

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.03.007

· 基础研究 ·

## 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

廖珍媛, 秦娜琳, 李永菊, 陈超, 田丹, 罗军敏, 徐林(贵州省遵义医学院免疫学教研室, 贵州省免疫学研究生教育创新基地, 贵州 遵义 563003)

**[摘要]** **目的:** 构建 miRNA-126 的重组真核表达载体, 研究其对小鼠乳腺癌 4T1 细胞增殖和迁移的影响。**方法:** 设计合成 miRNA-126 的正义和反义寡核苷酸, 构建真核表达载体 pcDNA6.2-miR-126, 体外瞬时转染至 4T1 细胞, 荧光显微镜下观测转染效率。Real-time PCR 检测 4T1 细胞中 miRNA-126 的表达, MTT 法和克隆形成实验检测 4T1 细胞的增殖和克隆形成能力, 划痕法观察 4T1 细胞的体外迁移。**结果:** 成功构建 pcDNA6.2-miR-126 真核表达载体, 其可在 4T1 细胞中有效表达 miR-126。与转染空质粒组 (pcDNA6.2-Ctrl) 相比, 瞬时转染 72 h 后, pcDNA6.2-miR-126 转染组 4T1 细胞的体外增殖能力受到明显抑制 [ $(0.30 \pm 0.03)$  vs  $(0.51 \pm 0.04)$ ],  $P < 0.05$ ]; 瞬时转染 48 h 后, pcDNA6.2-miR-126 组 4T1 细胞迁移能力也受到明显抑制 [ $(8.17 \pm 2.30)$  vs  $(28.33 \pm 2.16)$  个,  $P < 0.05$ ]。**结论:** miRNA-126 过表达可抑制乳腺癌 4T1 细胞的增殖及迁移。

**[关键词]** miR-126; 真核表达; 乳腺癌; 4T1 细胞; 增殖; 迁移

**[中图分类号]** R737.9; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)03-0295-06

## Construction of miRNA-126 eukaryotic expression vector and its inhibitory effect on proliferation and migration of breast cancer cells

Liao Zhenyuan, Qin Nalin, Li Yongju, Chen Chao, Tian Dan, Luo Junming, Xu Lin (Department of Immunology, Immunology Graduate Education and Innovation Base of Guizhou Province, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct a recombinant eukaryotic expression vector encoding miRNA-126 and to explore its effect on proliferation and migration of mouse breast cancer 4T1 cells. **Methods:** Sense and antisense oligonucleotides of miRNA-126 were designed and synthesized respectively. The eukaryotic expression vector pcDNA6.2-miR-126 was constructed and transiently transfected into 4T1 cells *in vitro*. The transfection efficiency was observed under a fluorescent microscope. The expression level of miRNA-126 in 4T1 cells was determined by real-time PCR. The proliferation and colony formation ability of 4T1 cells were detected by MTT assay and colony formation assay. The migration of 4T1 cells *in vitro* was determined by scratch assay. **Results:** pcDNA6.2-miR-126 eukaryotic expression vector was successfully constructed and miRNA-126 was effectively expressed in 4T1 cells. Compared with that in empty plasmid transfected group (pcDNA6.2-Ctrl), the proliferation capacity of 4T1 cells *in vitro* was obviously decreased in pcDNA6.2-miR-126 transfected group after transient transfection for 72 hours ( $[0.30 \pm 0.03]$  vs  $[0.51 \pm 0.04]$ ,  $P < 0.05$ ). The migration capacity of 4T1 cells in pcDNA6.2-miR-126 transfected group was also significantly inhibited after transfection for 48 hours ( $[8.17 \pm 2.30]$  vs  $[28.33 \pm 2.16]$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Overexpression of miRNA-126 may inhibit the proliferation and migration of breast cancer 4T1 cells.

**[Key words]** miRNA-126; eukaryotic expression; breast cancer; 4T1 cell; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(3): 295-300]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81260398); 贵州省国际合作项目(No. 10C315); 贵州省联合基金资助项目(No. 2011-51)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81260398), the International Cooperation Foundation of Guizhou Province (No. 10C315), and the Collaborative Foundation of Guizhou Province (No. 2011-51)

**[作者简介]** 廖珍媛(1986-), 女, 广西壮族自治区河池市人, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究。E-mail: liaozhenyuan1109@163.com

**[通信作者]** 徐林(Xu Lin, corresponding author), E-mail: xulinzhouya@163.com

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是近年来发现的一种小分子非编码 RNA, 其稳定表达于生物体的各种组织细胞, 广泛参与了生物体发育、细胞增殖和凋亡、肿瘤发生以及炎症反应等多种生理和病理过程<sup>[1-4]</sup>。大量研究<sup>[5-6]</sup>显示, miRNA 在乳腺癌细胞生长和转移中发挥重要的调控作用, 参与乳腺癌的发生、发展过程。miR-126 是新近报道的 miRNA 家族成员之一, 其基因定位于小鼠第 2 号染色体的 *EGFL7* 基因 7 号内含子中<sup>[7-8]</sup>。研究<sup>[9-10]</sup>发现, miR-126 参与调控乳腺癌细胞的发生、侵袭及迁移, 然而, miR-126 参与乳腺癌发生、发展的具体分子机制亟待进一步探究。本研究旨在构建 miRNA-126 的真核表达载体, 鉴定其表达活性, 并探究其体外对乳腺癌细胞生长及迁移的影响, 为后续深入研究 miR-126 在乳腺癌发生、发展中的作用机制及基于 miR-126 的乳腺癌治疗策略提供前期实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

小鼠乳腺癌细胞株 4T1 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  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 *Bam*H I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, MTT、DMSO 试剂购自 Sigma 公司, RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司, 优质胎牛血清购自 Solarbio 公司, 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 Fermentas 公司, SYBR Premix Ex Taq real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-miR 真核表达载体和 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; 分析纯级异丙醇、无水乙醇、甲醛、结晶紫购自重庆川东化工公司, 生化培养基购自苏州净化设备厂, 二氧化碳培养箱购自 Thermo 公司, C1000<sup>TM</sup> Thermal cycler real-time PCR 仪、S1000<sup>TM</sup> Thermal cycler PCR 仪购自 Bio-Rad 公司, TD5A-WS 台式低速离心机购自湘仪仪器公司, IX-51 倒置显微镜、IX-71 倒置荧光显微镜购自 Olympus 公司。

### 1.2 靶向 miR-126 的 siRNA 设计与合成

用 BLAST 检索出 miRBase 数据库中 miR-126 的成熟序列, 进而合成 miRNA-126 特异性干扰片段。为提高序列正确退火成为双链 DNA 分子的效率, 将包含目的小干扰 RNA 序列的 DNA 设计为 miR-126 序列的正义链和反义链寡核苷酸序列。正义链模板的 5' 端添加了 TGCT, 与载体的黏端互补; 反义链模板的 5' 端添加了 CCTG, 与载体的黏端互

补; 因为 siRNA 的第 1 个碱基不是 G, 所以在 TGCT 后补加 1 个 G。miR-126 正义序列: 5'-TGCTGCAT-TACTACTTTTGGTACGCGCTGTGACACTTCAAACCTCGTACCGTGAGTAATAATG-3', 反义序列: 5'-CCT-GCCGATTACTACGCGTACGAGTTTGAAGTGTCA-CAGCGGTACCAAAAGTAATAATCC-3'。所有序列由上海生物工程有限公司合成。

### 1.3 构建重组 pcDNA6.2-miR-126 质粒

正义链和反义链寡核苷酸片段溶解及退火配成双链, 其反应体系为: 200  $\mu$ mol/L 正义链寡核苷酸 5  $\mu$ l, 200  $\mu$ mol/L 反义链寡核苷酸 5  $\mu$ l, 10  $\times$  寡核苷酸退火缓冲液 2  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ l, 总体积 20  $\mu$ l。其反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 加热 5 min, 放置室温冷却 10 min, 形成双链寡核苷酸。步骤为: 将以上混合物于 PCR 仪上 95  $^{\circ}$ C 加热反应 5 min, 取出样品, 冷却至室温退火 10 min。退火处理后进行连接反应。连接反应: 5  $\times$  连接缓冲液 4  $\mu$ l, pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 2  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 9  $\mu$ l, oligo(10 nm) 4  $\mu$ l, T4 DNA 连接酶 1  $\mu$ l, 总体积 20  $\mu$ l, 室温连接 1 h 后转化。挑取 6 个连接反应的菌落, 接种到含 10  $\mu$ g/ml 含壮观霉素的 LB 培养基中。质粒小抽法抽提质粒, 并用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。重组质粒命名为 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-126 (简称为 pcDNA6.2-miR-126) (图 1), 送上海生物工程有限公司进行测序, 并用 Chromas 软件将测序所得到的序列与原设计寡核苷酸序列进行比对分析。

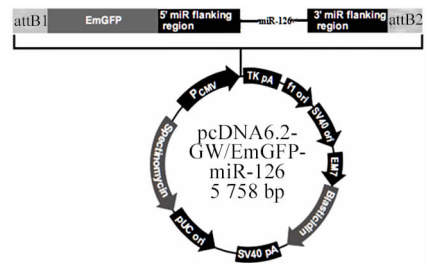


图 1 pcDNA6.2-miR-126 质粒图谱

Fig. 1 pcDNA6.2-miR-126 plasmid map

### 1.4 pcDNA6.2-miR-126 瞬时转染 4T1 细胞

选择小鼠乳腺癌细胞株 4T1, 用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素及 2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 细胞培养液, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 4T1 细胞, 当细胞汇合度达 80% ~ 90% 时, 按 3  $\times$  10<sup>4</sup> 个/ml 细胞接种于 24 孔板中培养。按转染试剂说明书, 采用脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 分别将 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 空白

对照质粒(命名为 pcDNA6.2-Ctrl)或 pcDNA6.2-miR-126 重组质粒转染入 4T1 细胞。采用 Opti-MEM 优化培养基稀释脂质体和质粒;转染 24、48 h 后,倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达,转染后细胞命名为 Ctrl-4T1 细胞和 miR-126-4T1 细胞。

### 1.5 Real-time PCR 检测细胞 miR-126 的表达

收集转染后的细胞,用 TRIzol 试剂抽提总 RNA。采用 miR-126 反转录引物对 RNA 样品进行转录,利用 real-time 法对样品中 miR-126 表达水平进行检测和比较分析<sup>[7]</sup>。miR-126 反转录条件:16 °C、30 min;42 °C、30 min;85 °C、30 min;4 °C 保存。GAPDH 反应条件:42 °C、1 h;70 °C、10 min;4 °C 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 °C、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。用 SYBR-Green 荧光染料法于 real-time PCR 仪检测 miR-126 和 GAPDH 的表达,miR-126 上游引物:5'-ACACTCCAGCTGGGTCGTACCGTGAGTAAT-3',下游引物:5'-TGGTGTCTGGAG GAGTC-3'; GAPDH 上游引物:5'-GAAGGTCCGAGTCAACGGATT-3',下游引物:5'-ATGGGTGGAATCATATTGAA-3'。miR-126 反应条件:95 °C、5 min,95 °C、15 s,60 °C、15 s,共 40 个循环。GAPDH 反应条件:95 °C、10 min,95 °C、15 s,60 °C、1 min,共 50 个循环。84 °C 采集荧光信号,反应完成后,绘制溶解曲线。miR-126 的表达量以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算。

### 1.6 MTT 实验检测转染 pcDNA6.2-miR-126 后 4T1 细胞的增殖

分别收集转染 24 h 后的细胞制备成单细胞悬液,调整细胞密度至  $1 \times 10^4$  个/ml,接种于 96 孔培养板,每孔加 200 μl,每组细胞设 6 个复孔。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 全湿度培养 72 h,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 二甲基亚砷(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)值。

### 1.7 克隆形成实验检测 4T1 细胞的克隆形成能力

收集 Ctrl-4T1 细胞和 miR-126-4T1 细胞,制成细胞悬液,细胞悬液反复吹打,使细胞充分分散;细胞记数,并用培养基调节细胞密度;将细胞悬液按每孔 100、200、400、600、800、1 000 个细胞分别接种 2 ml 细胞悬液至 6 孔板中,轻轻晃动使细胞分散均匀;置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 中培养 10 ~ 15 d,中间根据培

养液变化适时更换新鲜培养液,当出现肉眼可见克隆时,终止培养,倒掉孔里的培养液,PBS 小心洗涤 2 次,空气干燥,4% 多聚甲醛固定 30 min,空气干燥,用 1% 结晶紫染液染色 30 min,洗去染液,干燥后拍照。

### 1.8 划痕实验检测 pcDNA6.2-miR-126 转染后 4T1 细胞的体外迁移

收集 4T1 细胞,按  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,培养 12 h;分别转染 pcDNA6.2-Ctrl 或 pcDNA6.2-miR-126,培养 6 h;用 1 ml 枪头沿板中线刮出 2 mm 刮痕,PBS 洗涤 3 次,显微镜下观察刮痕内无细胞,加上培养液,继续培养 48 h;吸去培养上清,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;倒掉孔里的培养液,PBS 洗涤 2 次,空气干燥,每孔加入 4% 多聚甲醛 1 ml,固定 30 min,弃甲醛后空气干燥,用 1% 的结晶紫染液染色 30 min;用三蒸水小心洗去染液,空气干燥后拍照。

### 1.9 统计学处理

采用 GraphPad Prism™ 统计软件,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验或方差分析, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 pcDNA6.2-miR-126 阳性克隆的 PCR 鉴定

正、反义 miRNA-126 寡核苷酸退火后与酶切后的 pcDNA6.2-GW/EmGFP 连接,连接产物转化入 DH5 $\alpha$  感受态细胞,壮观霉素抗性筛选培养 12 h 后随机挑取 6 个克隆,分别培养 16 h。PCR 鉴定,电泳结果显示均可见 277 bp 大小的目的条带(图 2),提示所挑取的 6 个克隆均为阳性克隆。

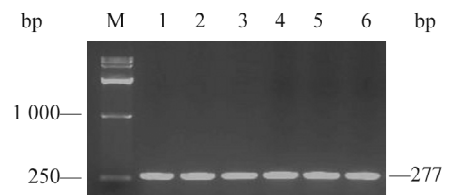


图 2 pcDNA6.2-miR-126 质粒的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of pcDNA6.2-miR-126 plasmid by PCR  
M: Marker; 1-6: Distinct clones amplified by PCR

### 2.2 成功构建 pcDNA6.2-miR-126 重组质粒

pcDNA6.2-miR-126 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,并进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后,可见约 5.6 kb 的线性化 pcDNA6.2-GW/EmGFP 及 155 bp 大小的

目的条带(图3)。DNA 测序结果(图4)显示,插入片段与 GenBank 中人 miR-126 序列完全一致。结果表明,重组载体 pcDNA6.2-miR-126 构建成功。

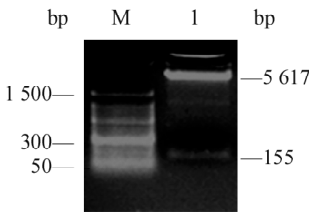


图3 pcDNA6.2-miR-126 质粒的 BamHI /Xho I 双酶切鉴定  
Fig.3 Identification of pcDNA6.2-miR-126 plasmid by BamHI /Xho I double digestion

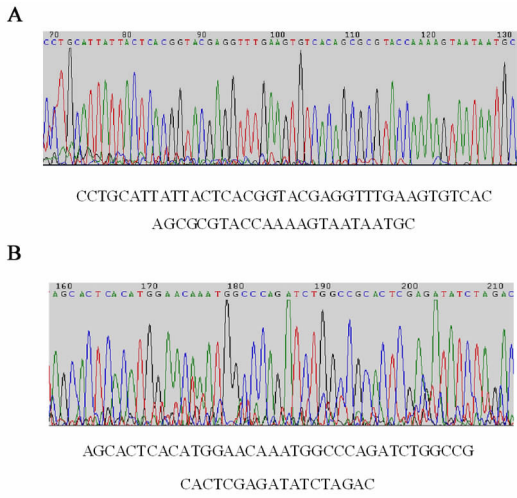


图4 pcDNA6.2-miR-126 和 pcDNA6.2-Ctrl 质粒的测序结果

Fig.4 Sequencing results of pcDNA6.2-miR-126 and pcDNA6.2-Ctrl plasmids

A: pcDNA6.2-miR-126; B: pcDNA6.2-Ctrl

### 2.3 pcDNA6.2-miR-126 转染上调 4T1 细胞 miR-126 的表达

pcDNA6.2-miR-126 转染小鼠乳腺癌 4T1 细胞 48 h 后,倒置荧光显微镜观察 4T1 细胞的转染效率,结果可见 40% 左右的细胞为 GFP 阳性(图5)。进一步利用 real-time PCR 特异性探针法检测了各组细胞中 miR-126 成熟体的表达水平,结果显示,与 Ctrl-4T1 细胞相比,miR-126-4T1 细胞中 miR-126 成熟体的表达水平显著增加[(2.6 ± 0.6) vs (1.1 ± 0.3), P < 0.05],提示 pcDNA6.2-miR-126 真核载体可有效表达 miR-126 成熟体。

### 2.4 pcDNA6.2-miR-126 转染抑制 4T1 细胞的增殖

MTT 实验结果(图6)显示,光镜下观察发现,pcDNA6.2-miR-126 转染 4T1 细胞 72 h 后,细胞数明显少于 pcDNA6.2-Ctrl 质粒转染组;与 Ctrl-4T1 细胞相比,miR-126-4T1 细胞的增殖能力明显降低,转染 72 h 后 D 值为(0.30 ± 0.03),而对照组 Ctrl-4T1 细胞 D 值为[(0.51 ± 0.04), P < 0.05],增殖抑制率为(42 ± 1.1)%。结果提示,pcDNA6.2-miR-126 转染抑制 4T1 细胞的增殖。

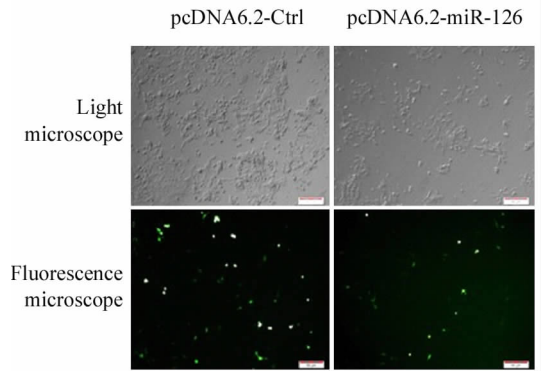


图5 pcDNA6.2-miR-126 转染 4T1 细胞后 GFP 的表达(×100)

Fig.5 Expression of the GFP in 4T1 cells transfected with pcDNA6.2-miR-126 (×100)

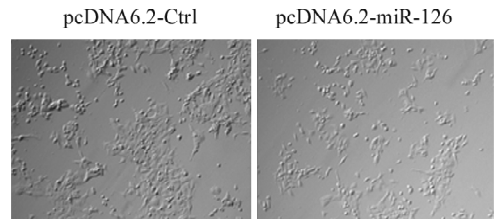


图6 pcDNA6.2-miR-126 转染抑制 4T1 细胞的增殖(×100)

Fig.6 Transfection of pcDNA6.2-miR-126 inhibited the proliferation of 4T1 cells (×100)

### 2.5 pcDNA6.2-miR-126 转染对 4T1 细胞体外克隆形成的影响

克隆形成实验结果(图7)显示,100 和 800 个/孔的接种条件下,pcDNA6.2-miR-126 转染组中 4T1 细胞克隆形成数较对照质粒转染组均明显降低[(13 ± 3) vs (32 ± 3)个,(132 ± 3) vs (256 ± 4)个;均 P < 0.05]。结果说明,pcDNA6.2-miR-126 不仅抑制乳腺癌 4T1 细胞的增殖,同时也影响其克隆形成的能力。

### 2.6 pcDNA6.2-miR-126 转染抑制 4T1 细胞的迁移

为了进一步明确真核载体 pcDNA6.2-miR-126

表达的 miR-126 成熟体的生物学活性,采用划痕法观察 4T1 细胞体外迁移能力的改变。结果(图 8)显示,与 Ctrl-4T1 细胞相比,miR-126-4T1 细胞的体外迁移能力受到显著抑制,48 h 后的细胞迁移数为  $(8.17 \pm 2.32)$  个,而 Ctrl-4T1 细胞的迁移数为  $[(28.33 \pm 2.16)$  个,  $P < 0.05$ ]。结果说明,pcDNA6.2-miR-126 转染可抑制 4T1 细胞的迁移。

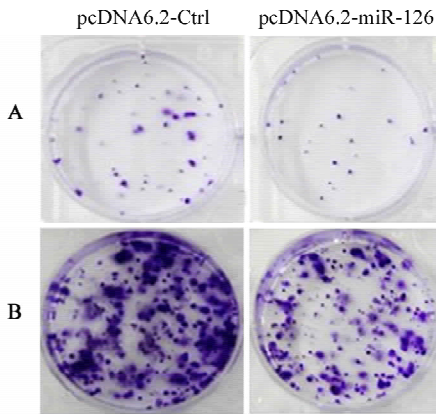


图 7 pcDNA6.2-miR-126 转染抑制 4T1 细胞的克隆形成能力

Fig. 7 pcDNA6.2-miR-126 transfection inhibited the colony formation ability of 4T1 cells

A: 100 cells/well group; B: 800 cells/well group

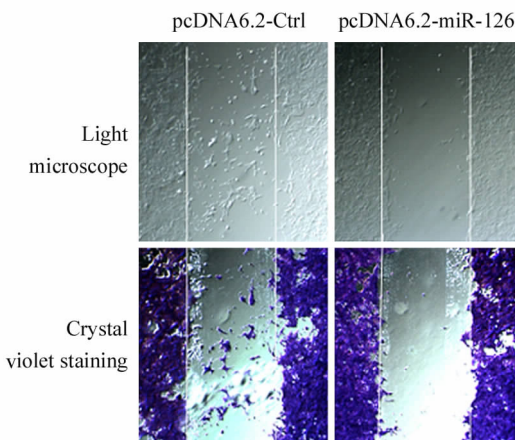


图 8 pcDNA6.2-miR-126 转染抑制 4T1 细胞的体外迁移(×100)

Fig. 8 pcDNA6.2-miR-126 transfection inhibited migration of 4T1 cells *in vitro* (×100)

### 3 讨论

近年来研究显示,miRNA 与乳腺癌的发生、发展密切相关,其中有些 miRNA 分子促进乳腺癌的发

生,而有些 miRNA 分子则抑制乳腺癌的生长。研究<sup>[11-12]</sup>报道,miR-21 在乳腺癌细胞中过表达,抑制乳腺癌细胞中 miR-21 的表达能够抑制乳腺癌细胞体内、外的生长,其作用与下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达有关。另一方面,乳腺癌细胞中 miR-125a 的表达降低,其直接的功能性靶点是 HuR,因此,miR-125a 表达降低可导致其靶点癌基因 *HuR* 的表达增加,从而促进肿瘤生长<sup>[13]</sup>。以上研究表明,miRNA 是乳腺癌发生、发展中重要的调控分子,因此,深入研究 miRNA 分子在乳腺癌发生发展中的作用及其机制可为乳腺癌的诊断和基因治疗提供重要线索。

miR-126 是新近报道的 miRNA 家族成员之一。研究<sup>[9-10]</sup>显示,其参与调控乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭。在本研究中,首次利用基于 CMV 启动子的 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 载体来构建 miRNA-126 的真核表达载体,并观察了其表达活性。将设计合成的 miR-126 正义和反义寡核苷酸链退火后,以 T4 DNA 连接酶进行连接,转化至 DH5 $\alpha$  后,分别经 PCR、酶切以及测序验证,结果表明,成功构建真核表达载体 pcDNA6.2-miR-126。进一步将 pcDNA6.2-miR-126 瞬时转染至小鼠乳腺癌 4T1 细胞后发现,转染组细胞 miR-126 成熟体的表达水平显著增加,说明该载体可以有效表达 miR-126 成熟体。本研究还发现 pcDNA6.2-miR-126 表达的 miR-126 可显著抑制 4T1 细胞的体外增殖。研究<sup>[14]</sup>发现,miR-126 通过调控靶基因 *PI3K* 信号抑制结肠癌细胞的生长;另外,Liu 等<sup>[16]</sup>的研究显示,肺癌细胞中 miR-126 表达减少,将 miR-126 转染肺癌细胞,可以抑制肺癌细胞的生长。以上研究均提示,miR-126 可能在包括乳腺癌在内的多种肿瘤生长中发挥了重要的调控作用。

本研究发现 pcDNA6.2-miR-126 转染后,4T1 细胞的体外迁移能力也显著削弱,提示 miR-126 还可调控乳腺癌 4T1 细胞的迁移能力。Tavazoie 等<sup>[5]</sup>的研究发现,复发性与转移性乳腺癌患者中 miR-126 的表达显著减少,且其功能主要是阻断乳腺癌细胞的转移。此外,Liu 等<sup>[15]</sup>报道,将 miR-126 转染肺癌细胞可以显著降低 VEGF-A 的表达,抑制肺癌细胞的迁移能力。研究<sup>[16-19]</sup>还发现,miR-126 可以抑制白血病细胞 PLK2 的表达,并与 PLK2 的 3'-UTR 相结合,抑制白血病的转移。以上结果均表明,miR-126 可以作用于多种肿瘤细胞靶分子,参与肿瘤转移的调控;然而 miR-126 调控乳腺癌细胞迁移、侵袭的具体机制仍待进一步深入研究。

总之,本研究成功构建了靶向 miR-126 的真核

表达载体,为后续进一步探讨 miR-126 在乳腺癌发生和转移中的作用,以及基于 miR-126 的乳腺癌治疗策略提供了前期实验基础。

## 【参考文献】

- [ 1 ] Barte DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [ J ]. Cell, 2004, 116( 2 ): 281-297.
- [ 2 ] Ambros V. The functions of animal microRNAs [ J ]. Nature, 2004, 431( 7006 ): 350-355.
- [ 3 ] 徐林,任涛,周涯,等. 微小 RNA-7 对人肺癌 95D 细胞体外增殖的作用 [ J ]. 肿瘤, 2010, 30( 9 ): 763-767.
- [ 4 ] 徐林,任涛,秦安东,等. MicroRNA-7 对人肺癌 95D 细胞体外侵袭的作用 [ J ]. 遵义医学院学报, 2011, 34( 1 ): 12-16.
- [ 5 ] Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [ J ]. Nature, 2008, 451( 7175 ): 147-152.
- [ 6 ] Weigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: Markers and models [ J ]. Nature Rev Cancer, 2005, 5( 8 ): 591-602.
- [ 7 ] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis [ J ]. Dev Cell, 2008, 15( 2 ): 261-271.
- [ 8 ] Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity [ J ]. Dev Cell, 2008, 15( 2 ): 272-284.
- [ 9 ] Guan P, Yin Z, Li X, et al. Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues [ J ]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 31( 1 ): 54-62.

- [ 10 ] Ma YY, Tao HQ. Microribonucleic acids and gastric cancer [ J ]. Cancer Sci, 2012, 103( 4 ): 620-625.
- [ 11 ] Lehmann U, Streichert T, Otto B, et al. Identification of differentially expressed microRNAs in human male breast cancer [ J ]. BMC Cancer, 2010, 10( 1 ): 109-118.
- [ 12 ] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. Mir-21-mediated tumor growth [ J ]. Oncogene, 2007, 26( 19 ): 2799-2803.
- [ 13 ] Guo X, Wu Y, Hartley RS. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting Hur in breast cancer [ J ]. RNA Biol, 2009, 6( 5 ): 575-583.
- [ 14 ] Guo C, Sah JF, Beard L, et al. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers [ J ]. Genes Chromosomes Cancer, 2008, 47( 11 ): 939-946.
- [ 15 ] Liu B, Peng XC, Zheng XL, et al. miR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines *in vitro* and *in vivo* [ J ]. Lung Cancer, 2009, 66( 2 ): 169-175.
- [ 16 ] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [ J ]. Cell, 2005, 120( 1 ): 15-20.
- [ 17 ] Krek A, Grun D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions [ J ]. Nat Genet, 2005, 37( 5 ): 495-500.
- [ 18 ] John B, Enright AJ, Aravin A, et al. Human microRNA targets [ J ]. PLoS Biol, 2004, 2( 11 ): 1862-1879.
- [ 19 ] Li Z, Lu J, Sun M, et al. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105( 40 ): 15535-15540.

【收稿日期】 2013-01-25

【修回日期】 2013-03-20

【本文编辑】 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1)生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2)各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3)限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam* H I、*Sal* I 等。(4)各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5)各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外),例如长度 *l*、面积 *A* (或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。(6)化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。(7)数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8)英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)