

鸡 miR-19a、miR-19b 通过靶向抑制 LIN9 促进前脂肪细胞增殖

宋鹤^{1) 2) 3)##}, 张潇飞^{1) 2) 3)##}, 褚衍凯^{1) 2) 3)}, 邢天宇^{1) 2) 3)},
闫晓红^{1) 2) 3)}, 李辉^{1) 2) 3)}, 王宁^{1) 2) 3)*}

(¹⁾ 农业部鸡遗传育种重点实验室; (²⁾ 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室;

(³⁾ 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

摘要 miR-17-92 基因簇编码包括 miR-19a、miR-19b 在内的至少 6 个 miRNA, 在鸡细胞的增殖、分化、凋亡及发育等多种生物学过程中发挥重要作用, 但其作用机制尚不清楚。生物信息学分析显示, 细胞周期调控子 LIN9 是 miR-17-92 基因簇成员 miR-19a 和 miR-19b 的潜在靶点。为验证这一预测, 构建含野生型 LIN9 3'-UTR 荧光素酶报告基因载体 (psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-WT) 及突变型报告基因载体 (psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT), 开展靶标 LIN9 的鉴定。复合转染结合报告基因酶活性测定结果表明, 过表达 miR-19a 和 miR-19b 能显著抑制含野生型 LIN9 3'-UTR 的报告基因表达, 而过表达 miR-19a 和 miR-19b 抑制剂显著提高野生型 LIN9 3'-UTR 报告基因的表达。实时定量 PCR (RT-qPCR) 证明, miR-19a 和 miR-19b 抑制剂对内源性 LIN9 mRNA 的表达没有影响, 提示 miR-19a 和 miR-19b 可能不是通过降解 mRNA 调控 LIN9 表达。转染结合 CCK-8 细胞增殖分析显示, 在鸡前脂肪细胞过表达 LIN9 明显抑制细胞增殖。与此相一致的是, 细胞增殖标志分子 CyclinD1、c-Myc、PCNA、Ki67 的 mRNA 表达量明显降低。本研究证实, LIN9 是 miR-17-92 基因簇成员 miR-19a 和 miR-19b 的靶标, 同时证实, LIN9 抑制鸡前脂肪细胞的增殖。是否 miR-17-92 基因簇编码的其它 miRNA 成员也以 LIN9 为靶标尚不得而知, 我室正在研究中。

关键词 miR-17-92 基因簇; LIN9; 细胞增殖; 鸡前脂肪细胞

中图分类号 Q78

Chick miR-19a and miR-19b Promote Chicken Preadipocyte Proliferation by Targeting LIN9

SONG He^{1) 2) 3)##}, ZHANG Xiao-Fei^{1) 2) 3)##}, CHU Yan-Kai^{1) 2) 3)}, XING Tian-Yu^{1) 2) 3)},
YAN Xiao-Hong^{1) 2) 3)}, LI Hui^{1) 2) 3)}, WANG Ning^{1) 2) 3)*}

(¹⁾ Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture; (²⁾ Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province; (³⁾ College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract The miR-17-92 gene cluster codes for at least 6 microRNAs including miR-19a and miR-19b and plays roles in a variety of biological processes such as cellular proliferation, differentiation, apoptosis and development. However, the mechanisms remain to be elucidated. Bioinformatics analysis showed

收稿日期: 2016-03-07; 修回日期: 2016-05-14; 接受日期: 2016-05-24

国家自然科学基金项目 (No. 31372299) 和农业部产业体系 (No. CARS-42) 资助

* 联系人 Tel: 0451-55191770; E-mail: wangning@neau.edu.cn

并列第一作者

Received: March 7, 2016; Revised: May 14, 2016; Accepted: May 24, 2016

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31372299) and Project from Department of Agriculture Technology System (No. CARS-42)

* Corresponding author Tel: 0451-55191770; E-mail: wangning@neau.edu.cn.

These authors contributed equally to this paper

that miR-19a and miR-19b might target LIN9, an important modulator for cell-cycle progress. To test whether LIN9 is a target of miR-19a and miR-19b, luciferase reporter vector (psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-WT) and its substitution mutant (psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT) were constructed. Co-transfection and reporter enzyme assays showed that compared with control (without miR-19a and miR-19b transfection), transfection/over-expression of miR-19a and miR-19b significantly inhibited the reporter luciferase activities expressed by psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-WT, while transfection of miR-19a and miR-19b inhibitors increased reporter enzyme activities. RT-qPCR analysis found that miR-19a and miR-19b inhibitors had no effect on the endogenous LIN9 mRNA expression, indicating that the regulation of LIN9 expression by both microRNAs may not depend on the degradation of LIN9 mRNA. Transfection and CCK-8 assay showed that over-expression of LIN9 in chicken preadipocytes significantly blocked cellular proliferation. In consistence with these findings, the transcript levels of cellular proliferation-promoting proteins such as CyclinD1, c-Myc, PCNA, and Ki67 were markedly decreased in LIN9-transfected the preadipocytes. These data demonstrate that LIN9 is a target of miR-19a and miR-19b, and LIN9 inhibits chicken preadipocyte proliferation. Whether other members of miR-17-92 may also target LIN9 is presently unknown and under investigation in our laboratory.

Key words miR-17-92 cluster; LIN9; cell proliferation; chicken preadipocyte

MicroRNAs (miRNAs) 是一类大小约 22 个核苷酸的非编码 RNA 分子,它通过碱基互补结合于靶基因 mRNA 的 3'UTR,导致靶基因 mRNA 降解或翻译抑制,从而调控靶基因的表达^[1]。miRNA 是基因表达的重要调控因子,目前推测,人类超过 1/3 的编码蛋白质基因都受到 miRNA 的调控^[2,3]。研究表明,miRNA 在细胞增殖、分化、凋亡、发育以及代谢等生命活动中发挥重要的调控作用^[4]。

miRNA 基因在染色体上的分布并非随机,许多 miRNA 基因紧密相邻,形成 miRNA 基因簇^[4,5]。这些 miRNA 往往由一个共同的启动子调控,转录产生多顺反子前体转录本,再经过 Drosha 酶和 Dicer 酶加工,产生多个不同的成熟 miRNAs。miR-17-92 基因簇是一个高度保守的 miRNA 基因簇,是目前备受关注的 miRNA 基因簇之一。人 miR-17-92 基因簇定位于染色体 13q31-q32^[6],位于其宿主基因 MIR17HG (miR-17-92 cluster host gene) 第 3 内含子区^[7]。miR-17-92 基因簇能编码 miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b 和 miR-92 等至少 6 个成熟的 miRNAs^[8]。目前已知,miR-17-92 基因簇参与 B 细胞的发育、肺祖细胞增殖与分化、骨骼肌发育、血管发生和前脂肪细胞分化等多种生物学过程^[9-15]。敲除 miR-17-92 基因簇可能会导致肺发育不全、室间隔缺损、骨骼肌畸形以及 B 细胞发育障碍等致命性畸形的发生^[9,15]。此外,miR-17-92 基因簇在多种肿瘤中高表达,它可通过抑制抑癌基因和细胞周期调控基因表达,促进血管形成等诱导肿瘤发生^[16-23]。目前已发现,miR-17-92 基因簇能促进原癌基因 *c-Myc*、抑制抑癌基因 (*p21*、*PTEN*、*BIM*、

RB1、*TGFBR2*)^[16-19]、细胞周期调控基因 (E2F 家族)^[20-21] 以及抗血管生成相关因子 (*TSP-1* 和 *CTGF*)^[22] 的表达,从而促进肿瘤细胞增殖。miR-17-92 基因簇是第 1 个被确认的非编码癌基因 (oncomiR-1)^[23]。但也有报道称,miR-17-92 基因簇可以作为抑癌基因。例如,它可通过抑制乳腺癌扩增基因-1 (*AIB1*) 从而抑制人乳腺癌细胞的生长和肿瘤细胞集落的形成^[24]。

尽管目前对人 miR-17-92 基因簇的功能研究已取得很大进展,但是,有关鸡 miR-17-92 基因簇的作用及其作用机制的研究报道并不多。Huang 等^[25]选择北京油鸡的公鸡与科宝公司的快大型白羽肉鸡的母鸡进行杂交,构建了一个鸡 F2 资源群体,他们采用高通量测序及 Real-time RT-PCR 方法检测极端高腹脂鸡和低腹脂鸡个体的脂肪组织中 miRNA 的表达情况。结果发现,miR-17-92 基因簇成员 miR-19b-3p 是一个差异表达极显著的 miRNA。进一步的实验证实,脂肪酸代谢关键酶 *ACSL* 是 miR-19b-3p 的靶基因,过表达 miR-19b-3p 能促进北京油鸡前脂肪细胞增殖及分化。我们前期对东北农业大学的高脂、低脂鸡前脂肪细胞小 RNA 高通量测序发现,miR-17-92 基因簇在鸡前脂肪细胞中表达^[26]。过表达 miR-17-92 基因簇能促进鸡原代前脂肪细胞的增殖(未发表资料)。

LIN9 是重要的细胞周期调控分子,它是 DREAM 复合物中的核心亚基之一^[27]。DREAM 复合物是一种高度保守的多蛋白体亚基复合物,在细胞周期、增殖、分化、凋亡等生命过程中发挥重要作用^[28-31]。DREAM 复合物在果蝇卵巢提取物中首次

被发现。此后证实,DREAM 复合物在线虫和人等哺乳动物中也存在。哺乳动物 DREAM 的组成与果蝇及线虫的成分存在差异^[32-34]。人类 DREAM 复合物又叫 LINC 复合物,参与调控细胞周期 G₂/M 期基因(*Ubch10*、*Birc5*、*Bub1*、*cdc2*)的表达^[35]。在细胞静止期,DREAM 核心亚基能与转录因子 E2F4 和 p130 结合,形成转录抑制复合物;在 S 期时,DREAM 与 E2F4/p130 的结合发生解离,转而与转录因子 B-MYB 结合,形成转录激活复合物。DREAM-B-MYB 对细胞周期进程非常重要,该复合物能调控一系列有丝分裂因子从而调控细胞有丝分裂及胞质分裂过程^[36]。敲除 *LIN9* 基因会抑制胚胎干细胞增殖,引起表型异常,导致外胚层缺损、羊膜、绒毛膜和尿囊发育不全,早期胚泡壁形成缺失,并抑制成年鼠肠上皮细胞增殖等^[37]。干扰 *LIN9* 基因能抑制人成纤维细胞的增殖,并导致 G₂/M 期的细胞阻滞,延缓 G₂ 向 M 期转换;基因表达分析显示,干扰 *LIN9* 基因将导致 G₂/M 期基因表达量明显下降,但是对 G₁ 期基因的表达量无影响^[38]。目前,*LIN9* 基因被认为是一种肿瘤抑制基因,*LIN9* 抑制 DNA 合成,过表达 *LIN9* 抑制小鼠胚胎成纤维细胞系(NIH3T3)、人肺癌细胞、子宫颈癌细胞、大鼠前列腺癌细胞及人骨肉瘤细胞等多种癌细胞的集落形成能力,*LIN9* 基因参与抑制肝癌和结肠癌等多种癌症的发生^[39,40]。

目前,尚无关于 *LIN9* 基因转录后调控研究的报道。我们的生物信息学分析提示,miR-17-92 基因簇成员 miR-19a 和 miR-19b 靶作用于 *LIN9* 基因。为揭示鸡 miR-17-92 基因簇的作用及其作用机制,本研究开展了 miR-19a 和 miR-19b 靶作用于 *LIN9* 基因的鉴定与分析研究。

1 材料与方法

1.1 材料

载体 pEasy-T1 simple vector 及菌株 Top10 均购自全式金公司(北京);psiCHECK-2 vector 购自 Promega 公司(美国);鸡胚成纤维细胞系(DF1)购自上海生命科学研究院细胞资源中心;鸡前脂肪细胞为本实验室保存的细胞系^[41]。

限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司(美国);DNA 纯化回收试剂盒、质粒小量制备试剂盒购自 Axygen 公司(杭州);PureLink™ RNA MicroKit、Opti-MEM、Trizol Reagent、Lipofectamine 2000 均购自 Invitrogen 公司(美国);胎牛血清、

DMEM 购自 Gibco 公司(美国);FastStartUniversal SYBR Green Master(ROX) 购自 Roche 公司(德国);Dual-Luciferase Reporter Assay System,ImProm- II™ Reverse Transcription System 为 Promega 公司产品(美国);鼠源 myc 标签单克隆抗体购自 Clontech 公司(美国);RIPA 细胞裂解液、小鼠 β-actin 单克隆抗体、一抗稀释液、ECL 显色液、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔抗体(A0208)及 HRP 标记的山羊抗鼠抗体(A0216)均购自碧云天生物技术公司(上海);CCK-8 试剂盒购自日本东仁研究所。

1.2 引物设计及合成

参照 NCBI 数据库中鸡 *LIN9* 基因(NM_001031042.1)、*CyclinD1* 基因(NM_205381)、*c-Myc* 基因(M20006.1)、*PCNA* 基因(NM_204170)和 *Ki67* 基因(NM_205505)序列数据,分别设计这些基因的 Real-time qPCR 表达检测引物。选择 *NONO* 基因(NM_001031532)作为内参基因。为构建 *LIN9* 基因 3'UTR 报告基因载体,参照鸡 *LIN9* 基因序列,设计 *LIN9* 基因 3'UTR 区的 RT-PCR 扩增引物 LIN9-F2 和 LIN9-R2,上、下游引物分别携带 *Not I* 和 *Xho I* 酶切位点;为构建 *LIN9* 基因真核表达载体,设计 *LIN9* 全长 CDS 区的扩增引物 LIN9-F3 和 LIN9-R3,上、下游引物分别引入 *Sal I*、*Kpn I* 酶切位点。所有引物均利用 Primer Premier 5.0 软件进行设计,引物信息详见 Table 1,引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.3 miRNA 抑制剂的设计与合成

参照 miRBase 数据库(miRBase database, <http://www.mirbase.org>)中 gga-miR-19a、gga-miR-19b 的序列,设计并合成 miR-19a 抑制剂(miR-19a inhibitor)、miR-19b 抑制剂(miR-19b inhibitor)及无关干扰片段 NC,序列合成由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.4 细胞培养

DF1 细胞和鸡前脂肪细胞均培养于添加了 10% 胎牛血清及终浓度为 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基,在 37℃ 含 5% CO₂ 和 90% 相对湿度的细胞培养箱中培养。

1.5 RNA 提取及 Real-time RT-PCR 检测

将 miR-19a 抑制剂、miR-19b 抑制剂及无关干扰片段 NC 分别转染汇合度达 30% ~ 50% DF1 细胞,转染试剂为 Lipofectamine 2000,48 h 后收集细胞,利用 Trizol 法提取 RNA,按照 Promega ImProm-II (Promega, USA) 反转录试剂盒说明书,将提取的

细胞 RNA 反转录为 cDNA。Real-time PCR 反应体系为: FastStart Universal SYBR Green Master(ROX) 5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 0.2 μ L, 水 3.6 μ L, 总体积为 10 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 复性

延伸 60 s, 共 40 个循环。采用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行 Real-time RT-PCR 检测分析。以 *NONO* 基因为内参, 利用 $2^{-\Delta Ct}$ 的方法将原始 Ct 值转换为相对的基因表达量。以上实验均进行 3 次独立的重复。

Table 1 Primers used in this study

Primer	Usage	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
LIN9-F1	Real-time RT-PCR	AAACCGCTATTTGAAGGAGACA	148
LIN9-R1		CAAAGAACGCAGAGGAGCAC	
CyclinD1-F	Real-time RT-PCR	CTCGGAGCTACCTGCATGTTTCT	237
CyclinD1-R		TTTACGGATGATCTGTTTGGTGT	
c-Myc-F	Real-time RT-PCR	CCTCCTGCTTCCCTTCCACC	188
c-Myc-R		CTTCTCCGACACCACCTTCTCC	
PCNA-F	Real-time RT-PCR	GTGCTGGGACCTGGGTT	217
PCNA-R		CGTATCCGCATTGTCTTCT	
Ki67-F	Real-time RT-PCR	AGGTCCGTTCCCTCGTT	270
Ki67-R		CATTGTGGTCTGGGTCATC	
NONO-F	Real-time RT-PCR	AGAAGCAGCAGCAAGAAC	115
NONO-R		TCCTCCATCCTCCTCAGT	
LIN9-F2	Amplification of 3'UTR	<u>CTCGAGCCGAGTCGTAAGGAACC</u>	946
LIN9-R2		<u>GCGGCCGCCAAAACAACCAAAGCCA</u>	
LIN9-F3	Amplification of CDS	<u>GTGACGAGTTGTGATGTTCCACAG</u>	1 440
LIN9-R3		<u>GGTACCGGATTTTCCAGAACTACTTGCT</u>	

Underlined sequences indicate restriction sites

1.6 LIN9 基因 3'UTR 报告基因载体及真核表达载体的构建

以鸡前脂肪细胞的 cDNA 为模板, 利用 LIN9-F2 和 LIN9-R2 引物(Table 1), PCR 扩增 LIN9 的 3'UTR 区, 扩增片段大小为 946 bp, 琼脂糖凝胶电泳, 胶纯化回收扩增片段, 双酶切后将其插入 psiCHECK-2 vector 构建成 LIN9 基因的 3'UTR 报告基因 psi-CHECK-2-LIN9-WT(野生型)。采用 DNA 合成的方法突变 LIN9 基因 3'UTR 区中 miR-19a/miR-19b 的结合位点, 将种子区结合位点的 6 个碱基进行突变(将 TTGCAC 突变为 ACATGT), 并构建出相应的突变型 LIN9 基因报告基因载体 psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT。另外, 利用引物 LIN9-F3 和 LIN9-R3(Table 1), 扩增 LIN9 基因的全长 CDS 区。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。扩增产物包括 LIN9 基因的起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG, 产物大小为 1 440 bp。将扩增产物经胶纯化和酶切, 插入真核表达载体 pCMV-myc vector(Clontech 公司), 获得 LIN9 基因的真核表达载体 pCMV-myc-LIN9。所有构建的载体均经测序验证无误。

1.7 荧光素酶报告基因活性分析

将 DF1 细胞接种至 12 孔板(2.5×10^5 个/孔) 中, 待汇合度达 30% ~ 50% 时, 将野生型报告基因载体(psiCHECK-2-LIN9-WT) 和突变型报告基因载体(psiCHECK-2-LIN9-MUT) 分别与 pcDNA-3.1-miR-17-92 基因簇表达载体和特定的 miRNA 抑制剂共转染到 DF1 细胞, 转染后的细胞培养于 Opti-MEM medium 培养基中, 4 ~ 6 h 后换为添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 转染 48 h 后, 使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega) 进行双荧光素酶检测。先弃去培养基, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 加 100 μ L/孔细胞裂解缓冲液 RIPA, 放摇床上室温振荡 15 min, 取 20 μ L 细胞裂解液, 加入 100 μ L 萤火虫荧光素酶检测试剂 LAR II, 采用化学单管检测仪测定各组萤火虫荧光素酶活性, 然后加入 100 μ L 的 Stop & Glo 试剂, 检测海肾荧光素酶活性。报告基因活性为海肾荧光素酶活性/萤火虫荧光素酶活性的比值, 每个实验均做 3 次独立的重复。

1.8 Western 印迹检测

将 DF1 细胞接种至 6 孔板中, 待细胞汇合至 70% ~ 80% 时, 利用 Lipofectamine 2000 将 LIN9 基因的真核表达载体 pCMV-myc-LIN9 和 pCMV-myc

空载体分别转染 DF1 细胞 48 h 后,用 PBS 清洗后,加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂 PMSF,其比例为 100:1,混匀后置于冰上,裂解细胞 30~40 min,分别获得转染 pCMV-myc 空载体和 pCMV-myc-LIN9 质粒的细胞裂解液。采用 10% SDS-PAGE 分离蛋白,电泳完成后,采用 Mini Trans-Blot 系统(BIO-RAD),将分离的蛋白质样品转至孔径为 0.45 μm 的 NC 膜上。用含有 5% 脱脂乳的 PBST(含 0.05% 吐温的 PBS)室温封闭 2 h,PBST 洗去膜上的封闭液(5 min/次×3 次)将膜孵育在含有抗体的一抗稀释液(碧云天)中,抗体稀释比例分别为 β-actin 抗体(碧云天,1:1 000),myc 标签抗体(Clontech,1:1 000),4℃过夜。一抗孵育结束后,用 PBST 洗膜 3 次,每次 5 min。然后,将膜孵育在含辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体(稀释度为 1:5 000)的 PBST 溶液中,置于水平摇床上,室温孵育 1 h。用 PBST 洗膜 3 次,每次 5 min,之后进行常规 ECL 显色。

1.9 细胞增殖检测

将鸡前脂肪细胞系接种于 24 孔板上,接种密度为 5 × 10⁴ 个/孔,待完全贴壁后,分别转染 pCMV-myc 空载体及 pCMV-myc-LIN9,每组处理设置 3 个重复,采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖,具体步骤参照 CCK-8 试剂盒操作说明进行。在细胞转染后的不同时间点(24 h、48 h、72 h 和 96 h),每孔避光加入 CCK-8 试剂 100 μL,在 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 2~3 h 后,采用酶联免疫检测仪,选择波长

450 nm,测定各孔的吸光值。另外,细胞转染后 24 h、48 h、72 h 和 96 h 时,采用 Real-time RT-PCR 方法检测细胞增殖标志基因(*CyclinD1*、*c-Myc*、*PCNA* 及 *Ki67*) 的表达量。

1.10 统计分析

运用 SAS 9.2 软件(SAS Institute Inc)分析实验数据,数据用均数 ± 标准差表示,采用标准 *t* 检验方法,*P* < 0.05 为差异显著,*P* < 0.01 为差异极显著。

2 结果

2.1 LIN9 基因 3'UTR 区的 miRNA 结合位点的分析

利用 Targetscan 和 miRanda 软件分析鸡 LIN9 基因(NM_001031042.1) mRNA 的 3'UTR 序列。结果显示 LIN9 基因是 miR-17-92 基因簇成员 miR-19a 和 miR-19b 的一个潜在靶基因, LIN9 基因 3'UTR 序列中第 742~748 bp 与 miR-19a 和 miR-19b 的种子区序列的第 2~8 bp 完全互补(Fig. 1)。比较人(NM_001270410.1)、小鼠(NM_001103182.2)、兔(XM_008268645.1)、猪(XM_013143535.1)和鸡(NM_001031042.1) LIN9 基因的 3'UTR 序列发现,上述这些物种 LIN9 基因的 3'UTR 都具有这个保守的 miR-19a/miR-19b 结合位点(Fig. 1),提示 LIN9 基因的 3'UTR 可能是 miR-19a 和 miR-19b 的真实结合位点,miR-17-92 基因簇可能参与 LIN9 基因的表达调控。

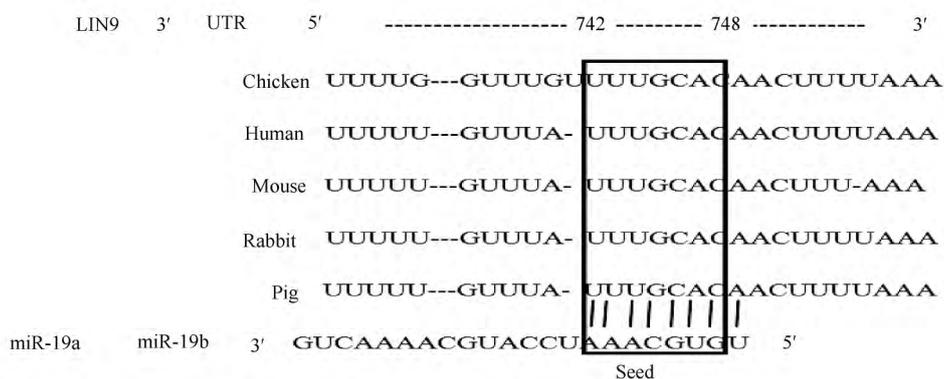


Fig. 1 The binding site of miR-19a and miR-19b in 3'UTR of chicken LIN9 mRNA The results showed that the potential binding site of miR-19a and miR-19b in the 3'UTR of chicken LIN9 mRNA was highly conserved in various species. The miRNA binding site was predicted by TargetScan and miRanda software

2.2 过表达 miR-19a 和 miR-19b 抑制 LIN9 3'-UTR 的报告基因表达

为验证 LIN9 是否为 miR-17-92 基因簇成员 miR-19a 和 miR-19b 的靶基因,构建了 LIN9 基因 3'

UTR 的报告基因载体 psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-WT(野生型)和 psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT(突变型)(Fig. 2A 和 2B)。将野生型报告基因载体分别与 pcDNA3.1-miR-17-92 基因簇表达载体和空表达

载体 pcDNA-3.1 共转染 DF1 细胞。报告基因活性分析显示,与 pcDNA-3.1 空载体对照组相比,转染 pcDNA3.1-miR-17-92 基因簇能显著降低野生型报告基因的荧光素酶报告基因活性($P < 0.01$),下降 28.5% (Fig. 2C),提示 miR-17-92 基因簇可调控 *LIN9* 基因的表达。

为确认 miR-17-92 基因簇成员 miR-19a 和 miR-19b 靶作用于鸡 *LIN9* 基因,将 psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-WT 和 psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT 分别与 miR-19a、miR-19b 的抑制剂及抑制剂对照共转 DF1 细胞。报告基因活性检测显示,与 miRNA-NC 对照相比,转染 miR-19a 和 miR-19b 抑制剂均能

显著提高野生型报告基因载体 psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-WT 的活性($P < 0.01$),分别提高 34.2% 和 22.0% (Fig. 2D)。本实验室前期研究发现,在 DF1 细胞中 miR-17-92 基因簇有较高的表达。*LIN9* 基因 3'-UTR 区 miR-19a/b 结合位点的突变会降低 miR-19a 和 miR-19b 与 *LIN9* 基因 3'-UTR 区的结合,从而导致 psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT 报告基因活性的升高。与此预期结果一致,psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT 和 NC 共转染组的报告基因活性显著高于 psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-WT 和 NC 共转染组($P < 0.01$) (Fig. 2D)。这些数据表明,miR-19a 和 miR-19b 靶作用于 *LIN9* 基因。但意想不到的是,本

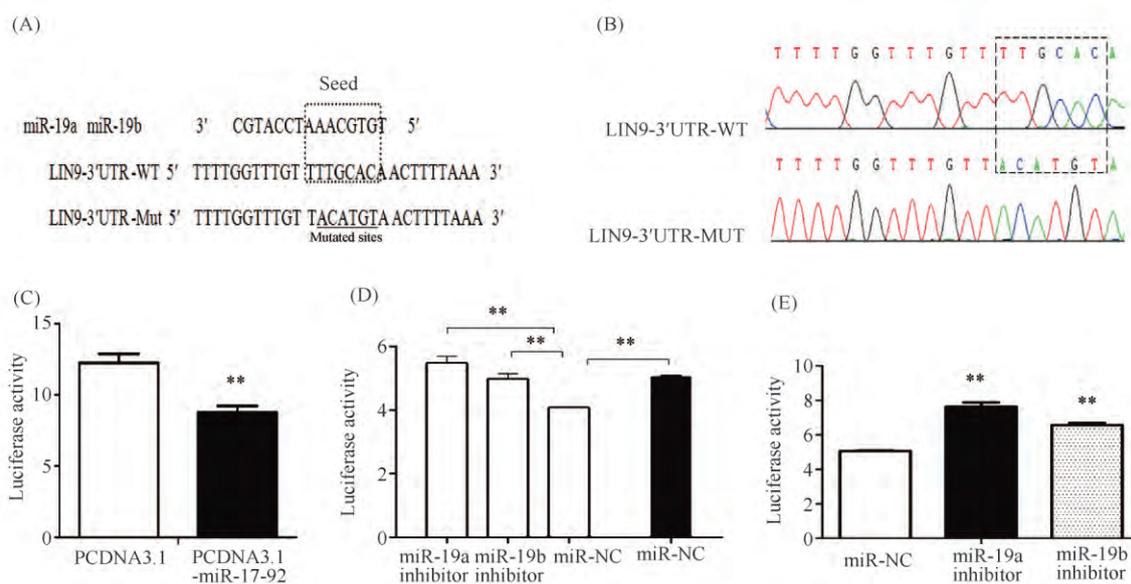


Fig. 2 Identification of *LIN9* as a target of miR-19a and miR-19b by luciferase reporter assays (A) Partial sequence alignment of miR-19a/b and the 3'UTR and the mutated 3'UTR of *LIN9* mRNA. The figure showed miR-19a/b sequence (top), the wild-type 3'UTR (middle) and the mutated 3'UTR (bottom) of chicken *LIN9* mRNA. The boxed sequences were the seed sequence and its complementary sequence of miR-19a/b. The complementary sequence was mutated in the mutated 3'UTR of *LIN9* (*LIN9*-3'UTR-MUT). (B) Sequencing chromatogram of the wild-type and the mutant-type of *LIN9* 3'UTR. The figure showed sequencing results of the wild-type 3'UTR (top) and the mutant-type 3'UTR (bottom) of chicken *LIN9*. The boxed sequences were the potential miR-19a/b binding sequence and its mutated sequence. (C) The effect of transfection of pcDNA-3.1-miR-17-92 cluster on the reporter activity of psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-WT. DF1 cells were seeded in twelve-well plates, and transfected with psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-WT (0.5 μ g/well) and either pcDNA3.1-miR-17-92 cluster (0.5 μ g/well) or pcDNA-3.1 vector (0.5 μ g/well). Cell lysates were harvested 48 hours after transfection, and luciferase activity was measured according to the manufacturer's instructions. Values are the mean \pm SD of three determinations from separate experiments. ** $P < 0.01$, compared with the cells transfected with pcDNA3.1 vector. (D) Effects of miR-19a and miR-19b inhibitors on the reporter activity of wild type (open columns) and mutant type (filled column) *LIN9* 3'UTR reporters. DF1 cells were seeded in twelve-well plates and cotransfected with 0.5 μ g/well of psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT or psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-WT and either 100 nmol/L of miR-NC, miR-19a inhibitor or miR-19b inhibitors. Cell lysates were harvested 48 hours after transfection and luciferase activity was measured. Values are the mean \pm SD of three determinations from separate experiments. ** $P < 0.01$, compared with the cells cotransfected with psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT/WT and miR-NC at the same concentration. (E) Effect of miR-19a/b inhibitor on the activity of mutant *LIN9* reporters. DF1 cells were seeded in twelve-well plates and cotransfected with psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT (0.5 μ g/well) and either 100 nmol/L of miR-19a/b inhibitor or miR-NC. Cell lysates were harvested 48 hours after transfection and luciferase activity was measured. Values are the mean \pm SD of three determinations from separate experiments. ** $P < 0.01$, compared with the cells cotransfected with psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT and miR-NC.

研究发现,与 NC 对照相比,miR-19a 和 miR-19b 抑制剂仍能提高 psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT 的荧光素酶活性,分别提高 50.7% 和 29.7% (Fig. 2E)。

2.3 miR-19a 和 miR-19b 抑制剂对细胞内源性 LIN9 基因表达的影响

为深入了解 miR-19a 和 miR-19b 靶作用于 LIN9 基因的机制,分析了 miR-19a 和 miR-19b 的抑制剂对细胞内源性 LIN9 基因表达的影响。将 miR-19a 和 miR-19b 的抑制剂和 miRNA NC 分别转染鸡 DF1 细胞,48h 后提取细胞总 RNA,采用 Real-time RT-PCR 检测 LIN9 基因 mRNA 的表达变化。结果发现,与 NC 对照相比,分别转染 miR-19a 和 miR-19b 的抑制剂后,细胞 LIN9 基因 mRNA 的表达水平无明显变化 (Fig. 3),提示 miR-19a 和 miR-19b 通过抑制 mRNA 翻译来调控 LIN9 基因的表达。

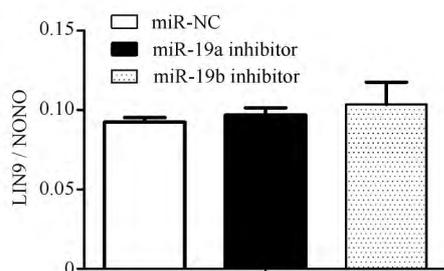


Fig. 3 The effect of miR-19a and miR-19b inhibitors on the endogenous LIN9 gene expression in DF1 cells

DF1 cells were transfected with 100 nmol/L of miR-19a, miR-19b inhibitors or miR-NC, respectively. After 48 hours, total RNA was isolated and LIN9 expression was analyzed by real-time RT-PCR. The NONO gene was used as an internal control. Values are the mean \pm SD of three determinations from separate experiments. $P > 0.05$, compared with the cells transfected with miR-NC.

2.4 过表达 LIN9 抑制鸡前脂肪细胞增殖及增殖相关蛋白的表达

哺乳动物研究表明, LIN9 是一个细胞周期调控因子,参与细胞增殖的调控^[26]。为了揭示 LIN9 在鸡前脂肪细胞增殖中的作用,采用 RT-PCR 扩增了全长的 LIN9 基因的 CDS 序列,构建 LIN9 基因真核表达载体 pCMV-myc-LIN9。利用 myc 标签抗体进行 Western 印迹检测分析,发现在转染 pCMV-myc-LIN9 的细胞裂解液中检测到 1 个预期大小约 60 kD 的蛋白分子,但在转染 pCMV-myc vector 的细胞裂解液中没有检测到相应的蛋白分子,提示成功构建了鸡 LIN9 基因的真核表达载体 (Fig. 4)。

将 pCMV-myc-LIN9 和 pCMV-myc vector 分别转染鸡前脂肪细胞,利用 CCK-8 试剂盒检测 LIN9 基

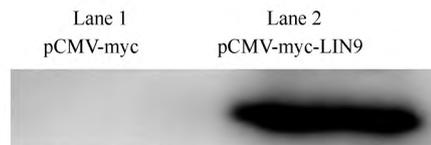


Fig. 4 Identification of the expression of the LIN9 eukaryotic expression vector (pCMV-myc-LIN9) by Western blot analysis with an anti-myc antibody. Lane 1: Lysate of pCMV-myc-vector-transfected cells; Lane 2: Lysate of pCMV-myc-LIN9-transfected cells

因过表达对鸡前脂肪细胞系增殖的影响。CCK-8 分析显示,在转染后 24 h,过表达 LIN9 基因的组细胞吸光度值显著低于空载体对照组 ($P < 0.05$, 约低 22.7%); 而转染后 48 h、72 h 和 96 h,过表达 LIN9 基因的组细胞吸光度值极显著低于空载体对照组 ($P < 0.01$, 分别低 59.1%、62.0% 和 62.3%) (Fig. 5A),说明过表达 LIN9 抑制前脂肪细胞的增殖。增殖细胞核相关抗原 (PCNA) 和细胞核相关抗原 (Ki67) 是常用的增殖相关蛋白标志物,与细胞的增殖关系密切。c-Myc 及细胞周期蛋白 D1 (cyclinD1) 是重要的细胞周期调节因子,参与细胞周期调控^[42-45]。与增殖检测结果相一致。Real-time RT-PCR 表达分析发现, LIN9 过表达时细胞增殖标志基因 c-Myc、Cyclin D1、PCNA 和 Ki67 的表达量在 24 h、48 h、72 h、96 h 时都显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 低于空载体对照组 (Fig. 5B)。

3 讨论

LIN9 是一个重要的细胞周期调控因子,目前尚无 miRNA 靶作用于 LIN9 基因的研究报道。本研究生物信息学分析显示, LIN9 基因 mRNA 3'-UTR 具有保守的 miR-19a/b 的结合位点 (Fig. 1),进一步的 LIN9 基因的 3'-UTR 报告基因分析和定点突变分析证实, miR-17-92 基因簇成员 miR-19a 和 miR-19b 靶作用于鸡 LIN9 基因。

大多数 miRNAs 通过与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 不完全互补配对,抑制靶基因 mRNA 的翻译,从而调节靶基因表达,这种作用方式只影响蛋白表达水平,并不引起靶基因 mRNA 的降解^[46,47]。但研究也发现,许多 (但不是全部) miRNA 能导致靶基因 mRNA 的降解,从而调控靶基因的表达^[48]。本研究发现, miR-19a 和 miR-19b 抑制剂对细胞内源性 LIN9 基因 mRNA 的表达都无明显影响 (Fig. 3),提示 miR-19a 和 miR-19b 可能通过翻译抑制来调控 LIN9 表达。我们尝试利用兔抗人的 LIN9 多克隆抗

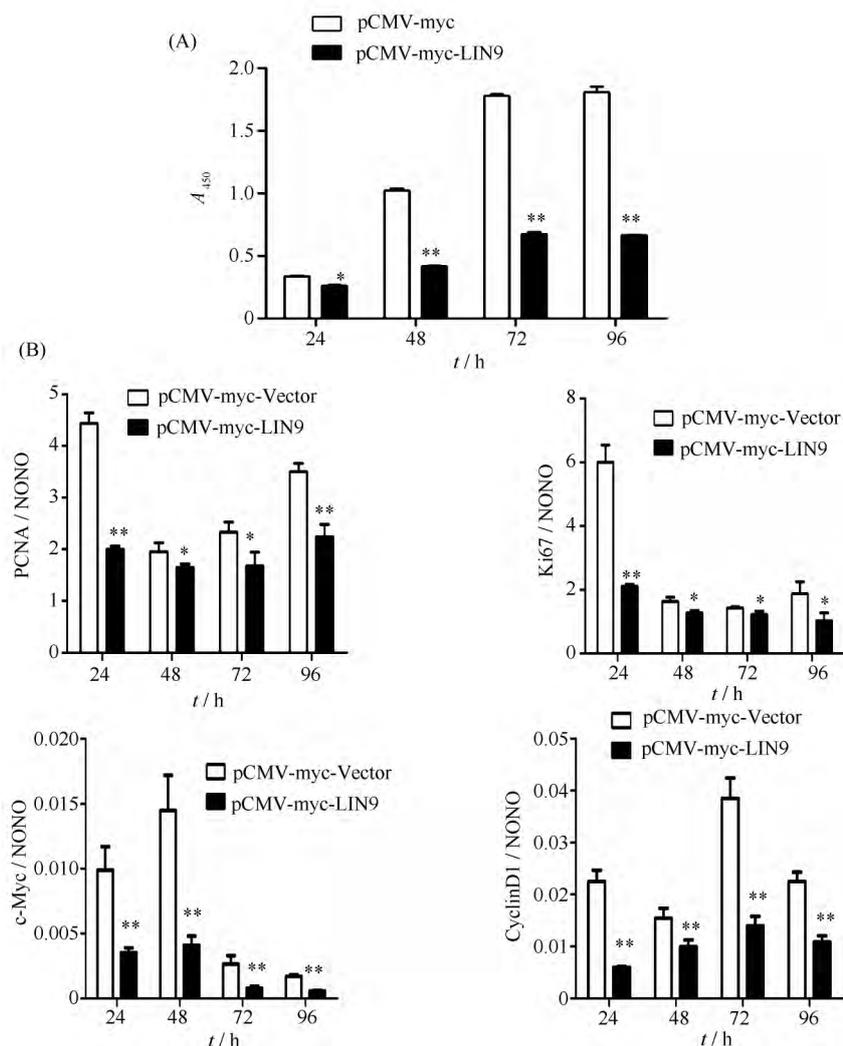


Fig. 5 The effect of LIN9 overexpression on chicken preadipocyte proliferation (A) The effect of LIN9 overexpression on chicken preadipocyte proliferation. Chicken preadipocytes were seeded in twenty-four-well plates and transfected respectively with 0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ of pCMV-myc-LIN9 and pCMV-myc vector. Cell proliferation was assayed by CCK-8 kit at 24, 48, 72 or 96 hours after transfection. Absorbance was measured at a wavelength of 450 nm. Values are the mean \pm SD of three determinations from separate experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with the absorbance of the cells transfected with pCMV-myc empty vector at the same time points. (B) The effect of LIN9 overexpression on the expression of *c-Myc*, *Cyclin D1*, *PCNA* and *Ki67* in chicken preadipocytes. Chicken preadipocytes were seeded in twenty-four-well plates and transfected with 0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ of pCMV-myc-LIN9 and pCMV-myc vector, respectively. Total RNA was isolated at 24, 48, 72, 96 hours after transfection and mRNA levels of *c-Myc*, *Cyclin D1*, *PCNA* and *Ki67* were analyzed by real-time RT-PCR. The *NONO* gene was used as an internal control. Values are the mean \pm SD of three determinations from separate experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with the expression of the same gene in the cells transfected with pCMV-myc empty vector at the same time points

体进行 Western 印迹检测,结果并未检测到鸡 LIN9 蛋白,这可能是由于鸡 LIN9 基因在细胞中表达水平较低或抗体滴度太低,也可能是由于抗体特异性太高,只能检测人 LIN9,无法检测鸡 LIN9 蛋白。未来将自制鸡 LIN9 抗体,进一步确认 miR-19a 和 miR-19b 是否通过翻译抑制调控 LIN9 基因表达。

LINC/DREAM 复合物是调节细胞周期的重要因子,在调控细胞周期和细胞增殖中起关键性作用。LIN9 是 LINC/DREAM 复合物的核心亚基之一,也

是重要的功能组分, LIN9 缺失会阻遏 LINC/DREAM 和 BMYB-MuvB 形成复合物,该复合物对发育相关基因表达有重要调控作用^[37]。Gagrica 等^[49]首次发现, LIN9 与肿瘤抑制蛋白 pRB 交互,通过 pRB 依赖性方式抑制肿瘤细胞增殖,在缺乏口袋蛋白 pRB, p107 和 p130 的细胞中,过表达 LIN9 仍能抑制小鼠胚胎成纤维细胞增殖^[39]。与这些研究结果相一致,本研究发现过表达 LIN9 抑制鸡前脂肪细胞的增殖(Fig. 5A)。

敲除小鼠研究表明, miR-17-92 基因簇是哺乳动物生长发育所必需的, miR-17-92 基因簇参与多种生物学发育过程。大量研究表明, miR-17-92 基因簇可促进癌细胞增殖^[50-52]。本实验室的前期研究发现, 过表达 miR-17-92 基因簇能促进鸡前脂肪细胞的增殖(未发表资料)。但是, miR-17-92 基因簇中具体哪一个 miRNA 成员发挥作用尚不明确。本研究发现, LIN9 是 miR-19a 和 miR-19b 的一个靶基因, 且 LIN9 过表达抑制鸡前脂肪细胞的增殖(Fig. 5A), 这正好与 miR-17-92 基因簇的作用相反, 提示 miR-17-92 基因簇可能通过 miR-19a 和 miR-19b 抑制 LIN9 基因表达, 从而促进鸡前脂肪细胞的增殖。miR-17-92 基因簇有多个成员, 各成员的靶基因众多^[53], miR-17-92 基因簇是否通过抑制 LIN9 基因表达从而促进鸡前脂肪细胞的增殖, 这还有待进一步的分析。未来需要开展拯救分析以确认 LIN9 是否介导 miR-17-92 基因簇促进鸡前脂肪细胞增殖的作用。

在 miRNA 靶基因的报告基因分析鉴定中, 一般情况下, 如果突变 3'UTR 区的特定 miRNA 结合位点, 那么这个 miRNA 的抑制剂会丧失对这个突变型 3'UTR 报告基因载体活性的调控作用^[54, 55]。但在本研究中, LIN9 基因 3'UTR 的 miR-19a/b 结合位点突变分析显示, 与抑制剂阴性对照相比, 转染 miR-19a/b 抑制剂能显著提高突变型 LIN9 基因 3'UTR 报告基因载体(psi-CHECK2-LIN9-3'-UTR-MUT) 的活性(Fig. 2E)。产生这种现象的可能原因, 一是由于 LIN9 基因 3'UTR 区 miR-19a/b 结合位点的局部突变并未能使 miR-19a 和 miR-19b 完全丧失与 LIN9 基因 3'UTR 结合的能力, 而仅使其结合能力下降。大量的研究表明, 除了 miRNA 结合位点序列外, miRNA 结合位点在 3'UTR 区的位置、miRNA 结合位点周围的碱基分布、3'UTR 靶结合区的二级结构以及 miRNA 的非种子区序列等都在 miRNA 与靶基因 3'UTR 区的相互作用中发挥至关重要的作用^[56-58]。例如, Didiano 等^[57] 在转基因线虫研究中发现, 基因 cog-1 是 miRNA lsy-6 的一个靶基因, 在 cog-1 基因 3'UTR 区的 miRNA 结合位点下游有一段序列对 lsy-6 的作用同样至关重要, 改变这段序列可以导致 miRNA 的作用减弱, 如果删除这段序列, 则 lsy-6 对靶基因 cog-1 失去调控作用。还有一个可能的原因是, miR-19a/b 结合位点突变可能会影响那些调控 LIN9 基因的 miRNA 间协同作用。因为一个基因受到多个 miRNA 调控, 这些 miRNA 间可能存

在协同和组合作用, 如果破坏 miRNA 间协同和组合作用, 也可能使报告基因活性升高。已有研究报道, miR-17-92 基因簇成员间存在组合和协同作用^[59]。产生这一现象的原因尚有待深入研究。

参考文献(References)

- [1] Du T, Zamore PD. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA[J]. *Development*, 2005, **132**(21): 4645-4652
- [2] Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? [J]. *RNA*, 2005, **11**(12): 1753-1761
- [3] 盛熙晖, 杜立新. MicroRNA 及其在人和动物上的研究进展[J]. *遗传*(Sheng X H, Du L X. Progress on the research of microRNAs and its function in humans and animals [J]. *Hereditas*), 2007, **29**(6): 651-658
- [4] Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, **11**(4): 252-263
- [5] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297
- [6] He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene [J]. *Nature*, 2005, **435**(7043): 828-833
- [7] Bahari F, Emadi-Baygi M, Nikpour P. MiR-17-92 host gene, underexpressed in gastric cancer and its expression was negatively correlated with the metastasis [J]. *Indian J Cancer*, 2015, **52**(1): 22-25
- [8] Yan HL, Xue G, Mei Q, et al. Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis [J]. *EMBO J*, 2009, **28**(18): 2719-2732
- [9] Ventura A, Young AG, Winslow MM, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters [J]. *Cell*, 2008, **132**(5): 875-886
- [10] Korolov SB, Muljo SA, Galler GR, et al. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage [J]. *Cell*, 2008, **132**(5): 860-874
- [11] Lu Y, Thomson JM, Wong HY, et al. Transgenic overexpression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells [J]. *Dev Biol*, 2007, **310**(2): 442-453
- [12] Lu Y, Okubo T, Rawlins E, et al. Epithelial progenitor cells of the embryonic lung and the role of microRNAs in their proliferation [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, **5**(3): 300-304
- [13] Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, et al. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(37): 14082-14087
- [14] 李国喜, 宁小敏, 康相涛, 等. MicroRNA 调控动物脂肪细胞的分化 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*(Li GX, Ning XM, Kang XT, et al. MicroRNAs regulate animal's adipocyte differentiation [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2009, **25**(04): 321-326
- [15] Zhou M, Ma J, Chen S, et al. MicroRNA-17-92 cluster regulates osteoblast proliferation and differentiation [J]. *Endocrine*, 2014, **45**(2): 302-310
- [16] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(7): 2257-2261
- [17] Inomata M, Tagawa H, Guo Y M, et al. MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes [J]. *Blood*, 2009, **113**(2): 396-402
- [18] Molitoris JK, McColl KS, Distelhorst CW. Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17 ~ 92 contributes to the induction of Bim and initiation of apoptosis [J]. *Mol Endocrinol*, 2011, **25**(3): 409-420
- [19] Battistella M, Romero M, Castro-Vega LJ, et al. The high expression of the microRNA 17-92 cluster and its paralogs, and the downregulation of the target gene PTEN, is associated with primary cutaneous B-cell lymphoma progression [J]. *J Invest*

- Dermatol, 2015, **135**(6): 1659-1667
- [20] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, *et al.* C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression [J]. *Nature*, 2005, **435**(7043): 839-843
- [21] Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, *et al.* An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(4): 2135-2143
- [22] Dews M, Homayouni A, Yu D, *et al.* Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster [J]. *Nat Genet*, 2006, **38**(9): 1060-1065
- [23] Olive V, Jiang I, He L. MiR-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, **42**(8): 1348-1354
- [24] Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. MiR-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(21): 8191-8201
- [25] Huang HY, Liu RR, Zhao GP, *et al.* Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in abdominal adipose tissues in chickens [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 16132
- [26] Yao J, Wang Y, Wang W, *et al.* Solexa sequencing analysis of chicken pre-adipocyte microRNAs [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, **75**(1): 54-61
- [27] Esterlechner J, Reichert N, Iltzsch F, *et al.* LIN9, a subunit of the DREAM complex, regulates mitotic gene expression and proliferation of embryonic stem cells [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(5): e62882
- [28] Korenjak M, Taylor-Harding B, Binne UK, *et al.* Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes [J]. *Cell*, 2004, **119**(2): 181-193
- [29] Rovani MK, Brachmann CB, Ramsay G, *et al.* The dREAM/Myb-MuvB complex and Grim are key regulators of the programmed death of neural precursor cells at the *Drosophila* posterior wing margin [J]. *Dev Biol*, 2012, **372**(1): 88-102
- [30] Forristal C, Henley SA, MacDonald JI, *et al.* Loss of the mammalian DREAM complex deregulates chondrocyte proliferation [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, **34**(12): 2221-2234
- [31] Sadasivam S, Duan S, DeCaprio JA. The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression [J]. *Genes Dev*, 2012, **26**(5): 474-489
- [32] Lewis PW, Beall EL, Fleischer TC, *et al.* Identification of a *Drosophila* Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex [J]. *Genes Dev*, 2004, **18**(23): 2929-2940
- [33] Harrison MM, Ceol CJ, Lu X, *et al.* Some *C. elegans* class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(45): 16782-16787
- [34] Pilkinton M, Sandoval R, Song J, *et al.* Mip/LIN-9 regulates the expression of B-Myb and the induction of cyclin A, cyclin B, and CDK1 [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(1): 168-175
- [35] Schmit F, Korenjak M, Mannefeld M, *et al.* LINC, a human complex that is related to pRB-containing complexes in invertebrates regulates the expression of G₂/M genes [J]. *Cell Cycle*, 2007, **6**(15): 1903-1913
- [36] Guiley KZ, Liban TJ, Felthousen JG, *et al.* Structural mechanisms of DREAM complex assembly and regulation [J]. *Genes Dev*, 2015, **29**(9): 961-974
- [37] Reichert N, Wurster S, Ulrich T, *et al.* Lin9, a subunit of the mammalian DREAM complex, is essential for embryonic development, for survival of adult mice, and for tumor suppression [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, **30**(12): 2896-2908
- [38] Osterloh L, von Eyss B, Schmit F, *et al.* The human synMuv-like protein LIN-9 is required for transcription of G₂/M genes and for entry into mitosis [J]. *EMBO J*, 2007, **26**(1): 144-157
- [39] Pilkinton M, Sandoval R, Barrett K, *et al.* Mip/LIN-9 can inhibit cell proliferation independent of the pocket proteins [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, **39**(3): 272-277
- [40] Sandoval R, Xue J, Tian X, *et al.* A mutant allele of BARA/LIN-9 rescues the cdk4^{-/-} phenotype by releasing the repression on E2F-regulated genes [J]. *Exp Cell Res*, 2006, **312**(13): 2465-2475
- [41] 王宁, 段遼, 宋鹤, 等. 鸡 miR-20a 靶基因 TP53INP1 鉴定 [J]. 东北农业大学学报 (Wang N, Duan K, Song H, *et al.* Identification of TP53INP1 as a targets gene of chicken miR-20a [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2015, **46**(9): 69-74
- [42] Dietrich DR. Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1993, **23**(1): 77-109
- [43] Ohta Y, Ichimura K. Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, Ki67, 5-bromo-2'-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2000, **109**(11): 1046-1048
- [44] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, *et al.* Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 [J]. *J Immunol*, 1984, **133**(4): 1710-1715
- [45] Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(1): 1-11
- [46] Xiang R, Lei H, Chen M, *et al.* The miR-17-92 cluster regulates FOG-2 expression and inhibits proliferation of mouse embryonic cardiomyocytes [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, **45**(2): 131-138
- [47] Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, **65**(4): 545-562
- [48] Liu Q, Fu H, Sun F, *et al.* miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(16): 5391-5404
- [49] Gargic S, Hauser S, Kolschoten I, *et al.* Inhibition of oncogenic transformation by mammalian Lin-9, a pRB-associated protein [J]. *EMBO J*, 2004, **23**(23): 4627-4638
- [50] Zhu H, Han C, Wu T. MiR-17-92 cluster promotes hepatocarcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2015, **36**(10): 1213-1222
- [51] Park D, Lee SC, Park JW, *et al.* Overexpression of miR-17 in gastric cancer is correlated with proliferation-associated oncogene amplification [J]. *Pathol Int*, 2014, **64**(7): 309-314
- [52] Zhu H, Han C, Lu D, *et al.* MiR-17-92 cluster promotes cholangiocarcinoma growth: evidence for PTEN as downstream target and IL-6/Stat3 as upstream activator [J]. *Am J Pathol*, 2014, **184**(10): 2828-2839
- [53] 申健, 张越, 潘秋辉, 等. 生物信息学分析及预测 miR-17-92 的分子调控网络 [J]. 中国生物工程杂志 (Shen J, Zhang Y, Pan QH, *et al.* Bioinformatics analysis and prediction of miR-17-92 cluster mediated regulatory network [J]. *Chin Biotechnol*, 2012, **32**(03): 69-75
- [54] Wang M, Gu H, Qian H, *et al.* MiR-17-5p/20a are important markers for gastric cancer and murine double minute 2 participates in their functional regulation [J]. *Eur J Cancer*, 2013, **49**(8): 2010-2021
- [55] Kang HW, Wang F, Wei Q, *et al.* MiR-20a promotes migration and invasion by regulating TNKS2 in human cervical cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 2012, **586**(6): 897-904
- [56] Long D, Lee R, Williams P, *et al.* Potent effect of target structure on microRNA function [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, **14**(4): 287-294
- [57] Didiano D, Hobert O. Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR [J]. *RNA*, 2008, **14**(7): 1297-1317
- [58] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing [J]. *Mol Cell*, 2007, **27**(1): 91-105
- [59] Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, *et al.* Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes [J]. *Nat Immunol*, 2008, **9**(4): 405-414