



# 构建 ECE1 3'UTR 荧光素酶报告基因载体验证其与 miR-199a-5p 靶向关系 \*

鲍 宁<sup>1,2</sup> 陈凤收<sup>1</sup> 姜艳华<sup>1</sup> 方 波<sup>1</sup> 马 虹<sup>1△</sup>

(1 中国医科大学附属第一医院麻醉科 辽宁 沈阳 110001;2 沈阳市妇婴医院麻醉科 辽宁 沈阳 110003)

**摘要 目的:**通过构建双荧光素酶报告基因重组质粒验证 miRNA-199a-5p(miR-199a-5p)与 ECE1 基因的靶向调控关系。**方法:**通过 microRNA 靶基因预测软件 Targetscan 获取 miR-199a-5p 与 ECE1 基因 3'UTR 潜在的互补结合位点,PCR 技术扩增 ECE1 基因 3' 端非翻译区,将此序列与 miR-199a-5p mimics 或空质粒(NC)共转染到 pmirGLO-ECE1- 野生型(WT)的 293 细胞里;将此序列突变序列与 miR-199a-5p mimics 或 NC 共转染到 pmirGLO-ECE1- 突变型(MUT)的 293 细胞里,共四组,检测四组细胞中荧光素酶活性。**结果:**成功构建双荧光素酶报告基因重组质粒 pmirGLO-ECE1-WT 和 pmirGLO-ECE1-MUT。与野生型 NC( $4.30 \pm 0.53$ )组及突变型 miR-199a-5p mimics 组( $4.465 \pm 0.3968$ )比较,野生型 miR-199a-5p mimics 组( $1.686 \pm 0.4098$ )荧光素酶活性明显降低,  $P < 0.05$ ,有显著差异;突变型 miR-199a-5p mimics 组( $4.465 \pm 0.3968$ )与突变型 miR-199a-5p NC( $4.18 \pm 0.498$ )组及野生型 NC( $4.30 \pm 0.53$ )组两两比较,  $P > 0.05$ ,无明显差异。**结论:**miR-199a-5p 与野生型 ECE1 存在结合位点,miR-199a-5p 对野生型 ECE1 重组质粒荧光活性有明显的抑制作用,证实 miR-199a-5p 能够靶向调控 ECE1 基因。

**关键词:**MiRNA-199a-5p;ECE1 基因;荧光素酶报告基因;3' 端非翻译区

**中图分类号:**R-33;R394;Q782 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)02-207-04

## Construction of ECE1 3'UTR Dual Luciferase Reporter Vector and Verification of the Targeted Relationship with miR-199a-5p\*

BAO Ning<sup>1,2</sup>, CHEN Feng-shou<sup>1</sup>, JIANG Yan-hua<sup>1</sup>, FANG Bo<sup>1</sup>, MA Hong<sup>1△</sup>

(1 Department of Anaesthesiology, The First Hospital of China Medical University Liaoning province, Shenyang Liaoning, 110001, China;  
2 Shenyang Women's and Children's Hospital, Shenyang Liaoning, 110003, China)

**ABSTRACT Objective:** To identify the targeted-regulating relationship between miR-199a-5p and ECE1 via constructing luciferase reporter gene vector. **Methods:** The potential complementary binding sites of miR-199a-5p and ECE1 were predicted by Targetscan. The 3'-untranslated regions (3'UTR) of ECE1 fragment amplified by PCR was cloned into luciferase reporter vector pmirGLO and constructed the recombinant plasmids pmirGLO-ECE1-WT and pmirGLO-ECE1-MUT, respectively, 293T cells were cultured. Two recombinant plasmids were cotransfected into 293T cells with miR-199a-5p group mimics or negative control, four groups totally. The luciferase activity was detected by dual luciferase reporter gene system. **Results:** The sequences of pmirGLO-ECE1-WT and pmirGLO-ECE1-MUT were cloned into pmirGLO successfully. Compared with the wild-type NC ( $4.30 \pm 0.53$ ) group and the mutant miR-199a-5p mimics group ( $4.465 \pm 0.3968$ ), the luciferase activity of the wild type miR-199a-5p mimics group ( $1.686 \pm 0.4098$ ) was significantly reduced,  $P < 0.05$ . The mutant miR-199a-5p mimics group ( $4.465 \pm 0.3968$ ) was compared with the mutant miR-199a-5p NC ( $4.18 \pm 0.498$ ) group and the wild-type NC ( $4.30 \pm 0.53$ ),  $P > 0.05$ , no significant difference, and concluded that miR-199a-5p had a significant inhibitory effect on wild-type ECE1 recombinant plasmid fluorescence activity, and confirmed that miR-199a-5p could target the ECE1 gene. **Conclusion:** The miR-199a-5p had binding sites with wild-type ECE1. The miR-199a-5p inhibited the luciferase activity of ECE1 wild type vector, which indicates ECE1 gene could be targeted regulated by miR-199a-5p.

**Key words:** MiRNA-199a-5p; ECE1 gene; Luciferase reporter gene; 3'UTR

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R394; Q782 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2019)02-207-04

### 前言

microRNA(简写作 miRNA)是由 21~24 个核苷酸小分子组成的短链非编码 RNA 分子, 是一种功能强大的代谢调控分

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81771342)

作者简介:鲍宁(1878-),博士研究生,副主任医师,主要研究方向:围术期中枢神经保护,电话:024-83283100,E-mail: baoning0518@qq.com

△通讯作者:马虹,博士生导师,教授,主要研究方向:围术期中枢神经保护,E-mail: mahong5466@126.com

(收稿日期:2018-03-31 接受日期:2018-04-27)



子,它通过局部相互作用链接 mRNA 序列,特异性地沉默 mRNA,并在转录水平后调控基因表达<sup>[1]</sup>。miR-199a-5p 在许多组织里都有表达,包括大脑、肝脏、血管等<sup>[2]</sup>,脊髓表达丰富<sup>[3]</sup>。miR-199a-5p 在缺血性中风脑组织里表达下降<sup>[4]</sup>,在缺血 / 再灌注的大鼠心肌,miR-199a 对低氧非常敏感,很快就降到测不到的水平,过度表达 miR-199a 可以下调其靶基因缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)和 Sirt1,稳定 p53,减少细胞凋亡<sup>[5]</sup>。内皮素转化酶(endothelinconvertingenzyme, ECE),有两个亚型,即 ECE1, ECE2,其中以 ECE1 活性最强,属于 M13 家族的锌螯合的金属酶,丰富表达于脊髓神经细胞,少量表达于星形胶质细胞<sup>[6]</sup>。ECE1 是内皮素-1(ET-1)最重要的激活剂<sup>[7]</sup>,所以,如果抑制了 ECE1,那么 ET-1 将没有活性。AN-KUO<sup>®</sup>实验证明大鼠脊髓缺血再灌注损伤预处理,尾静脉注射 ECE1 抑制剂 CGS 26303,对 SCIRI 有神经保护作用。本课题组前期研究证明,大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型内 miR-199a-5p 负调控 ECE1,减少脊髓细胞凋亡,保护脊髓。通过生物信息学预测发现 ECE1 也是 miR-199a-5p 的潜在靶基因,本研究拟采用双荧光素酶报告基因检测生物学技术验证 miR-199a-5p 和 ECE1 之间的靶向关系,为进一步阐明 miR-199a-5p 调节脊髓缺血再灌注损伤分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HEK-293T 细胞株(中国科学院上海细胞库),T4 连接酶、限制性内切酶 Xho I 和 Not I (Thermo 公司),DH5α 感受态大肠杆菌(南京诺唯赞生物科技有限公司),双荧光素酶报告基因载体(pmirkGLO 载体),Lipofectamine™2000,DL2000bp Marker,DMEM 培养基,Gel Extraction 胶回收试剂盒,胎牛血清,Plasmid Mini KitI 质粒提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司),miR-199a-5p,PCR 引物(上海生工生物技术有限公司),双荧光素酶报告基因荧光检测仪(Promega 公司)。

### 1.2 构建含 ECE1 3'UTR 野生型和突变型荧光素酶报告基因质粒

以 SD 健康大鼠组织 DNA 为模版,构建荧光素酶报告基因载体预测软件 Targetscan 获取 miRNA-199a-5p 与 ECE1 基因 3'UTR 潜在的互补结合位点,设计成对 PCR 扩增引物,构建含有 miR-199a-5p 应答序列的 ECE1 3'UTR 片段。ECE1 引物上游 5'-CCGCTCGAGCAGCATCCAGACACCCCTGAGT-3',下游 5'-ATTTGCGGCCGCTGCATTTCCCTGAA-GATTTCCA-3'。取扩增产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,120 V,25 min,切胶,纯化回收。将 PCR 扩增的 ECE1 基因野生型胶回收产物与 psiCHECK-2 载体,用与 Xhol 与 NotI 进行双酶切。酶切产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,并将产物进行回收纯化。按照 OMEGA Plasmid Mini KitI 质粒提取试剂盒说

明书进行目的序列与载体连接,将 5 μL 连接产物加到 DH5α 感受态细胞中,转化后的菌落挑取单菌落扩增,而后进行双酶切,酶切鉴定正确的质粒测序。野生型为含有正确目的序列。通过 TargetScan7.0 和 microrna.org 软件预测,在 ECE1 3'UTR 的第 381-388 个碱基为 miR-199a-5p 与 ECE1 的结合位点,突变这些结合位点,合成构建突变型载体。野生型和突变型荧光素酶报告基因质粒分别命名为 pmirkGLO-ECE1-WT 和 pmirkGLO-ECE1-MUT。

### 1.3 重组载体与 miR-199a-5p mimics 或 NC 分别共转染 293T 细胞

转染前 24 h,当培养瓶中 293T 细胞密度达到 80% ~ 90% 左右按 2105 cells/well 细胞,将 HEK-293T 细胞接种在 24 孔板中,使用含 20% 不含抗生素培养基培养。将细胞随机分为 4 组:野生型 +miR-199a-5p mimics 组(共转染野生型质粒 + miR-199a-5p mimics)、野生型 + 空质粒组(共转染野生型质粒 + NC)、突变型 +miR-199a-5p mimics 组(共转染突变型质粒 + miR-199a-5p mimics)、突变型 + 空质粒组(共转染突变型质粒 + NC),每组设三个复孔。每个孔用无血清基础培养基稀释 lipofectamine 2000 1 μL,终体积为 50 μL,室温下静置 5 min;每个孔各加入 4 μg 不同质粒,再加入 DMEM- 高糖培养基至总体积 50 μL,室温下静置 5 min;将两种稀释液混合,室温下静置 20 min;每孔加入 100 μL 转染复合液,晃动 24 孔板稍加混匀;在 5% CO<sub>2</sub>,37°C 培养箱中孵育 5 h,用新鲜的完全培养基(含血清)替换含有转染复合物的培养基继续培养 48 h。

### 1.4 双荧光素酶报告基因活性检测

转染 48 h 后,吸去旧的培养基,用 PBS 清洗两次,每孔细胞加入 100 μL 的 PLB(Passive Lysis Buffer),室温轻微振摇 15 min,收集细胞裂解液。将 20 μL 细胞裂解液加入发光板后,每样品加入 100 μL LAR II 工作液,快速混匀,读值 2 s,检测萤火虫荧光素酶活性值;记录所测数值,每样品再加入 100 μL Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent,快速摇匀后,放入发光检测仪中,读值 2 s,检测海肾荧光素酶活性值。荧光检测仪会根据之前检测到的萤火虫荧光素酶活性值和海肾荧光素酶活性值的比值表述相对荧光素酶活性。

### 1.5 统计学方法

数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间均数比较用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ECE1 与 miR-199a-5p 的结合位点

通过 TargetScan7.0 发现,ECE1 3'UTR 与 miR-199a-5p 存在结合位点如图 1。

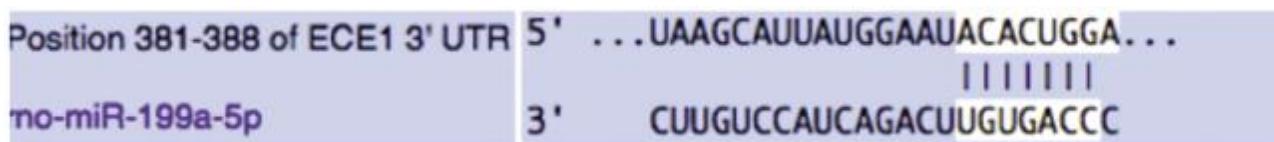


图 1 预测 miR-199a-5p 与 ECE1 3'UTR 的结合位点  
Fig.1 Prediction of binding sites of miR-199a-5p to ECE1 3'UTR

## 2.2 重组载体构建质粒结果

将双酶切后的 pmirGLO-ECE1-WT 载体质粒进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 2 所示,在 233 bp 左右有 DNA 条带,与预期的片段大小一致,证明 ECE1 基因 3'UTR、已扩增出来。如图 3 所示,双酶切后野生型质粒和突变型质粒片段大小一

致、分子量一致,说明两种载体构建成功。比较图 4 ECE1 基因 3'UTR 野生型部分测序图(阴影部分为 miR-199a-5p 结合序列)和图 5 ECE1 基因 3'UTR 突变型部分测序峰图(阴影部分为 miR-199a-5p 结合序列)的测序图更进一步表明两种重组质粒构建成功。

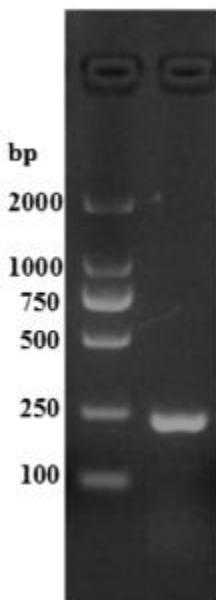


图 2 ECE1 基因 3'UTR PCR 扩增产物电泳图

Fig.2 Electrophoregram of PCR amplification products of ECE1 3'UTR

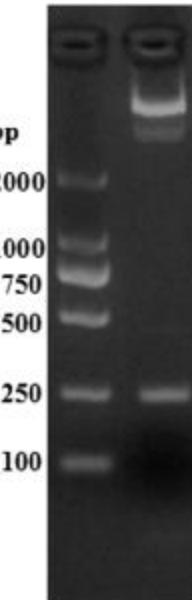


图 3 ECE1 基因 3'UTR 重组质粒双酶切电泳图

Fig.3 Map of ECE1 3'UTR recombinant plasmid by double enzyme digestion

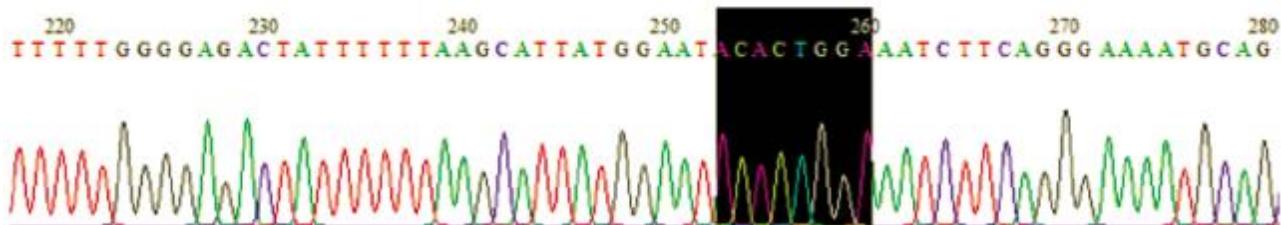


图 4 ECE1 基因 3'UTR 野生型部分测序图

Fig.4 Map for partial sequences of the wild type ECE1 3'UTR

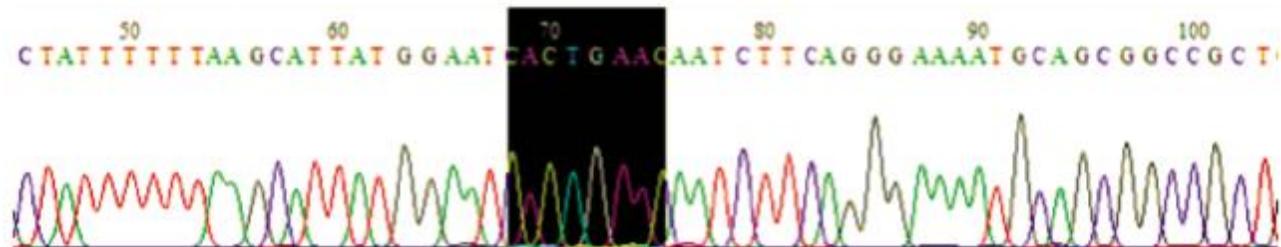


图 5 ECE1 基因 3'UTR 突变型部分测序峰图

Fig.5 Map for partial sequences of the mutant type ECE1 3'UTR

## 2.3 各组细胞中荧光素酶活性分析

在转染重组载体质粒 pmirGLO -ECE1 的实验中,miR-199a-5p 通过识别 ECE1 3'UTR 结合位点,特异性降解 ECE1 基因 mRNA,沉默 ECE1 表达,抑制萤火虫荧光素酶转录,使萤火虫荧光素酶蛋白翻译受阻,萤火虫荧光活性酶值降低。与野生型 NC( $4.30 \pm 0.53$ )组及突变型 miR-199a-5p mimics 组( $4.465 \pm 0.3968$ )比较,野生型 miR-199a-5p mimics( $1.686 \pm 0.4098$ )组荧光素酶活性明显降低,  $P < 0.05$ ,均有统计学意义;突

变型 miR-199a-5p mimics 组 ( $4.465 \pm 0.3968$ ) 与突变型 miR-199a-5p NC( $4.18 \pm 0.498$ )组及野生型 NC( $4.30 \pm 0.53$ )组两两比较,  $P > 0.05$ ,无统计学意义。如图 6 所示。

## 3 讨论

miRNA 的异常表达常会引起许多疾病,所以基于 miRNA 在细胞生长发育过程中的重要调控作用,作为研究和开发新的、高效的、准确的疾病诊断和治疗技术的靶标,具有良好的应

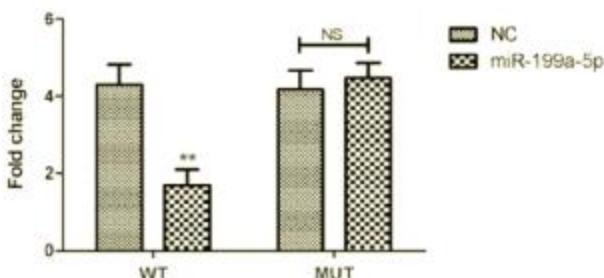


图 6 各组荧光素酶活性表达

Fig.6 Expression of Luciferase activity among different groups

用前景<sup>[9]</sup>。miR-199a-5p 通过下调其靶基因 Smad3, 影响肺动脉高压<sup>[10]</sup>。miR-199a-5p 下调表达的低氧诱导因子 -1α(HIF-1α)从而抑制黑素瘤扩散<sup>[11]</sup>, HIF-1α 也是 miR-199a-5p 的潜在靶基因, 作者也是用双荧光素酶报告基因载体验证了 HIF-1α 与 miR-199a-5p 通过与相关 3'UTR 结合而发挥调控。miR-199a-5p 通过抑制 Rheb 表达和抑制 mTOR 通路的激活, 与强直性脊柱炎的严重程度成负相关<sup>[12]</sup>。可以看出一个 miRNA 可以调节多个靶基因, 每个目标靶基因又可以同时由多个 miRNA 调控, 形成一个复杂的调控网络<sup>[13]</sup>。ECE1 是激活内皮素(endothelin, ET)-1 最重要的转化酶<sup>[14]</sup>, 属于锌螯合的金属蛋白酶, 丰富表达于脊髓神经细胞<sup>[15]</sup>。Kilic E<sup>[14]</sup>证明褪黑素的预防应用可以通过抑制 ECE1 保护脊髓缺血再灌注损伤。在本课题小组前期体内实验研究发现, 大鼠脊髓缺血再灌注损伤后 miR-199a-5p 的表达水平与 ECE1 mRNA 表达水平成负相关, 本实验结果与前期研究结果一致。

目前, 用于验证预测的 miRNA 与其目标靶基因相互作用, 电泳迁移率改变分析(EMSA)检测是最广泛的方法。而报告基因分析是研究 miRNA 为基础调控 mRNA 表达的一种独特的方法, 可以避免不准确的结果和结论<sup>[15]</sup>。我们只用了编码测序的方法明确了 miRNA 在靶基因 3'UTR 位置的关系, 去除了不同细胞对验证 miR-199a-5p 与 ECE1 关系时的影响。miRNA 通过与 3'UTR 的相互作用发挥其功能是其重要方法<sup>[16]</sup>, 但不是唯一方法, 也有证据表明 miRNA 可以与 5'UTR 相互作用<sup>[17]</sup>, 或作用于哺乳动物转录的蛋白编码区<sup>[18]</sup>。本实验野生型 miR-199a-5p mimics 组( $1.686 \pm 0.4098$ )与荧光素酶活性比突变型 miR-199a-5p mimics 组( $4.465 \pm 0.3968$ )降低 62%, 也验证了这一点。

荧光素酶报告基因实验的原理是以荧光素为底物来检测萤火虫荧光素酶活性的一种报告系统<sup>[19]</sup>。荧光素酶来自于自然界发光的生物, 萤火虫荧光素酶, 是从甲虫中分离得到, 做为主要报告基因; 而海肾荧光素酶则是从海肾中分离, 做为标准化内参, 两者组成双荧光素酶试验<sup>[20]</sup>。双荧光素酶报告基因系统比传统的荧光素酶报告基因检测时具有更快的速度, 更高的灵敏度和线型范围。包括萤火虫荧光素酶上结合的氯霉素乙酰转移酶, β-半乳糖苷酶等这些辅助报告基因延长了荧光素酶检测和定量的时间。双荧光素酶检测系统中, 荧光素酶活性检测完, 萤火虫荧光被快速淬灭, 并同时激活海肾荧光素酶的荧光反应, 可以快速定量。萤火虫荧光素酶可以检测 8 个酶浓度数量级, 海肾荧光素酶可以检测 7 个酶浓度数量级, 可测量线性范围广。荧光素酶与底物反应, 产生荧光, 通过检测荧光的强度可

以测定荧光素酶的活性, 从而判断转录因子是否能与此靶启动子片段有作用。而本实验通过生物信息学软件分析, 预测 miR-199a-5p 与 ECE1 3'UTR 的互补结合位点, 构建野生型及点突变型荧光素酶报告基因质粒; 通过识别 ECE1 3'UTR 结合位点, 特异性降解 ECE1 基因 mRNA, 沉默 ECE1 表达, 使萤火虫荧光素酶转录过程受阻, 萤火虫荧光素酶蛋白被抑制, 萤火虫荧光值降低; 然而, 海肾荧光素酶基因的表达, 作为标准化的参考, 没有受到影响, 而最终结果计算的萤火虫荧光素酶活性 / 海肾荧光素酶活性的比值降低, 提示 miR-199a-5p 可以直接作用于 ECE1 3'UTR 的 381-388 序列位置, 与本课题前期研究结果一致。miRNA 通过 6-8 bp 种子序列的链接, 调控 mRNA, 通过这种随机的机会可以找到许多靶基因, 但是 miRNA 是否能影响到下游的有关蛋白的变化, 从而对机体产生影响需要进一步实验研究<sup>[21]</sup>。

综上所述, 本实验成功构建了 ECE1 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体, 并验证了 miR-199a-5p 与 ECE1 3'UTR 区结合。而 miR-199a-5p 以怎样的信号通路, 在大鼠脊髓缺血再灌注损伤后如何调控 ECE1, 保护脊髓缺血再灌注损伤, 是我们进一步要研究的内容。

#### 参考文献(References)

- [1] Hong-Pei Ji, Yu Xiong, Wei-Tao Song, et al. MicroRNA-28 potentially regulates the photoreceptor lineage commitment of Müller glia-derived progenitors[J]. Sci Rep, 2017, 7: 11374
- [2] Chan YC, Roy S, Huang Y. The microRNA miR-199a-5p down-regulation switches on wound angiogenesis by derepressing the v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1-matrix metalloproteinase-1 pathway[J]. J Biol Chem, 2012, 287(49): 41032-41043
- [3] Wang Y, Luo J, Wang X, et al. MicroRNA-199a-5p Induced Autophagy and Inhibits the Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis by Modulating the mTOR Signaling via Directly Targeting Ras Homolog Enriched in Brain (Rheb) [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6): 2481-2491
- [4] Han-A Park, Natalia Kubicki, Surya Gnyawali. Natural Vitamin E α-Tocotrienol Protects Against Ischemic Stroke by Induction of Multidrug Resistance-Associated Protein 1[J]. Stroke. Author manuscript; available in PMC, 2012
- [5] Danish Sayed , Maha Abdellatif. AKT-ing via microRNA[J]. Cell Cycle, 2010, 9(16): 3213-3217
- [6] J C Palmer, P G Kehoe, S Love. Endothelin-converting enzyme-1 in Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. Neuropathology and Applied Neurobiology, 2010, 36: 487-497
- [7] Michael G Johnson, Kathryn Konicke, Jasmin Kristianto, et al. Endothelin signaling regulates mineralization and posttranscriptionally regulates SOST in TMOb cells via miR 126-3p[J]. Physiol Rep, 2017, 5(4): e13088
- [8] An-kuo Chou, Tai-chen, William winardi, et al. Functional Neuroprotective Effect of CGS 26303, a Dual ECE Inhibitor, on Ischemic-Reperfusion Spinal Cord Injury in Rats[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2007, 232(2): 214-218
- [9] Braicu C, Cojocneanu-Petric R, Chira S, et al. Clinical and pathological implications of miRNA in bladder cancer[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 791-800

(下转第 243 页)



- [33] Ji W, Yu Y, Li Z, et al. FGFR1 promotes the stem cell-like phenotype of FGFR1-amplified non-small cell lung cancer cells through the Hedgehog pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 15118-15134
- [34] Wang Y, Gao W, Xu J, et al. The Role of FGFR1 Gene Amplification as a Poor Prognostic Factor in Squamous Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of Published Data [J]. *BioMed research international*, 2015, 763080
- [35] Vander Wekken A J, Sabe A, Hiltermann T J, et al. Resistance mechanisms after tyrosine kinase inhibitors afatinib and crizotinib in non-small cell lung cancer, a review of the literature [J]. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2016, 100(107-16)
- [36] Burbridge M F, Bossard C J, Saunier C, et al. S49076 is a novel kinase inhibitor of MET, AXL, and FGFR with strong preclinical activity alone and in association with bevacizumab[J]. *Molecular cancer therapeutics*, 2013, 12(9): 1749-1762
- [37] Lorusso P M. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Solid Tumors[J]. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2016, 34(31): 3803-3815
- [38] Tsurutani J, Fukuoka J, Tsurutani H, et al. Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small-cell lung cancer tumors [J]. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2006, 24(2): 306-314
- [39] Cully M, You H, Levine A J, et al. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis[J]. *Nature reviews Cancer*, 2006, 6(3): 184-192
- [40] Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer [J]. *Nature reviews Cancer*, 2002, 2(7): 489-501
- [41] Sun Z, Li Q, Zhang S, et al. NVP-BEZ235 overcomes gefitinib-acquired resistance by down-regulating PI3K/AKT/mTOR phosphorylation[J]. *OncoTargets and therapy*, 2015, 8(269-77)
- [42] Zhao Z Q, Yu Z Y, Li J, et al. Gefitinib induces lung cancer cell autophagy and apoptosis via blockade of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Oncology letters*, 2016, 12(1): 63-68
- [43] Zheng R, Jiang H, Li J, et al. Polyphyllin II Restores Sensitization of the Resistance of PC-9/ZD Cells to Gefitinib by a Negative Regulation of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway [J]. *Current cancer drug targets*, 2017, 17(4): 376-385
- [44] Li H, Schmid-bindert, Wang D, et al. Blocking the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways can overcome gefitinib-resistance in non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Advances in medical sciences*, 2011, 56(2): 275-284
- [45] Wang B, Jiang H, Wang L, et al. Increased MIR31HG lncRNA expression increases gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines through the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Oncology letters*, 2017, 13(5): 3494-500

#### (上接第 210 页)

- [10] Liu Y, Liu G, Zhang H, et al. MiRNA-199a-5p influences pulmonary artery hypertension via downregulating Smad3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 859-866
- [11] Yang X, Lei S, Long J, et al. MicroRNA-199a-5p inhibits tumor proliferation in melanoma by mediating HIF-1 $\alpha$ [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6): 5241-5247
- [12] Wang Y, Luo J, Wang X, et al. MicroRNA-199a-5p Induced Autophagy and Inhibits the Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis by Modulating the mTOR Signaling via Directly Targeting Ras Homolog Enriched in Brain (Rheb)[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6): 2481-2491
- [13] Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression networks[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(19): 3582-3600
- [14] Kilic E, Kilic U, Reiter RJ, et al. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1[J]. *J Pineal Res*, 2004, 37(4): 247-251
- [15] Danae Campos-Melo, Cristian A. Doppelmann, Kathryn Volkening, et al. Comprehensive Luciferase-Based Reporter Gene Assay Reveals Previously Masked Up-Regulatory Effects of miRNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9): 15592-15602
- [16] Minlee Kim, Nicole Kogan, Frank J. Slack. Cis-acting elements in its 3' UTR mediate posttranscriptional regulation of KRAS[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11): 11770-11784
- [17] Orom UA, Lund AH. Experimental identification of microRNA targets[J]. *Gene*, 2010, 451: 1-5
- [18] Reczko M, Maragakis M, Alexiou P, et al. Hatzigeorgiou A.G. Functional microRNA targets in protein coding sequences[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28: 771-776
- [19] Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression networks[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(19): 3582-3600
- [20] Wider D, Picard D. Secreted dual reporter assay with Gaussia luciferase and the red fluorescent protein mCherry[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189403
- [21] Kenneth W Witwer, Marc K Halushka. Toward the promise of microRNAs-Enhancing reproducibility and rigor in microRNA research [J]. *RNA Biol*, 2016, 13(11): 1103-1116