 U6 为阳性对照基因校正 PCR 模板的拷贝数,基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值计算。②检测人正常肝细胞 LO2 和人肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721 中 miR-185 mRNA 水平,实验方法和计算方法同①。③检测过表达 miR-185 后 HepG2 细胞中 NR1D1 mRNA 水平,实验方法和计算方法同①,但逆转录时使用 M-MLV 逆转录酶试剂盒,以 GAPDH 为阳性对照基因。

1.8 miR-185 对 HepG2 细胞中 NR1D1 基因蛋白表达水平的影响

Western blot 检测 HepG2 细胞中 NR1D1 蛋白表达水平。将 HepG2 细胞接种于 6 孔板,实验分为 miR-185 组、pcDNA3 组、ASO-185 组和 ASO-NC 组,每组重复 3 次,转染 48 h 后加入预冷的 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,经超声机粉碎后离心取上清。提取的细胞蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭,加入一抗(抗 NR1D1 抗体,内参为抗 GAPDH 抗体),4 ℃孵育过夜,洗膜后加入 HRP 标记的二抗进行杂交,ECL 试剂显色,采用成像仪拍照,以目的条带与内参 GAPDH 的光密度值比值表示蛋白的相对表达水平。

1.9 荧光报告载体实验验证 NR1D1 是 miR-185 的靶基因

构建 pcDNA3/EGFP-NR1D1 3′UTR 载体,然后转染到 HepG2 细胞中,实验分为 pcDNA3/EGFP 组、pcDNA3/NR1D1 3′UTR 组、NR1D1 3′UTR + miR-185 组、NR1D1 3′UTR + pcDNA3 组、NR1D1 3′UTR + ASO-185 组和 NR1D1 3′UTR + ASO-NC 组。将 HepG2 细胞接种于 96 孔培养板,次日转染寡聚核苷酸和质粒,第 3 天转染 EGFP 表达质粒,第 2 次转染 48 h 后用荧光显微镜观察细胞内荧光基因的表达情况。实验重复 3 次。每个样品的 3 个数据取平均值,计算各组相对荧光值,比较各组间 EGFP 表达强度值的关系并绘制柱状图。

1.10 统计学分析

计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,方差齐性采用 Levene's 检验,两两比较采用 LSD 法,检验水准为 $\alpha=0.05$。

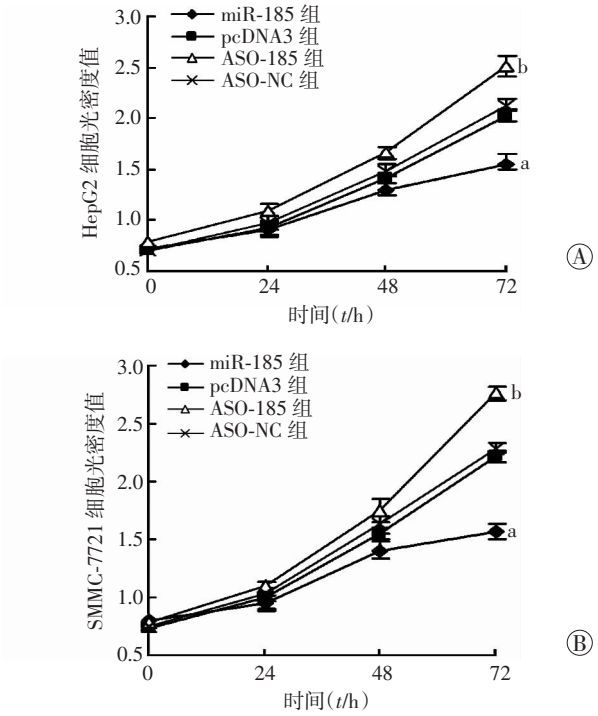
2 结果

2.1 miR-185 对 HepG2 和 SMMC-7721 细胞增殖的影响

在 HepG2 和 SMMC-7721 细胞中分别转染 pcDNA3/pri-miR-185 和对照 pcDNA3 质粒,或转染 ASO-185 和对照 ASO-NC 寡聚核苷酸,0、24、48、72 h 分别测定每孔细胞 $D(450)$ 值,CCK-8 实验结果表明过表达 miR-185 可以抑制 HepG2 和 SMMC-7721 细胞的增殖,抑制细胞中的 miR-185 可以促进细胞增殖(图 2)。

2.2 miR-185 对 SMMC-7721 细胞侵袭和迁移的影响

miR-185 组细胞侵袭和迁移的能力明显低于 pcDNA3 对照组,而 ASO-185 组与 ASO-NC 组相比 SMMC-7721 细胞的侵袭和迁移能力均增强(表 1)。



A:HepG2 细胞;B:SMMC-7721 细胞

a:$P<0.01$,与 pcDNA3 组比较;b:$P<0.01$,与 ASO-NC 组比较

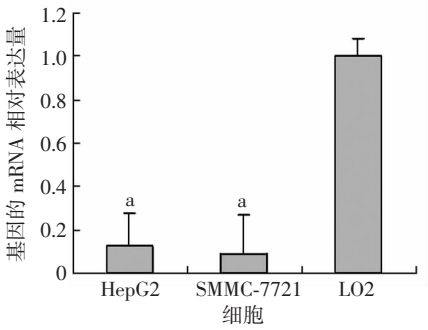
图 2　miR-185 对 HepG2 和 SMMC-7721 细胞增殖的影响

表 1　miR-185 对 SMMC-7721 细胞迁移抑制率和侵袭抑制率的影响($n=3$)

组别	细胞侵袭(个)	细胞迁移(个)	侵袭抑制率(%)	迁移抑制率(%)
miR-185 组	74.1±3.6	80.9±5.8	33.0±5.3	40.7±4.8
pcDNA3 组	110.9±6.6	136.7±9.1	0	0
ASO-185 组	124.4±3.8	154.6±4.2	−16.1±5.7	−8.5±4.2
ASO-NC 组	107.4±5.7	142.6±4.5	0	0

2.3　实时荧光定量 PCR 检测细胞中 miR-185 和 NR1D1 的 mRNA 水平

①实时荧光定量 PCR 检测过表达 miR-185 后 HepG2 细胞中 miR-185 mRNA 水平。转染 pcDNA3/pri-miR-185 质粒后,细胞中 miR-185 基因明显过表达,相对表达量是 pcDNA3 组的 7.73 倍,表明转染 pcDNA3/pri-miR-185 质粒能够使 miR-185 mRNA 表达量增加。②实时荧光定量 PCR 检测 HepG2 细胞、SMMC-7721 细胞和 LO2 细胞中 miR-185 mRNA 水平,结果表明 miR-185 在肝癌细胞中低表达($P<0.01$,图 3)。③实时荧光定量 PCR 检测过表达 miR-185 后 HepG2 细胞中 NR1D1 mRNA 水平。转染 pcDNA3/pri-miR-185 质粒后,细胞中 NR1D1 mRNA 的相对表达量明显低于对照组,是对照组的 0.21 倍($P<0.01$),表明过表达 miR-185 可以降低 NR1D1 mRNA 表达量。

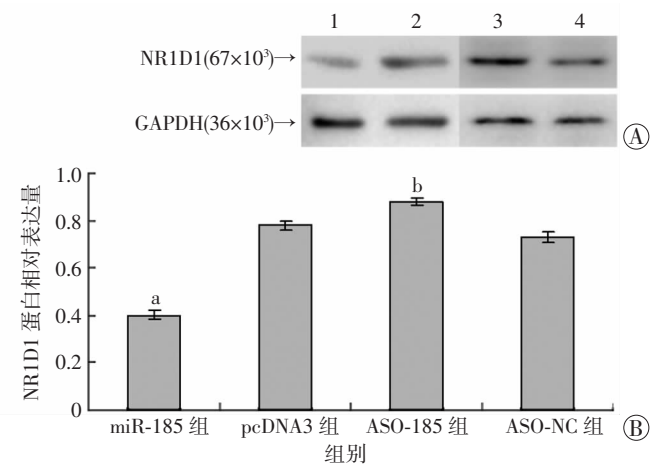


a:$P<0.01$,与 LO2 比较

图 3　肝癌细胞和正常肝细胞中 miR-185 mRNA 的相对表达量

2.4　miR-185 对 HepG2 细胞中 NR1D1 基因蛋白表达水平的影响

Western blot 检测 HepG2 细胞中 NR1D1 蛋白的表达水平,结果显示,miR-185 组 HepG2 细胞中 NR1D1 蛋白表达量较 pcDNA3 组明显减少($P<0.01$),ASO-185 组 HepG2 细胞中 NR1D1 蛋白表达量较 ASO-NC 组明显增加($P<0.01$,图 4)。这表明过表达 miR-185 可以下调肝癌细胞中 NR1D1 蛋白表达,而抑制 miR-185 的表达使 NR1D1 的蛋白表达量增加。



A:Western blot 检测结果　1:miR-185 组;2:pcDNA3 组;3:ASO-185 组;4:ASO-NC 组;B:半定量分析结果　a:$P<0.01$,与 pcDNA3 组比较;b:$P<0.01$,与 ASO-NC 组比较

图 4　miR-185 对 HepG2 细胞中 NR1D1 蛋白表达水平的影响

2.5　荧光报告载体实验验证 NR1D1 是 miR-185 的靶基因

将 pcDNA3/EGFP-NR1D1 3′UTR 质粒与 miR-185 ASO 共转染 HepG2 细胞,所得的 EGFP 荧光强度与共转染 pcDNA3/EGFP-NR1D1 3′UTR 质粒和 ASO-NC 组相比明显升高,表明内源 miR-185 的功能被其反义寡

聚核苷酸 miR-185 ASO 封闭后,对 NR1D1 3′UTR 的抑制作用减低,导致 EGFP 表达升高。相反,将 pcDNA3/EGFP-NR1D1 3′UTR 质粒与 pcDNA3/pri-miR-185 共转染 HepG2 细胞,所得的 EGFP 荧光强度与共转染 pcDNA3/EGFP-NR1D1 3′UTR 质粒和 pcDNA3 组相比明显降低,表明过表达 miR-185 后,对 NR1D1 3′UTR 的抑制作用加强,导致 EGFP 表达量减少。此外,单转染 pcDNA3/EGFP-NR1D1 3′UTR 质粒组比单转染 pcDNA3/EGFP 质粒组的 EGFP 荧光表达强度低,是由于 HepG2 细胞内源性的 miR-185 发挥了抑制 NR1D1 3′UTR 的作用,导致 EGFP 表达减少(图 5)。

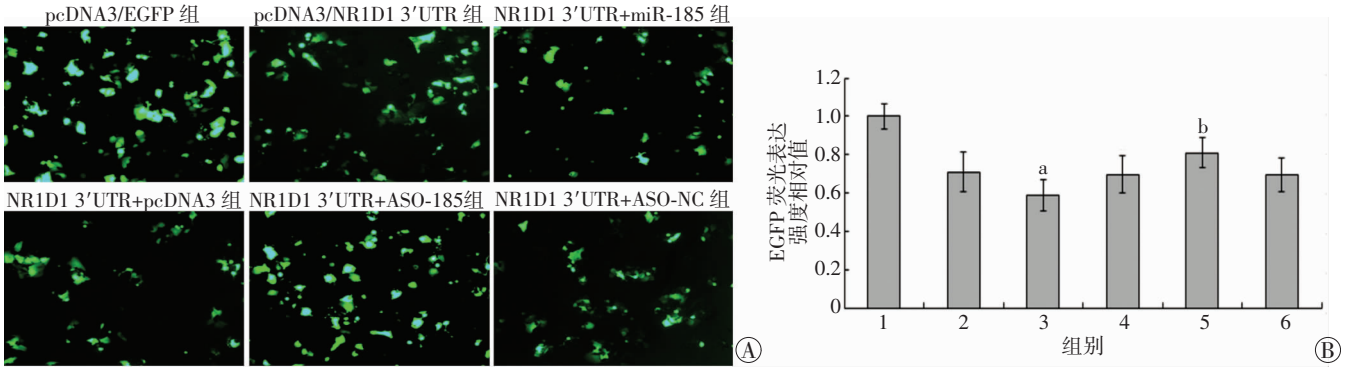
3 讨论

miRNAs 是一类内源性非编码、长度为 18 ~ 22 个核苷酸的小 RNA 分子,其通过结合目标 mRNA 的 3′UTR 区,引起靶 mRNA 降解或抑制其翻译,在转录后沉默目的基因,从而对生物的发育、分化、增殖以及细胞凋亡等生物活动进行精确调节,miRNA 基因约占人类基因的 1%,是最大的基因表达调控家族之一,调节人类近 30% 的基因表达[12]。miR-185 是一个长度为 22 个核苷酸的非编码小分子 RNA,定位于人染色体 22q11.21,在肿瘤的发生、发展过程中扮演着非常重要的角色,对于肿瘤细胞的生长、侵袭迁移和耐药性等多种生物学行为具有非常重要的作用[13]。Liu 等[14]对人结肠癌细胞 SW1116、Lovo 研究发现,miR-185 能下调 RhoA/Cdc42 表达,抑制细胞周期 G_1/S 期的转变、诱导细胞凋亡和抑制细胞侵袭。在肝癌组织和肝癌细胞中 miR-185 呈低表达状态,可作为肿瘤抑制因子,在 HCC 发生、发展中起重要作用[6]。Zhi 等[15]研究发现,miR-185 的低表达使早期肝癌患者生存率更低且复发时间更短,因此上调 miR-185 可能是一个潜在的肝癌分子治疗策略。

NR1D1 是重要的转录调节因子,可直接将胞外刺激信号和核内基因转录联系起来,在生物体中广泛调节机体的各种生理代谢过程。NR1D1 通过识别并结合靶基因启动子上 ROR 应答元件而抑制基因 BMAL1 转录,是昼夜节律时钟核心转录因子 CLOCK 和 BMAL1 的负调节因子[16]。BMAL1/CLOCK 异质二聚体可以在细胞周期 G_1 早期下调癌基因 MYC 的转录,激活 WEEL 基因表达从而活化 G_2/M 检查点阻止细胞进入 M 期[17-18]。所以 NR1D1 可通过抑制 BMAL1 基因的转录而促进细胞分裂增殖。癌症是机体在各种致瘤因素的作用下,局部组织细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控导致异常增生与分化而形成的,在体内一个或几个癌变前的细胞逃脱凋亡的监管就可能会发展成癌症。

miR-185 能够明显抑制肝癌细胞的生长、侵袭和迁移。生物信息学数据库资料结合基因芯片结果表明:NR1D1 可能是 miR-185 的靶基因,其 3′UTR 区有与 miR-185 结合的保守位点;采用荧光报告载体实验证明 NR1D1 是 miR-185 的直接靶基因。在 miR-185 的功能受到抑制或过表达 miR-185 的肝癌细胞中,NR1D1 在 mRNA 和蛋白水平上的表达都有明显升高或降低,也证明 NR1D1 受到 miR-185 的负性调控。这说明 miR-185 可能是通过下调 NR1D1 的表达,抑制肝癌细胞的生长。

miR-185 作为一个关键性的调节 miRNA,可下调 NR1D1 蛋白表达抑制肝癌细胞的生长增殖、侵袭迁移行为,为进一步研究肝癌的诊断和治疗提供新的思路和方向。



A:荧光显微镜观察 EGFP 荧光表达强度(×200);B:EGFP 荧光表达强度统计结果 1:pcDNA3/EGFP 组;2:pcDNA3/NR1D1 3′UTR 组;3:NR1D1 3′UTR + miR-185 组;4:NR1D1 3′UTR + pcDNA3 组;5:NR1D1 3′UTR + ASO-185 组;6:NR1D1 3′UTR + ASO-NC 组;a:$P<0.05$,与 pcDNA3/NR1D1 3′UTR 组比较; b:$P<0.05$,与 NR1D1 3′UTR + ASO-NC 组比较

图 5 pcDNA3/EGFP-NR1D1 3′UTR 荧光报告载体验证 NR1D1 是 miR-185 的直接靶基因

参考文献:

[1] DeSano J T, Xu L. MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications[J]. AAPS J, 2009, 11(4): 682-692. DOI: 10.1208/s12248-009-9147-7

[2] Xu X, Jiang C, Wang S, *et al*. HPIP is upregulated in liver cancer and promotes hepatoma cell proliferation *via* activation of G_2/M transition[J]. IUBMB Life, 2013, 65(10): 873-882. DOI: 10.1002/iub.1202

[3] Cao L, Zhou Y, Zhai B, *et al*. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines[J]. BMC Gastroenterol, 2011, 11: 71. DOI: 10.1186/1471-230x-11-71

[4] Huang Y H, Lin K H, Chen H C, *et al*. Identification of postoperative prognostic microRNA predictors in hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37188. DOI: 10.1371/journal.pone.0037188

[5] 谭翠, 莫春容. miR-148b/DUSP1 调节巨噬细胞分泌细胞因子 CD206 促进肝癌的发生[J]. 第三军医大学学报, 2016,38(3): 270-275. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201506030

[6] Qadir X V, Han C, Lu D, *et al*. miR-185 inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting the DNMT1/PTEN/Akt pathway[J]. Am J Pathol, 2014, 184(8): 2355-2364. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.05.004

[7] Feng D, Liu T, Sun Z, *et al*. A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism [J]. Science, 2011, 331(6022): 1315-1319. DOI: 10.1126/science.1198125

[8] Cho H, Zhao X, Hatori M, *et al*. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-α and REV-ERB-β [J]. Nature, 2012, 485(7396): 123-127. DOI: 10.1038/nature11048

[9] Woldt E, Sebti Y, Solt L A, *et al*. Rev-erb-α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy[J]. Nat Med, 2013, 19(8): 1039-1046. DOI: 10.1038/nm.3213

[10] Gerhart-Hines Z, Feng D, Emmett M J, *et al*. The nuclear receptor Rev-erbα controls circadian thermogenic plasticity [J]. Nature, 2013, 503(7476): 410-413. DOI: 10.1038/nature12642

[11] Jager J, O'Brien W T, Manlove J, *et al*. Behavioral changes and dopaminergic dysregulation in mice lacking the nuclear receptor Rev-erbα[J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(4): 490-498. DOI: 10.1210/me.2013-1351

[12] Berezikov E, Guryev V, van-de-Belt J, *et al*. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes[J]. Cell, 2005, 120(1): 21-24. DIO: 10.3410/f.1023366.270672

[13] Tang H, Wang Z, Liu X, *et al*. LRRC4 inhibits glioma cell growth and invasion through a miR-185-dependent pathway [J]. Curr Cancer Drug Targ, 2012, 12(8): 1032-1042. DOI: 10.2174/156800912803251180

[14] Liu M, Lang N, Chen X, *et al*. miR-185 targets Rho A and Cdc42 expression and inhibits the proliferation potential of human colorectal cells[J]. Cancer Lett, 2011, 301(2): 151-160. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.11.009

[15] Zhi Q, Zhu J, Guo X, *et al*. Metastasis-related miR-185 is a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma in early stage[J]. Biomed Pharmacother, 2013, 67(5): 393-398. DOI: 10.1016/j.biopha.2013.03.022

[16] Sadacca L A, Lamia K A, deLemos A S, *et al*. An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice[J]. Diabetologia, 2011, 54(1): 120-124. DOI: 10.1007/s00125-010-1920-8

[17] Lee S, Donehower L A, Herron A J, *et al*. Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice[J]. PLoS One, 2010, 5(6): e10995. DOI: 10.1371/journal.pone.0010995

[18] Fu L, Patel M S, Bradley A, *et al*. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation[J]. Cell, 2005, 122(5): 803-815. DOI: 10.1016/j.cell.2005.06.028

(收稿:2016-01-13;修回:2016-02-12)

(编辑 汪勤俭)