

诱导表达型miR-302s敲入小鼠的构建及表型分析

杨桦¹ 倪良荣³ 万颖寒³ 周云鹤^{1,2} 费俭^{1,3*}

(¹同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; ²同济大学体育教学部, 上海 200092;

³上海南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要 诱导型多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)是干细胞治疗的重要手段。以过表达miR-302s制备iPSC的方法因兼备较高的诱导效率和较低的成瘤潜能, 具有良好的应用前景。为综合评价体内miR-302s过表达的生物学效应以及为临床转化提供实验依据, 该研究设计构建了miR-302s可由药物诱导过表达的敲入小鼠模型。研究结果显示, 在药物处理后, 该模型小鼠可在体内持续稳定表达导入的miR-302s基因; 初步表型分析发现, miR-302s的过表达可能导致个体脂蛋白和嘌呤代谢异常。该模型为在体研究miR-302s功能、探讨其用于干细胞治疗的可行性提供了有效工具。

关键词 miR-302s; iPSC; 诱导表达; 敲入模型

Establishment and Characterization of Inducible miR-302s Knock-in Mice

Yang Hua¹, Ni liangrong³, Wan Yinghan³, Zhou Yunhe^{1,2}, Fei Jian^{1,3*}

(¹School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²Department of Physical Education, Tongji University, Shanghai 200092, China; ³Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract Induced pluripotent stem cell (iPSC) is an important method of stem-cell therapy. Compared with traditional Oct4/Sox2/Klf4/Myc-mediated method, miR-302s-induced iPSC displays higher inductive efficiency and lower tumorigenicity, suggesting that it may have broad prospect for clinical application. In order to evaluate the biological roles of miR-302s overexpression *in vivo*, and provide experimental support for further clinical transformation, we constructed drug-inducible miR-302s knock-in mice. The results showed that the knock-in miR-302s cluster could be drug-regulated and expressed stably *in vivo*. Preliminary phenotypic analysis revealed that overexpression of miR-302s may lead to lipoprotein or purine metabolism disorder. This mice model could be a useful tool for investigate the function of miR-302s and explore its feasibility into the clinic.

Keywords miR-302s; iPSC; inducible expression; knock-in model

体细胞重编程可将分化终末期细胞重新诱导为多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC), 是干细胞治疗的重要手段, 具有良好的临床应用前景。而经典的Yamanaka 4因子包括, Oct4(POU domain class 5 transcription factor 4)、Sox2(SRY-box 2)、Klf4(Kruppel-like factor 4)和c-Myc(cellular-

myelocytomatosis viral oncogene)。经典Yamanaka 4因子诱导方法所获得的多能干细胞具有较高的肿瘤发生率, 成为其临床应用的主要障碍。

miR-302s家族最早由Suh等^[1-3]在分析人类ES细胞miRNA表达谱时被发现。该家族包含在染色体上串联排列的miR-302b、miR-302c、miR-302a、

收稿日期: 2016-03-16 接受日期: 2016-07-04

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB965103)和上海市科委项目基金(批准号: 14140904300)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65985591, E-mail: jfei@tongji.edu.cn

Received: March 16, 2016 Accepted: July 4, 2016

This work was supported by the National Key Basic Research&Development Project (Grant No.2011CB965103) and the Fund of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Grand No.14140904300)

*Corresponding author. Tel: +86-21-65985591, E-mail: jfei@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2016-08-31 16:12:46

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160831.1612.002.html>

miR-302d和miR-367共5个核心成员,以多顺反子结构共同转录并特异性表达于个体胚胎发育的早期阶段。前期研究发现^[4],miR-302s高效诱导细胞重编程的主要机制在于:通过沉默AOF1/2等引发细胞内广泛的去甲基化、抑制NR2F2从而激活*Oct4*等干性基因表达以及调控细胞EMT过程中TGF β (transforming growth factor β)、Nodal、Smad 3条信号通路等^[5-7]。同时,体内荷瘤实验表明,以过表达miR-302s制备成的人iPSC在裸鼠皮下接种后不形成畸胎瘤,而是向接种部位的组织类型分化,提示miR-302s过表达所诱导的iPSC兼备干细胞特性和较低的肿瘤潜能,有望成为临床治疗需求的理想供体^[8]。

尽管iPSC制备中只是利用病毒导入且瞬时表达miR-302s,但不能完全排除发生基因组整合并稳定表达的可能。由于miR-302s只特异表达于早期胚胎,在成体细胞中人为过表达是否会导致异常的生物学效应?特别是目前关于miR-302s与肿瘤的相关性尚存有较多争议。一方面,多个研究团队证实,将外源miR-302s导入多种肿瘤细胞系后,将抑制肿瘤细胞增殖和侵袭并诱导凋亡,表现出抑癌基因的功能^[9-11]。另一方面,也有报道显示,在睾丸癌等恶性生殖系统肿瘤中miR-302s高表达,检测血清miR-302s可作为疾病诊断指征^[12-13]。对高侵袭性乳腺癌患者的样本分析表明,miR-302s高表达与肿瘤高度恶性、早期转移以及生存期缩短显著正相关^[14]。基于以上数据,我们认为,充分验证miR-302s过表达的体内安全性是miR-302s途径iPSC临床转化的必要前提。

本研究旨在构建条件性miR-302s敲入(knock-in, KI)小鼠模型,实现miR-302s全身或组织特异性可调控性表达。该模型可用于评价miR-302s过表达的个体组织生物学效应和肿瘤倾向、探索miR-302s体内功能及其机制,并为后续miR-302s途径iPSC的临床医学转化奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和试剂基因打靶工具载体 pRosa26-DEST由本实验室保存。实验中所用的各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶及PCR相关试剂购自日本TaKaRa公司;TRizol、miRNA cDNA第一链合成试剂盒、荧光定量PCR试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;Tamoxifen为美国Sigma公司出品;常

规化学试剂主要购自Sigma公司和国药集团上海化学试剂公司。

1.1.2 引物合成与序列测定 miRNA-302s各成员的Real-time PCR引物购自天根生化科技(北京)有限公司;其余PCR引物合成以及DNA序列测定由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.1.3 实验小鼠基因敲入 小鼠模型由上海南方模式生物科技发展有限公司制备完成,基因打靶操作作用ES(embryonic stem cell)细胞系SCR012来源于129S6/SvEv品系小鼠。繁育用C57BL/6J、UBC-Cre/ERT2小鼠品系均由该公司提供。本实验中所有小鼠为SPF级饲养标准,动物实验方案获上海南方模式生物研究中心实验动物使用与伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 载体构建及小鼠制备设计引物 miR302-F: 5'-GCT TAT GTC TGT AAC CGG GT-3'、miR302-R: 5'-TGA GAG TGC TGT CCA AGT AAG T-3',从小鼠基因组中扩增获得miR-302s片段,以Gateway重组方式克隆至打靶载体pRosa26-DEST。miR-302s元件经ES细胞同源重组途径定点整合到基因组Rosa26位点上,对重组位点的侧翼序列进行PCR扩增及测序验证同源重组。重组位点上游鉴定PCR引物Rosa 5'arm F: 5'-GGC GGA CTG GCG GGA CTA-3'、Rosa 5'arm R: 5'-GGG ACA GGA TAA GTA TGA CAT CAT CAA GG-3',下游鉴定PCR引物Rosa 3'arm F: 5'-TGC ATC GCA TTG TCT GAG TAG G-3',Rosa 3'arm R: 5'-AGT GGC TCA ACA ACA CTT GGT C-3'。重组阳性ES细胞经囊胚注射制备获得miR-302s KI小鼠,与C57BL/6J小鼠回交以纯化品系背景。随后,通过与UBC-Cre/ERT2转基因小鼠交配繁育获得miR-302s^{L2/wt}:UBC-Cre/ERT2^{+/wt}双基因杂合子代用于实验;小鼠的基因型鉴定以鼠尾基因组DNAPCR检测的方式完成,所用引物XLR wtU: 5'-CCG GCC GGG CCT CGT CGT CT-3'、XLR wtL: 5'-GAG AAT AGG CCC AAA TGT GGA ACA C-3'和XLR Neo: 5'-GGG ACA GGA TAA GTA TGA CAT CAT CAA GG-3'。

1.2.2 药物诱导及miRNA表达检测 Tamoxifen配制方法及用药剂量参考文献^[15-16]。药物用含10%乙醇的玉米油配制成20 mg/mL,6周龄小鼠腹腔注射给药剂量为170 mg/kg;对照组给予相同剂量的玉米油(含10%乙醇)。在药物诱导1周后,每一种基因

型取3只雄性小鼠,提取小鼠各组织样本总RNA,利用试剂盒将miRNA反转录合成cDNA,以Real-time PCR方式检测miR302s各成员表达水平。具体扩增条件均为: 94 °C 2 min; 94 °C 20 s, 57 °C 34 s, 往复40个循环; 溶解程序设置从55 °C至95 °C, 每30 s上升0.5 °C。采用小鼠U6内参基因的Ct值来标准化miR-302s各成员的水平, 数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来得到相对浓度。同时, PCR产物序列的正确性经测序验证。

1.2.3 血液生化检测 由小鼠内眦静脉采集血样, 室温静置2 h、2 000 r/min离心收集血清, -80 °C冻存。样本由Sysmex公司CHEMIX-180全自动生化分析仪进行各项生化指标分析。

1.2.4 组织病理分析 过量麻醉处死小鼠,将各组织样本经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋切片,切片厚度为4 μm ,再经苏木素-伊红(HE)染色后,于光镜下进行组织形态学观察。

1.2.5 数据统计和分析 实验数据以均数±标准误(mean±S.E.M.)表示,使用统计软件GraphPad Prism 5.0进行分析,组间比较采用方差分析(Two-Way ANOVA, Bonferroni post hoc analysis)和 Student's *t*-test方法检验,*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 诱导表达型miR-302s KI小鼠模型的构建

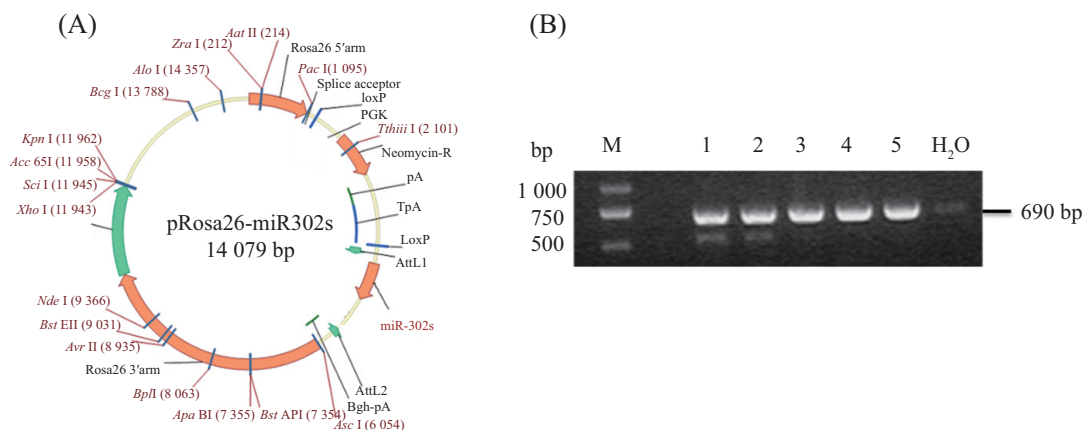
miR-302s诱导型表达的设计策略是通过打靶载体pRosa26-miR302s将miR-302s编码序列定点整合至基因组Rosa26位点上, miR-302s的表达受内源Rosa26启动子的调控, 该启动子已被证明在体内可

广泛表达^[17]; 同时, 在Rosa26启动子和miR-302s序列之间插入loxP-Neo-tPA-loxP元件, 造成miR-302s的转录被阻断; 只有在细胞中同时表达Cre重组酶时, 通过Cre-loxP重组机制将loxP-Neo-tPA-loxP序列切除, miR-302s转基因才得以转录。

打靶载体pRosa26-miR302s的图谱如图1A所示, 主要结构包括: 打靶位点Rosa26的双侧同源臂序列、miR-302s表达序列和loxP-Neo-tPA-loxP表达调控单元。其中, 690 bp长度的miR-302s编码序列由小鼠基因组PCR扩增获得, Gateway重组后的阳性克隆经PCR鉴定及测序验证(图1B)。

打靶载体经电穿孔方法转入ES细胞中, 经药物筛选并挑取抗性克隆144个。重组ES克隆的上游PCR鉴定引物分别位于Rosa26同源臂5' arm上游以及打靶载体neo序列上, 扩增片段长度为1.5 Kb(图2A); 而重组位点下游PCR鉴定引物分别位于miR-302s插入元件和Rosa26同源臂3' arm下游, 预期片段长度为4.5 Kb(图2B)。经鉴定, 144个药物抗性克隆中有7个ES克隆为双臂重组阳性, PCR产物经DNA序列测定证实序列正确。经ES育种所获得的miR-302s KI小鼠的基因型鉴定采用3引物PCR方式进行, 3种基因型的PCR图谱分别为: 野生型1.3 Kb, 杂合子miR-302^{L2/+}具650 bp、1.3 Kb 2条带, 而miR-302s^{L2/L2}纯合个体为650 bp(图2C)。

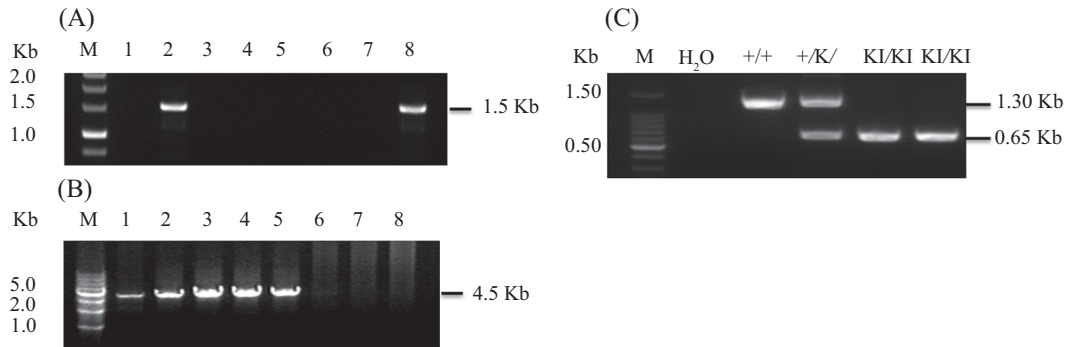
UBC-Cre/ERT2转基因小鼠的CreERT2由组织广泛表达的人泛素C(ubiquitin C, UBC)启动子驱动, CreERT2是否入核受药物Tamoxifen的调控。为全面评价miR-302s在体内广泛表达后的生物学效应, 本



A: 打靶载体图谱; B: 重组载体中miR-302s元件的PCR鉴定; M: DL2000 DNA marker; 1~5: 细菌DNA的PCR扩增样本。

A: map of targeting vector; B: PCR verification of miR-302s cassette of recombinant vector; M: DL2000 DNA marker; 1~5: PCR samples from bacterial DNA.

图1 miR-302s敲入小鼠的构建
Fig.1 Construction of miR-302s KI mice

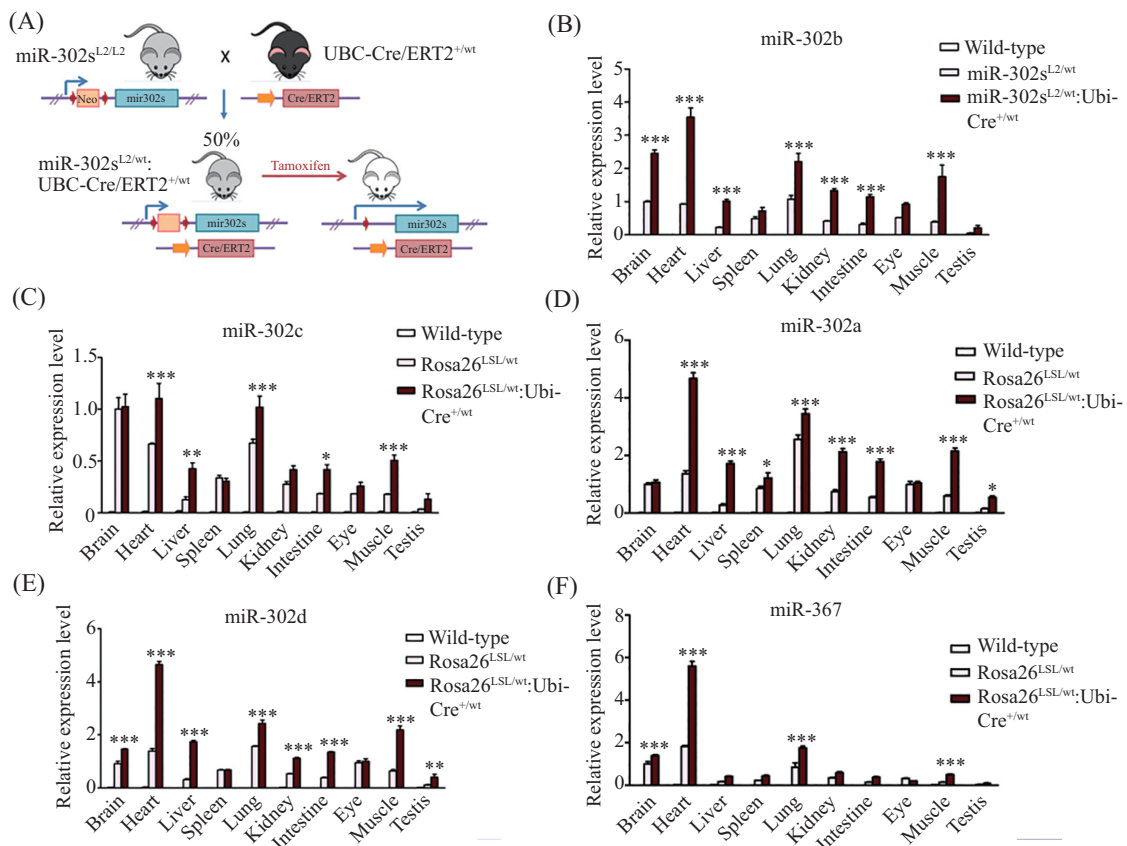


A: ES细胞克隆的5'arm PCR鉴定; M: DL2000 DNA marker; 1~8: ES细胞基因组PCR扩增样本。B: ES细胞克隆的3'arm PCR鉴定; M: 1 Kb DNA ladder; 1~8: ES细胞基因组PCR扩增样本。C: miR-302s敲入小鼠的基因型鉴定; M: DL2000 DNA marker。

A: PCR identification of 5'arm of ES clones; M: DL2000 DNA marker; 1-8: PCR samples from ES cell genomic DNA. B: PCR identification of 3'arm of ES clones; M: 1 Kb DNA ladder; 1-8: PCR samples from ES cell genomic DNA. C: genotyping of miR-302s knock-in mice; M: DL2000 DNA marker.

图2 重组ES细胞克隆及miR-302s敲入小鼠的PCR鉴定

Fig.2 PCR identification of recombinant ES clones and miR-302s KI mice



A: miR-302s小鼠的条件表达策略。B~F: 个体各组织脏器中miR-302s各成员的表达水平分析; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, 与miR-302s^{L2/wt}组作比较。

A: inducible expression strategy of miR-302s knock-in mice. B-F: expression profile of miR-302s members in mice tissues; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with miR-302s^{L2/wt} group.

图3 KI小鼠miR-302s的药物诱导表达及其检测

Fig.3 Inducible strategy and expression profile of miR-302s in mice model

研究选用该工具小鼠与miR-302s^{L2/L2}小鼠繁育, 子代小鼠中50%为双转基因杂合个体miR-302s^{L2/wt}:Ubi-Cre/ERT2^{+/wt}; 随后, 通过腹腔注射Tamoxifen诱导Cre-loxP切除反应, 使miR-302s转基因全身性开放表达, 表达策略如图3A所示。

在Tamoxifen药物处理后, 以Real-time PCR方法比较了野生型、miR-302s^{L2/wt}以及miR-302s^{L2/wt}:Ubi-Cre/ERT2^{+/wt} 3种小鼠组织中miR-302s的表达水平。结果如图3B~图3F所示。(1)相对于野生型小鼠的不表达, 在miR-302s^{L2/wt}小鼠各组织中可检测

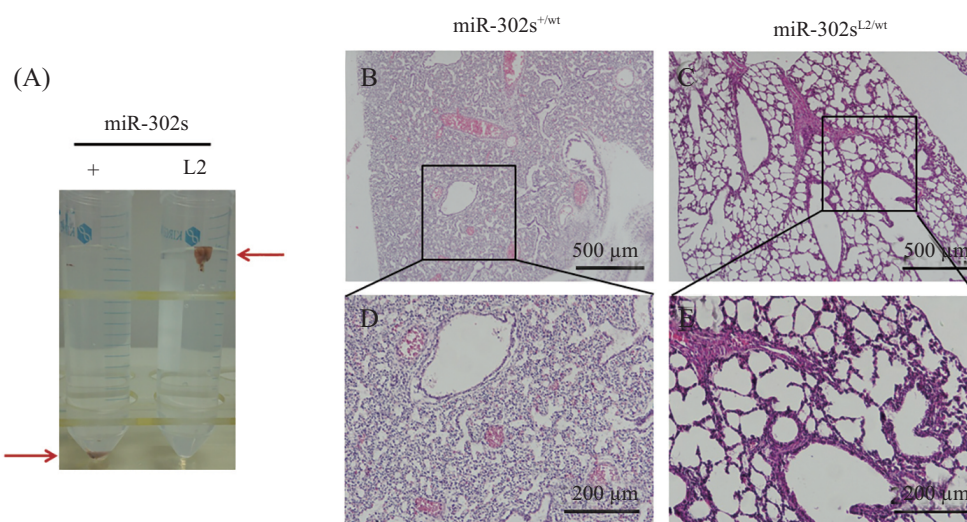
到miR-302s水平;说明在loxP-Neo-tPA-loxP调控元件存在的情况下,miR-302s仍有低水平漏表达;(2)miR-302s^{L2/wt}:UBC-Cre/ERT2^{+/wt}双转基因个体经Tamoxifen诱导后miR-302s分子簇各成员的表达水平均显著性上调,尽管在各组织的上调效率各有差异(平均约3倍)。此结果说明,药物诱导仍可有效提高miR-302s表达水平。

已有文献报道,miR-302s在胚胎后期的开放表达将导致肺内皮祖细胞分化受阻、个体出生后因肺不张而窒息死亡^[18]。据此,我们进行了miR-302s表达的功能性验证。将Tamoxifen诱导后的miR-302s^{L2/wt}:UBC-Cre/ERT2^{+/wt}雄性小鼠与C57BL/6J雌性个体测交,预期子代个体可有miR-302s^{+/wt}(miR-302s高表达)、miR-302s^{L2/wt}(miR-302s低表达)和野生型3种基因型。实验中所有的miR-302s^{+/wt}子代均在出生后即

死亡,经与存活的miR-302s^{L2/wt}小鼠对比肺组织的充气程度及进行肺组织病理分析(图4),证实miR-302s^{+/wt}个体因肺功能障碍而窒息死亡。同时,miR-302s^{L2/wt}(miR-302s低表达)个体能够正常存活也说明miR-302s的低水平漏表达不足以产生影响功能的剂量效应。以上结果证实所构建的小鼠模型在药物诱导后具有确实的基因开放表型,与设计目标相符合,为后续应用奠定了基础。

2.3 miR-302s KI小鼠的血液生化分析

Tamoxifen药物诱导后6个月(8月龄小鼠),Real-time PCR检测显示,与miR-302s^{L2/wt}对照组个体相比,miR-302s基因簇的头尾2个成员miR-302b、miR-367在双转基因miR-302s KI模型小鼠(miR-302s^{L2/wt}:UBC-Cre/ERT2^{+/wt})中仍维持有高水平表达,且各组织表达图谱与药物诱导后一周时的检测结果相一致(图5),

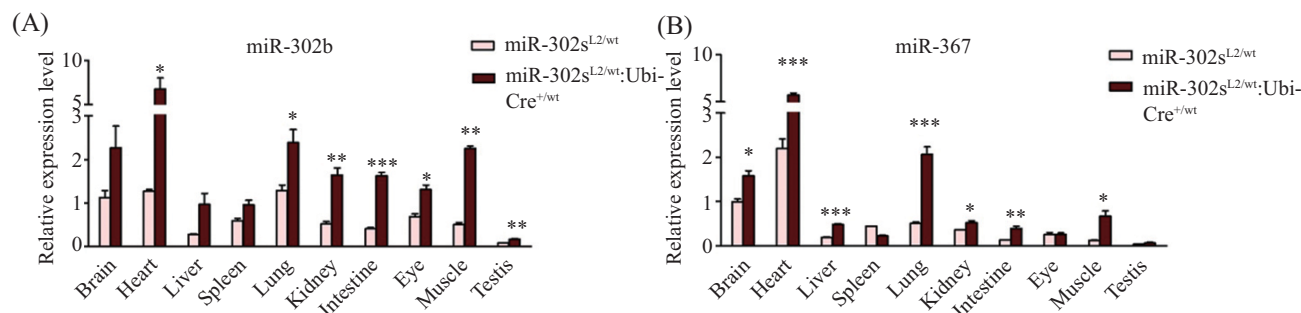


A: 不同miR-302s基因型个体(P0)肺组织充气程度比较。箭头指示肺组织所在位置。B-E: 不同miR-302s基因型个体(P0)肺组织病理分析。

A: comparison of lung inflation degree of neonatal mice. Arrows pointed the location of lung tissues. B-E: histology analysis of lung tissue of neonatal mice.

图4 miR-302s高表达导致肺发育障碍

Fig.4 Overexpression of miR-302s leads to abnormal lung development



A: 8月龄小鼠体内各组织中miR-302b表达水平分析; B: 8月龄小鼠体内各组织中miR-367表达水平分析; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与miR-302s^{L2/wt}对照组作比较。

A: expression profile of miR-302b in 8-month-old miR-302s KI mice tissues; B: expression profile of miR-367 in 8-month-old mice tissues; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with miR-302s^{L2/wt} control group.

图5 8月龄模型小鼠体内miR-302s成员仍维持高水平表达

Fig.5 High levels of miR-302s members in 8-month-old mice model

表1 miR-302s KI小鼠个体的血液生化指标检测
Table 1 Serum biochemistry analyze of miR-302s KI mice

血清生化指标 Serum biochemistry	均数±误差 Mean±S.E.M.	
	对照小鼠 Control mice	miR-302s KI小鼠 miR-302s KI mice
Total cholesterol (mmol/L)	2.200±0.092	1.913±0.152
Triglycerides (mmol/L)	0.847±0.104	0.927±0.095
HDL-C (mmol/L)	4.323±0.153	3.997±0.242
LDL-C (mmol/L)	0.413±0.033	0.603±0.055*
Total bilirubin (μmol/L)	2.000±0.231	2.133±0.449
Total protein (g/L)	50.500±0.473	49.500±0.569
ALT (U/L)	180.10±64.91	359.60±84.62
AST (U/L)	199.20±29.48	427.80±84.38
Alkaline Phosphatase (U/L)	71.900±2.597	70.700±2.930
Albumin (g/L)	20.800±0.173	20.570±0.145
Globulin (g/L)	30.000±0.577	29.330±0.667
A/G	0.703±0.019	0.713±0.015
Blood urea nitrogen (mmol/L)	7.967±1.114	9.900±0.557
Creatinine (μmol/L)	17.560±0.777	16.590±2.790
Uric acid (μmol/L)	220.80±21.37	328.00±22.35*

统计分析的差异显著性以Student's *t*-test方法检验。**P*<0.05, 与对照组小鼠比较。

Statistical significance was determined by using the Studentt models and explore its feasible. **P*<0.05 compared with control mice.

证明miR-302s可在体内保持长期表达的稳定性。

对于药物诱导后6个月的小鼠血清生化检测显示(表1), 双转基因小鼠在低密度脂蛋白(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)及尿酸(uric acid)含量上相对对照miR-302s^{L2/wt}个体均表现出显著性上升。而组织解剖观察2组所有个体均未见有器官形态异常或肿瘤发生, 随后的组织切片HE染色也未见有组织形态存在差异。

3 讨论

小鼠miR-302s分子簇由位于3号染色体上Larp7基因的内含子序列编码, 5个核心成员串联排列并共同转录; Oct3/4、Nanog、Rex1、Sox2等转录因子可激活miR-302s的表达, 随之miR-302s通过调控下游靶基因维持细胞的干性特征^[19-20]。

本研究采用基因组Rosa26位点miR-302s定点敲入的方式以保证其长期稳定表达。有研究发现, 在胚胎期miR-302s的过量表达将导致个体肺发育障碍、出生后即窒息死亡; 为避免该胚胎致死效应, 我们在内源启动子和miR-302s编码序列间设计插入loxP-Neo-tPA-loxP调控元件, 该元件已经文献证实可用于封闭下游基因的表达, 通过Cre-loxP重组机制实

现可调控性开放^[21]。本研究中的miR-302s^{L2/wt}:UBC-Cre/ERT2^{+/wt}双转基因小鼠经Tamoxifen诱导后, 组织中miR-302s成员的水平相对于miR-302s^{L2/wt}个体显著上调, 与设计预期相符。我们注意到, 即使位于同一转录单元, 同组织中miR-302s各成员间表达水平有着较大差异。经查证, 以往研究中检测结果, miR-302s各成员的表达水平的确各不相同, 推测这可能与PCR反应中不同基因的扩增效率并不一致或是各miRNA分子在体内降解速率的差异有关^[22-24]。同时, Real-time PCR结果显示, 插入的元件并不能完全封闭miR-302s的表达, 存在一定数量的漏表达, 通过反转录PCR也证实了pre-miR-302s转录本的存在。

在miR-302s水平及功能上验证了模型小鼠对药物可有效响应且持续稳定表达后, 我们对miR-302s KI小鼠进行了初步的表型分析。生化检测发现, 相比于对照组, miR-302s过表达个体血清中嘌呤代谢产物——尿酸含量显著增高, 提示具有嘌呤代谢障碍的可能。同时, 血尿酸升高是诱发痛风的主要病因, 近期的一项基于临床大样本量数据分析结果表明, 痛风患者的泌尿系统、消化系统肿瘤以及肺癌的发病风险增加^[25]。以上结果提示, 高尿酸血症与部分类型肿瘤发生率具有正相关, 后续我们将深入

观察模型小鼠各系统肿瘤的发生率。生化检测还发现, 模型小鼠的脂质代谢相关指标——低密度脂蛋白中胆固醇升高, 但血清中总胆固醇以及甘油三酯水平并没有异常, 同时8月龄小鼠的体重与对照组也没有差异, 因此, 单项指标的升高尚不足以说明个体存在脂质代谢的异常。

对于8月龄小鼠的组织病理检查未发现个体有器官形态异常或肿瘤发生, 证实成体内miR-302s持续6个月的稳定高表达并不增加个体的肿瘤发生风险, 而miR-302s KI小鼠的长期肿瘤观察实验尚在进行之中。

参考文献 (References)

- Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, *et al.* Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 2004; 270(2): 488-98.
- Barroso-delJesus A, Romero-Lopez C, Lucena-Aguilar G, Melen GJ, Sanchez L, Ligerio G, *et al.* Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: Human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol* 2008; 28(21): 6609-19.
- Ren J, Jin P, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J Transl Med* 2009; 7: 20.
- Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, *et al.* Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011; 8(4): 376-88.
- Lin SL, Chang DC, Lin CH, Ying SY, Leu D, Wu DT. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(3): 1054-65.
- Rosa A, Brivanlou AH. A regulatory circuitry comprised of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation. *EMBO J* 2011; 30(2): 237-48.
- Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R, *et al.* Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29(5): 443-8.
- Lin SL, Chang DC, Ying SY, Leu D, Wu DT. microRNA miR-302 inhibits the tumorigenicity of human pluripotent stem cells by coordinate suppression of the CDK2 and CDK4/6 cell cycle pathways. *Cancer Res* 2010; 70(22): 9473-82.
- Wang L, Yao J, Shi X, Hu L, Li Z, Song T, *et al.* MicroRNA-302b suppresses cell proliferation by targeting EGFR in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *BMC Cancer* 2013; 13: 448.
- Zhang Y, Hu H, Song L, Cai L, Wei R, Jin W. Epirubicin-mediated expression of miR-302b is involved in osteosarcoma apoptosis and cell cycle regulation. *Toxicol Lett* 2013; 222(1): 1-9.
- Cai N, Wang YD, Zheng PS. The microRNA-302-367 cluster suppresses the proliferation of cervical carcinoma cells through the novel target AKT1. *RNA* 2013; 19(1): 85-95.
- Murray MJ, Halsall DJ, Hook CE, Williams DM, Nicholson JC, Coleman N. Identification of microRNAs From the miR-371~373 and miR-302 clusters as potential serum biomarkers of malignant germ cell tumors. *Am J Clin Pathol* 2011; 135(1): 119-25.
- Scheel AH, Beyer U, Agami R, Döbelstein M. Immuno-fluorescence-based screening identifies germ cell associated microRNA 302 as an antagonist to p63 expression. *Cell Cycle* 2009; 8(9): 1426-32.
- Volinia S, Nuovo G, Drusco A, Costinean S, Abujarour R, Despons C, *et al.* Pluripotent stem cell miRNAs and metastasis in invasive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014; doi: 10.1093/jnci/dju324.
- Goldsworthy M, Absalom NL, Schroter D, Matthews HC, Bogani D, Moir L, *et al.* Mutations in Mll2, an H3K4 methyltransferase, result in insulin resistance and impaired glucose tolerance in mice. *PLoS One* 2013; 8(6): e61870.
- Kasten J, Hu C, Bhargava R, Park H, Tai D, Byrne JA, *et al.* Lethal phenotype in conditional late-onset arginase 1 deficiency in the mouse. *Mol Genet Metab* 2013; 110 (3): 222-30.
- Giel-Moloney M, Krause DS, Chen G, Van Etten RA, Leiter AB. Ubiquitous and uniform *in vivo* fluorescence in ROSA26-EGFP BAC transgenic mice. *Genesis* 2007; 45(2): 83-9.
- Tian Y, Zhang Y, Hurd L, Hannehalli S, Liu F, Lu MM, *et al.* Regulation of lung endoderm progenitor cell behavior by miR302/367. *Development* 2011; 138(7): 1235-45.
- Barroso-del Jesus A, Lucena-Aguilar G, Menendez P. The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle* 2009; 8(3): 394-8.
- Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, Mishina Y, *et al.* Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28(20): 6426-38.
- Hohenstein P, Slight J, Ozdemir DD, Burn SF, Berry R, Hastie ND. High-efficiency Rosa26 knock-in vector construction for Cre-regulated overexpression and RNAi. *PathoGenetics* 2008; 1(1): 3.
- Zhang Z, Wu WS. Sodium butyrate promotes generation of human induced pluripotent stem cells through induction of the miR302/367 cluster. *Stem Cells Dev* 2013; 22(16): 2268-77.
- Zhang Z, Xiang D, Heriyanto F, Gao Y, Qian Z, Wu WS. Dissecting the roles of miR-302/367 cluster in cellular reprogramming using TALE-based repressor and TALEN. *Stem Cell Rep* 2013; 1(3): 218-25.
- Jouneau A, Ciaudo C, Sismeiro O, Brochard V, Jouneau L, Vandormael-Pournin S, *et al.* Naïve and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA* 2012; 18(2): 253-64.
- Wang W, Xu D, Wang B, Yan S, Wang X, Yin Y, *et al.* Increased risk of cancer in relation to gout: A review of ythree prospective cohort studies with 50,358 subjects. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 680853.