

# gga-miR-140-3p 抑制马立克病病毒转化 细胞 MSB1 增殖、迁移和侵袭

赵春芳<sup>1</sup>, 李新<sup>1</sup>, 韩博<sup>1</sup>, 曲鲁江<sup>1</sup>, 刘长军<sup>2</sup>, Jiuzhou Song<sup>3</sup>, 连玲<sup>1\*</sup>, 杨宁<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽传染病研究室, 哈尔滨 150001;  
3. 马里兰州大学帕克分校动物与禽类科学系, 马里兰州 20742, 美国)

**摘要:** 以马立克病病毒 (MDV) 感染 SPF 白来航鸡, 收集脾和肝来源的淋巴瘤, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 进行检测, 结果显示 gga-miR-140-3p 在感染 MDV 的肿瘤化脾和肝淋巴瘤中低表达。为揭示该 miRNA 在马立克病 (MD) 肿瘤转化过程中的作用, 以该 miRNA 为研究对象, MDV 转化细胞系 MDCC-MSB1 为试验材料, 分别转染 miRNA 激动剂或阴性对照, 检测细胞增殖和迁移, 并检测与细胞侵袭密切相关的基因 *MMP2* 和 *MMP9* mRNA 表达情况。结果显示, 与阴性对照组相比, 转染 gga-miR-140-3p 激动剂后, 细胞增殖在 24、36 和 48 h 后发生显著 ( $P < 0.05$ ) 抑制, 在 60 和 72 h 后发生极显著 ( $P < 0.01$ ) 抑制。转染激动剂后, 细胞迁移数也显著 ( $P < 0.05$ ) 减少。转染激动剂后, *MMP2* 在转染后 24 h 转录显著下调 ( $P < 0.05$ ), 转染后 48 和 72 h 转录极显著 ( $P < 0.01$ ) 下调, *MMP9* 基因在转染后 48 h 转录显著 ( $P < 0.05$ ) 下调。gga-miR-140-3p 作为在 MDV 感染组织中异常表达的 miRNA, 能够影响 MD 肿瘤淋巴细胞的特征——增殖、迁移和侵袭, 提示该 miRNA 可能参与 MD 肿瘤转化过程。

**关键词:** 马立克病病毒; 增殖; 迁移; *MMP2* 基因; *MMP9* 基因

中图分类号: S831.2; S852.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)05-1005-07

## gga-miR-140-3p Inhibit Proliferation, Migration and Invasion in MDV-transformed MSB1 Cells

ZHAO Chun-fang<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, HAN Bo<sup>1</sup>, QU Lu-jiang<sup>1</sup>,

LIU Chang-jun<sup>2</sup>, SONG Jiu-zhou<sup>3</sup>, LIAN Ling<sup>1\*</sup>, YANG Ning<sup>1\*</sup>

(1. *Department of Animal Genetics and Breeding, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China*; 2. *Division of Avian Infectious Diseases, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China*; 3. *Department of Animal & Avian Sciences, University of Maryland, College Park, Maryland 20742, United States*)

**Abstract:** Specific pathogen free Leghorn chickens were infected with MDV, and lymphoma from spleens and livers were collected post infection. The qRT-PCR assay showed that microRNA gga-miR-140-3p was downregulated in MDV-induced tumorous spleen and lymphoma from liver. To elucidate the functions of this miRNA in Marek's disease tumor transformation, we transfected MDV-transformed lymphoid cell line, MDCC-MSB1 with gga-miR-140-3p agomir or agomir NC, and inspected their effects on cell proliferation and migration as well as *MMP2* and *MMP9* genes expression levels whose expression levels were closely correlated with invasion. The proliferation

收稿日期: 2017-11-01

基金项目: 863 计划 (2013AA102501); 国家自然科学基金 (31320103905; 31301957); 教育部长江学者及创新团队发展计划 (IRT\_15R62); 现代农业产业技术体系 (CARS-41); 青年科学家托举项目; 畜禽种质资源平台和青年教师创新计划

作者简介: 赵春芳 (1989-), 女, 山东人, 博士, 主要从事家禽分子遗传育种研究, E-mail: zhyy199002@163.com

\* 通信作者: 杨宁, 教授, E-mail: nyang@cau.edu.cn; 连玲, 副教授, E-mail: lianlinglara@126.com

of MSB1 cells decreased at 24, 36, 48, 60 and 72 h post gga-miR-140-3p agomir transfection. The cell number of migration also decreased after transfection with gga-miR-140-3p agomir. MMP2 expression was significantly downregulated at 24, 48 and 72 h; in addition, MMP9 transcription was remarkably downregulated at 48 h post gga-miR-140-3p agomir transfection. In conclusion, gga-miR-140-3p which was downregulated in MDV-induced tumorous tissues had an effect on features of tumor cells such as proliferation, migration and invasion, which indicates that this miRNA may be involved in Marek's disease tumor transformation.

**Key words:** Marek's disease virus; proliferation; migration; *MMP2* gene; *MMP9* gene

马立克病 (Marek's disease, MD) 是由马立克病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 引起的恶性 T 淋巴细胞增生性肿瘤疾病; 它是一种严重危害养鸡业和家禽健康的传染病<sup>[1]</sup>。MDV 属于马立克病毒属, 又称为禽疱疹病毒 2 型。体内感染 MDV 可以分为四个阶段, 分别为病毒溶细胞感染 (感染病毒后的 3 至 6 d), 潜伏感染 (感染病毒后的 7 至 10 d), 溶细胞感染第二阶段 (感染病毒后的 10 至 14 d) 和肿瘤转化 (感染病毒后的 21 d)<sup>[2-3]</sup>。越来越多的微小 RNA (microRNA, miRNA) 在病毒引起的肿瘤性疾病中扮演重要角色, 其中包括 miRNA-181a<sup>[4]</sup>、miRNA-26a<sup>[5-6]</sup>、miRNA-219<sup>[7]</sup> 等。

miRNA 是小的单链非编码 RNA, 长度约 22 个核苷酸, 在调节细胞增殖、分化、凋亡、发育和肿瘤发生等生物过程中扮演重要角色<sup>[8]</sup>。miRNA 通过与靶基因 mRNA 的 3'-非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 结合影响转录或者 mRNA 的翻译, 从而在转录后水平上发挥作用<sup>[9]</sup>。现在, 越来越多与 MD 肿瘤发生密切相关的宿主 miRNA 和病毒 miRNA 被挖掘出来。gga-miR-155 只在 MDV 转化的肿瘤细胞系中表达下调, 这可以作为 MD 肿瘤细胞中特异性表达的标志<sup>[10]</sup>。MDV 编码的 Mdv1-miR-M4-5p 和 gga-miR-155 具有高度同源性, 对 MDV 的原癌性具有至关重要的作用<sup>[11]</sup>; 并且它能够通过靶向潜伏转化生长因子  $\beta$  结合蛋白 1 (Latent TGF- $\beta$  binding protein 1, LTBP1) 激活原癌基因 *c-Myc*, 从而抑制 TGF- $\beta$  信号通路<sup>[12]</sup>。Z. J. Li 等<sup>[13]</sup> 发现了 79 个感染 MDV 后表达呈显著差异的 miRNA, 并发现两类可以作为 MDV 感染和 MD 肿瘤发生指示标志的 miRNA。gga-miR-26a 在 MDV 引发的肿瘤中低表达<sup>[14]</sup>, 在禽类转化淋巴细胞系中介导白细胞介素 2<sup>[5]</sup> (interleukin-2, IL-2) 和 NIMA 相关激酶 6<sup>[6]</sup> (NIMA related kinase 6, NEK6) 的表达, 并能抑制 MD 淋巴瘤细胞增殖。gga-miR-181a

通过抑制类 v-myb 成髓细胞瘤病毒原癌基因同源体 1 (v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1, MYBL1) 使 MSB1 细胞增殖发生抑制<sup>[15]</sup>。

我们利用 Solexa 深度测序分析了 MD 肿瘤组和非感染组的 miRNA 表达谱<sup>[16]</sup>, 发现 gga-miR-140-3p 在 MDV 引发的肿瘤组织中表达异常。本研究检测该 miRNA 对 MD 肿瘤细胞 MSB1 增殖、迁移的影响以及对与侵袭密切相关的 *MMP2*、*MMP9* 基因转录水平的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品收集

试验鸡群和马立克病毒毒株 (MDV-GA) 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。试验选择 150 只无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 的白来航鸡, 分成 2 组, 攻毒组 100 只, 对照组 50 只。在 1 日龄时攻毒组个体腹腔注射 MDV-GA (2 000 PFU) 国际标准毒株 0.2 mL。对照组注射同等剂量的无病毒稀释液。两组鸡分开饲养在不同的负压隔离器中, 其他试验条件一致, 试验全期 56 d。MDV 感染后 30 d, 剩余 66 只 MDV 感染鸡和 28 只未感染对照组鸡。在感染 MDV 的第 30~56 天, 一共有 47 只鸡形成肿瘤, 另外 19 只鸡状态良好, 未形成肿瘤。在感染后 31~55 d, 连续观察鸡群状态, 对外表现为严重病症的个体进行屠宰, 同时屠宰未感染对照组个体。个体屠宰后收集脾、肝和各组织来源的 MD 淋巴瘤。所有组织保存在 RNA 保存液中用于 RNA 的提取。

### 1.2 细胞培养和 miRNA 转染

MDV 转化淋巴细胞系, MDCC-MSB1, 由 C. Itakura 博士友情馈赠, 培养在含有 10% 胎牛血清 (Invitrogen 公司) 的 RPMI-1640 培养基中, 放置于温度 37 °C, 相对湿度 95%, 含有 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。FuGENE HD 转染试剂 (Promega 公司) 用于

miRNA 转染,用于转染的 miRNA 激动剂(agomir)和阴性对照(Negative control, NC)剂量分别为  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。gga-miR-140-3p agomir 和 NC 购自上海吉玛公司。

### 1.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

利用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)按照说明书要求提取冰冻组织或细胞总 RNA。利用 cDNA synthesis kit (miRACLE 公司)反转录 miRNA; qPCR miRNA kit(miRACLE 公司)用于 miRNA 定量检测,每组 8 个样本。用于检测内对照 5S 的上游引物序列为  $5' \text{-ACCGGGTGCTGTAGGCT-TAA-3'}$ ;检测 gga-miR-140-3p 的上游引物序列为  $5' \text{-AGGGTAGAACCACGGACAAAA-3'}$ 。反应条件为  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 10 min,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 10 s,  $57 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 20 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 1 min, qRT-PCR 反应在 Invitrogen 公司的 ABI 7500 仪器上进行 40 个循环。

利用 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen 公司)将总 RNA 反转录为 cDNA 用于基因表达水平的检测。使用 Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen 公司)在 ABI 7500 仪器上进行 qRT-PCR,每组三个生物学重复。引物信息如下: $\beta actin$  上游引物为  $5' \text{-GAGAAAT-TGTGCGTGACATCA-3'}$ ,下游引物为  $5' \text{-CCT-GAACCTCTCATTGCCA-3'}$ ;MMP2 上游引物为  $5' \text{-TGAAACAGGAGATTTGGAT-3'}$ ,下游引物为  $5' \text{-CATTTTGGCTTTCTTGGA-3'}$ ,MMP9 上游引物为  $5' \text{-ACCTGGACCGTGCCGTGAT-3'}$ ,下游引物为  $5' \text{-TGCCTCGCCGCTGTAAAT-3'}$ 。基因的相对表达量以 5S 和  $\beta actin$  为参考基因通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法表达为倍数变化。

### 1.4 细胞增殖检测

在 96 孔板中接种  $95 \mu\text{L}$  细胞悬液 ( $3 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$ ),进行转染。在转染后的 24、36、48、60 和 72 h 利用 CCK-8 检测细胞增殖。检测时每孔加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 溶液,在细胞培养箱内继续孵育 2 h,用分光光度计在 450 nm 测定吸光度。每组设置 5 个重复。

### 1.5 细胞迁移检测

所有细胞培养试剂和 Transwell chamber (8 mm 孔径; BD Bioscience 公司)放在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  温育。在 24 孔板中接种  $500 \mu\text{L}$  细胞悬液 ( $1.5 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ ),进行转染。转染 48 h 后,收集细胞,用 PBS 和无血清培养基先后洗涤一次,用无血清培养基悬浮细胞,计数。在 Transwell 下室加入  $600 \mu\text{L}$

含 20% 血清的培养基,上室加入  $100 \mu\text{L}$  细胞悬液,每孔  $5 \times 10^4$  个细胞,继续在培养箱培养 16 h,收集下室的细胞进行计数。每组设置 2 个重复。

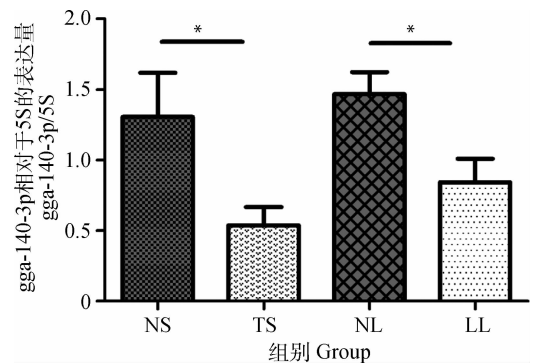
### 1.6 统计分析

所有数据的表达形式为“ $\bar{x} \pm s_x$ ”。用 SAS 软件按照 Student's *t* 检验进行统计分析。当  $P < 0.05$  时表示数据之间差异显著;当  $P < 0.01$  时表示数据之间差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 gga-miR-140-3p 在不同组织中的差异表达

gga-miR-140-3p 在不同组织中的表达量见图 1。与非感染组脾相比,gga-miR-140-3p 在肿瘤化脾中显著下调( $P < 0.05$ );与非感染组肝相比,gga-miR-140-3p 在肝淋巴瘤中也呈现显著低表达( $P < 0.05$ )(图 1)。结果表明该 miRNA 在 MD 肿瘤化组织中表达下调。



NS. 非感染脾;TS. 肿瘤化脾;NL. 非感染肝;LL. 肝淋巴瘤。 $n=8$ , \* .  $P < 0.05$

NS. Non-infected spleen; TS. Tumorous spleen; NL. Non-infected liver; LL. MD lymphoma from liver.  $n=8$ . \* .  $P < 0.05$

图 1 不同组织中 gga-miR-140-3p 表达水平

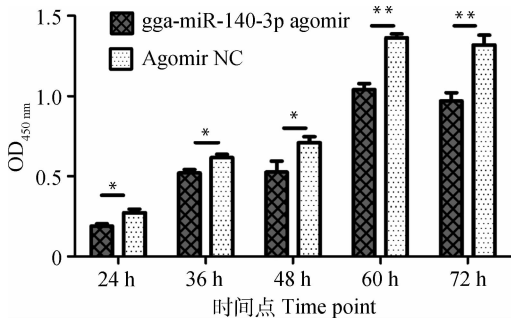
Fig. 1 Differential expression of gga-miR-140-3p in different tissues

### 2.2 gga-miR-140-3p 对 MD 肿瘤细胞 MSB1 增殖的影响

过表达 gga-miR-140-3p 对 MSB1 细胞增殖影响的检测结果见图 2。与对照组相比,转染 gga-miR-140-3p agomir 后的 24、36、48 h 细胞吸光值显著( $P < 0.05$ )降低,60 和 72 h 吸光值极显著( $P < 0.01$ )降低(图 2)。这表明该 miRNA 能显著抑制 MD 肿瘤淋巴细胞增殖。

### 2.3 gga-miR-140-3p 对 MD 肿瘤细胞 MSB1 迁移的影响

过表达 gga-miR-140-3p 对 MSB1 细胞迁移影



$n=5$ , \* .  $P<0.05$ , \* \* .  $P<0.01$

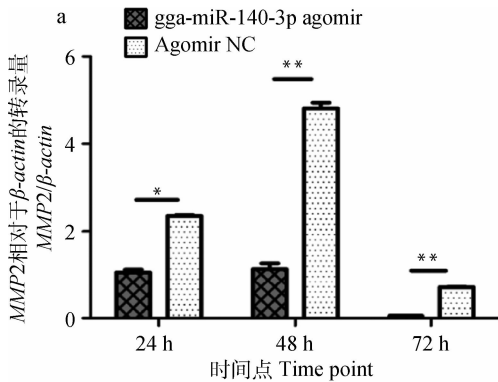
图2 gga-miR-140-3p对MSB1细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of gga-miR-140-3p on MSB1 cell proliferation

响的检测结果见图3。与对照组相比,转染 gga-miR-140-3p agomir后,Transwell 下室中的细胞数目显著( $P<0.05$ )较低(图3)。这表明该 miRNA 能显著抑制 MSB1 细胞迁移。

#### 2.4 gga-miR-140-3p对MD肿瘤细胞MSB1侵袭的影响

过表达 gga-miR-140-3p对MMP2、MMP9转录量影响的检测结果见图4。转染 gga-miR-140-3p



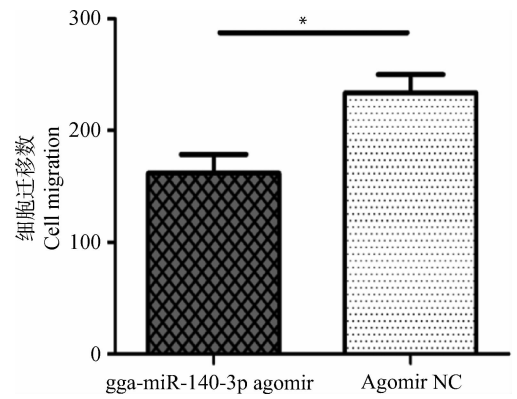
$n=3$ , \* .  $P<0.05$ , \* \* .  $P<0.01$

图4 gga-miR-140-3p对MMP2和MMP9转录的影响

Fig. 4 Effect of gga-miR-140-3p on MMP2 and MMP9 mRNA expression level

### 3 讨论

作为一种短的非编码RNA,miRNA参与肿瘤发生的报道日趋增多<sup>[17-21]</sup>。在前期试验中,通过Solexa高通量测序发现gga-miR-140-3p在MDV引发的肿瘤化脾及肝淋巴瘤中表达异常<sup>[16]</sup>,提示该miRNA或许能够作为MD肿瘤发生的生物标记。MDCC-MSB1细胞是一种由感染MDV BC-1毒株引发的脾淋巴瘤制备的细胞系,主要由CD4<sup>+</sup>T细胞组成,可以作为研究MD肿瘤转化的细胞模

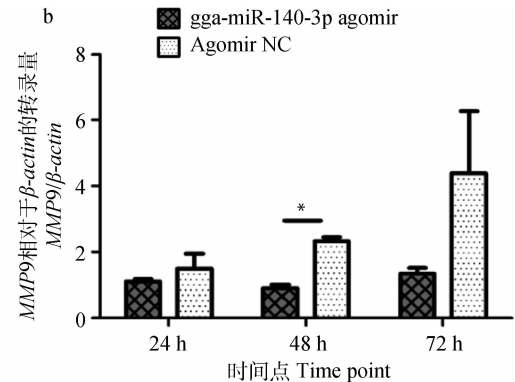


$n=2$ , \* .  $P<0.05$

图3 gga-miR-140-3p对MSB1细胞迁移的影响

Fig. 3 Effect of gga-miR-140-3p on MSB1 cell migration

agomir后,MMP2转录量在24h显著( $P<0.05$ )降低,48和72h极显著( $P<0.01$ )降低(图4a);MMP9转录量在48h显著( $P<0.05$ )降低(图4b)。这表明该miRNA能够影响与侵袭相关基因的转录,从而可能影响MD肿瘤细胞侵袭。



型<sup>[22-23]</sup>。为揭示gga-miR-140-3p在MD肿瘤转化过程中的作用,我们研究了它对肿瘤细胞MSB1功能的影响,结果表明该miRNA在一定程度上能够影响MD肿瘤细胞增殖和迁移,同时能影响与侵袭密切相关基因的转录水平。

miR-140在多种癌症中表达紊乱,通过靶向不同靶基因发挥各种各样的作用。miR-140-3p在肺鳞状细胞癌<sup>[24]</sup>、卵巢癌<sup>[25]</sup>、鳞状上皮细胞癌<sup>[26]</sup>和基质细胞瘤<sup>[27]</sup>中表达下调,扮演肿瘤抑制因子的作用;然而在脊髓脊索瘤<sup>[28]</sup>中表达上调,扮演原癌

miRNA 的角色。F. Tian 等<sup>[29]</sup>报道,与非感染组相比,感染 MDV 后 gga-miR-140 在 MD 易感系 7<sub>2</sub> 脾中表达下调。L. Lian 等<sup>[30]</sup>报道在感染 MDV 14 d 后,gga-miR-140-3p 在感染脾中的表达量显著降低,表明该 miRNA 表达异常在肿瘤转化前期就已发生,肿瘤细胞在早期已经开始渗透入脾。我们的研究结果也显示 gga-miR-140-3p 在 MDV 引发的肿瘤化脾中表达下调。在感染 MDV 的鸡肌肉成纤维细胞(chicken embryo fibroblast, CEF)中,gga-miR-140-3p 呈现高表达趋势<sup>[31]</sup>;然而,我们发现 gga-miR-140-3p 在感染 MDV 的肿瘤化脾和肝淋巴瘤中表达比非感染组低。造成该 miRNA 表达差异的原因可能是因为 CEF 和脾、肝的细胞组成成分不一致,CEF 主要是肌肉成纤维细胞,而脾和肝中含有大量的淋巴细胞。在骨肉瘤细胞 U-2 OS 和结肠癌细胞 HCT116 中,过表达 miR-140 能够诱导 p53 和 p21 表达,同时伴随细胞周期 G1 和 G2 期阻滞;进一步研究发现,该 miRNA 是通过靶向组蛋白去乙酰酶 4(histone deacetylase 4, HDAC4)介导细胞周期进程<sup>[32]</sup>。在骨肉瘤细胞 MG63 中,过表达 miR-140 使细胞周期阻滞在 G0/G1 期,同时细胞迁移发生抑制<sup>[33]</sup>。过表达 gga-miR-140-3p 显著抑制 MSB1 细胞增殖,提示该 miRNA 可能参与 MD 肿瘤细胞增殖。不过增殖发生抑制的原因是由细胞周期阻滞还是凋亡抑制引发还需要进一步研究。过表达 miR-140-3p 抑制肺癌细胞 A549 和 H1299 的增殖、迁移和侵袭<sup>[34]</sup>。在非小细胞肺癌裸鼠中,miR-140-3p 靶向 ATP 酶磷脂运输 8A1(ATPase phospholipid transporting 8A1, ATP8A1)诱导凋亡从而抑制肿瘤细胞增殖,并且该 miRNA 抑制细胞迁移和侵袭<sup>[35]</sup>。迁移作为肿瘤转化的重要特征之一,我们利用 Transwell 进行迁移试验检测过表达 gga-miR-140-3p 对 MSB1 迁移能力的影响。考虑到 MSB1 属于悬浮细胞,细胞无法黏附在 Transwell 上室的膜上,而是会移动到下室的培养基中,所以我们采用细胞计数的方法来反映细胞迁移情况,过表达 gga-miR-140-3p 显著抑制 MSB1 细胞迁移。金属基质蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)能够降解基底膜的主要组成成分——IV 型胶原蛋白,参与肿瘤细胞侵袭和转移,其中 MMP2 和 MMP9 是 MMP 家族的重要成员<sup>[36-39]</sup>。定量检测 MMP2 和 MMP9 基因表达可以间接反映肿瘤细胞的侵袭能力。过表达 gga-miR-140-3p 抑制 MMP2 和 MMP9

的表达,提示该 miRNA 可能通过抑制细胞侵袭影响 MD 肿瘤转化过程。

## 4 结 论

gga-miR-140-3p 作为在 MD 肿瘤中异常表达的 miRNA,能够影响 MD 肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,提示该 miRNA 可能通过影响肿瘤细胞功能参与肿瘤转化过程,该 miRNA 可以作为 MD 肿瘤发生的指示标志。

## 参考文献(References):

- [1] BIGGS P M. The Leeuwenhoek Lecture, 1997. Marek's disease herpesvirus: oncogenesis and prevention[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1997, 352(1364):1951-1962.
- [2] CALNEK B W. Marek's disease-a model for herpesvirus oncology[J]. *Crit Rev Microbiol*, 1986, 12(4): 293-320.
- [3] CALNEK B W. Pathogenesis of Marek's disease virus infection [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 255:25-55.
- [4] BHATTACHARYAS D, GARRISON J, GUO H T, et al. Micro-RNA-181a regulates osteopontin-dependent metastatic function in hepatocellular cancer cell lines[J]. *Surgery*, 2010, 148(2):291-297.
- [5] XU H T, YAO Y X, SMITH L P, et al. MicroRNA-26a-mediated regulation of interleukin-2 expression in transformed avian lymphocyte lines[J]. *Cancer Cell Int*, 2010, 10:15.
- [6] LI X, LIAN L, ZHANG D X, et al. gga-miR-26a targets NEK6 and suppresses Marek's disease lymphoma cell proliferation[J]. *Poult Sci*, 2014, 93(5): 1097-1105.
- [7] FAVREAU A J, SATHYANARAYANA P. miR-590-5p, miR-219-5p, miR-15b and miR-628-5p are commonly regulated by IL-3, GM-CSF and G-CSF in acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Res*, 2012, 36(3): 334-341.
- [8] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [9] BRENNECKE J, STARK A, RUSSELL R B, et al. Principles of microRNA-target recognition[J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(3):e85.
- [10] YAO Y X, ZHAO Y G, SMITH L P, et al. Differential expression of microRNAs in Marek's disease vi-

- rus-transformed T-lymphoma cell lines [J]. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt 7):1551-1559.
- [11] ZHAO Y G, YAO Y X, XU H T, et al. A functional MicroRNA-155 ortholog encoded by the oncogenic Marek's disease virus [J]. *J Virol*, 2009, 83(1):489-492.
- [12] CHI J Q, TENG M, YU Z H, et al. Marek's disease virus-encoded analog of microRNA-155 activates the oncogene c-Myc by targeting LTBP1 and suppressing the TGF- $\beta$  signaling pathway [J]. *Virology*, 2015, 476:72-84.
- [13] LI Z J, ZHANG Y P, LI Y, et al. Distinct expression pattern of miRNAs in Marek's disease virus infected-chicken splenic tumors and non-tumorous spleen tissues [J]. *Res Vet Sci*, 2014, 97(1):156-161.
- [14] BURNSIDE J, OUYANG M, ANDERSON A, et al. Deep sequencing of chicken microRNAs [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9:185.
- [15] LIAN L, LI X, ZHAO C F, et al. Chicken gga-miR-181a targets MYBL1 and shows an inhibitory effect on proliferation of Marek's disease virus-transformed lymphoid cell line [J]. *Poult Sci*, 2015, 94(11):2616-2621.
- [16] LIAN L, QU L J, CHEN Y M, et al. A systematic analysis of miRNA transcriptome in Marek's disease virus-induced lymphoma reveals novel and differentially expressed miRNAs [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e51003.
- [17] LI X, LIAN L, ZHANG D X, et al. gga-miR-26a targets NEK6 and suppresses Marek's disease lymphoma cell proliferation [J]. *Poult Sci*, 2014, 93(5):1097-1105.
- [18] LIAN L, LI X, ZHAO C F, et al. Chicken gga-miR-181a targets MYBL1 and shows an inhibitory effect on proliferation of Marek's disease virus-transformed lymphoid cell line [J]. *Poult Sci*, 2015, 94(11):2616-2621.
- [19] HAN B, LIAN L, LI X, et al. Chicken gga-miR-130a targets HOXA3 and MDFIC and inhibits Marek's disease lymphoma cell proliferation and migration [J]. *Mol Biol Rep*, 2016, 43(7):667-676.
- [20] ZHAO C F, LI X, HAN B, et al. Gga-miR-219b targeting BCL11B suppresses proliferation, migration and invasion of Marek's disease tumor cell MSB1 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:4247.
- [21] TIAN F, LUO J, ZHANG H M, et al. MiRNA expression signatures induced by Marek's disease virus infection in chickens [J]. *Genomics*, 2012, 99(3):152-159.
- [22] AKIYAMA Y, KATO S. Two cell lines from lymphomas of Marek's disease [J]. *Biken J*, 1974, 17(3):105-116.
- [23] NAZERIAN K. An updated list of avian cell lines and transplantable tumours [J]. *Avian Pathol*, 1987, 16(3):527-544.
- [24] TAN X G, QIN W Y, ZHANG L, et al. A 5-microRNA signature for lung squamous cell carcinoma diagnosis and hsa-miR-31 for prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(21):6802-6811.
- [25] MILES G D, SEILER M, RODRIGUEZ L, et al. Identifying microRNA/mRNA dysregulations in ovarian cancer [J]. *BMC Res Notes*, 2012, 5:164.
- [26] SAND M, SKRYGAN M, GEORGAS D, et al. Microarray analysis of microRNA expression in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *J Dermatol Sci*, 2012, 68(3):119-126.
- [27] SAND M, SKRYGAN M, SAND D, et al. Expression of microRNAs in basal cell carcinoma [J]. *Br J Dermatol*, 2012, 167(4):847-855.
- [28] ZOU M X, HUANG W, WANG X B, et al. Identification of miR-140-3p as a marker associated with poor prognosis in spinal chordoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(8):4877-4885.
- [29] TIAN F, LUO J, ZHANG H M, et al. MiRNA expression signatures induced by Marek's disease virus infection in chickens [J]. *Genomics*, 2012, 99(3):152-159.
- [30] LIAN L, ZHANG D X, WANG Q, et al. The inhibitory effects of gga-miR-199-3p, gga-miR-140-3p, and gga-miR-221-5p in Marek's disease tumorigenesis [J]. *Poult Sci*, 2015, 94(9):2131-2135.
- [31] BURNSIDE J, OUYANG M, ANDERSON A, et al. Deep sequencing of chicken microRNAs [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9:185.
- [32] SONG B, WANG Y, XI Y, et al. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells [J]. *Oncogene*, 2009, 28(46):4065-4074.
- [33] GU R, SUN Y F, WU M F, et al. Biological roles of microRNA-140 in tumor growth, migration, and metastasis of osteosarcoma *in vivo* and *in vitro* [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1):353-360.
- [34] KONG X M, ZHANG G H, HUO Y K, et al. MicroRNA-140-3p inhibits proliferation, migration and

- invasion of lung cancer cells by targeting ATP6AP2 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10):12845-12852.
- [35] DONG W, YAO C P, TENG X P, et al. MiR-140-3p suppressed cell growth and invasion by downregulating the expression of ATP8A1 in non-small cell lung cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3):2973-2985.
- [36] STETLER-STEVENSON W G, AZNAVOORIAN S, LIOTTA L A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis [J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1993, 9(1):541-573.
- [37] SUN J, HEMLER M E. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5):2276-2281.
- [38] LUO Y, LIANG F B, ZHANG Z Y. PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(8):1838-1846.
- [39] TABOURET E, BOUDOURESQUE F, FARINA P, et al. MMP2 and MMP9 as candidate biomarkers to monitor bevacizumab therapy in high-grade glioma [J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17(8):1174-1176.

(编辑 白永平)