

Mirtron类microRNA6894-5p过表达促进胃癌细胞的迁移、侵袭和增殖

赵茂嘉 彭美茜 秦旖璐 刘水清 陈燕林 杨丽萍 柳满然*

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文主要探讨Mirtron类microRNA6894-5p过表达对胃癌细胞迁移、侵袭和增殖的影响。将miRNA6894-5p的模拟物分别转染进入胃癌MGC803和SGC7901细胞中, 构建miRNA6894-5p过表达的细胞系; 实时荧光定量PCR测miRNA6894-5p的RNA表达; Transwell实验检测细胞迁移侵袭能力; Cell Counting Kit 8实验检测细胞的增殖能力; 荧光素酶报告基因实验检测miRNA6894-5p与肝配蛋白A3的靶向关系; 实时荧光定量PCR和蛋白质印迹法进一步检测miRNA6894-5p过表达后EFNA3的mRNA和蛋白的变化。结果显示, 成功构建miRNA6894-5p过表达模型的胃癌细胞系; 与相应阴性对照组相比, 过表达miRNA6894-5p可提高细胞迁移侵袭能力($P<0.05$)和增强细胞增殖能力($P<0.05$); 荧光素酶报告基因实验证实, miRNA6894-5p靶向作用于肝配蛋白A3, 过表达miRNA6894-5p后肝配蛋白A3的mRNA及蛋白水平显著下降($P<0.05$)。该研究结果显示, Mirtron类miRNA6894-5p在人胃癌细胞中过表达可促进胃癌细胞的迁移、侵袭和增殖。

关键词 mirtron类; microRNA6894-5p; 肝配蛋白A3; 细胞迁移; 细胞侵袭; 细胞增殖

Effects of Mirtron MicroRNA6894-5p Overexpression on Migration, Invasion and Proliferation of Human Gastric Carcinoma Cells

Zhao Maojia, Peng Meixi, Qin Yilu, Liu Shuiqing, Chen Yanlin, Yang Liping, Liu Manran*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Chinese Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This article was to investigate the effects of human microRNA6894-5p (miRNA6894-5p) on migration, invasion and proliferation of human gastric carcinoma cells. Mimics of miRNA6894-5p were constructed and transfected into gastric cancer cells. The expression of miRNA6894-5p in gastric carcinoma cells after transfection was determined by quantitative real time PCR (qRT-PCR). The migration, invasion and proliferation ability of gastric cancer cells were detected by Transwell chamber test and Cell Counting Kit-8 assays respectively. Luciferase reporter gene assay was used to detect the targeted relationship of miRNA6894-5p and hepatic protein A3. The mRNA and protein expression of hepatic protein A3 were detected by qRT-PCR and Western blot. The results showed that microRNA6894-5p mimics were successfully transfected into gastric carcinoma cells. Compared with control cells, the ability of migration and invasion were significantly increased in overexpression cells ($P<0.05$) and miRNA6894-5p overexpression could significantly promote gastric cancer

收稿日期: 2018-03-13 接受日期: 2018-05-21

国家自然科学基金资助项目(批准号: 81472476、31671481)和2017年重庆市研究生科研创新项目(批准号: CYS17162)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15111991149, E-mail: mliu-hncq@hotmail.com

Received: March 13, 2018 Accepted: May 21, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81472476, 31671481) and Chongqing Graduate Research and Innovation Project (2017) (Grant No.CYS17162)

*Corresponding author. Tel: +86-15111991149, E-mail: mliu-hncq@hotmail.com

网络出版时间: 2018-07-25 10:54:02

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180725.1053.008.html>

cells proliferation ($P < 0.05$). The relationship between miRNA6894-5p and *EFNA3* was confirmed by Luciferase reporter gene assay. The mRNA and protein expression of *EFNA3* were downregulated in miRNA6894-5p overexpression cell. The above results indicate that miRNA6894-5p can promote the migration, invasion and proliferation of gastric cancer cells.

Keywords mirtron; microRNA6894-5p; EPHRIN-A3; cell migration; cell invasion; cell proliferation

胃癌是全球性高发的癌症之一,已逐渐成为我国继肺癌后导致肿瘤患者死亡的第二大原因^[1-3]。MicroRNA是一类含有18~22个碱基的、具有调控功能的、短的非编码RNA,既往文献报道, microRNA表达失调可在几乎所有的癌症中起原癌基因或者肿瘤抑制基因的作用^[4-6]。成熟microRNA的生成,需要经历核酸酶Drosha和Dicer的剪切加工,进而生成miRNA/miRNA*双链体,之后其中一条链与AGO结合为RISC,通过碱基互补配对的方式识别其相应靶基因,根据互补程度的不同,导致转录物的降解和/或翻译的抑制^[7]。尽管大多数microRNAs的产生需要Drosha酶的加工,但目前已经发现了可以绕过Drosha加工而直接产生的microRNAs,其中最普遍的替代途径就是通过短发夹内含子的直接剪接而得到的mirtron类microRNA,其可以作为pre-miRNA模拟物^[8-11]。除了已知的典型的mirtron外,目前还可根据内含子剪接部位的不同而衍生出5' tail mirtron和3' tail mirtron。对于5' tail mirtron和3' tail mirtron,其剪接仅发生于内含子3'剪接受体或5'剪接供体的一端,另一端则由额外的核糖核酸酶裂解处理以产生pre-miRNA发夹^[12-13]。microRNA6894-5p(miRNA6894-5p)由本课题组前期通过Drosha敲低后的microRNA的芯片数据发现。当Drosha敲低后,miRNA6894-5p的表达量未见降低反而还异常升高^[14-15],同时在关于mirtron的相关文献中发现其属于5' tail mirtron类^[13]。目前对于普通microRNA在癌症中的作用已研究得较为成熟,但对于mirtron类microRNA在癌症中的作用却研究甚少,对于此类microRNA是否和普通microRNA一样对癌细胞进行调节并不清楚。因此,本研究拟通过在胃癌细胞中对miRNA6894-5p进行过表达,来探讨mirtron类miRNA6894-5p对胃癌细胞迁移及增殖能力的影响,从而为深入研究胃癌治疗提供新的观点。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293T细胞、胃癌MGC803细胞、MGC803

Drosha knockdown细胞和SGC7901细胞由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存; DMEM和RPMI1640培养基及胎牛血清购自Gibco公司; Lipofectamine 2000转染试剂和Trizol试剂购自Invitrogen公司; RIPA蛋白裂解液和BCA蛋白定量检测试剂盒购自碧云天生物技术研究; 兔抗人EFNA3单克隆抗体购自Abcam公司; 鼠抗人 β -actin单克隆抗体、山羊抗兔/山羊抗鼠辣根过氧化物酶IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL发光液购自上海百乐生命医学产品有限公司; Transwell小室购自Millipore公司; ECM基质胶购自Sigma公司; Drosha慢病毒、miRNA6894-5p mimics及随机序列RNA Oligo购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、Drosha慢病毒转染及miRNA6894-5p mimic转染 人胃癌MGC803细胞、HEK293T细胞和SGC7901细胞分别培养于含10%胎牛血清的DMEM和RPMI1640完全培养基中,放置于37℃、5% CO₂孵箱中进行培养。每隔2天换液1次,待80%~90%细胞融合时,用胰蛋白酶消化传代进行后续实验。于前1天晚上将MGC803(1×10^5 /孔)细胞和SGC7901(1.5×10^5 /孔)细胞分别铺板于6孔板中,第2天待细胞长到60%汇合度时,按Lipofectamine 2000转染试剂盒提供的方法分别将 1.0×10^{-7} μmol miRNA6894-5p mimics或随机序列RNA Oligo加入Opti-MEM中配制成转染混合物,将转染混合物分别加入含有2种细胞的6孔板中分别作为MGC803/miRNA6894-5p过表达组和SGC7901/miRNA6894-5p过表达组(miRNA6894-5p)、MGC803和SGC7901阴性对照组(control),把未转染混合物的野生型胃癌细胞设为空白对照组(WT)。以上述同样的方法将MGC803细胞铺板与6孔板中,第2天待细胞长到60%汇合度时,将Drosha慢病毒及阴性对照病毒以MOI=50加到细胞培养板中,并加入5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的polybrene(1:1 000),72 h后加入1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素筛选阳性感染细胞株,连续筛选3天,浓度减半维持

一周,获得MGC803胃癌细胞稳定干扰*Drosha*基因细胞株(*Drosha* KD)、阴性对照细胞株(*Drosha* WT)^[15]。

1.2.2 实时荧光定量PCR检测miRNA6894-5p RNA的水平 利用Trizol提取各组细胞总的RNA,并逆转录为cDNA,用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法检测各细胞株的miRNA6894-5p RNA水平。miRNA6894-5p的茎环引物为:5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT CTG GC-3',上游引物为:5'-CGA GGA GGA TGG AGA GCT GG-3',下游引物为:5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。反应条件:95 °C预变性30 s;95 °C变性10 s,59 °C退火30 s,72 °C延伸20 s,39个循环。

1.2.3 细胞迁移能力检测 消化各组细胞,收集单个无血清培养基悬浮细胞并计数。Transwell小室的上室中加入200 μ L含 4.0×10^4 细胞的细胞悬液,将小室放入24孔板中,在小室的下室加入500 μ L含血清的细胞培养基,每组3个复孔,培养箱培养MGC803细胞8~10 h或SGC7901细胞14~16 h。取出小室,用棉签拭去未穿过膜的细胞,然后用4%多聚甲醛固定15 min,之后用PBS清洗后用棉签擦拭小室,最后用结晶紫染色5 min,用PBS洗后晾干。正置显微镜下观察,随机取5个不同的视野(200 \times)进行细胞计数,试验重复3次,评估迁移细胞。

1.2.4 细胞侵袭能力检测 Transwell侵袭小室以40 μ L/孔的量铺Matrigel胶(Matrigel:无血清培养基=1:8),取转染后的各组细胞离心并消化,收集单个无血清培养基悬浮细胞并计数。以每200 μ L含有 4.0×10^4 细胞接种于Transwell小室的上室中,Transwell小室的下室中加入500 μ L含血清的细胞培养基,每组3个复孔,培养箱培养MGC803细胞16~20 h或SGC7901细胞28~32 h。取出小室,用棉签拭去未穿过膜的细胞,然后用4%多聚甲醛固定15 min,之后用PBS清洗后用棉签擦拭小室,最后用结晶紫染色5 min,用PBS洗后晾干。显微镜下观察,随机取5个不同的视野(200 \times)进行细胞计数,试验重复3次,评估迁移细胞。

1.2.5 CCK8(Cell Counting Kit 8)实验检测细胞增殖能力 消化细胞,收集单个无血清培养基悬浮细胞并计数。在4盘96孔板中分别加入 1.0×10^3 /孔细胞的细胞悬液,每组5个复孔,然后当细胞贴壁后先用CCK8试剂检测0 h的吸光度值,随后在细胞中

分别转入miRNA6894-5p的mimics和随机序列RNA Oligo,在转入24 h、48 h、72 h后加入CCK8检测试剂并在放置2 h后于450 nm波长下检测其吸光度值。其吸光度值与细胞密度成正比。

1.2.6 生物信息学寻找miRNA6894-5p靶基因 应用miRDB、TargetScan7.1等数据库对miRNA6894-5p的靶基因分别进行预测,然后与*Drosha*敲低芯片中下调的基因取交集筛选得到miRNA6894-5p最有可能的靶基因——肝配蛋白A3(EPHRIN-A3, *EFNA3*)。

1.2.7 荧光素酶报告基因实验 应用TargetScan7.1预测出miRNA6894-5p与*EFNA3*的结合位点,构建野生型和突变型*EFNA3*的3' UTR-荧光素酶表达载体(*EFNA3*-WT和*EFNA3*-MUT)。采用Lipofectmine 2000将荧光素酶报告载体*EFNA3*-WT和*EFNA3*-MUT分别与miRNA6894-5p模拟物(mimics)或miRNA6894-5p阴性对照(control)共转染入HEK293T细胞。转染48 h后弃去培养基,每孔加入荧光素酶底物,反应2~3 min,检测荧光强度。

1.2.8 蛋白质印迹法检测miRNA6894-5p相应的靶基因*EFNA3*蛋白的表达 收集MGC803 WT空白对照组细胞、MGC803 control阴性对照组细胞和MGC803 miRNA6894-5p过表达组细胞,加入预冷的(含蛋白酶抑制剂)RIPA蛋白裂解液,冰上裂解30 min,4 °C预冷离心收集上清液。用BCA蛋白定量试剂盒检测各组蛋白浓度,每孔上样50 μ g蛋白,经10% SDS-PAGE胶分离蛋白,将蛋白转移至0.22 μ m PVDF膜,5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h,一抗4 °C孵育过夜。*EFNA3*、 β -actin和HRP标记二抗(山羊抗兔和山羊抗鼠)(体积稀释比均为1:1 000)室温孵育90 min,ECL发光显色,凝胶成像分析仪采集图像。

1.3 统计学分析

所有实验均独立重复3次,采用SPSS 19.0统计软件对数据进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其中多组间数据的比较采用单因素方差分析,组间两两比较则采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建microRNA6894-5p过表达胃癌细胞系

基于课题组前期的研究我们发现,当*Drosha*敲低后,胃癌细胞的生物学行为会发生改变,且前期芯片数据显示,*Drosha*敲低后miRNA6894-5p表达未见

降低反而还升高,同时查阅文献发现,其属于mirtron类microRNA^[13]。因此,我们选择对miRNA6894-5p过表达的胃癌细胞的生物学行为的改变进行研究。首先,在人胃癌MGC803细胞中,与未敲低Drosha的细胞(Drosha WT)相比,Drosha敲低后的细胞(Drosha KD)中miRNA6894-5p的表达水平增高($P<0.05$)(图1A)。随后,在人胃癌MGC803细胞和SGC7901细胞中成功构建了miRNA6894-5p过表达的细胞模型,在两种胃癌细胞中转入miRNA6894-5p的模拟物(mimics)后,与其相应的空白对照组(WT)、阴性对照组(control)相比,在两种miRNA6894-5p过表达组胃癌细胞中miRNA6894-5p的表达水平明显增高($P<0.05$)(图1B)。

2.2 miRNA6894-5p过表达诱导胃癌细胞的迁移

为了研究miRNA6894-5p过表达的胃癌细胞迁移能力的改变,我们在人胃癌MGC803和SGC7901两个细胞系中将miRNA6894-5p过表达,通过Transwell实验评估细胞迁移能力。结果显示,在两种胃癌细胞中转入miRNA6894-5p的mimics后,与其相应的阴性对照组(control)相比,MGC83细胞和SGC7901细胞的miRNA6894-5p过表达组迁移能力有明显增强($P<0.05$)(图2)。

2.3 miRNA6894-5p过表达促进胃癌细胞侵袭

为了研究miRNA6894-5p过表达的胃癌细胞侵

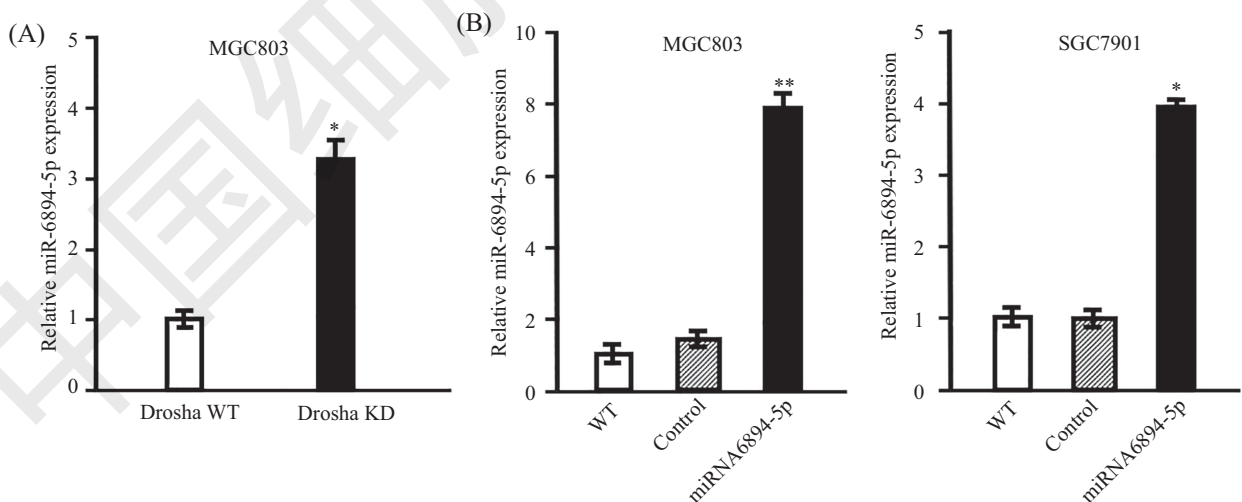
袭能力的改变,我们在人胃癌MGC803和SGC7901两个细胞系中将miRNA6894-5p过表达,通过Transwell实验评估细胞侵袭能力。结果显示,miRNA6894-5p在两种胃癌细胞中过表达后,其细胞侵袭能力明显增强($P<0.05$)(图3)。

2.4 miRNA6894-5p过表达促进胃癌细胞的增殖

为了研究miRNA6894-5p过表达对胃癌细胞增殖能力的影响,我们在MGC803和SGC7901胃癌细胞中分别将miRNA6894-5p过表达后,通过CCK8实验检测发现,miRNA6894-5p过表达后的胃癌MGC803细胞增殖能力在24 h、48 h和72 h明显高于相应的阴性对照组(control)细胞($P<0.05$)(图4A),胃癌SGC7901细胞增殖能力在48 h和72 h高于相应阴性对照组(control)细胞($P<0.05$)(图4B)。

2.5 miRNA6894-5p下调EFNA3 mRNA及蛋白表达

为了进一步探究miRNA6894-5p过表达后胃癌细胞迁移和增殖能力发生改变的机制,我们通过生物信息学分析,应用miRDB、TargetScan等数据库对miRNA6894-5p的靶基因进行预测,然后与Drosha敲低芯片中下调的mRNA取交集筛选得到miRNA6894-5p最有可能的靶基因——肝配蛋白A3(EPHRIN-A3, *EFNA3*)(图5A)。通过荧光素酶报告基因实验证实,miRNA6894-5p可靶向调控*EFNA3*,在HEK293T细胞中,miRNA6894-5p过表达



A: qRT-PCR验证在Drosha敲低细胞中miRNA6894-5p的表达水平; * $P<0.05$,与Drosha WT组比较; B: qRT-PCR验证在人胃癌MGC803和SGC7901细胞中转入miRNA6894-5p mimics后的miRNA6894-5p的表达水平; * $P<0.05$, ** $P<0.01$,与阴性对照组、空白对照组比较。

A: relative expression levels of miRNA6894-5p in gastric cells after Drosha knockout detected by quantitative Real-time PCR (qRT-PCR); * $P<0.05$ vs Drosha WT group; B: relative expression levels of miRNA6894-5p in gastric cells after infection mimics of miRNA6894-5p was detected by qRT-PCR. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group and WT group.

图1 miRNA6894-5p在不同胃癌细胞组中的相关表达水平

Fig.1 Relative expression levels of microRNA6894-5p mRNA in different groups

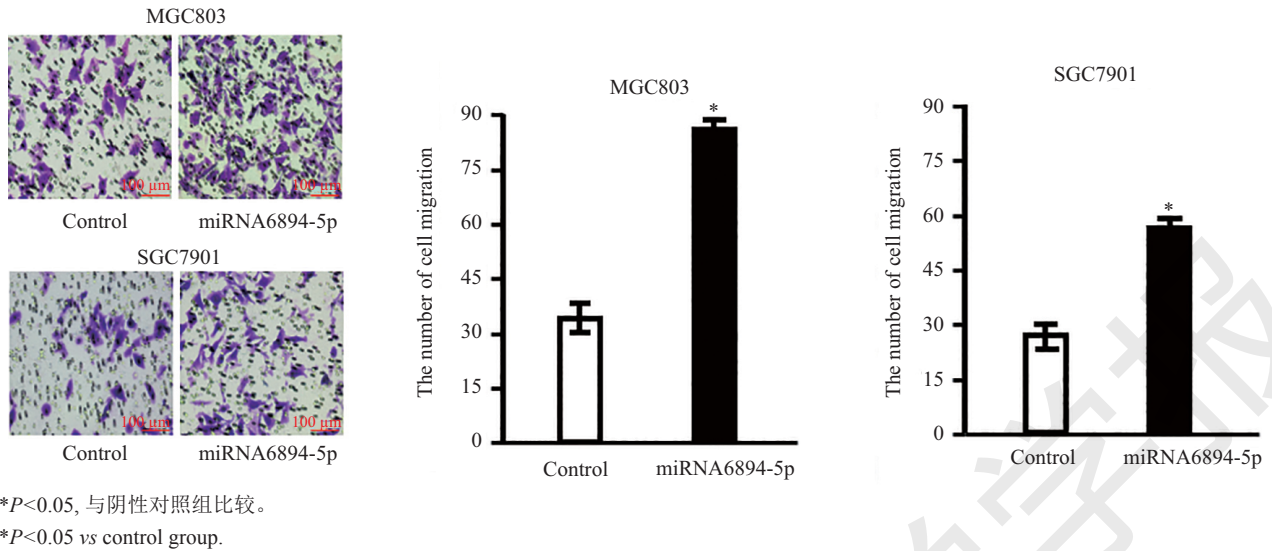


图2 Transwell实验检测miRNA6894-5p过表达对胃癌细胞迁移影响

Fig.2 The effects of miRNA6894-5p over-expression on migration abilities of gastric cells by Transwell

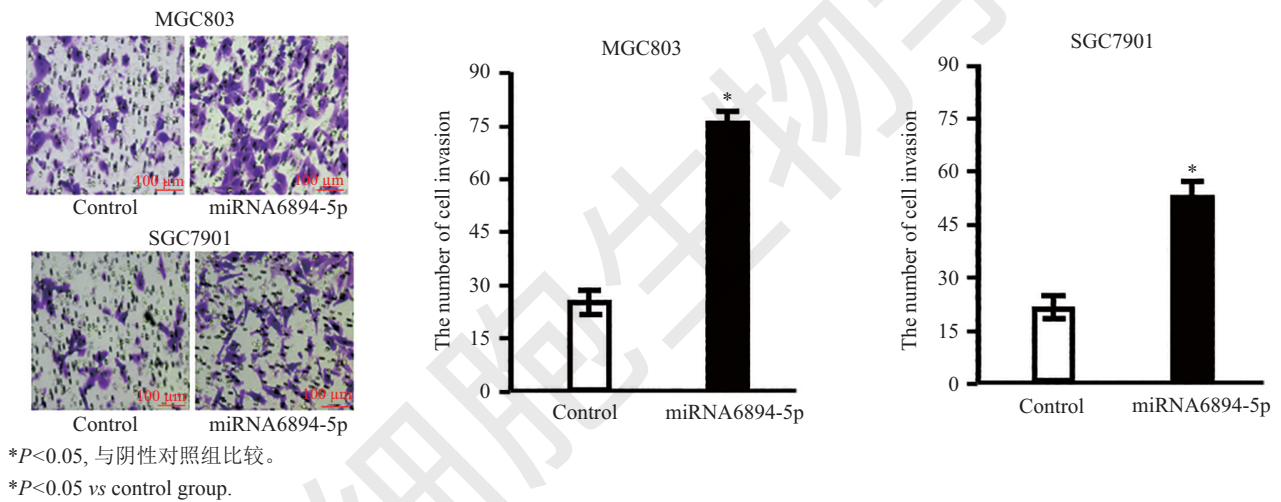
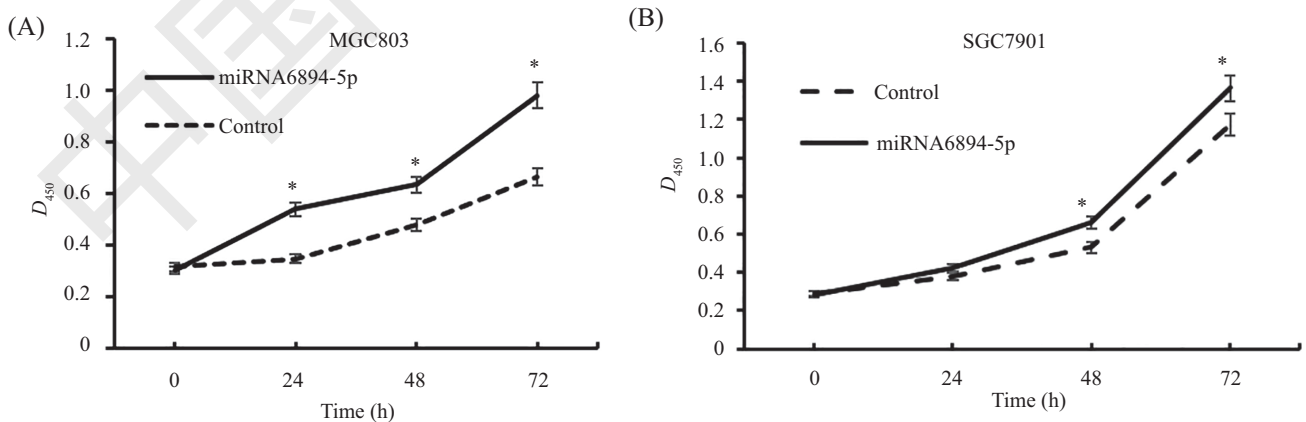


图3 Transwell实验检测miRNA6894-5p过表达对胃癌细胞侵袭影响

Fig.3 The effects of miRNA6894-5p over-expression on invasion abilities of gastric cells by Transwell

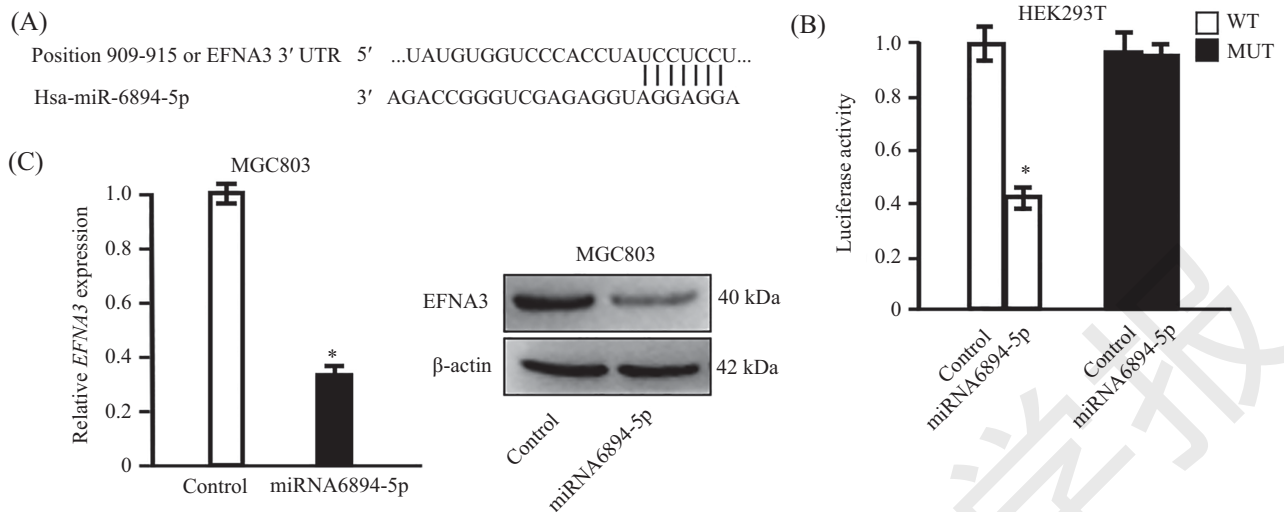


A: miRNA6894-5p过表达对MGC803细胞增殖的影响; B: miRNA6894-5p过表达对SGC7901细胞增殖的影响。*P<0.05, 与阴性对照组比较。

A: cell proliferation in MGC803 gastric cancer cell; B: cell proliferation in SGC7901 gastric cancer cell. *P<0.05 vs control group.

图4 CCK8实验检测miRNA6894-5p过表达对胃癌细胞增殖的影响

Fig.4 The effects of miRNA6894-5p over-expression on proliferation ability of gastric cells by CCK8



A: 生物信息学网站预测miRNA6894-5p与EFNA3 3' UTR的作用位点; B: 荧光素酶报告基因实验(WT: 野生型细胞; MUT: 结合位点突变型细胞); C: 在MGC803胃癌细胞中miRNA6894-5p过表达对EFNA3的mRNA及蛋白的影响。* $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

A: the binding site of miRNA6894-5p to EFNA3 3' UTR was predicted by bioinformatics; B: the luciferase reporter assay; C: the mRNA and protein expression level of EFNA3 in miRNA6894-5p over-expression MGC803 gastric cancer cell. * $P < 0.05$ vs control group.

图5 miRNA6894-5p过表达下调EFNA3的mRNA及蛋白水平

Fig.5 Overexpression of miRNA6894-5p down-regulates mRNA and protein levels of EFNA3

后, 报告基因的荧光素酶活性明显下降($P < 0.05$), 相反, 将结合位点突变后报告基因荧光素酶活性得以恢复(图5B)。在MGC803细胞中我们发现, 与阴性对照组细胞相比, miRNA6894-5p过表达组细胞由于miRNA6894-5p过表达使得EFNA3的mRNA及蛋白表达量降低($P < 0.05$)(图5C)。

3 讨论

microRNA的异常表达在大多数疾病(特别是癌症)中可调控疾病的发生发展。目前已有文献发现, microRNAs通过抑制其相应靶基因在胃癌的细胞周期及增殖等方面发挥至关重要的作用^[16-17]。通常大多数microRNA需要经过Drosha以及Dicer核酸酶的加工而产生, 但目前已有部分文献报道了两类不经过Drosha加工的特殊microRNA: 5' capped microRNA和mirtron类。EFNA是糖基磷酰基醇偶联配体, 可以与酪氨酸激酶受体结合, 通过激活酪氨酸磷酸酶, 从而启动不同信号传导途径, 影响细胞的生长发育情况, 最终在肿瘤的发生发展中起关键作用^[18-19]。目前, 在癌组织中主要对EFNA1的研究比较广泛, 而对于EFNA3在癌症中的研究尚少, 仅在卵巢癌和鼻咽癌中起着原癌基因的作用^[18], 在恶性外周神经鞘瘤中则起着抑癌基因作用^[20]。

基于本课题组前期的研究发现, Drosha敲低后

会影响胃癌细胞的发生发展, 且通过microRNA芯片数据分析, miRNA6894-5p在Drosha敲低后表达量不仅没有下降反而还异常升高, 且通过文献查询可知, miRNA6894-5p是属于不依赖于Drosha剪切的mirtron类别下的一个分支类型: 5' tail mirtron。本研究在人胃癌MGC803细胞和SGC7901细胞中分别转入miRNA6894-5p的mimics, 经qRT-PCR验证成功构建miRNA6894-5p过表达的胃癌细胞(图1B)。通过Transwell实验发现, miRNA6894-5p过表达后, 胃癌细胞的迁移和侵袭能力增强(图2和图3); 经CCK8实验检测发现, miRNA6894-5p过表达后胃癌MGC803细胞的增殖能力显著增强, 胃癌SGC7901细胞增殖能力也增强(图4)。然而, 根据实验结果也发现, 模拟物对两种细胞系的增殖有差异, 我们认为有可能是这两种细胞的分化类型不同, 导致了它们对miRNA6894-5p模拟物的反应不一样, 但总体结果表明, miRNA6894-5p的过表达可以促进细胞增殖。进一步探究miRNA6894-5p过表达后胃癌细胞迁移、和增殖能力发生改变的机制, 经生物信息学分析预测得到miRNA6894-5p的靶基因EFNA3, 荧光素酶试验证实miRNA6894-5p调控EFNA3(图5A和图5B)。经qRT-PCR和Western blot实验证实, 在miRNA6894-5p过表达后, 其潜在的靶基因EFNA3的mRNA及蛋白水平明显降低(图5C)。以上结果初步表明,

mirtron类microRNA6894-5p过表达促进胃癌细胞的迁移、侵袭和增殖有可能是通过调控靶基因*EFNA3*而发生,但其具体机制有待进一步研究。

综上所述,本文通过转染microRNA6894-5p的mimics成功构建过表达miRNA6894-5p的人胃癌细胞株后miRNA6894-5p表达量增加可以促进胃癌细胞的迁移和侵袭并诱导细胞增殖。尽管目前对于microRNA对疾病的研究已十分明确,但对于非经典microRNA对疾病的研究却甚少。本研究通过探讨非经典microRNA(mirtron类)——microRNA6894-5p过表达对胃癌细胞的影响为研究胃癌治疗提供新的思路及研究工具。

参考文献 (References)

- Li W, Jin X, Deng X, Zhang G, Zhang B, Ma L. The putative tumor suppressor microRNA-497 modulates gastric cancer cell proliferation and invasion by repressing eIF4E. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 449(2): 235-40.
- Gong J, Li J, Wang Y, Liu C, Jia H, Jiang C, *et al.* Characterization of microRNA-29 family expression and investigation of their mechanistic roles in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2014; 35(2): 497-506.
- Imamura T, Komatsu S, Ichikawa D, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, *et al.* Low plasma levels of miR-101 are associated with tumor progression in gastric cancer. *Oncotarget* 2017; 8(63): 106538-50.
- Wilk G, Braun R. Integrative analysis reveals disrupted pathways regulated by microRNAs in cancer. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(3): 1089-101.
- Watkin RL, Fitzpatrick GG, Kerrigan SW. The evolving role of MicroRNAs in endothelial cell dysfunction in response to infection. *Semin Thromb Hemost* 2018; 44(3): 216-23.
- Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, *et al.* MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase gamma pathway. *Rheumatology (Oxford, England)* 2017; 57(4): 718-26.
- Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(5): 376-85.
- Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 2007; 28(2): 328-36.
- Sakai E, Miura Y, Suzuki-Kouyama E, Oka K, Tachibana M, Kawabata K, *et al.* A mammalian mirtron miR-1224 promotes tube-formation of human primary endothelial cells by targeting anti-angiogenic factor epsin2. *Sci Rep* 2017; 7(1): 5541.
- Butkyte S, Ciupas L, Jakubauskiene E, Vilys L, Mocevicius P, Kanopka A, *et al.* Splicing-dependent expression of microRNAs of mirtron origin in human digestive and excretory system cancer cells. *Clin Epigenetics* 2016; 8: 33.
- Kim YK, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(13): E1881-9.
- Flynt AS, Greimann JC, Chung WJ, Lima CD, Lai EC. MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*. *Mol Cell* 2010; 38(6): 900-7.
- Ladewig E, Okamura K, Flynt AS, Westholm JO, Lai EC. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res* 2012; 22(9): 1634-45.
- Zhang H, Hou Y, Xu L, Zeng Z, Wen S, Du YE, *et al.* Cytoplasmic Drosha is aberrant in precancerous lesions of gastric carcinoma and its loss predicts worse outcome for gastric cancer patients. *Dig Dis Sci* 2016; 61(4): 1080-90.
- Xu L, Hou Y, Tu G, Chen Y, Du YE, Zhang H, *et al.* Nuclear Drosha enhances cell invasion via an EGFR-ERK1/2-MMP7 signaling pathway induced by dysregulated miRNA-622/197 and their targets LAMC2 and CD82 in gastric cancer. *Cell Death Dis* 2017; 8(3): e2642.
- 石晓磊. MicroRNA-148a/b在胃癌中的表达及其功能与机制研究. 第四军医大学(Xiaolei Shi. The expression and functional study of microRNA-148a/b in gastric cancer. Fourth Medical University), 2011.
- 赵晓迪. microRNA-7调控胃癌恶性生物学行为的功能与分子机制研究. 第四军医大学(Xiaodi Zhao. Functional elucidation & mechanistic study of microRNA-7 in gastric carcinogenesis. Fourth Medical University), 2015.
- Shukla A, Dahiya S, Onteru SK, Singh D. Differentially expressed miRNA-210 during follicular-luteal transition regulates pre-ovulatory granulosa cell function targeting HRas and EFNA3. *J Cell Biochem* 2017; doi: 10.1002/jcb.26508.
- Wang Z, Liu Z, Liu B, Liu G, Wu S. Dissecting the roles of Ephrin-A3 in malignant peripheral nerve sheath tumor by TALENs. *Oncol Rep* 2015; 34 (1): 391-8.
- Wang Z, Yin B, Wang B, Ma Z, Liu W, Lv G. MicroRNA-210 promotes proliferation and invasion of peripheral nerve sheath tumor cells targeting EFNA3. *Oncol Res* 2013; 21(3): 145-54.