

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.02.003  
文章编号: 1005-8982(2020)02-0014-08

## 慢病毒载体对 MDA-MB-231 细胞中 microRNA-18a-3P 表达的影响\*

王立斌<sup>1</sup>, 王丹妮<sup>2</sup>, 马荣<sup>1</sup>, 张旭<sup>1</sup>, 田进海<sup>1</sup>, 李晓菡<sup>2</sup>, 冯惠敏<sup>2</sup>, 马芳<sup>2</sup>

(1. 宁夏医科大学总医院 生物芯片工程研究中心, 宁夏 银川 750004,  
2. 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏 银川 750004)

**摘要: 目的** 构建人 microRNA-18a-3P(miR-18a-3P) 过表达及干扰慢病毒载体, 研究病毒感染人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的步骤和方法。**方法** PCR 技术扩增相应目的基因片段并进行酶切, 回收后与目的基因连接, 产物转化细菌感受态细胞, 对阳性克隆测序行对比分析, 构建 miR-18a-3P 过表达及干扰慢病毒载体, 荧光法测定病毒滴度; 倒置荧光显微镜观察人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 转染及筛选过程的转染效率, 筛选最佳 MOI 值; qRT-PCR 检测慢病毒转染后 MDA-MB-231 细胞内 miR-18a-3P 的表达。**结果** 测序分析证实重组慢病毒构建正确; 过表达及干扰慢病毒滴度分别为  $2 \times 10^9$  和  $1 \times 10^9$  TU/ml; 加 Polybrene 较未加 Polybrene 转染效率升高, 当感染复数为 10 TU/ml, Polybrene 浓度为  $1 \mu\text{g/ml}$  时, 转染效率最佳; miR-18a-3P 转染组过表达 miR-18a-3P 的相对表达量较空白对照组、阴性对照组高 ( $P < 0.05$ ), miR-18a-3P 转染组干扰表达 miR-18a-3P 的相对表达量较空白对照组、阴性对照组低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 成功构建了 miR-18a-3P 过表达及干扰慢病毒表达载体, 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 进行转染和筛选后, 可快速高效率获得所需目的细胞。

**关键词:** 乳腺肿瘤; microRNA-18a-3P/ 微 RNAs; 慢病毒感染

**中图分类号:** R737.9

**文献标识码:** A

## Effect of lentiviral vector on the expression of microRNA-18a-3P in MDA-MB-231 cells\*

Li-bin Wang<sup>1</sup>, Dan-ni Wang<sup>2</sup>, Rong Ma<sup>1</sup>, Xu Zhang<sup>1</sup>, Jin-hai Tian<sup>1</sup>, Xiao-han Li<sup>2</sup>, Hui-min Feng<sup>2</sup>, Fang Ma<sup>2</sup>

(1. Department of Biochip Research Center, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Clinical Medicine College, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

**Abstract: Objective** To construct a lentivirus vector expressing miRNA-18a-3P, and to discuss the optimal steps and methods in infecting human breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods** Target gene which was digested to be amplified by PCR, and then those target genes were connected with carriers. The products were transformed into bacterial competent cells. The positive clones were sequenced and analyzed to construct miR-18a-3P overexpression or interference lentiviral vectors. The virus titer was determined by fluorescence method. In the process of transfection and screening of human breast cancer cell line MDA-MB-231, the transfection efficiency

收稿日期: 2019-07-26

\* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81560474, 81860470); 宁夏高等学校优秀青年培育项目(No: NGY2018-91); 宁夏高等学校一流学科建设资助项目(No: NXYLXK2017A05)

was observed by inverted microscope, and the optimal MOI value was screened. Real-time PCR was used to detect the expression of miR-18a-3P in MDA-MB-231 cells after lentivirus transfection. **Results** Sequencing proved that recombinant lentiviral expression vector was constructed correctly. The titer of obtained overexpression and suppression expression recombinant lentivirus was  $2 \times 10^9$  TU/ml and  $1 \times 10^9$  TU/ml. The transfection efficiency was higher in the polybrene group than in the non-polybrene group, and the transfection efficiency was the best when the polybrene concentration was 1  $\mu$ g/ml. The expression of mir-18a-3p in mir-18a-3p transfection group was higher than that in blank control group and negative control group ( $P < 0.05$ ). The expression of mir-18a-3p in mir-18a-3p interference group was lower than that in blank control group and negative control group. **Conclusions** The lentiviral expression or interference vector for miR-18a-3P is successfully constructed, and target cells can be obtained after transfection and selection of human breast cancer MDA-MB-231 cells.

**Keywords:** breast neoplasms; mir-18a-3p/microRNAs; lentivirus infections

MicroRNAs (miRNAs) 是一类内源性非编码 RNA, 与 mRNA 的 3' -UTR 结合, 调控 mRNA 的表达, 影响细胞的基因转录、翻译及表观遗传等环节, 参与肿瘤细胞的发生、发展<sup>[1]</sup>。miR-18a 是一个新的肿瘤相关 miRNA。有文献报道 miR-18a 能通过调控多种靶基因影响肿瘤细胞的功能<sup>[2-4]</sup>。miR-18a 在形成过程中存在 2 种形式, 即 miR-18a-3P 和 miR-18a-5P, 目前已有关于 miR-18a-5P 在肿瘤发生中作用的研究报道, 而 miR-18a-3P 与肿瘤的关系很少报道<sup>[5]</sup>。本研究通过建立 miR-18a-3P 慢病毒载体, 鉴定其在人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中的表达, 为研究 miR-18a-3P 对乳腺癌发生、发展的影响及探究机制奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和主要试剂、仪器

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购自美国典型培养物保藏中心, 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、慢病毒载体 GV369 和 GV280 及 Polybrene 购自上海吉凯基因有限公司, DMEM 细胞培养液、标准胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司; PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 及 Premix Ex Taq<sup>®</sup> Version2.0 等购自日本 TaKaRa 公司, Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 1 kP DNA Ladder Marker 购自美国 Fermentas 公司, 限制性内切酶 Age I、Nhe I 及 EcoR I 购自美国 NEB 公司, 质粒抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司, U6、miR-18a-3P 引物合成及质粒测序由上海生工生物工程有限公司完成。二氧化碳 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司, 超净工作台购自新加坡艺思高科技有限公司, 台式细胞离心

机购自德国 Eppendorf 公司, 倒置荧光显微镜购自德国 LEICA 公司; Light Cycler480 II 型 qRT-PCR 仪购自美国 Roche 公司。以不转染病毒载体作为空白对照组, 转染病毒空载体作为阴性对照组, 将转染的 miR-18a-3P 作为 miR-18a-3P 转染组。

### 1.2 miR-18a-3P 干扰与过表达慢病毒载体的构建

**1.2.1 引物合成及目的基因片段获取** 为构建 miR-18a-3P 过表达慢病毒载体, 首先通过 miRbase 数据库查找 miR-18a-3P 成熟引物序列, 依据序列组成设计合成引物, 其中包含交换配对碱基、酶切位点及用于 PCR 扩增 microRNA 的 5' 端部分序列。所采用的过表达载体为上海吉凯公司的慢病毒载体 GV369, 元件顺序为 Ubi-MCS-SV40-EGFP-IRES-puromycin。构建 miR-18a-3P 干扰表达慢病毒载体为 GV280, 载体的元件顺序为 hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin。经查询和确认, 所设计反向互补序列分别合成 2 段寡聚核苷酸, 其上游为 5'-, 其下游把合成的引物用 ddH<sub>2</sub>O 在 90 $^{\circ}$ C 水浴中溶解稀释, 室温自然冷却。抽提人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的基因组 DNA, 并以此作为模板用上述引物, PCR 扩增 miR-18a-3P, 分别以限制性内切酶 Age I /Nhe I 和 Age I /EcoR I 酶切收集目的基因片段。

**1.2.2 载体的构建与鉴定** 分别用限制性内切酶 Age I / 和 Nhe I 在 37 $^{\circ}$ C 条件下酶切载体 GV369, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下, 用限制性内切酶 Age I / 和 EcoR I 酶切载体 GV280, 3 h 后获得酶切后的线性载体。然后将 1.2.1 中获得的目的基因片段移入线性表达载体, 以 1 : 2 的摩尔比将线性载体 DNA 和纯化的 PCR 产物混合, 16 $^{\circ}$ C 条件下孵育 6 h, 使其充分反应。将上述

连接产物转化入感受态细胞,在含有 Amp 的 LB 固体培养基平板上均匀涂布,37℃过夜孵育,挑取阳性的单克隆菌落,用 PCR 进行菌落鉴定,并取菌液测序,选择 PCR 鉴定阳性的克隆与测序结果,并进行对比分析。

**1.2.3 慢病毒包装与浓缩** 采用三质粒共转染 293T 细胞的方法进行病毒包装,用质粒抽提试剂盒分别提取 GV 载体质粒、pHelper1.0 载体质粒和 pHelper 2.0 载体质粒 DNA,将提取的质粒 DNA 溶于无菌 TE 中,测定其浓度及纯度,确认质粒 DNA 的纯度(A260/A280)在 1.8 ~ 2.1。消化处于对数生长期的 293T 细胞,接种于 10 cm<sup>3</sup> 细胞培养皿中培养,待细胞融合度达 60% ~ 70% 时,更换为无血清培养基,继续培养 2 h 后,缓慢滴加含 GV 载体质粒 20 μg、pHelper 1.0 载体质粒 15 μg、pHelper 2.0 载体质粒 10 μg 及一定体积转染试剂的混合液,继续在培养箱中培养 6 h 后,弃去转染混和液后用 PBS 液清洗 1 遍,加入 10% 血清培养基继续培养,分别于 48 和 72 h 收集培养细胞上清液,4℃、12 000 r/min 离心 10 min,除去细胞碎片;0.45 μm 过滤后,4℃、25 000 r/min 离心 2 h,弃上清,加病毒保存液,分装,-80℃保存。

**1.2.4 病毒滴度测定** 取 3 个无菌 Ep 管,依次编号 1、2、3,每管均加入无血清培养基 90 μl,在 1 号管内加入 10 μl 待测原液病毒,吹打混匀后取 10 μl 加入到 2 号管中;2 号管再吹打混匀后取 10 μl 加入到 3 号管。1 号管内加入 10 μl 病毒原液,计为 1E+1 μl;2 号管中进行第 1 次 10 倍稀释,所得病毒原液为 1 号管中的 1/10,计为 1E+0 μl;3 号管中进行第 2 次 10 倍稀释,计为 1E-1 μl。将 293T 细胞按 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 96 孔板,细胞培养箱中培养 12 h,待细胞融合度达 60% 时,弃培养基,加入 90 μl 上述稀释好的病毒,继续培养 24 h,再添加完全培养基 100 μl,48 h 后荧光显微镜下观察荧光亮度并拍照。根据绿色荧光蛋白的表达量计算病毒滴度,病毒滴度 = 荧光细胞数 / 原液

病毒数。

### 1.3 感染复数

MDA-MB-231 细胞按 1 × 10<sup>4</sup> 个/孔接种至 96 孔板中,共接种 8 孔。将慢病毒稀释后分别加入其中 4 孔,使其感染复数(multiplicity of infection, MOI)值分别为 0、5、10 及 20;另外 4 孔在加入相应浓度病毒的同时,还添加 1 μg/ml Polybrene。转染 12 h 后,将上层培养基吸除,添加新鲜培养基,继续培养 48 h,荧光显微镜下观察并拍照。通过对细胞感染效果的评估,明确 MDA-MB-231 细胞的感染条件并计算 MOI。

### 1.4 稳定转染细胞株筛选

MDA-MB-231 细胞按 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板中,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h,待细胞密度达 50% 时病毒转染。先将 6 孔板中细胞上清液吸除,每孔中加入 1 ml 无血清培养基配制的转染液,培养 24 h,待病毒转染进细胞后吸除转染液,加入含 1 μg/ml 嘌呤霉素培养基继续培养,隔天更换 1 次培养基,3 或 4 d 后即可获得能稳定传代的转染细胞,经传代培养后,分别冻存同一批次的各组细胞 5 支备用。

### 1.5 miR-18a-3P 在稳定转染细胞株中的表达

取稳定转染的 MDA-MB-231 细胞,按照 miR Neasy Mini Kit 试剂说明书提取细胞总 RNA。使用 microRNA cDNA Synthesis Kit 试剂盒将各细胞总 RNA 逆转录成 cDNA,逆转录反应体系内共加入 200 ng 总 RNA,置于 -80℃ 储存备用。取 cDNA 行 qRT-PCR:94℃ 预变性 2 min,92℃ 变性 20 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,共 30 个循环,72℃ 继续延伸 7 min。用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算各基因的相对表达量。见表 1。

### 1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism6 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较用方差分析,进一步两两比较用 LSD-t 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 qRT-PCR 的引物序列

基因	引物序列	长度 /bp	Tm 值 /℃
U6	正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	17	60
	反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	20	60
miR-18a-3P	正向: 5'-CGACTGCCCTAAGTGCTCC-3'	19	60
	反向: 5'-AGTGCAGGCTCCGAGGTATT-3'	20	60

## 2 结果

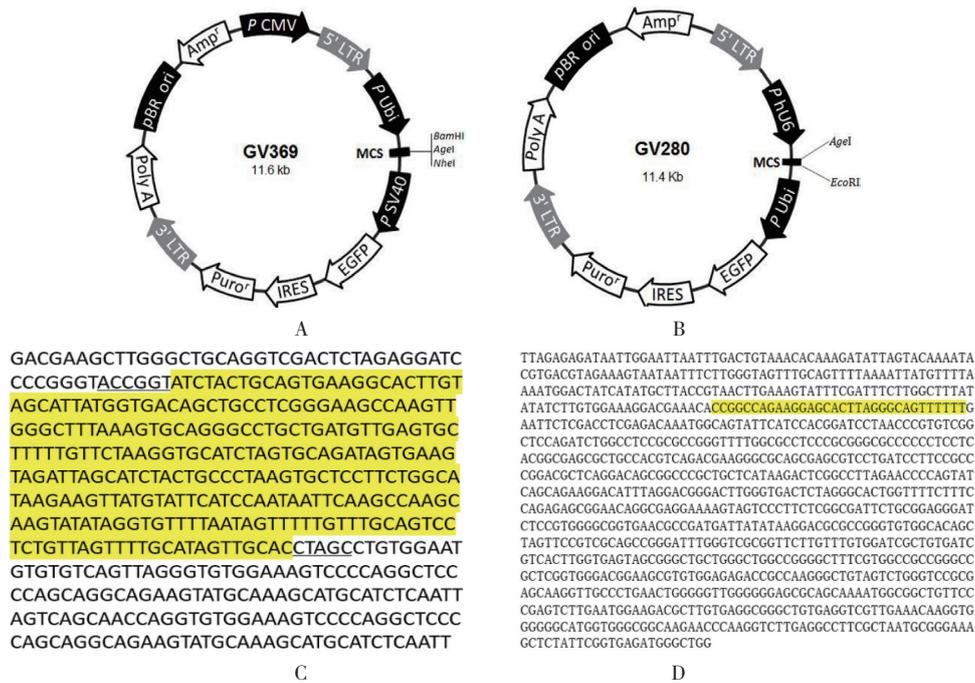
### 2.1 miR-18a-3P 慢病毒载体的构建及测序结果

将 miR-18a-3P 过表达及干扰慢病毒载体 GV369 和 GV280 (见图 1A、B)。将筛选出来的阳性重组克隆菌落挑于液体 LB 培养基中扩增培养, 提取质粒后进行测序分析, 并与 miR-18a-3P 反向互补序列比

对, 结果完全匹配, 未见碱基缺失或突变等异常 (见图 1C、D)。

### 2.2 慢病毒滴度测定

构建好的 miR-18a-3P 过表达慢病毒滴度为  $2 \times 10^9$  TU/ml, miR-18a-3P 干扰慢病毒滴度为  $1 \times 10^9$  TU/ml。见图 2、3。



A: miR-18a-3P 过表达慢病毒 GV369 载体图谱; B: miR-18a-3P 干扰慢病毒 GV280 载体图谱; C: miR-18a-3P 过表达载体测序结果 (黄色区域部分为目的序列); D.miR-18a-3P 干扰载体测序结果 (黄色区域部分为目的序列)。

图 1 GV369 和 GV280 载体结构及测序

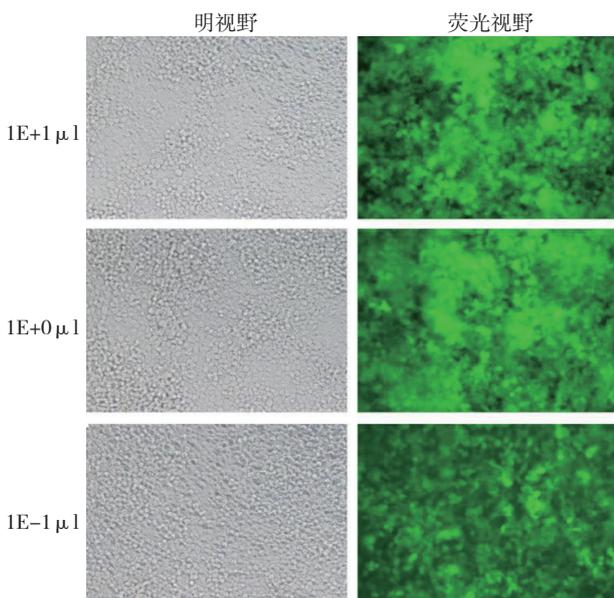


图 2 过表达慢病毒荧光法滴度测定 (×100)

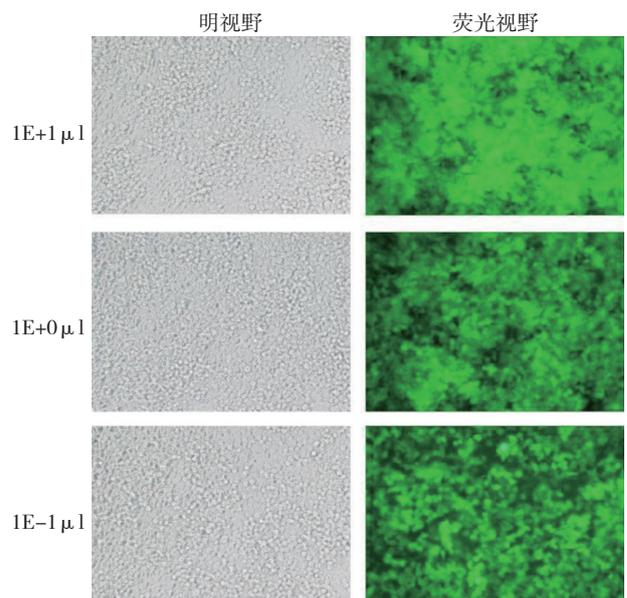


图 3 干扰表达慢病毒荧光法滴度测定 (×100)

2.3 稳定过表达和干扰的 MDA-MB-231 细胞系建立及载体 MOI 值测定

miR-18a-3P 过表达及干扰慢病毒载体感染

MDA-MB-231 细胞 48 h 后, 当 MOI 值为 10 TU/ml, Polybrene 浓度为  $1 \mu\text{g/ml}$  时, 转染效率最高, 且效率  $>80\%$ , 筛选后得到满意的细胞。见图 4 ~ 7。

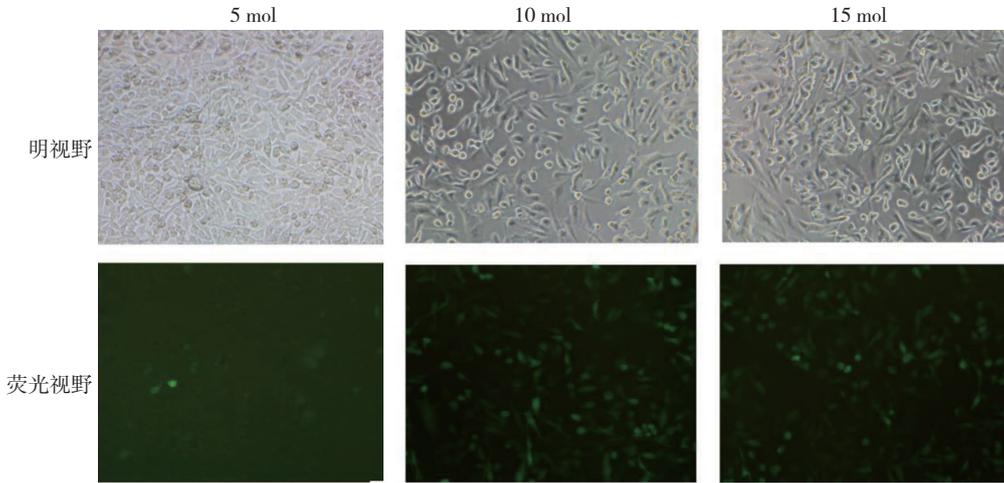


图 4 MDA-MB-231 细胞未加 Polybrene 时 miR-18a-3P 过表达载体感染 (光镜  $\times 100$ )

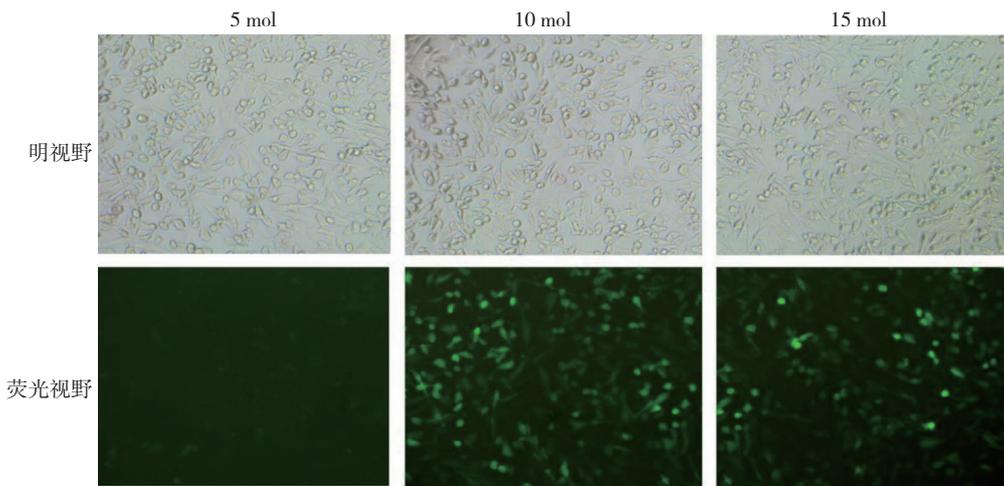


图 5 MDA-MB-231 细胞加 Polybrene 后 miR-18a-3P 过表达载体感染 (光镜  $\times 100$ )

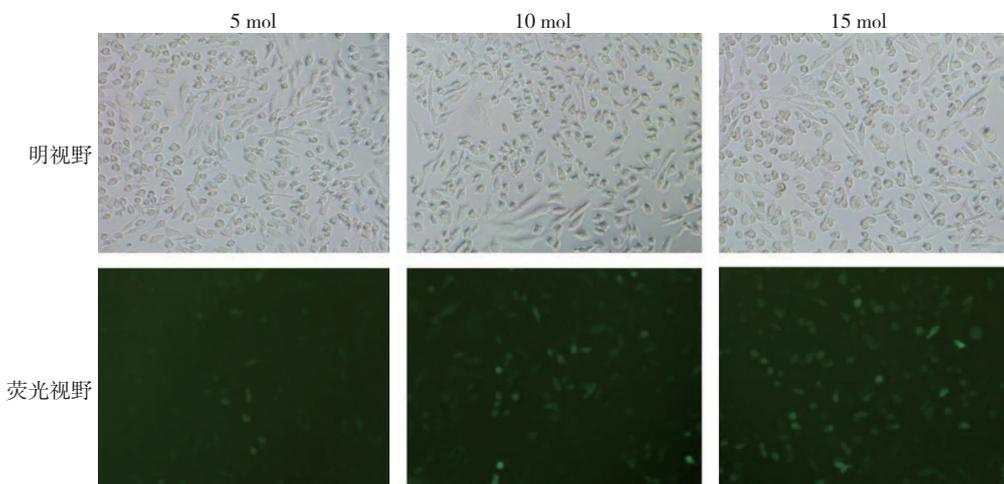


图 6 MDA-MB-231 细胞未加 Polybrene 时 miR-18a-3P 干扰载体感染 (光镜  $\times 100$ )

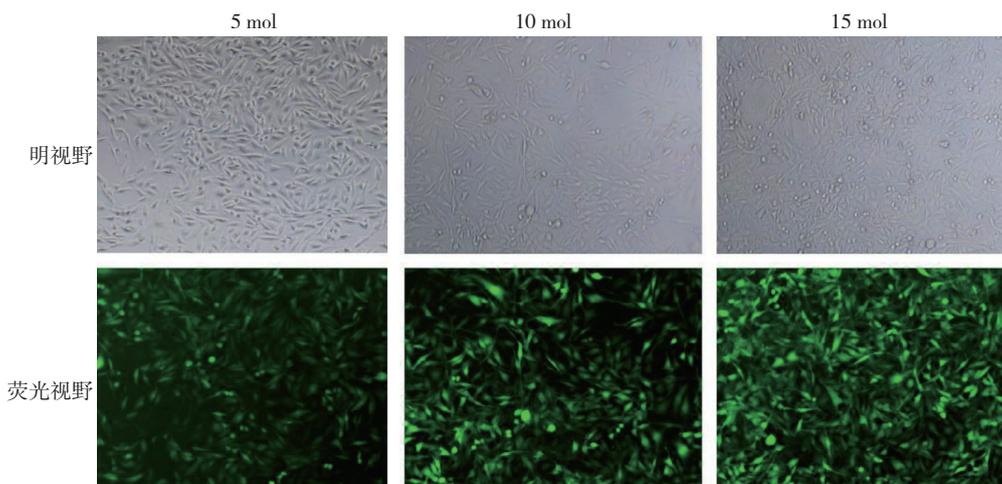


图 7 MDA-MB-231 细胞加 Polybrene 后 miR-18a-3P 干扰载体感染 (光镜 × 100)

### 2.4 各组 miR-18a-3P 相对表达量比较

miR-18a-3P 过表达慢病毒载体转染后, 各组 miR-18a-3P 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), miR-18a-3P 转染组较其他两组高 ( $P < 0.05$ )。miR-18a-3P 干扰表达慢病毒载体转染后, 各组 miR-18a-3P 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), miR-18a-3P 转染组较其他两组低 ( $P < 0.05$ )。见表 2 和图 8、9。

表 2 各组 miR-18a-3P 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-18a-3P 过表达慢病毒	miR-18a-3P 干扰慢病毒
空白对照组	1.000 ± 0.000 <sup>†</sup>	1.000 ± 0.000 <sup>†</sup>
阴性对照组	1.175 ± 0.035 <sup>†</sup>	0.835 ± 0.077 <sup>†</sup>
miR-18a-3P 转染组	2.065 ± 0.049	0.125 ± 0.021
F 值	528.905	199.531
P 值	0.000	0.001

注: † 与 miR-18a-3P 转染组比较,  $P < 0.05$ 。

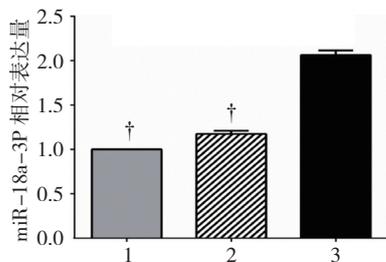


图 8 各组过表达 miR-18a-3P 慢病毒载体转染 MDA-MB-231 细胞后 miR-18a-3P 的相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

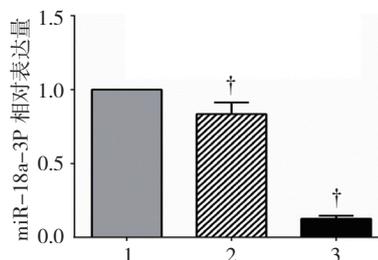


图 9 各组干扰表达 miR-18a-3P 慢病毒载体转染 MDA-MB-231 细胞后 miR-18a-3P 的相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

miRNA 是存在于多种真核细胞生物中的一类单链非编码 RNA 分子, 多数 miRNA 由大约 70 个碱基组成的发夹结构 RNA 前体经过 Dicer 酶酶切加工形成。miRNA 前体在酶切过程中可以产生 2 条有功能的成熟 miRNA, 以 miRNA-5p 和 miRNA-3p 命名<sup>[6]</sup>。miRNA 通过与其靶基因配对, 诱导靶基因 mRNA 降解, 抑制 mRNA 的翻译。这种调控是多向发生的, 一个 miRNA 可以调控多个 mRNA 的表达, 多个 miRNA 也可以分别与同一个 mRNA 序列结合<sup>[7-8]</sup>。由于存在调控方式和结合位点的多样性, miRNA 在基因转录、翻译及表观遗传等环节调控基因组表达, 参与肿瘤细胞增殖、转移等过程<sup>[9]</sup>。

miR-18a 属于 miR-17-92 基因簇, 通常与抑癌基因 GUGC 序列结合发挥作用<sup>[10]</sup>。现已发现 miR-18a 与多种疾病相关, RAO 等<sup>[11]</sup>证实四氢大麻酚通过调节 miR-17-92 簇和诱导 T 细胞, 减轻葡萄球菌肠毒

素 B 刺激的小鼠炎性肺损伤,并防止死亡。MAO 等<sup>[12]</sup>证实 2 型糖尿病引起的脑损伤患者血清中, S100 蛋白和内皮素 -1 等生化指标的升高与 miRNA-18a 表达下调有关。YAU 等<sup>[13]</sup>发现 miR-18a 的表达与非侵袭性结直肠癌的发展密切相关,认为 miRNA-18a 可以成为诊断结直肠癌的一个潜在生物标志物。在乳腺肿瘤研究中, FAN<sup>[14]</sup>、KRUTILINA 等<sup>[15]</sup>和 QI 等<sup>[16]</sup>发现, miR-18a 可通过干扰缺氧诱导因子 1 $\alpha$  亚基和调控 mTOR 信号通路的表达,增强乳腺癌细胞凋亡及自噬的比率。

2 种对 miR-18a 存在形式的研究中,目前只有关于 miR-18a-5p 与肿瘤关系的文献报道, LIANG 等<sup>[5]</sup>发现 miR-18a-5p 在非小细胞肺癌组织中高表达,并通过抑制干扰素调节因子 -2 的表达,抑制非小细胞性肺癌细胞自噬,并促进肿瘤细胞增殖和转移。LU 等<sup>[17]</sup>证实 miR-18a-5p 通过抑制 IRF2 的表达,促进骨肉瘤细胞的侵袭和迁移。玛依努尔·达吾提等<sup>[18]</sup>发现 miR-18a-5p 通过调控其靶基因的表达,抑制 SW480 细胞增殖并促进其凋亡。而目前关于 miR-18a-3P 与肿瘤关系的报道较少。

稳定转染和瞬时转染是目前在细胞中获得稳定表达载体的 2 种主要方式。其中瞬时转染的结果定量更加容易和快速,但该方法观察时间短,无法获得稳定传代细胞。一般用于获得外源基因稳定转染的方式常用慢病毒载体,慢病毒载体包含病毒包装、转染和整合所需的所有遗传信息,其通过感染细胞,并随着宿主细胞的分裂而扩增,实现外源基因在宿主细胞内稳定的表达。与瞬时转染相比,慢病毒转染效果更稳定,结果定量更准确<sup>[19]</sup>。

本研究首先构建了 miR-18a-3P 过表达慢病毒载体 GV369 和 miR-18a-3P 干扰慢病毒载体 GV280,并对所构建的载体进行滴度测定。将构建成功的慢病毒载体转染人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中, qRT-PCR 检测经转染载体后 MDA-MB-231 细胞株中 miR-18a-3P 的表达,发现慢病毒载体能显著改变 MDA-MB-231 细胞内 miR-18a-3P 的表达。本研究成功构建了 miR-18a-3P 慢病毒过表达载体 GV369 和干扰载体 GV280,并能在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 内稳定表达,为后续开展 miR-18a-3P 对乳腺癌发生、发展进程的研究及其分子机制奠定了实验基础。

## 参 考 文 献:

- [1] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, 16(3): 203-222.
- [2] LIU L, CAI X, LIU E, et al. MicroRNA-18a promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma via targeting KLF4[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68263-68269.
- [3] LIU X, ZHANG Y, WANG P, et al. HBX Protein-Induced downregulation of microRNA-18a is responsible for upregulation of connective tissue growth factor in hbv infection-associated hepatocarcinoma[J]. *Medical Science Monitor*, 2016, 22: 2492-2500.
- [4] XIAO H, LIU Y, LIANG P, et al. TP53TG1 enhances cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cells through regulating miR-18a/PEN axis[J]. *Cell & Bioscience*, 2018, 8: 23-36.
- [5] LIANG C, ZHANG X, WANG H M, et al. MicroRNA-18a-5p functions as an oncogene by directly targeting IRF2 in lung cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(5): 1-10.
- [6] MORO B, ROJAS A M L, PALATNIK J F. Detection of MicroRNA processing intermediates through RNA ligation approaches[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1932: 261-283.
- [7] MAKITIE R E, HACKL M, NIINIMAKI R, et al. Altered MicroRNA profile in osteoporosis caused by impaired WNT signaling[J]. *the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2018, 103(5): 1985-1996.
- [8] ISWARIYA G T, PAITAL B, PADMA P R, et al. MicroRNAs: epigenetic players in cancer and aging[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2019, 11: 29-55.
- [9] ACUNZO M, ROMANO G, WERNICKE D, et al. MicroRNA and cancer-a brief overview[J]. *Adv Biol Regul*, 2015, 57: 1-9.
- [10] VOLINIA S, CALIN G A, LIU C G, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [11] RAO R, NAGARKATTI P S, NAGARKATTI M. Delta tetrahydrocannabinol attenuates staphylococcal enterotoxin B-induced inflammatory lung injury and prevents mortality in mice by modulation of miR-17-92 cluster and induction of T-regulatory cells[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172(7): 1792-1806.
- [12] MAO G, LIU L. MicroRNA-18a is a genetic marker for the early diagnosis of cerebral injury induced by type 2 diabetes[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2014, 8(6): 1901-1905.
- [13] YAU T O, WU C W, DONG Y, et al. MicroRNA-221 and microRNA-18a identification in stool as potential biomarkers for the non-invasive diagnosis of colorectal carcinoma[J]. *British Journal of Cancer*, 2014, 111(9): 1765-1771.
- [14] FAN Y X, DAI Y Z, WANG X L, et al. miR-18a upregulation enhances autophagy in triple negative cancer cells via inhibiting mTOR signaling pathway[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2016, 20(11): 2194-2200.

- [15] KRUTILINA R, SUN W, SETHURAMAN A, et al. MicroRNA-18a inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha activity and lung metastasis in basal breast cancers[J]. *Breast Cancer Research*, 2014, 16(4): 1-16.
- [16] QI Y, WANG X, KONG X, et al. Expression signatures and roles of microRNAs in inflammatory breast cancer[J]. *Cancer cell International*, 2019, 19: 8-23.
- [17] LU C, PENG K, GUO H, et al. miR-18a-5p promotes cell invasion and migration of osteosarcoma by directly targeting IRF2[J]. *Oncology letters*, 2018, 16(3): 3150-3156.
- [18] 玛依努尔·达吾提, 胡尼其古丽·阿巴克, 阿依努尔·玉苏普, 等. 过表达 miR-18a-5p 对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制 [J]. *山东医药*, 2018, 58(8): 10-13.
- [19] WANG T, ZENG L N, ZHU Z, et al. Effect of lentiviral vector-mediated overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha delivered by pluronic F-127 hydrogel on brachial plexus avulsion in rats[J]. *Neural Regeneration Research*, 2019, 14(6): 1069-1078.

(李科 编辑)