

微小 RNA-122 降低乳腺癌细胞 Warburg 效应抑制其增殖、侵袭的作用机制研究

王瑾 杨毅 盛泳佳 李文燕 韩晨阳

【摘要】目的 研究微小 RNA-122(miRNA-122)通过降低 Warburg 效应抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭的机制。**方法** 荧光素酶报告基因验证 miRNA-122 与 M 型丙酮酸激酶(PKM)和柠檬酸合酶(CS)的关系。以人乳腺癌 MCF-7 细胞株为对象,将细胞分为 Con 组和 miRNA-122 组,Con 组不作转染,miRNA-122 组转染 miRNA-122 类似物。以流式细胞术检测细胞周期的改变,CCK-8 法检测细胞增殖能力,克隆形成实验检测肿瘤细胞克隆形成能力,Transwell 小室试验检测肿瘤细胞侵袭能力,同时检测细胞的葡萄糖消耗量和乳酸产生水平,Western blot 检测糖代谢关键酶 PKM、CS、己糖激酶(HK)的表达水平。**结果** 荧光素酶报告基因结果显示,PKM 和 CS 是 miRNA-122 的靶基因。MCF-7 细胞转染 miRNA-122 类似物后,G0/G1 期细胞比例显著增高,而 G2/M、S 期细胞比例下降;细胞增殖率下调,miRNA-122 组细胞增殖率低于 Con 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 Con 组比较,miRNA-122 组细胞克隆形成能力、肿瘤侵袭能力下降,同时葡萄糖利用率和乳酸水平降低,HK、PKM 表达水平下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** miRNA-122 可以通过靶向抑制肿瘤细胞糖代谢酶的表达,降低细胞糖代谢水平,从而抑制乳腺癌的转移和侵袭。

【关键词】 乳腺癌 微小 RNA-122 糖代谢 转移 增殖

MicroRNA-122 inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells through decreasing Warburg effect WANG Jin, YANG Yi, SHENG Yongjia, et al. Department of Pharmacy, the Second Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314001, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of microRNA-122 (miRNA-122) on the proliferation and invasion of breast cancer cells and its mechanism. **Methods** Luciferase reporter gene was used to validate the relationship between M pyruvate kinase (PKM) and citrate synthase (CS) targeting by miRNA-122. Breast cancer MCF-7 cells were transfected with miRNA-122 analogues. Flow cytometry was used to detect cell cycle changes, CCK-8 assay was used to detect cell proliferation, clonogenesis assay was used to detect tumor cell clonogenesis, Transwell chamber was used to detect tumor cell invasion. Cell utilization of glucose and lactate production was also detected, and the expression of glycometabolism enzymes PKM, CS and hexokinase (HK) was detected with Western blot. **Results** Luciferase reporter gene analysis showed that PKM and CS were the target genes of miRNA-122. After transfected with miRNA-122 analogue, the proportion of G0/G1 phase increased significantly in MCF-7 cells, while the proportion of G2/M and S phase decreased, and the cell proliferation rate decreased ($P<0.05$). Compared with control group, the ability of cell clone formation and tumor invasion were decreased, the utilization rate of glucose was decreased, the level of lactic acid was decreased, and the expression levels of HK and PKM was down-regulated in miRNA-122 group ($P<0.05$). **Conclusion** MicroRNA-122 can reduce glycometabolism by targeting the expression of glycometabolism enzymes in breast cancer cells, resulting in the inhibition of cell proliferation and invasion.

【Key words】 Breast cancer MicroRNA-122 Glycometabolism Metastasis Proliferation

近几年来研究表明,肿瘤为了逃避代谢压力,发生了转移,这个过程需要能量支持,同时伴随着物质代

谢^[1-3]。正常细胞的能量代谢以有氧糖代谢为主,而肿瘤细胞以无氧糖酵解的代谢方式为主,这种代谢方式可以使得肿瘤获得更高的侵袭能力,逃避正常的细胞凋亡程序。正常细胞中糖类代谢的主要方式是有氧代谢,在缺氧条件下则发生糖酵解,产生乳酸^[4-5]。研究证实,肿瘤细胞即使在有氧环境中依然进行无氧糖酵解,而不经过程线粒体的氧化磷酸化过程^[6],因此调控肿瘤物质能量代

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.16.2019-391

基金项目:浙江省医药卫生科技计划面上项目(2019KY695)

作者单位:314001 嘉兴市第二医院药学部

通信作者:韩晨阳,E-mail:691513770@qq.com

谢成了肿瘤治疗新的方向。

微小 RNA-122 (microRNA, miRNA) 是一种 <20nt 的非编码 RNA, 可以结合到 mRNA 编码区, 影响蛋白质合成, 在细胞生理和病理过程中发挥着重要的调控作用。乳腺癌存在多种 miRNA 的异常表达, 其中 miRNA-122 在乳腺癌中呈低表达。研究表明, miRNA-122 在乳腺癌中的表达水平直接影响到肿瘤患者的预后, 但是 miRNA-122 低表达的调控原因不明, 其作用机制也尚未明确^[7-8]。课题组前期研究发现, miRNA-122 是 M 型丙酮酸激酶 (pyruvate kinase M, PKM) 和柠檬酸合酶 (citrate synthase, CS) 的调控非编码 RNA。PKM 和 CS 是糖代谢的关键酶, 其表达水平可以影响糖酵解过程, 尤其是 PKM 表达增高可以促进肿瘤细胞对于葡萄糖的摄取和利用, 提高其代谢水平。本研究拟以人乳腺癌细胞为对象, 从能量代谢的角度探讨 miRNA-122 抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂 人乳腺癌细胞株 MCF-7、DMEM 高糖培养基购于武汉普诺赛生命科技有限公司 (批号: CL-0149、158758)。miRNA-122 mimic 购于德国 QiAGEN 公司 (批号: Q1854241); cDNA 试剂盒购于凯基生物技术有限公司 (批号: KGA1311); 实时定量 PCR 试剂盒/SYBR Green Real time PCR Master Mix 购于 Sinobio 公司 (批号: E090); 总 RNA 提取试剂盒 (Trizol 法) 购于 BioTeKe 公司 (批号: RP2041); 双荧光素酶检测试剂盒、T4 DNA 连接酶和感受态大肠杆菌 DH5 α 购于 Promega 公司 (批号: A18243654、M1794185、D1814522); Opti-MEM 无血清培养基购于 Gibco 公司 (批号: 15685); CCK-8 检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司 (批号: C0037); PKM 和 CS 单克隆抗体购于 Cell signaling technology 公司 (批号: 3827、14309); GOD-POD 法葡萄糖检测试剂盒、乳酸检测试剂盒 (乳酸脱氢酶法) 购于北京雷根生物技术有限公司 (批号: TC0711、TC0731)。

1.2 方法

1.2.1 荧光素酶报告基因验证 miRNA-122 和 PKM、CS 的调控关系 设计野生型 PKM 的 3' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 片段, 序列为 3'-CUGUCCUHCAGCA-AACACUCCA-5', 突变型序列为 3'-CUGUCCUGCAG-CAACCUCACAC-5'。野生型 CS 的 3'UTR 片段序列为 3'-GAAAGGAUUAAGAUAACAACUCCU-5', 突变型序列为 3'-GAAAGGAUUAAGAUCUACGACU-5'。序列设计合成由吉玛生物公司完成, 并进行质粒的构建, 试验所

用的质粒为实验室原有。PCR 扩增条件为: 反应体系 50 μ l, 95 $^{\circ}$ C 预热 4min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 5 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。将切胶回收的产物和载体酶切, T4 DNA 连接酶线性化后与 CD163 3'UTR 片段连接, 取连接产物转化至感受态大肠杆菌 DH5 α 筛选阳性克隆。将 miRNA-122 转染后, PBS 洗涤 1 次, 加入裂解缓冲液后剧烈震荡 15min, 然后移入 1.5ml 离心管, 10 000r/min 离心 1min 后, 取上清液 20 μ l 加入 96 孔板, 采用多功能酶标仪检测荧光素酶活性。

1.2.2 细胞分组及 miRNA-122 类似物 (mimic) 转染 MCF-7 细胞体外采用 DMEM 高糖培养基培养, 待细胞长至对数期后消化, 将细胞分为 Con 组和 miRNA-122 组, Con 组为未行 miRNA-122 转染的细胞; miRNA-122 组进行 mimic 的转染。将 mimic 加入用 DEPC 处理的双蒸水, 稀释浓度为 100nmol/ μ l, 将细胞接种至培养皿中, 调节细胞浓度为 7×10^5 /ml, 每孔体积 1ml。细胞贴壁后进行转染, 500 μ l 的 opti-MEM 培养基中加入 20 μ l 的 mimic 溶液, 将细胞培养基更换成混合了 mimic 的无血清 DMEM 培养基。转染后 12h 弃去培养基, 更换成 DMEM 完全培养基过夜培养。

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期 Con 组和 miRNA-122 组细胞接种在 6 孔板中贴壁培养 24h, 之后弃去培养基, 加入 500 μ l 胰蛋白酶消化细胞, 以 PBS 洗涤 2~3 次后, 3 000r/min 离心 10min, 收集细胞, 加入 PI 染液 50 μ l, 避光染色 15min, 洗去染液后上机检测。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力 将 Con 组和 miRNA-122 组细胞接种到 96 孔板中, 设置 3 组平行对照, 待细胞贴壁后继续培养 6、12、24、48h 后检测细胞活力。弃去每孔的培养基后加入新鲜培养基 100 μ l, 同时加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液继续孵育 4h。轻轻摇匀培养板后, 在 450nm 处检测 OD 值, 同时设置空白培养基为空白对照。细胞增殖能力 (%) = (OD 实验组 - OD 空白对照) / OD 空白对照 $\times 100\%$ 。

1.2.5 克隆形成实验 收集 Con 组和 miRNA-122 组细胞, 调整细胞浓度为 500~1 000 个/孔, 接种到 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔, 同时采用含有 30% FBS 的 DMEM 培养基培养, 每隔 3d 观察细胞状态。待细胞形成克隆后 (2 周时间), 弃去培养基, PBS 清洗 2 次后加入多聚甲醛固定, 每孔加入结晶紫染色液 1ml, 摇匀后染色 2min, 弃去染色液后双蒸水洗 2~3 次, 拍照后计算克隆形成数。

1.2.6 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力 Con 组

和 miRNA-122 组细胞加入 Transwell 小室,待细胞贴壁后,上室用无血清的 DMEM 培养基培养,下室加入 10%FBS 的 DMEM 完全培养基培养,培养 24h 后取出小室,弃去培养基,甲醇固定后用 0.1% 的结晶紫染色,棉签擦去上层未迁移的细胞后,镜下计算迁移的细胞数。

1.2.7 Western blot 检测糖代谢关键酶 HK、PKM、CS 的表达水平 Con 组和 miRNA-122 组细胞培养 48h 后,弃去培养基,收集细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 RIPA 蛋白裂解液冰上裂解细胞 30min,离心后取上清液,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,经过 SDS-PAGE 凝胶电泳,PVDF 转膜,脱脂奶粉封闭,加入一抗孵育过夜后以 TBST 漂洗,加入 IgG-HRP 二抗孵育,ECL 显色液显色后,成像系统成像,条带采用凝胶定量分析软件 Quantity One 4.4 处理后,以 GAPDH 为内参校正。

1.2.8 葡萄糖消耗量及乳酸水平的检测 细胞培养前,按照说明书操作检测 MCF-7 培养基以及 DMEM 高糖培养基中葡萄糖浓度,结果以 mmol/L 为单位表示,换算后作为初始葡萄糖含量 A(mmol)。将 Con 组和 miRNA-122 组细胞接种到 6 孔板后,设置 3 组平行孔,待细胞贴壁后继续培养 48h 后,参照说明书操作再次检测葡萄糖含量,结果为 A1(mmol),细胞对于葡萄糖的消耗量 (mmol/h)=(A-A1)/48h。乳酸水平的检测采用试剂盒进行,最终乳酸水平以 mmol/L 为单位表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光素酶报告基因验证 miRNA-122 与 CS 及 PKM 的靶向关系 空载体转染后,对荧光素酶活性无影响。miRNA-122 转染后,miRNA-122 组细胞中野生型 PKM 荧光素酶活性为(4.52±0.85),突变型 PKM 荧光素酶活性为(8.35±0.95),突变型 PKM 荧光素酶活性明显高于野生型,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);miRNA-122 组细胞中野生型 CS 荧光素酶活性为(3.57±0.35),突变型 CS 荧光素酶活性为(8.75±0.67),突变型 CS 荧光素酶活性明显高于野生型,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Con 组细胞中野生型 PKM 荧光素酶活性为(8.13±0.87),突变型 PKM 荧光素酶活性为(8.39±0.65),差异无统计学意义($P > 0.05$);野生型 CS 的荧光素酶活性为(8.05±0.74),突变型 CS 荧光素酶活性为(8.32±2.35),差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

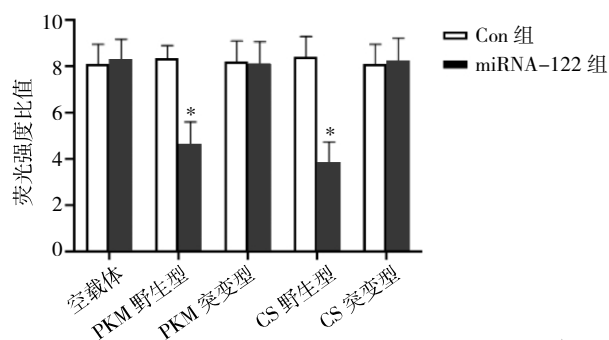


图 1 荧光素酶报告基因实验结果(与 Con 组比较,* $P < 0.05$)

2.2 两组细胞的细胞周期检测结果比较 miRNA-122 组细胞中 S 期和 G1/G0 期细胞比例高于 Con 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 G2 期细胞比例与 Con 组比较无统计学差异($P > 0.05$)。细胞周期检测提示,miRNA-122 组中细胞周期阻滞在 G0/G1 期,见图 2-3。

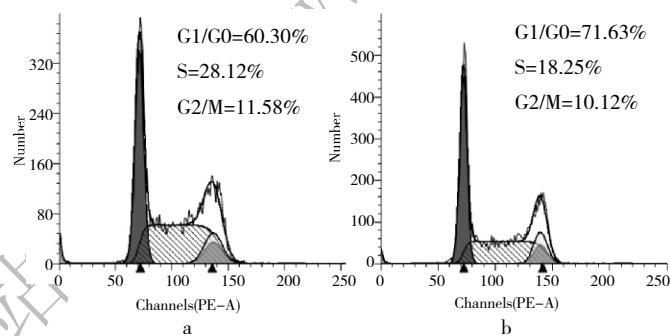


图 2 流式细胞术检测细胞周期(a:Con 组;b:miRNA-122 组)

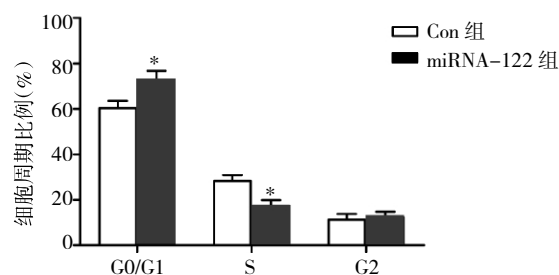


图 3 两组细胞的细胞周期分布比较(与 Con 组比较,* $P < 0.05$)

2.3 两组细胞增殖能力比较 miRNA-122 转染后 6、12、24、48h,CCK-8 检测显示,miRNA-122 组细胞增殖能力显著低于 Con 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明 miRNA-122 类似物可以抑制细胞的增殖,见图 4。

2.4 两组细胞克隆实验结果形成比较 在克隆实验的 2 周内,Con 组细胞形成的克隆数为(58.65±8.15)个,显著高于 miRNA-122 组的(19.35±3.58)个,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5(见插页)。

2.5 各组细胞侵袭能力比较 Con 组和 miRNA-122 组

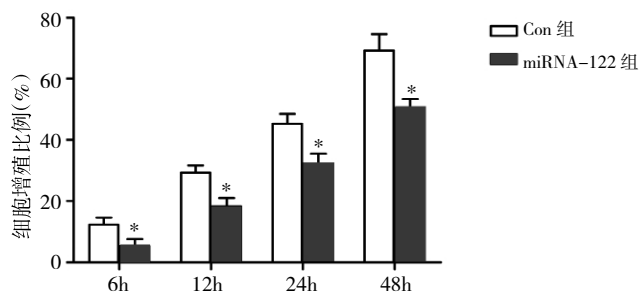


图4 细胞增殖能力的检测结果(与 Con 组比较, * $P<0.05$)

细胞均具有侵袭能力, 在同一条件下培养 24h 后, Con 组侵袭细胞 (112.55 ± 19.32) 个, 而 miRNA-122 组为 (65.85 ± 19.36) 个, 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 6(见插页)。

2.6 各组细胞糖酵解关键酶 HK、PKM、CS 的蛋白表达比较 Con 组细胞中糖酵解关键酶 HK、PKM 和 CS 的蛋白水平显著低于 miRNA-122 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 说明细胞糖酵解被抑制, 见图 7。

2.7 两组细胞葡萄糖利用率和乳酸水平比较 培养 48h 后, Con 组中葡萄糖的消耗水平显著高于 miRNA-122 组, 而乳酸的产生水平也显著高于 miRNA-122 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 见图 8。

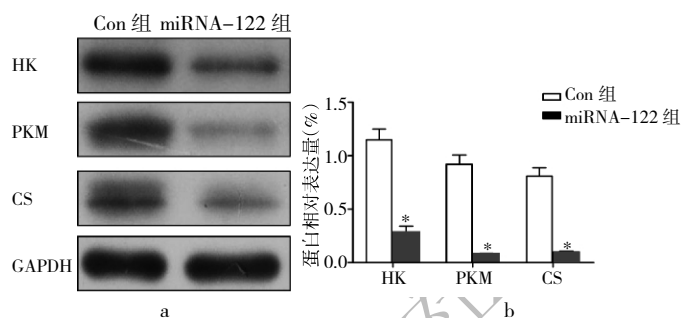


图7 两组细胞糖酵解关键酶的表达比较(a: 蛋白电泳条带图; b: 蛋白相对表达量统计柱状图; 与 Con 组比较, * $P<0.05$)

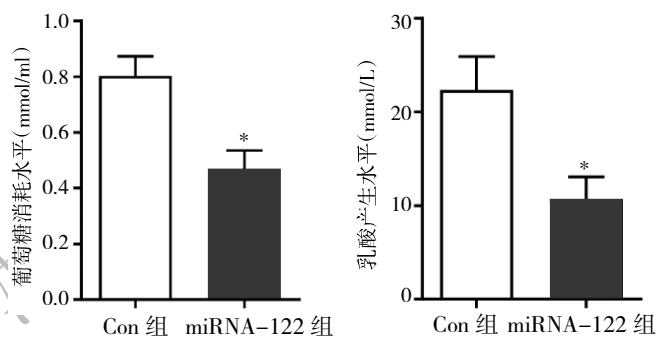


图8 细胞葡萄糖利用率和乳酸水平(a: 葡萄糖消耗水平; b: 乳酸产生水平; 与 Con 组比较, * $P<0.05$)

3 讨论

肿瘤细胞的能量代谢不同于正常细胞, 1930 年 Warburg 就发现肿瘤细胞中糖代谢的主要方式是无氧糖酵解, 这种代谢方式不依赖于环境, 称为 Warburg 效应。相比有氧代谢, 糖酵解能够消耗更多的葡萄糖, 产生乳酸, 有利于维持肿瘤微环境。研究发现, 绝大多数实体肿瘤中都存在代谢异常, Warburg 效应广泛存在^[9-10]。肿瘤细胞葡萄糖有氧代谢减少后, 丙酮酸脱氢酶激酶 (pyruvate dehydrogenase kinase, PDK)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 等的高表达可以进一步促进糖酵解的发生, 而糖酵解作为肿瘤糖代谢的主要方式, 可以产生三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 提供能量, 也可以维持肿瘤微环境的乳酸供给, 从而提高了肿瘤细胞抗凋亡能力, 也为延长肿瘤细胞生存期提供了物质和能量的保证^[11-12]。乳腺癌是一种转移能力较高的恶性肿瘤, 随着病情的发展, 往往会发生骨转移、肺转移、脑转移等^[13], 转移过程中需要大量的能量供给, 所以乳腺癌细胞的代谢异常旺盛, 这种代谢能力也和 Warburg 效应直接相关。

miRNA 能结合到 mRNA 3'UTR 区, 导致 mRNA 降解或翻译受阻, 从而下调靶基因的表达。miRNA 表达失调与肿瘤的发生、进展和转移等有着密切联系, 外周血液循环中的 miRNA 可作为肿瘤诊断和预后的分子标志之一。miRNA 可通过小囊泡作为载体 (如: 外泌体 exosomes) 分泌到细胞外微环境中。越来越多的证据表明, miRNA 能够通过这些小囊泡被转运到邻近或远处的细胞中, 参与细胞功能调节^[14]。研究发现, miR-122 能调节细胞胆固醇外流、肝脏甘油三酯含量及 β 氧化率, PKM 是 miR-122 潜在的靶基因之一^[15-16]。由于脂代谢和糖代谢密切相关, 以往的研究已经证实 miRNA-122 与脂代谢的关系, 而 miRNA-122 也是 PKM 的重要调控非编码 RNA 之一, 因此在脂代谢和糖代谢中 miRNA-122 可能都有一定的作用, 除了可以调节脂的代谢水平外, 也可以降低糖代谢的水平^[17]。研究已经发现, 在乳腺癌细胞中 miRNA-122 低表达, 而外周血中 miRNA-122 表达增高, 这提示 miRNA-122 可能通过细胞外分泌的方式产生生物学效应, 但是 miRNA-122 是否影响乳腺癌细胞糖代谢还需要进一步深入的研究^[18-19]。

本研究采用荧光素酶报告基因法证实了 miRNA-122 是 PKM 和 CS 的调控基因, miRNA-122 可以抑制 PKM 和 CS 翻译过程。而 PKM 和 CS 是糖酵解的关键酶, 对于葡萄糖转化成乳酸的关键环节具有调控作用。

后续实验中也发现,miRNA-122 类似物转染后,糖酵解相关的酶活性受到抑制,葡萄糖利用率下降,乳酸水平也下降,这表明,miRNA-122 抑制了细胞的 Warburg 效应,降低了乳酸的产生。同时细胞周期发生阻滞,细胞增殖率也下调,细胞克隆形成能力和侵袭能力也减弱,笔者认为这也是因为细胞能量供应不足所致^[20]。综合上述实验结果,笔者得出结论,miRNA-122 可以通过靶向抑制 PKM 和 CS 基因表达,抑制蛋白质的翻译,同时抑制了细胞 Warburg 效应,降低乳腺癌细胞转移侵袭的能力。

综上所述,本研究发现 miRNA-122 可以通过调节乳腺癌细胞 Warburg 效应,抑制乳腺癌细胞转移和侵袭,这是 miRNA-122 在肿瘤细胞内的作用,而在细胞外和细胞间信息传递和功能依旧需要进一步深入研究。

4 参考文献

- [1] Fogal V, Richardson AD, Karmali PP, et al. Correction for Fogal et al. "Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation"[J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(14):e00137-17. DOI: 10.1128/MCB.00137-17.
- [2] Otto AM. Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism[J]. *Cancer Metab*, 2016, 4(1):5-16. DOI: 10.1186/s40170-016-0145-9.
- [3] Wenes M, Shang M, Di Matteo M, et al. Macrophage metabolism controls tumor blood vessel morphogenesis and metastasis[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(5):701-715. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.09.008.
- [4] Niu W, Luo Y, Wang X, et al. BRD7 inhibits the Warburg effect and tumor progression through inactivation of HIF1 α /LDHA axis in breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):519-529. DOI: 10.1038/s41419-018-0536-7.
- [5] Harada K, Ferdous T, Harada T, et al. Metformin in combination with 5-fluorouracil suppresses tumor growth by inhibiting the Warburg effect in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(1):276-284. DOI: 10.3892/ijo.2016.3523.
- [6] Rhein VF, Carroll J, Ding S, et al. Human METTL12 is a mitochondrial methyltransferase that modifies citrate synthase[J]. *Febs Letters*, 2017, 591(12):1641-1652. DOI: 10.1002/1873-3468.12649.
- [7] Munagala R, Aqil F, Vadhanam MV, et al. MicroRNA 'signature' during estrogen-mediated mammary carcinogenesis and its reversal by ellagic acid intervention[J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2):175-184. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.06.012.
- [8] Zhang Y, Sturgis EM, Sun Y, et al. A functional variant at miRNA-122 binding site in IL-1 α 3' UTR predicts risk and HPV-positive tumours of oropharyngeal cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(11):1415-1423. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.04.016.
- [9] Deivc S. Warburg effect-a consequence or the cause of Carcinogenesis?[J]. *J Cancer*, 2016, 7(7):817-822. DOI: 10.7150/jca.14274.
- [10] Otto AM. Warburg effect (s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism[J]. *Cancer Metab*, 2016, 4(1):5-13. DOI: 10.1186/s40170-016-0145-9.
- [11] Pavlides S, Vera I, Gandara R, et al. Warburg meets autophagy: cancer-associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(11):1264-1284. DOI: 10.1089/ars.2011.4243.
- [12] Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2):156-164. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.04.001.
- [13] Guo Q, Minnier J, Burchard J, et al. Physiologically activated mammary fibroblasts promote postpartum mammary cancer[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(6):e89206. DOI: 10.1172/jci.insight.89206.
- [14] Das S, Halushka MK. Extracellular vesicle microRNA transfer in cardiovascular disease[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2015, 24(4):199-206. DOI: 10.1016/j.carpath.2015.04.007.
- [15] Wang L, Tang W, Yan S, et al. Efficient delivery of miR-122 to regulate cholesterol metabolism using a non-covalent peptide-based strategy[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(5):1472-1478. DOI: 10.3892/mmr.2013.1691.
- [16] Yamada H, Suzuki K, Ichino N, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 424:99-103. DOI: 10.1016/j.cca.2013.05.021.
- [17] Van d RMH, Van d MAJ, Van Nuenen AC, et al. Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 43(1):102-113. DOI: 10.1111/apt.13432.
- [18] Rybicka A, Mucha J, Majchrzak K, et al. Analysis of microRNA expression in canine mammary cancer stem-like cells indicates epigenetic regulation of transforming growth factor-beta signaling[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2015, 66(1):29-39.
- [19] Von Deetzen MC, Schmeck BT, Gruber AD, et al. Malignancy associated microRNA expression changes in canine mammary cancer of different malignancies[J]. *ISRN Vet Sci*, 2014, 2014:1-5. DOI: 10.1155/2014/148597.
- [20] Liao Y, Du W. Rb-independent E2F3 promotes cell proliferation and alters expression of genes involved in metabolism and inflammation[J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(10):1611-1621. DOI: 10.1002/2211-5463.12306.

(收稿日期:2019-02-08)

(本文编辑:严玮雯)