

上调 microRNA-205 表达对 HeLa 细胞生物学特性的影响

孙小丽, 林仲秋*, 吴维光

(中山大学附属第二医院妇科肿瘤专科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨上调 microRNA-205(miR-205)表达对 HeLa 细胞生物学特性的影响。【方法】实验分4组:miR-205 上调组,阴性对照组,空白转染组和空白对照组。每种检测重复3次。利用脂质体 siPORT NeoFX Transfection Agent,向 miR-205 上调组细胞转染 Pre-miR-hsa-miR-205 miRNA Precursor, 阴性对照组细胞转染 Cy3 dye labeled PremiR Negative Control。荧光显微镜下评估转染情况,实时定量 PCR 方法检测 miR-205 表达,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法和平板克隆形成实验分别检测细胞生长和增殖能力,流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期分布,Transwell 小室法检测细胞迁移能力。【结果】实时定量 PCR 结果显示,miR-205 上调组 miR-205 的表达增加 3061.5 倍。与空白对照组相比,72 h miR-205 上调组与阴性对照组活细胞数分别为 $(126 \pm 41)\%$, $(126 \pm 39)\%$;两组克隆形成率分别为 $(79 \pm 11)\%$, $(63 \pm 10)\%$;凋亡率分别为 $(4.6 \pm 2.1)\%$, $(4.1 \pm 2.4)\%$;S 期细胞比例分别为 $(19.2 \pm 3.6)\%$, $(23.4 \pm 3.0)\%$;200 倍镜视野下迁移细胞数分别为 63 ± 17 和 68 ± 16 。与对照组比,miR-205 上调组细胞增殖能力增强但生长曲线不受影响,S 期细胞比例降低,而凋亡率不变,细胞迁移能力无明显改变。【结论】上调 miR-205 表达后,HeLa 细胞增殖能力及细胞周期改变,但生长曲线、凋亡率和迁移能力无变化。

关键词: HeLa 细胞; miR-205; 生物学; 调控

中图分类号: R739.63

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)02-0148-06

Effects of Upregulated Expression of microRNA-205 on Biological Properties of HeLa Cells

SUN Xiao-li, LIN Zhong-qiu, WU Wei-guang

(Department of Gynecologic Oncology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effects of the upregulated expression of microRNA-205 (miR-205) on the biological properties of HeLa cells.【Methods】There were four groups: miR-205 up-regulation group, negative control group, mock transfection group, and blank control group. Each kind of detection was repeated for three times. Through siPORT NeoFX transfection agent, the cells in miR-205 up-regulation group were transfected with Pre-miR-hsa-miR-205 miRNA precursor, while the cells in negative control group were transfected with Cy3 dye labeled PremiR negative control. The transfection efficiency was evaluated under fluorescence microscope. The miR-205 expression was measured by real time PCR. Cellular growth and proliferation capacity were assayed by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and colony formation assay, respectively. The apoptosis rate and cell cycle distribution were tested by flow cytometry. Cellular migration ability was detected by Transwell chamber assay.【Results】Real time PCR showed that the miR-205 expression in miR-205 up-regulation group increased 3061.5 folds after the transfection of hsa-miR-205 Precursor. Compared with that of blank control group, the numbers of live cells 72 h after transfection in miR-205 up-regulation group and negative control group were $(126 \pm 41)\%$ and $(126 \pm 39)\%$ respectively. In miR-205 up-regulation group and negative control group, the colony forming rates were $(79 \pm 11)\%$ and $(63 \pm 10)\%$ respectively, the apoptosis rates were $(4.6 \pm 2.1)\%$ and $(4.1 \pm 2.4)\%$ respectively, the cell proportions in S phase were $(19.2 \pm 3.6)\%$ and $(23.4 \pm 3.0)\%$ respectively, and the migration cells under 200 magnification field were (63 ± 17) and (68 ± 16) respectively. The cell proliferation ability was enhanced in miR-205 up-regulation group, while the cellular growth activity did not change compared with that in control group. The cell proportion in S phase decreased, while the apoptosis rate and the cellular migration

收稿日期:2008-11-20

基金项目:国家自然科学基金(30672221)

作者简介:孙小丽,硕士;*通讯作者:林仲秋,教授,博士生导师,E-mail:lin-zhongqiu@163.com

ability did not show significant change. 【Conclusions】 After the up-regulated expression of miR-205, the cellular proliferation ability and the cell cycle change in HeLa cells, while the cellular growth, the apoptosis rate or the migration ability show no change.

Key words: HeLa cell; microRNA-205; biology; regulation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2): 148-153]

宫颈癌是全世界妇女中第二常见的恶性肿瘤。高危型人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染是宫颈癌及癌前病变的主要原因, 但仅有一小部分 HPV 感染者会发生癌变, 说明其它未知因素, 如基因水平改变也发挥一定作用。microRNAs (miRNAs) 是一类可调控基因表达的内源性非编码单链小分子 RNA, 长度约 18 ~ 24 个核苷酸, 通过与靶 mRNA 特异的碱基配对, 引起靶 mRNA 降解或者翻译抑制, 产生转录后基因沉默。miRNAs 的作用涉及多种生理和病理过程, 如生长发育、胚胎发育、细胞增殖、神经元分化和成熟、凋亡等^[1]。miRNAs 与肿瘤关系密切, 包括分子发生机制、肿瘤诊断、预后预测及治疗等^[2]。miRNAs 与宫颈癌的研究甚少。最近, Lee 等^[3]研究发现, 宫颈鳞癌和正常组织相比有 70 个基因呈差异性表达, 其中下调 miR-199a 表达可抑制细胞生长, 化疗药物顺铂可增强这种抑制作用。但 miRNA 与宫颈腺癌关系的研究尚无报道。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人宫颈腺癌细胞株 HeLa 细胞 (本科实验室保存), hsa-miR-205 Precursor, Cy3 dye labeled PremiR Negative Control 和 siPORT NeoFX Transfection Agent (Ambion), miRNA Isolation Kit (Ambion), SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen), FITC-annexin V 凋亡试剂盒和 PI (Invitrogen), MTT 试剂盒 (Sigma), Transwell 小室 (Corning), 定量 PCR 引物 (Invitrogen)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养和转染 HeLa 细胞在含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养。按 siPORT NeoFX Transfection Agent 说明书的“一步法”进行转染。以 96 孔板为例, 3 pmol hsa-miR-205 Precursor, 0.3 μL NeoFx 脂质体转染试剂分别稀释于 10 μL Opti-MEM 后混匀, 室温孵育 10 min。将 80 μL 含

8 000 个细胞的细胞悬液加入转染混合物上层, 轻轻左右晃动, 使细胞分布均匀。常规培养 24 h 后换含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液继续培养, 转染后 72 h 后进行细胞生物学行为的检测。荧光显微镜下观察 Cy3 标记的阴性对照组的荧光表达情况。荧光显微镜下随机选取视野, 同一视野先后拍摄荧光镜下及普通光镜下图片, 通过分别计数两张图片上的细胞数目, 来估计荧光标记的阴性对照组转染效率。细胞分 4 组: 组 1 为 miR-205 上调组 (转染 Pre-miR-hsa-miR-205 miRNA Precursor); 组 2 为阴性对照组 (转染 Cy3 dye labeled PremiR Negative Control); 组 3 为空白转染组 (只有转染试剂, 无 RNA 分子); 组 4 为空白对照组 (无转染试剂和 RNA 分子)。

1.2.2 荧光实时定量 PCR 检测 miR-205 Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 异丙醇法浓缩 RNA, 分光光度计测定总 RNA 的纯度, 甲醛变性凝胶电泳质检总 RNA 的质量。取 60 ng 总 RNA, 应用 miRNA Isolation Kit 分离小于 100 nt 的小分子 RNA, 应用 SuperScript III Reverse Transcriptase Kit 逆转录合成 cDNA, 再应用 PRISM 7000 型定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 进行定量 PCR 检测。相应的 PCR 引物序列见表 1, PCR 条件: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 74 °C 3 s, 共 40 个循环。采用 U6 RNA 作为内标, 进行归一化。采用美国 Biosystems 公司的 Sequence Detection system (SDS) 2.2.2 软件进行数据分析。样品目的基因的相对表达率 (relative expression, RQ) 采用 $\Delta\Delta CT$ 方法计算, $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (CT 表示反应的实时荧光强度显著大于背景值时的循环数, $\Delta CT \text{ sample} = CT \text{ sample} - CT \text{ U6 sample}$, $\Delta CT \text{ control} = CT \text{ control} - CT \text{ U6 control}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ sample} - \Delta CT \text{ control}$)。

1.2.3 MTT 法检测细胞生长 直接在 96 孔板中转染, 分别于转染 24、48、72 h 后, 各孔加入 20 μL MTT (50 mg/mL) 液体, 避光, 继续培养 4 h 后弃去液体, 加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 于酶标仪上行 492 nm、630 nm 双波长检测。每个处理组设 4 个复孔。重复 3 次。

表1 用于 miR-205 实时定量 RT-PCR 的引物
Table 1 Primers used to perform RT-PCR of miR-205

Primer	Sequence(5'-3')
U6-Forward	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6-Reverse	AACGCTTCACGAATTTGCGT
General primer Sense	GTGCAGGCTCCGAGGT
hsa-miR-205-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACTGGATACGACcagact
hsa-miR-205-AS	AGTCCTTCATTCCACCGGAGT

1.2.4 平板克隆形成实验检测细胞增殖 转染 72 h 后细胞消化,计数,稀释,六孔板每孔接种 500 个细胞,常规培养,每隔 3 d 换液,10 ~ 14 d 后终止培养。甲醇固定 15 min,0.1%的结晶紫染色 15 min,于倒置显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。克隆形成率(%) = 克隆数/实际接种细胞数 × 100。每个处理组设 3 个复孔,重复 3 次。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 转染 72 h 行流式细胞仪检测细胞凋亡率。将细胞消化,预冷的 PBS 洗细胞两次,100 μL Binding Buffer 重悬细胞于流式管中,加入 5 μL Annexin V/FITC 标记细胞,混匀后室温下避光 15 min,再用 400 μL PBS 洗细胞。离心后加入 150 μL PBS 重悬,加入 10 μL PI (碘化吡啶)后上机检测。实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期 转染 72 h 后细胞消化,以 PBS 重悬细胞,计数,浓度为 10⁶ 个/

mL。加入两倍体积在-20℃预冷的 750 mL/L 乙醇固定细胞 1 h,以 PBS 洗涤细胞 1 次。加入含有 50 μg/mL 的 PI 和 100 μg/mL 的无 DNA 酶污染的 RNA 酶 PBS 染色液,置 4℃避光染色 1 h,上机检测。重复 3 次。

1.2.7 Transwell 小室法检测细胞迁移 小室下层加 500 μL 含 100 mL/LFBS 的 1640 培养液,上室加 250 μL 细胞悬液,细胞用含 2 mL/L 牛血清白蛋白的无血清 1640 培养液悬浮,密度为 2 × 10⁵ 个/mL。常规培养 24 h 后,将小室取出,用棉签擦去膜上层的细胞,用 1 g/L 的结晶紫染色膜 15 min,倒置显微镜下观察膜上细胞数,200 倍镜下随机选取 5 个视野计数,取平均值进行比较。重复 3 次。

1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差表示($\bar{x} \pm s$),采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,多组间差异采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 法。

2 结 果

2.1 Cy3 标记的阴性对照试剂细胞转染率

荧光显微镜下观察转染 Cy3 dye labeled Pre-miR Negative Control 的 HeLa 细胞见图 1。结果显示 90%以上的 HeLa 细胞可见荧光,说明细胞转染率达 90%。

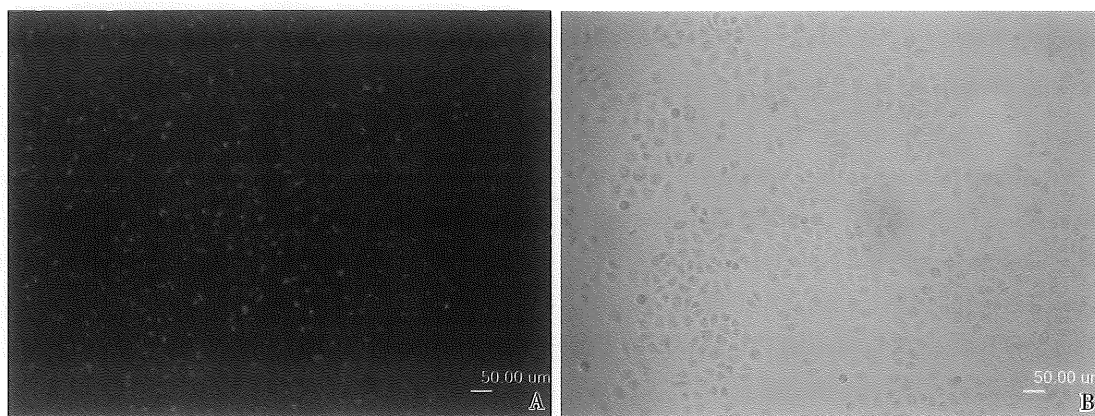


图1 转染 Cy3 dye labeled Pre-miR Negative Control 的 HeLa 细胞
Fig.1 HeLa cells transfected with Cy3 dye labeled Pre-miR negative control (×100)
A: fluorescent light; B: general light

2.2 定量 PCR 检测结果

应用实时定量 PCR 方法检测转染 hsa-miR-205 Precursor 后 HeLa 细胞中细胞 miR-205 表达溶解曲线呈单峰,显示引物的特异性较好。结果显

示,与组 4 相比,组 1 细胞 miR-205 表达增高 3061.5 倍(扩增曲线和溶解曲线见图 2)。

2.3 MTT 法检测细胞增殖结果

与组 4 相比,72 h 前 3 组细胞数分别为(126

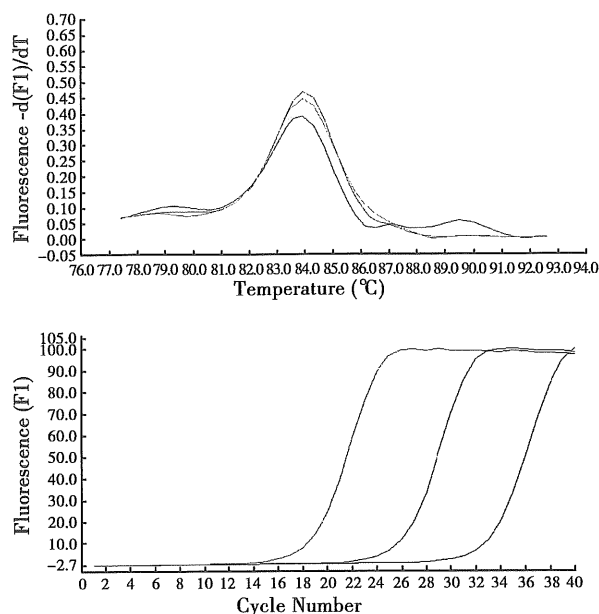


图2 miR-205 定量 PCR 检测
Fig.2 Real time PCR of miR-205

A: The melting curve of miR-205; B: The amplification curve of miR-205

$\pm 41\%$, $(126 \pm 39)\%$, $(114 \pm 34)\%$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。24、48、72 h 各组活细胞数比较 (图 3), 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

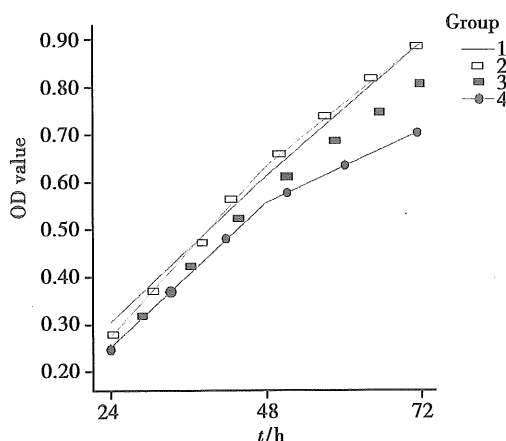


图3 转染 24, 48, 72 h 行 MTT 检测结果
Fig.3 MTT assay results 24, 48, and 72 h after transfection

2.4 克隆形成实验结果

各组克隆形成率分别为 $(79 \pm 11)\%$, $(63 \pm 10)\%$, $(54 \pm 14)\%$, $(48 \pm 5)\%$ 。组 1 与其余各组相比, 细胞克隆形成率明显增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且形成的克隆较大。而其余 3 组间两两比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4, 5)

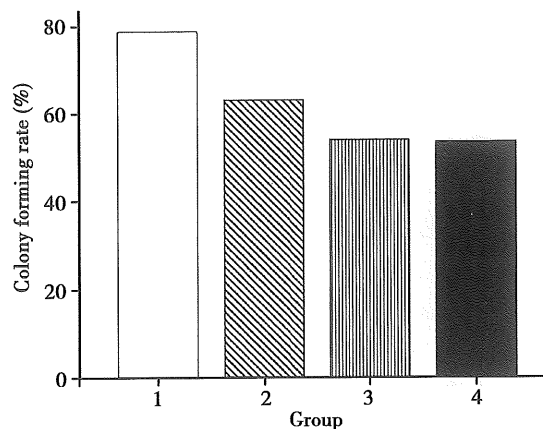


图4 各组克隆形成率比较

Fig.4 Comparison of colony forming rates in each group

2.5 流式细胞仪检测结果

各组凋亡率分别为 $(4.6 \pm 2.1)\%$, $(4.1 \pm 2.4)\%$, $(3.9 \pm 2.0)\%$, $(4.2 \pm 2.3)\%$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。细胞周期分布如图所示, 其中两组间 G_0/G_1 期, S 期的差异均有统计学意义 ($P < 0.001$, 图 6)。

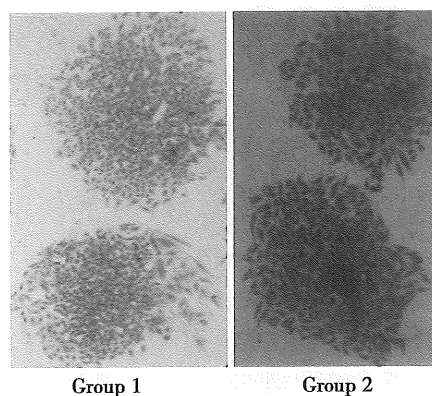


图5 100X 镜下组 1, 2 细胞形成的克隆
Fig.5 Cell colony in group 1 and 2 under 100 magnification field

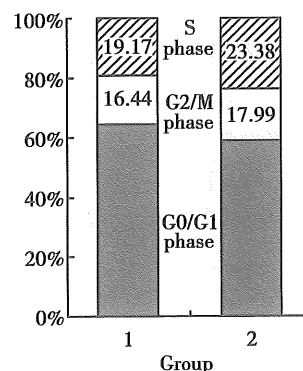


图6 组 1, 2 细胞周期分布的比较
Fig.6 Comparison of cell phase distribution in group 1 and 2

2.6 Transwell 小室法检测细胞迁移

200 倍镜下,平均每视野下迁移细胞数,各组分别为 63 ± 17 , 68 ± 16 , 72 ± 10 , 68 ± 14 , 差异无统计学意义($P > 0.089$)。

3 讨 论

3.1 miRNAs 与肿瘤

miRNAs 与肿瘤关系密切,可以癌基因、抑癌基因的方式发挥作用,将来可能用于肿瘤筛查、诊断、预后预测及肿瘤治疗。最先可将 miRNAs 看成抑癌基因的研究是在慢性淋巴性白血病(chronic lymphatic leukemia, CLL)中。CLL 患者经常丢失 13q14 片段,伴有 miR-15a 和 miR-16-1 表达下调。miR-15a 和 miR-16-1 能识别抗凋亡的癌基因 BCL-2 的端非翻译区,调控 BCL-2 表达。因此 13q14 片段缺失时 BCL-2 水平升高,促使 CLL 发生。在肺癌中,let-7 表达下降和术后生存率呈正相关,体外试验证实,肺腺癌细胞系中 let-7 表达可抑制细胞增殖。目前已发现 let-7 的靶基因包括 Ras 和 Myc,在肺癌组织标本中两种靶基因表达和 let-7 表达亦呈负相关。乳腺癌中 miR-21, 125b, 145, 155 表达下降,并和肿瘤分期、雌孕激素受体表达、增殖指数及血管侵犯相关。miRNA 也可作为癌基因存在,如肺癌中 miR-17-92 簇表达上调,预测其靶基因是抑癌基因 PTEN 和 RB2。乳头状甲状腺癌中,miR-221, 222, 146 表达升高,预测的靶基因包括 KIT^[2]。李晓霞等^[4]对鼻咽癌细胞与正常鼻咽上皮细胞行 miRNAs 芯片筛选,发现 miR-203 等存在差异表达,CCNG1 和 SPARC 可能是 miR-203 调控的靶基因,可能参与了鼻咽癌的发生发展。

3.2 miRNAs 与宫颈癌

miRNA 在宫颈癌发生发展中作用的研究较少。Muralidhar 等^[5]发现,50%以上浸润性宫颈鳞癌中存在 5p 片段获得,使 miRNAs 产生途径中的关键酶-Dorsha 酶拷贝数增加,由此带来的 miRNAs 水平改变可能是促使该类患者发病的因素之一。Lui 等^[6]对 6 个宫颈癌细胞株和正常宫颈组织研究发现,宫颈癌中 miR-143 表达下降,miR-21 表达升高,而 miR-21 正好位于 HPV16 整合位点之一,即脆性位点 FRA17B 区域中,但该研究未发现 HPV 编码的 miRNAs。Lee 等^[3]研究发现,宫颈鳞癌

和正常组织相比有 70 个基因呈差异性表达,其中下调 miR-199a 表达可抑制细胞生长。Martinez 等^[7]研究显示,HPV16E6 蛋白可抑制宫颈癌细胞 miRNA-218 的表达。我们课题组对宫颈鳞癌的研究表明,上调 miR-99b 表达可通过降低靶基因细胞分裂周期 25A 的表达,抑制宫颈鳞癌 SiHa 细胞增殖,诱导细胞凋亡,作者认为 miR-99b 可能成为宫颈癌治疗的靶基因^[8]。

在前期的研究中,我们应用 miRNA 芯片筛查了 10 例 HPV 阳性宫颈腺癌组织与癌旁组织差异表达的 miRNAs。结果显示在 HPV 阳性宫颈腺癌组织中,15 个 miRNA 表达差异,其中上调表达的 11 个,下调表达的 4 个。miR-205 在 HPV 阳性宫颈腺癌中下调表达,差异倍数为 11.15 倍,定量 PCR 也验证了芯片筛查结果。说明在 HPV 阳性宫颈腺癌组织中,存在 miR-205 表达下调。而 Lee 等^[9]研究发现,正常宫颈组织和 HeLa 细胞中 miR-205 表达分别是 8029、0 copy/cell,这也是本实验中转染常规剂量的 hsa-miR-205 Precursor 后,miR-205 的上调倍数如此之高的原因。

研究表面多种 miRNAs 能促进或抑制肿瘤细胞生长。如宫颈癌细胞中下调 miR-199a 表达,可抑制细胞生长。在胆管癌细胞中,分别下调 miR-141, miR-21, miR-200b 表达均可抑制细胞生长,而上调其表达均可促进细胞生长^[10]。本研究发现上调 miR-205 表达后,细胞生长情况不变,但增殖能力增强。MTT 法检测细胞生长和克隆形成实验检测增殖分别反映的是细胞生长和增殖,前者主要是群体细胞的生长情况,是增殖、凋亡等共同作用的结果,而后者是单个细胞对环境适应以及增殖能力,也可能和肿瘤干细胞样细胞所占比例大小有关。如 Yu 等^[11]研究发现 Let-7 可通过沉默多个靶位点,起到调节乳腺癌肿瘤起始细胞的干细胞样特性。上调 miR-205 后,克隆形成数增加,且形成的克隆较大,可能是增强单个肿瘤细胞的增殖能力,并且有可能增加肿瘤干细胞样细胞的比例。

miRNAs 可以促进或抑制凋亡,并且对细胞周期产生影响。如下调 miR-1d, 7, 148, 204, 210, 216, 296 表达促进 HeLa 细胞凋亡,而下调 miR-214 表达则抑制 HeLa 细胞凋亡^[12]。胆管癌中抑制 miR-200b, miR-21 表达可促进细胞凋亡,其中 PTEN 可能是 miR-21 调节凋亡的靶基因^[10]。miR-

16家族通过多个靶基因共同作用,阻止细胞从G₀/G₁期进入S期,靶基因之多反映了调控通路的复杂性^[13]。本研究发现上调 miR-205 虽不影响凋亡,但可阻止细胞从G₀/G₁期进入S期,这对化疗药物的使用及放疗计划的制定有一定的参考意义。

从首次认识 miRNA 至今十余年的时间,研究者对 miRNAs 寄予厚望,但认识仍较少,尤其是大部分 miRNA 的生物学功能尚未阐明。由于 miRNAs 与靶基因的结合不是完全互补,因此一个 miRNA 可能有数百个靶基因,而同一靶基因可能受多个不同的 miRNAs 调控。目前已知的人类 miRNAs 数目已达 418 个,在对肿瘤组织的 miRNAs 芯片筛查中,通常可以发现几十个差异表达的 miRNA,每个 miRNA 有可能通过直接或间接途径对肿瘤起作用,使得 miRNA 与肿瘤的研究极为复杂。通过生物信息学的方法,利用各种软件对 miRNA 靶基因进行预测,给 miRNAs 功能研究带来方便。同时可结合基因芯片筛查的方法,检测调控后细胞通路分子,癌基因、抑癌基因等改变情况,增加靶基因筛选的特异性。

3.3 本研究的不足与展望

本研究中有如下问题需进一步解决,①调控的倍数及检测时间。文献中,均未明确说明调控倍数的问题,是调控到正常细胞水平还是可能存在于一个最佳剂量尚未有研究探讨。调控倍数的高低和检测时间均可能对实验结果产生影响。本文中 hsa-miR-205 Precursor 的剂量及检测时间是参阅说明书及前人研究,但是否是最合理,仍不可知。②miRNAs 的作用可能是协同的,网络式的,将某一个 miRNA 挑出来研究可能会孤立地片面的看问题,蒙蔽了其它 miRNAs 的作用,产生虚假的结果。miRNA 作用之复杂,使其对不同生物学特性可能产生相互矛盾的结果,同样需要以整体的观点看待。

本研究成功上调宫颈癌 HeLa 细胞 miR-205 表达,调控后细胞增殖能力增强,细胞 G₀/G₁ 期阻滞,而细胞生长、凋亡和迁移能力无明显改变。结果说明 miR-205 可能对宫颈癌细胞的增殖和细胞周期有调控作用,但具体的作用机制以及靶基因的发现仍需更深入详细的实验来探讨。

参考文献:

- [1] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(7):522-531.
- [2] Medina PP, Slack FJ. MicroRNAs and cancer: an overview [J]. Cell Cycle, 2008, 7(16):2485-2492.
- [3] Lee JW, Choi CH, Choi JJ, et al. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(9):2535-2542.
- [4] 李晓霞,李瑞平,杜紫明,等. 鼻咽癌差异表达 miRNAs 筛选研究 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2007, (28)6:607-612.
- [5] Muralidhar B, Goldstein LD, Ng G, et al. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels [J]. Pathol, 2007, 212(4):368-377.
- [6] Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, et al. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67(13):6031-6043.
- [7] Martinez I, Gardiner AS, Board KF, et al. Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells [J]. Oncogene, 2008, 27(18):2575-2582.
- [8] 吴维光,孙小丽,陈 勃,等. 调控 microRNA-99b 表达对宫颈癌 SiHa 细胞增殖和凋亡的作用 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2008, 29(6):670-675.
- [9] Lee EJ, Baek M, Gusev Y, et al. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines and tumors [J]. RNA, 2008, 14(1):35-42.
- [10] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines [J]. Gastroenterology, 2006, 130(7):2113-2129.
- [11] Yu F, Yao H, Zhu P, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. Cell, 2007, 131(6):1109-1123.
- [12] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(4):1290-1297.
- [13] Linsley PS, Schelter J, Burchard J, et al. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(6):2240-2252.

(编辑 张恩健)