

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.011

miRNA-486-5p 对胃癌细胞 SGC7901 中 NRP2 表达的影响

连海峰¹, 李明¹, 刘成霞¹, 李锐¹, 李丹²(1. 滨州医学院附属医院 消化内科, 山东 滨州 256603; 2. 滨州医学院护理学院 内科护理学教研室, 山东 滨州 256603)

[摘要] **目的:** 预测并鉴定 miRNA-486-5p 在人胃癌细胞 SGC7901 中的靶基因及其表达。**方法:** 采用生物信息学技术预测 miRNA-486-5p 的作用靶点, 构建 miRNA-486-5p 过表达质粒(GV214-miR)并转染入 SGC7901 细胞(SGC7901-miR)中, 以空质粒转染 SGC7901 细胞(SGC7901-miR-NC)为阴性对照, 以 SGC7901 细胞为空白对照。Real-time PCR 检测转染细胞中 miRNA-486-5p 及其靶基因神经纤毛蛋白 2(neuropilin-2, NRP2) mRNA 的表达, Western blotting 检测 NRP2 的表达, 双荧光素酶实验验证 miRNA-486-5p 对 NRP2 基因的调控机制。**结果:** 经生物信息学预测, 选择与胃癌生物学行为密切相关的 NRP2 作为 miRNA-486-5p 的靶基因。与空白组相比, GV214-miR 转染后的 SGC7901 细胞 miRNA-486-5p 表达显著上调[(8.21 ± 1.18) vs (1.02 ± 0.26), $P < 0.01$], NRP2 mRNA 表达无明显变化($P > 0.05$), 而 NRP2 蛋白表达则明显下调[(0.36 ± 0.06) vs (0.76 ± 0.05), $P < 0.05$], 双荧光素酶实验证实 miRNA-486-5p 可与 NRP2 mRNA 3'-UTR 直接结合, 从而发挥对 NRP2 转录后翻译的抑制作用。**结论:** miRNA-486-5p 在胃癌细胞 SGC7901 中可直接作用于 NRP2 mRNA 3'UTR, 从而抑制其表达。

[关键词] miRNA-486-5p; 胃癌; 生物信息学技术; 神经纤毛蛋白 2; 转染

[中图分类号] R735.2; R730.54; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)03-0298-05

Effect of miRNA-486-5p on expression of NRP2 in gastric carcinoma SGC7901 cells

Lian Haifeng¹, Li Ming¹, Liu Chengxia¹, Li Kun¹, Li Dan²(1. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong, China; 2. Department of Internal Medicine Nursing, School of Nursing, Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To predict and identify the target genes of microRNA-486-5p (miRNA-486-5p) in human gastric cancer SGC7901 cells. **Methods:** Possible target genes of miRNA-486-5p were predicted by bioinformatics techniques and accordingly miRNA-486-5p over-expressing plasmid (GV214-miR) against the identified target gene, neuropilin-2 (NRP-2) was constructed. SGC7901 cells were transfected with a control miRNA and an NRP-2-specific miRNA-486-5p. In the transfectants and non-transfected control cells, miRNA-486-5p and NRP-2 mRNA levels and NRP-2 protein levels were analyzed by real-time PCR and Western blotting respectively, and the NRP-2 promoter activity was evaluated by a dual luciferase reporter assay. **Results:** The expression of miRNA-486-5p in miRNA-486-5p-transfected SGC7901 cells (SGC7901-miR cells) was significantly up-regulated compared with that in the control group (8.21 ± 1.18 vs 1.02 ± 0.26, $P < 0.01$). No significant difference in NRP2 mRNA abundance was observed ($P > 0.05$). However, the NRP2 protein level was significantly reduced in SGC7901-miR cells (0.36 ± 0.06) as compared with SGC7901 cells transfected with the control plasmid (0.76 ± 0.05, $P < 0.05$). Dual luciferase reporter assay demonstrated that miRNA-486-5p directly targeted the 3'-untranslated region (UTR) of the NRP2 gene, resulting in inhibition of the post-transcriptional translation of NRP2. **Conclusion:** Sequence-specific miRNA-486-5p may suppress the expression of NRP2 at the protein level in human gastric cancer cells by binding to NRP2 mRNA 3'UTR directly.

[基金项目] 山东省高校科技计划基金资助项目(No. J11LF75); 滨州医学院科研启动基金资助项目(No. BY2010KYQD02)。Project supported by Higher Educational Science and Technology Foundation of Shandong Province (No. J11LF75), and the Scientific Research Foundation of Binzhou Medical College (No. BY2010KYQD02)

[作者简介] 连海峰(1981-), 男, 山东省烟台市人, 博士, 主治医师, 主要从事胃癌淋巴结转移方面的研究。E-mail: lianhaifeng01@163.com

[通信作者] 刘成霞(Liu Chengxia, corresponding author), E-mail: phdlcx@163.com

[**Key words**] miR-486-5p; gastric carcinoma; bioinformatics technique; neuropilin-2(*NRP2*); transfect

[*Chin J Cancer Biother*, 2014, 21(3): 298-302]

胃癌(gastric carcinoma, GC)是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,中国 GC 发病率和病死率均居恶性肿瘤之首,高于世界平均水平^[1]。目前,根治性切除是治疗 GC 的主要手段,由于 GC 早期诊断率低,多数患者确诊时已属中晚期,其中相当部分患者失去手术治疗机会,加之术后复发和转移,导致 GC 患者总体治疗效果不理想^[2]。阐明 GC 发病的分子机制,对 GC 的早期预防、诊断、治疗具有重要的临床意义^[3]。

微小 RNA(microRNA, miRNA)于 1993 年在秀丽新小杆线虫中首次被发现,是一类进化保守、内源性非编码 RNA,长约 22 ~ 25 nt,通过与靶 mRNA 3'-UTR 互补结合,降解 mRNA 或抑制其翻译,从而在转录后水平负性调节蛋白编码基因的表达^[4]。研究^[5]发现,miRNA 在肿瘤中通过调控不同的靶基因起着癌基因或抑癌基因的作用。近年来,人们对 miRNA 在 GC 中的作用及其机制做了大量研究,为 GC 的基因诊断和治疗提供了新的靶点^[6]。既往研究^[7]证明,miRNA-486-5p 与 GC 有一定的相关性,但其在 GC 中的作用及具体机制目前尚不清楚。本研究首先采用生物信息学技术预测 miRNA-486-5p 可能的靶基因,并通过脂质体法将 miRNA-486-5p 过表达质粒转染入 GC 细胞株 SGC7901 中,观察其对靶基因的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人胃癌细胞株 SGC7901 购于武汉博士德公司, RPMI-1640 培养基、标准胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司, Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司,兔抗人 NRP2 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、GAPDH 兔单克隆抗体、硝酸纤维素膜、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所,总 RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒购自大连宝生物公司。Real-time PCR 引物为广州锐博有限公司设计合成,荧光实时定量 RT-PCR 仪购自澳大利亚 Corbett 公司,凝胶成像仪购自美国 Bio-RAD 公司, WB 曝光仪购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 过表达质粒 GV214-miR 的合成

miRNA-486-5p 过表达质粒 GV214-miR 由上海

吉凯公司构建、合成。首先合成 miRNA-486-5p 的前体序列,并在两端设计 *Bam*H I / *Hind* III 酶切位点,插入 GV214 多克隆位点,该载体以 GFP 为报告基因,同时构建阴性对照质粒 GV214-NC; 双荧光素酶报告质粒 pmirGLO vector 由上海吉玛公司构建合成;全基因合成靶基因神经纤毛蛋白 2(neuropilin-2, NRP2)3'-UTR,并在两端设计酶切位点,插入荧光素酶 3'-UTR 的克隆位点,该质粒同时包含海肾荧光素酶基因,作为内参验证其转染效率。

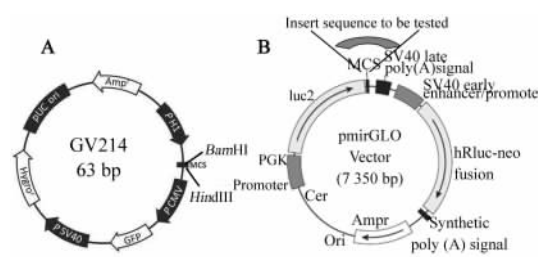


图 1 GV214-miR 质粒的构建

Fig. 1 Construction of GV214-miR plasmid

A: GV214-miR vector; B: pmirGLO vector

1.3 生物信息学技术预测 miRNA-486-5p 的作用靶点

检索 miRNA 生物信息学网站和软件,预测 miR-486-5p 可能的作用靶基因,从各网站和软件预测靶基因的交集中选择与胃癌密切相关的靶基因进行验证。本研究使用的预测网站有 TargetScans、miRanda、miRBase、PicTar 等。

1.4 细胞培养

SGC7901 细胞以含 10% 胎牛血清和 100 U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素 RPMI 1640 完全培养基,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养,每 2 ~ 3 d 用 0.25% 的胰蛋白酶消化、传代,取对数期细胞用于实验。

1.5 GV214-miR 质粒瞬时转染 SGC7901 细胞

取对数生长期 SGC7901 细胞以每孔 1×10^6 个接种于 6 孔板,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养至细胞汇合度 70% 后,将细胞分为 RPMI1640 培养组(空白组)、GV214-NC 质粒转染组(SGC7901-NC 组)、GV214-miR 质粒转染组(SGC7901-miR 组),将培养基换成无血清、无双抗的 RPMI 1640 培养基(每孔 1 ml),质粒及转染试剂 Lipofectamine™ 2000 分别用 100 μl RPMI 1640 培养基稀释后,以质粒

(μg):脂质体(μl)=1:2的比例混匀后静置30 min,逐滴加入并轻晃混匀,培养6 h后换为含完全培养基,48 h后收集细胞。

1.6 Real-time PCR 检测转染后 SGC790 细胞中 miRNA-486-5p 及 NRP2 mRNA 的表达

转染48 h后收集细胞,按照 TRIzol 试剂盒说明提取总 RNA,1%的琼脂糖变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性,紫外可见分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度;按逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA,反应条件如下:70 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min,冰浴 2 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 、60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min;PCR 反应:95 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,40 个循环。每个样品做3个平行管,每次实验至少重复3次。miRNA-486-5p、NRP2 mRNA 相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算,以 U6/ β -actin 基因为内参,引物序列见表1。

表1 引物序列
Tab. 1 Sequences of primers

Primer	Sequence
miRNA-486-5p	Sense 5'-TCCTGCACTGAGCTGCCCGAG-3'
	Antisense 5'-TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTT-3'
U6	Sense 5'-GCAGGGGCCATGCTAATCTTC-3'
	Antisense 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3'
NRP2	Sense 5'-CGGATTGCTAATGAACAGA-3'
	Antisense 5'-TTGGCTTGAAATACCTTGTGG-3'
β -actin	Sense 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'
	Antisense 5'-CTTCCTTAATGTCCACGCACGATTC-3'

1.7 Western blotting 检测转染后 SGC790 细胞中 NRP2 蛋白的表达

细胞转染48 h后,提取总蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,取 50 μg 变性处理的蛋白质加入 SDS-PAGE 凝胶小孔进行电泳(浓缩胶层 80 V,分离胶层 120 V),电泳后于冰上 0.25 mA 转膜 130 min,丽春红染色观察转移效果满意后,TBST 缓冲液洗膜后 5%脱脂奶粉与摇床上孵育 2 h,加入一抗(1:500 兔抗人 NRP2 多抗,1:5 000 兔抗人 GAPDH 单抗)4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,洗膜后加入羊抗兔 IgG/HRP 二抗(1:2 000)室温孵育 1 h,ECL 显影得到蛋白印记条带,以 Tanon 软件分析 NRP2 蛋白条带的灰度值。

1.8 双荧光素酶实验检测 miRNA-486-5p 与 NRP2 mRNA 3'-UTR 的结合作用

取对数生长期细胞接种于 96 孔板,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养至细胞汇合度 70% 后,将细胞分为 3 组:pmirGLO 质粒组、GV24-miR + pmirGLO 共转染组、GV214-NC + pmirGLO 共转染组;转染方法同前。转染 48 h 后吸弃细胞培养液后加入报告基因细胞裂解液,每孔加入萤火虫荧光素酶检测缓冲液 100 μl ,将 96 孔板放入多功能酶标仪内测定相对光单位(relative light unit,RLU),检测完成后加入海肾荧光素酶检测工作液,同样测定 RLU(荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶 RLU 值/海肾荧光素酶 RLU 值)。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 选择 NRP2 为 miRNA-486-5p 的靶基因预测

由于 miRNA-486-5p 可能的作用靶点较多,根据综合多个生物信息学预测网站和软件预测结果,NRP2 可能为 miRNA-486-5p 众多作用靶点之一,NRP2 与胃癌等消化道肿瘤密切相关,本研究选择 NRP2 基因进行下一步研究。

2.2 重组质粒成功转染 SGC7901 细胞

GV214-miR 质粒及 GV214-NC 质粒中含有 GFP 基因,转染 SGC7901 细胞 48 h 后荧光显微镜计数绿色荧光阳性的细胞,并计算转染率(图 2)。GV214-miR 及 GV214-NC 细胞的转染率差异无统计学意义 [(64.35 \pm 3.75)% vs (63.80 \pm 3.10)% , $P > 0.05$]。结果提示,各组细胞转染率均较高,且无明显差异。

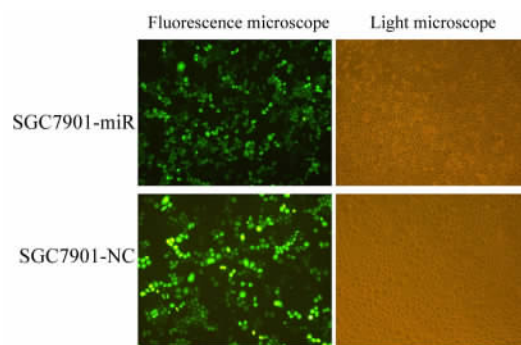


图2 GV214-miR 质粒转染 SGC 7901 细胞后 GFP 的表达($\times 200$)

Fig.2 Expression of GFP in SGC 7901 cells after transfection of GV214-miR plasmid($\times 200$)

2.3 SGC7901-miR 细胞中 miRNA-486-5p 及 NRP2 mRNA 的表达

miRNA-486-5p 及 U6 扩增曲线均为典型 S 型曲线,溶解曲线呈单峰且溶解温度均一,表明引物特异性好,qRT-PCR 结果可靠。与空白对照组相比,SGC7901-miR 细胞中 miRNA-486-5p 的表达显著上调[(8.21 ± 1.18) vs (1.02 ± 0.26) , $P < 0.01$],而 SGC7901-NC 细胞则无明显变化($P > 0.05$)。各组细胞 NRP2 表达无明显差异($P > 0.05$,图 3),提示 miRNA-486-5p 对 NRP2 mRNA 表达无明显影响。

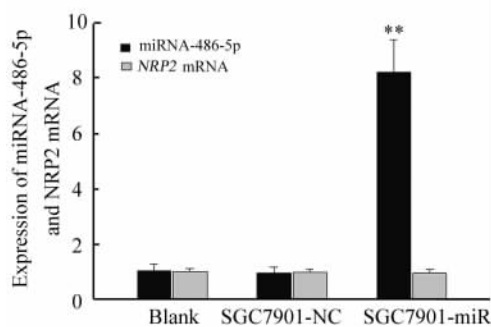


图 3 SGC7901-miR 细胞中 miRNA-486-5p 和 NRP2 mRNA 相对表达量

Fig. 3 Expression of miRNA-486-5p and NRP2 mRNA in SGC7901-miR cells

** $P < 0.01$ vs blank group

2.4 SGC7901-miR 细胞中 NRP2 蛋白的表达

Western blotting 结果显示,与空白对照组(0.36 ± 0.06)相比,SGC7901-miR 细胞中 NRP2 表达明显下调[(0.76 ± 0.05) , $P < 0.05$],而 SGC7901-NC 细胞中(0.69 ± 0.08)则无明显差异($P > 0.05$,图 4)。结果提示,GV214-miR 质粒转染 SGC7901 细胞后抑制 NRP2 蛋白的表达。

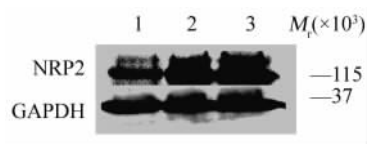


图 4 GV214-miR 转染后 SGC7901 细胞内 NRP2 蛋白的表达

Fig. 4 Expression of NRP2 protein in SGC7901 cells after transfection of GV214-miR

1: SGC7901-miR group; 2: SGC7901-NC group; 3: Blank group

2.5 miRNA-486-5p 可与 NRP2 mRNA 3'-UTR 直接结合

荧光素酶报告基因实验结果显示,与 pmirGLO

质粒组相比,GV24-miR + pmirGLO 共转染组荧光素酶活性明显降低[(0.47 ± 0.11) vs (0.89 ± 0.13) , $P < 0.05$],而 GV214-NC + pmirGLO 共转染组荧光素酶则无明显改变[(0.82 ± 0.16) vs (0.89 ± 0.13) , $P > 0.05$]。结果提示 miRNA-486-5p 可与 NRP2 mRNA 3'-UTR 直接结合,从而抑制 NRP2 蛋白的表达。

3 讨论

近年来,随着 miRNA 相关研究的不断深入,其在肿瘤中的作用日益受到人们的重视,miRNA 介导的基因沉默与肿瘤发生发展的相关性已成为目前分子生物学的研究热点^[8]。miRNA 常位于染色体的脆性位点,即异常扩增热点区、杂合性丢失高发区及癌基因或抑癌基因断裂点附近,与正常组织相比,肿瘤组织中 miRNA 存在明显异常表达^[9]。不同肿瘤具有不同的 miRNA 表达谱,miRNA 在肿瘤中既可作为抑癌基因下调原癌基因的活性,也可作为癌基因下调抑癌基因的活性^[10-11]。既往研究^[12]证明,GC 的发生发展涉及多种 miRNA,如 miR-9 在 GC 组织中表达下调,上调 MGC803 miR-9 的表达后,可抑制细胞增殖及裸鼠移植瘤的形成,进一步研究证实 miR-9 通过直接作用于 NF- κ B1 发挥抑癌作用。Takei 等^[13]报道了在高腹膜转移性 GC 细胞株 44As3 中 miR-516-3p 表达下调,恢复其表达后发现细胞 Sulfatase 1 表达下调,动物实验中发现其可以抑制细胞的成瘤能力,提示 miRNA-516-3p 通过作用靶基因 Sulfatase 1 抑制 GC 细胞的转移。

miR-486-5p 于 2005 年首次被发现,既往研究^[14]表明,miRNA-486-5p 在多个肿瘤中发挥抑癌作用,如 miRNA-486-5p 在肺癌组织中表达下调,体外实验证实 miRNA-486-5p 通过作用于 ARHGAP5 发挥抑癌作用。Mees 等^[15]发现,has-miR-486-5p 和胰腺导管腺癌的进展密切相关。既往研究^[7]表明,miRNA-486-5p 与 GC 有一定的关联性,在 GC 组织中 miRNA-486-5p 表达下调,临床病理分析显示 miRNA-486-5p 的低表达与肿瘤分期、淋巴转移及预后密切相关,进一步研究表明,miRNA-486-5p 在可作用于 OLFM4 蛋白发挥抑癌作用。目前 miRNA-486-5p 在 GC 的发生发展过程的具体作用及确切机制尚不明确。

生物信息学技术能够通过预测软件分析 miRNA 的序列或靶基因 mRNA 3'UTR 的序列,这些软件使用不同的参数预测 miRNA 和靶基因 mRNA 3'UTR 上互补配对的种子序列^[16]。对于一个给定的

miRNA 可以预测出其所有的靶基因 mRNA, 同时也可以根据给定的基因 mRNA 3'UTR 序列, 预测出其可能相关 miRNAs 以及结合位点的种子序列^[17]。由于不同的预测工具采用不同的计算方法, 会预测出不同的 miRNA 或靶 mRNA 以及互补配对的位点, 因此需要使用多个预测工具进行预测, 并结合相关文献, 选择软件中预测出来的有高度的重叠性 miRNA 或靶基因, 进一步用相关实验进行验证^[18-19]。既往研究^[7,14]证明, miRNA-486-5p 在不同肿瘤中通过作用于 OLFM4、ARHGAP5 发挥抑癌作用, 但 miRNA 可作用于多个靶基因发挥作用。本研究通过生物信息学技术预测 miRNA-486-5p 可能的作用靶点, 发现与肿瘤密切相关的 *NRP2* 与 miRNA-486-5p 可能存在靶向调控关系, 目前关于 miR-486-5p 与 *NRP2* 间的调控作用尚无报, 故本文选择 *NRP2* 作进一步研究。*NRP2* 是一种单链跨膜糖蛋白, 作为神经导向因子 semaphorins 的受体而被首先发现, 新近发现 *NRP2* 可以与 *VEGFR3* 形成受体复合物, 促进淋巴管生成。*Gray* 等^[20]采用免疫组化技术证实, *NRP2* 在结直肠癌组织中表达升高, 使用 RNA 干扰技术抑制结肠癌细胞株 *HCT116* 细胞的 *NRP2* 后, 细胞的增殖、迁移能力降低, 凋亡增加, 提示 *NRP2* 在结直肠癌发生、发展过程中具有重要作用。本实验发现, 上调 GC 细胞株 *SGC7901* miRNA-486-5p 对 *NRP2* mRNA 的表达无明显影响, 但可抑制 *NRP2* 蛋白的表达, 双荧光报告基因检测法证实 miRNA-486-5p 可与 *NRP2* 结合发挥作用, 提示 miRNA-486-5p 在 GC 中可通过作用于 *NRP2* 发挥抑癌作用。

综上所述, 生物信息学技术提示 *NRP2* 是 miRNA-486-5p 的潜在靶基因, miRNA-486-5p 可抑制 *NRP2* 蛋白的表达, 但对其 mRNA 的表达无明显影响, 双荧光素酶实验证实 miRNA-486-5p 可直接作用于 *NRP2* 3'UTR, 提示 *NRP2* 可能为 miRNA-486-5p 的靶基因, 为 GC 的防治提供了新的靶点。

[参 考 文 献]

[1] Hartgrink HH, Jansen EP, Grieken NC, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2009, 374(9688): 477-490.

[2] Hölscher AH1, Drebber U, Mönig SP, et al. Early gastric cancer: Lymph node metastasis starts with deep mucosal infiltration [J]. *Ann Surg*, 2009, 250(5): 791-797.

[3] Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, et al. Recent patterns in gastric cancer: A global overview [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(3): 666-673.

[4] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Droscha initiates

microRNA processing [J]. *Nature*, 2003, 425(6956): 415-419.

[5] Petri A, Lindow M, Kauppinen S. MicroRNA silencing in primates: Towards development of novel therapeutics [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2): 393-395.

[6] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(9): 2999-3004.

[7] Oh HK, Tan AL, Das K, et al. Genomic loss of miR-486 regulates tumor progression and the OLFM4 anti apoptotic factor in gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 2657-2667.

[8] Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: The beginning of a new tale [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7390-7394.

[9] Kunej T, Godnic I, Horvat S, et al. Cross talk between microRNA and coding cancer genes [J]. *Cancer*, 2012, 18(3): 223-231.

[10] Neelakandan K, Babu P, Nair S. Emerging roles for modulation of microRNA signatures in cancer chemoprevention [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(6): 716-40.

[11] Zhang L, Huang J, Yang N, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(24): 9136-9141.

[12] Wan HY, Guo LM, Liu T, et al. Regulation of the transcription factor NF- κ B1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2010, 26(1): 9-16.

[13] Takei Y, Takigahira M, Mihara K, et al. The metastasis-associated microRNA miR-516a-3p is a novel therapeutic target for inhibiting peritoneal dissemination of human scirrhous gastric cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 15, 71(4): 1442-1453.

[14] Wang J, Tian X, Han R, et al. Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer [J]. *Oncogene*, 2014, 33(9): 1181-1189.

[15] Mees ST, Mardin WA, Sielker S, et al. Involvement of CD40 targeting miR-224 and miR-486 on the progression of pancreatic ductal adenocarcinomas [J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(8): 2339-2350.

[16] Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, et al. Prediction of mammalian microRNA targets [J]. *Cell*, 2003, 115(7): 787-798.

[17] Shi M, Han W, Spivack SD, A quantitative method to identify microRNAs targeting a messenger RNA using a 3' UTR RNA affinity technique [J]. *Anal Biochem*, 2013, 443(1): 1-12.

[18] Wang Y, Chen M, Tao Z, et al. Identification of predictive biomarkers for early diagnosis of larynx carcinoma based on microRNA expression data [J]. *Cancer Genet*, 2013, 206(9/10): 340-346.

[19] Majer A, Caligiuri KA, Booth SA. A user-friendly computational workflow for the analysis of microRNA deep sequencing data [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 936(1): 35-45.

[20] Gray MJ, Van Buren G, Dallas NA, et al. The rapetuc targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver [J]. *Natl Cancer Inst*, 2008, 100(2): 109-120.

[收稿日期] 2013 - 12 - 24

[修回日期] 2014 - 05 - 15

[本文编辑] 周琳玲, 韩丹