

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.07.010

过表达 miR-455 促进肝癌细胞诱导的管型形成 *

伊丽娜¹ 魏欢² 赵方新² 张烜^{2△} 李文希¹ 孙鹏²

(1 内蒙古医科大学药学院 内蒙古 呼和浩特 010100; 2 内蒙古医科大学基础医学院 内蒙古 呼和浩特 010100)

摘要 目的:构建 miR-455 前体的真核表达载体,探讨其对肝癌细胞诱导管型形成的影响。**方法:**采用 PCR 扩增 miR-455 前体序列,通过双酶切将其连接到真核表达载体 pcDNA3 中。连接产物转化入大肠杆菌内进行扩增,采用菌落 PCR、双酶切和测序鉴定重组子。将构建的质粒转染 SMMC-7721 细胞,通过 real-time PCR 检测成熟 miR-455 的表达,采用 ELISA 方法检测培养液上清中 VEGF 的表达。用该上清处理人脐静脉内皮细胞 HUVEC 后,检测管型形成的情况。**结果:**本实验成功构建了 miR-455 前体的真核表达载体,将其瞬时转染 SMMC-7721 细胞后,real-time PCR 检测结果显示 miR-455 表达水平显著升高($P<0.01$)。过表达 miR-455 后,SMMC-7721 细胞上清 VEGF 表达水平呈时间依赖性升高 (24 h $P<0.05$, 48 h 和 72 h $P<0.01$)。人脐静脉内皮细胞分别用转染 pcDNA3 和 pcDNA3-pre-455 的肝癌细胞培养液上清(72 h)重悬,接种于基质胶 Matrigel 上,转染 pcDNA3-pre-455 组形成典型的微管,管样结构明显完整。**结论:**过表达 miR-455 可促进肝癌细胞诱导的微管形成。

关键词:miR-455;真核表达载体;肝癌细胞;微管形成

中图分类号:R-33;Q78;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)07-1248-05

Overexpression of miR-455 Promotes the Tube Formation Induced by Liver Cancer Cells*

YI Li-na¹, WEI Huan², ZHAO Fang-xin², ZHANG Xuan^{2△}, LI Wen-xi¹, SUN Peng²

(1 College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, 010100, China;

2 College of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, 010100, China)

ABSTRACT Objective: To establish the eukaryotic expression vector of miR-455 precursors and investigate the role of miR-455 on tube formation induced by liver cancer cells. **Methods:** The miR-455 precursor was amplified by PCR and inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA3. The recombinant plasmid was identified by colony PCR, enzyme digestion and sequencing. After transient transfection with the recombinant plasmid, the matured miR-455 expression of SMMC-7721 cell was detected using real-time PCR; the VEGF expression in cell culture supernatant was measured by ELISA; the tube formation of HUVEC was observed after treating with transfected cell culture supernatant. **Results:** The pre-miR-455 eukaryotic expression vectors were successfully constructed. The real-time PCR results showed that miR-455 expression was significantly increased ($P<0.01$) after transfecting into SMMC-7721 cells. The expression of VEGF in SMMC-7721 cells increased in a time-dependent manner ($P<0.05$ for 24 h, $P<0.01$ for 48 h and 72 h) after overexpression of miR-455. The human umbilical vein endothelial cells were resuspended with hepatic carcinoma cell supernatant (72 h) which was transfected by pcDNA3 and pcDNA3-pre-455 and seeded on Matrigel. The group which transfected with pcDNA3-pre-455 forms typical microtubules and the tubular structure is obviously complete. **Conclusions:** Overexpression of miR-455 promoted the tube formation induced by liver cancer cells.

Key words: miR-455; Construction of eukaryotic expression vector; Liver cancer cell; Tube formation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)07-1248-05

前言

microRNA(miRNA)是大约 18-25 nt 的内源性非编码单链 RNA,通过与靶基因 mRNA 的 5' 或 3' 非翻译区互补结合,在转录后水平影响靶 mRNA 的稳定性或蛋白翻译,参与基因表达调控^[1,2]。miRNA 广泛存在于脊椎动物、植物、藻类和一些病

毒中,参与复杂多样的生理或病理过程,如发育分化^[3]、免疫^[4]及肿瘤发生^[5]等,通过肿瘤相关靶基因调控癌细胞生长、凋亡、迁移、浸润和血管生成等过程^[6]。血管新生是肿瘤细胞生长后期为肿瘤组织内部提供营养物质的主要途径^[7],血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是肿瘤血管新生的主要驱动因子。miRNA-455 在不同癌症中作为致癌因子促进肿瘤

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81660482);内蒙古医科大学科技百万工程项目(YKD2015KJBW005)

作者简介:伊丽娜(1992-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤药理学,电话:15248081700, E-mail: 576163882@qq.com

△ 通讯作者:张烜,女,博士,讲师,主要研究方向:肿瘤分子生物学,电话:18647388275, E-mail: zhxuan024@163.com

(收稿日期:2017-12-06 接受日期:2017-12-25)

迁移浸润,也可作为抑瘤因子抑制肿瘤细胞生长或促其凋亡^[8-11]。但目前关于 miRNA-455 对肿瘤血管新生的调控作用鲜有报道。

研究 miRNA 的功能一般通过抑制或者过表达两种手段^[12-14]。实现 miRNA 在细胞内的过表达有两种方法:一种是通过化学合成 miRNA 模拟物(miRNA mimics)直接向细胞内转染^[15];另一种是通过构建 miRNA 前体(pre-miRNA)的表达载体,在细胞内实现过表达^[16,17],通过构建载体所表达的 miRNA 与细胞内源的 miRNA 更为接近,可以更真实地反映 miRNA 对靶基因的调控功能。因此,本研究通过 PCR 扩增 miR-455 前体片段,并将其构建到真核表达载体 pcDNA3 中。在肝癌细胞 SMMC-7721 中瞬时过表达 miR-455 后,观察其对培养液上清中 VEGF 表达及诱导 HUVEC 微管形成的影响,从而探讨 miR-455 在肝癌血管新生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 SMMC-7721 和人脐静脉内皮细胞 HUVEC 购自上海细胞库;GIBCO RPMI-1640 培养基购自 Thermo 公司;内皮细胞培养基购自 Lonza 公司;pcDNA3 载体由南开大学馈赠;琼脂糖、总 RNA 抽提纯化试剂盒、miRNA 特异性反转录试剂盒、凝胶染料、转染试剂购自 Transgen 公司;T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;感受态 *E.coli* DH5 α 、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司;UNI 质粒小提试剂盒购自 GenStar 公司;VEGF ELISA 试剂盒购自 DAKWE 公司;基质胶 Matrigel 购自 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及基因组 PCR 在 miRBase 和 NCBI nucleotide 中查找 miR-455 前体序列(pre-miR-455)信息,扩增范围包含 pre-miR-455 前后各约 100 bp,产物长度为 150~300 bp。在线设计特异于 miR-455 前体序列的引物,并在上、下游引物 5' 端分别添加 *KpnI* 和 *XhoI* 酶切位点。目的片段为 255 bp,引物序列如下:上游: 5'-ATGGTACCCTAGCATCTAACCCAGC-CG-3',下游: 5'-ATCTCGAGACCACTGCCATCCACAT-3';引物由上海生工生物技术有限公司合成。

以人肝癌细胞系 SMMC-7721 基因组 DNA 为模板,通过 PCR 反应扩增 pre-miR-455 目的片段。采用 50 μ L 体系:基因组 DNA 2 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L,10 $\times$ HiFi Buffer II 5 μ L,2.5 mM dNTPs 4 μ L,HiFi DNA Polymerase 0.6 μ L,H₂O 37.4 μ L。扩增反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s;35 个循环;PCR 循环完成后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 8 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后,切取大小正确的目的条带,用凝胶回收试剂盒进行回收(按说明书操作)。

1.2.2 miR-455 真核表达载体构建 用限制性内切酶 *KpnI* 和 *XhoI* 分别对 pcDNA3 载体和回收的 PCR 产物进行双酶切。采用 50 μ L 酶切反应体系:PCR 产物或载体 20 μ L,*KpnI* 5 μ L,*XhoI* 5 μ L,10 $\times$ M 反应缓冲液 5 μ L,H₂O 15 μ L;37 $^{\circ}$ C 反应 2-4 h。反应结束后,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,并切胶回收纯化。用 T4DNA 连接酶将酶切后的 pcDNA3 载体与 PCR 产物相连接,连接反应体系为:酶切后的 PCR 产物 3 μ L,酶切后的载体 12 μ L,T4 DNA 连接酶 1 μ L,10 $\times$ 连接反应缓冲液 2

μ L,H₂O 2 μ L,总体积 20 μ L,16 $^{\circ}$ C 反应过夜。通过转化将连接产物导入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,以氨苄青霉素筛选阳性克隆,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

1.2.3 重组载体筛选及鉴定 挑取 3 个单菌落至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡过夜。采用 20 μ L 体系:菌液模板 2 μ L,上、下游引物各 0.2 μ L,10 $\times$ HiFi Buffer II 2 μ L,2.5 mM dNTPs 1.6 μ L,HiFi DNA Polymerase 0.2 μ L,H₂O 13.8 μ L。扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s;30 个循环;PCR 循环完成后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 8 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。扩增产物以 1%琼脂糖凝胶电泳检测,选取 PCR 结果显示阳性的菌液进行质粒提取。用内切酶 *KpnI* 和 *XhoI* 对质粒进行双酶切,反应体系为:质粒 15 μ L,*KpnI* 5 μ L 和 *XhoI* 5 μ L,10 $\times$ 反应缓冲液 3 μ L,H₂O 2 μ L;37 $^{\circ}$ C 反应 4 h。酶切结果阳性的克隆送上海生工生物技术有限公司进行测序验证,序列正确的克隆提取质粒保存备用。

1.2.4 细胞培养 人肝癌细胞 SMMC-7721 用含 10%胎牛血清、100 μ g/mL 链霉素、100 μ g/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养基;人脐静脉细胞 HUVEC 用含 10%胎牛血清的 EGM 培养基,分别于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下培养。

1.2.5 基因转染 将 SMMC-7721 细胞以 4 $\times$ 10⁵/孔接入 6 孔板,过夜贴壁后向细胞分别转染 pcDNA3 空载体和 pcDNA3-pre-455 载体。转染步骤按照试剂盒说明书进行:先将 3 μ g 质粒稀释于 200 μ L Opti-MEM 培养基中,再取 8 μ L 转染试剂 TransIntroEL 加入稀释好的质粒 DNA 中,混匀,室温静置 20 min。将质粒-TransIntroEL 复合物加入细胞,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,4-6 h 后将培养基更换为完全培养基。

1.2.6 Real-time PCR 检测 miRNA 表达 转染 48 h 后收集细胞提取总 RNA,并反转录为 cDNA,利用 Real-time PCR 检测成熟 miR-455 的表达。上游引物:5'-TATGTGCCTTTGGAC-TACATC-3';下游通用引物:5'-GCGAGCACAGAATTAATAC-GACTCACTATAGG (T)18VN-3'。采用 20 μ L 体系:cDNA 2 μ L,上游引物 0.2 μ L,下游引物 0.4 μ L,2 $\times$ qPCR SuperMix 10 μ L,ROX 0.4 μ L,H₂O 7 μ L。两步法进行 PCR 反应:94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;94 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。

1.2.7 ELISA 法检测 VEGF 表达 分别于转染后 24、48 和 72 h 收集 SMMC-7721 细胞培养液,4 $^{\circ}$ C、2500 $\times$ g 离心 20 min,取上清。用 VEGF ELISA 试剂盒检测上清中 VEGF 的分泌情况,按试剂盒说明操作,实验重复 3 次。

1.2.8 微管的形成 将基质胶 Matrigel 以 60 μ L/孔平铺于预冷的 96 孔板,37 $^{\circ}$ C 放置 1 h 待凝。收集人脐静脉细胞 HUVEC,用 PBS 洗 2 次。用转染 pcDNA3 空载体和 pcDNA3-pre-455 载体的肝癌细胞培养液上清(72 h)分别重悬 HUVEC 细胞后,将细胞接种于预先铺好基质胶的 96 孔板,每孔 1 $\times$ 10⁴ 个细胞。放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 15 h,通过倒置显微镜观察微管形成情况。

1.3 统计学分析

用 SPSS Statistics 17.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 目标序列的获取

以人肝癌细胞系 SMMC-7721 基因组 DNA 为模板,通过 PCR 方法扩增得到 miR-455 前体片段(pre-miR-455),扩增片段长度为 255 bp,PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳检测,片段大小与预期相符,见图 1。

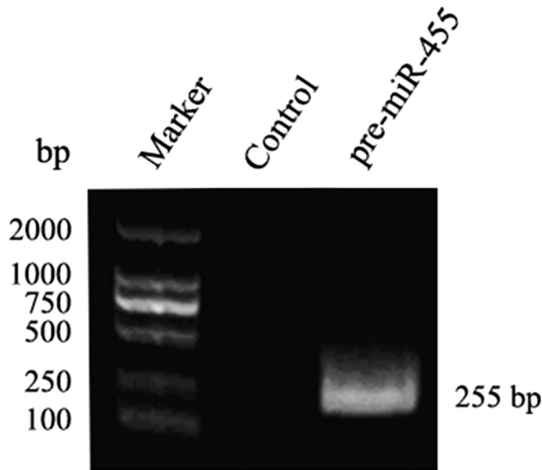


图 1 PCR 扩增 miR-455 前体序列

Fig.1 The pre-miR-455 fragment was amplified by PCR

2.2 双酶切结果

用核酸凝胶回收试剂盒分别回收 2 个 PCR 扩增产物。利用限制性内切酶 *KpnI* 和 *XhoI* 对回收的 PCR 产物及 pcDNA3 载体进行双酶切,酶切产物用琼脂糖凝胶电泳检测,见图 2。

2.3 重组质粒鉴定

应用 T4 DNA 连接酶将酶切后的 PCR 产物与载体连接,重组子转化感受态 DH5 α 。每个重组子随机挑取 3 个单菌落至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基。以经过克隆扩增的 DH5 α 菌液为模板,用带有限制性内切酶作用位点的引物进行 PCR 扩增反应。经琼脂糖凝胶电泳鉴定,所有片段大小均与设计相符,见图 3a。

选取 PCR 鉴定阳性的菌液提取质粒,用 *KpnI* 和 *XhoI* 进行双酶切,反应 4 h 后,采用琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图 3b 所示,重组质粒均切出两条带,其中小片段为 255 bp,与设计相符,表明目的片段成功插入载体。

选取菌液 PCR 鉴定阳性的克隆,送上海生工公司进行测序。测序结果与 miR-455 前体序列通过 BLAST 进行比对分析,其中 455-2 和 455-3 克隆显示 100%匹配,表明序列正确无突变,重组载体命名为 pcDNA3-pre-455 见图 3c。

2.4 Real-time PCR 检测成熟 miR-455 的表达

将空载体 pcDNA3 和构建成功的 pcDNA3-pre-455 分别转染人肝癌细胞 SMMC-7721,通过 real-time PCR 检测成熟 miR-455 的表达水平,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达水平。如图 4 所示,转染 pcDNA3-pre-455 的细胞中成熟 miR-455 的表达量与未转染(Control)和转染空载体(pcDNA3)的细胞相比显著增加($P<0.01$),说明构建的载体在细胞中能够成功表达成熟的 miR-NA。

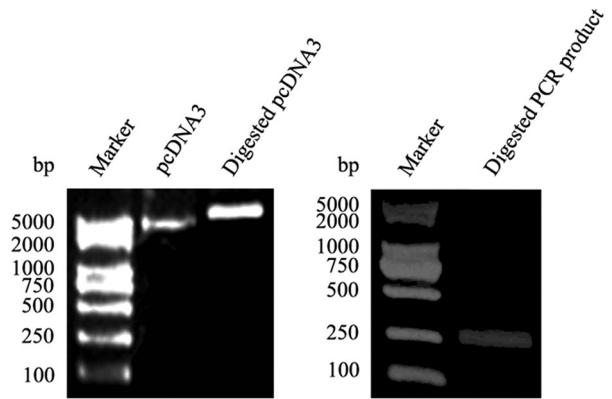


图 2 pcDNA3 载体及 PCR 产物双酶切电泳图

Fig.2 pcDNA3 vector and PCR product digested by *KpnI* and *XhoI*

2.5 过表达 miR-455 对 SMMC-7721 细胞中 VEGF 分泌的影响

在人肝癌细胞 SMMC-7721 中分别转染空载体 pcDNA3 和 pcDNA3-pre-455,取转染后 24、48、72 h 的细胞培养液上清,采用 ELISA 法检测其中 VEGF 的水平。如图 5 所示,与未转染(Control)及转染空载体(pcDNA3)的细胞相比,转染 pcDNA3-pre-455 的细胞上清中 VEGF 水平显著增加,并且呈时间依赖性(24 h $P<0.05$, 48 h 和 72 h $P<0.01$),说明过表达 miR-455 可上调肝癌细胞 SMMC-7721 中 VEGF 的表达。

2.6 过表达 miR-455 对肝细胞诱导微管形成的影响

人脐静脉内皮细胞 HUVEC 分别用转染 pcDNA3 空载体和 pcDNA3-pre-455 的肝癌细胞培养液上清(72 h)重悬,接种于基质胶 Matrigel 上,15 h 后镜下观察微管形成情况。结果显示,与对照组相比,转染 pcDNA3-pre-455 组形成典型的微管,管样结构明显完整,通过 ImageJ 软件分析显示 pcDNA3-pre-455 组微管结构显著增多($p<0.01$),说明在 SMMC-7721 细胞中,过表达 miR-455 可显著促进诱导微管形成,见图 6。

3 讨论

miRNA 基因单个或成簇散布于基因组上,在 RNA 聚合酶 II 或 III 的作用下转录出长达 1000 nt,具有一段双链 RNA 区和一个发夹结构的原始 miRNA(pri-miRNA)。pri-miRNA 经过两次连续剪切后形成成熟的 miRNA:第一次在核内,pri-miRNA 被核糖核酸酶 Drosha 剪切成具有茎环结构的、大约 70-100 nt 的前体 miRNA^[18];随后转运蛋白 exportin5 将 pre-miRNA 运输到细胞质,经核糖核酸酶 Dicer 作用进一步剪切为 18-25 nt 大小的成熟 miRNA 产物^[19,20]。成熟的 miRNA 通过与 RNA 诱导的沉默复合体结合,介导基因沉默。

通过构建 miRNA 前体的表达载体是研究 miRNA 功能的重要手段之一^[21-23]。利用此方法在细胞质中表达出的 miRNA 前体,可被细胞自身的 Dicer 酶剪切形成成熟的 miRNA,这个过程能够很好的模拟内源 miRNA 的产生过程,其表达 miRNA 的方式更符合生理情况。而化学合成的 miRNA mimics 是一种外源性双链 RNA,与生物体内源性的 miRNA 存在一定差别。因此,利用构建表达载体的方式研究 miRNA 的调控功能,结果更具有说服力和可靠性。本研究采用 PCR 方法扩增 miR-455 前体片段,并将其定向插入真核表达载体 pcDNA3 中,成功构建了重组载体 pcDNA3-pre-455(图 3)。随后将两个载体转染到

细胞中,提取总 RNA,并用 miRNA 特异性反转录试剂盒合成 cDNA 作为模板,通过 real-time RCR 检测成熟 miRNA 的表达。结果显示,转染 pcDNA3-pre-455 的实验组 miR-455 表达量

显著升高,表明构建的重组载体能够高效特异的表达 miRNA,为进一步研究其功能奠定基础。

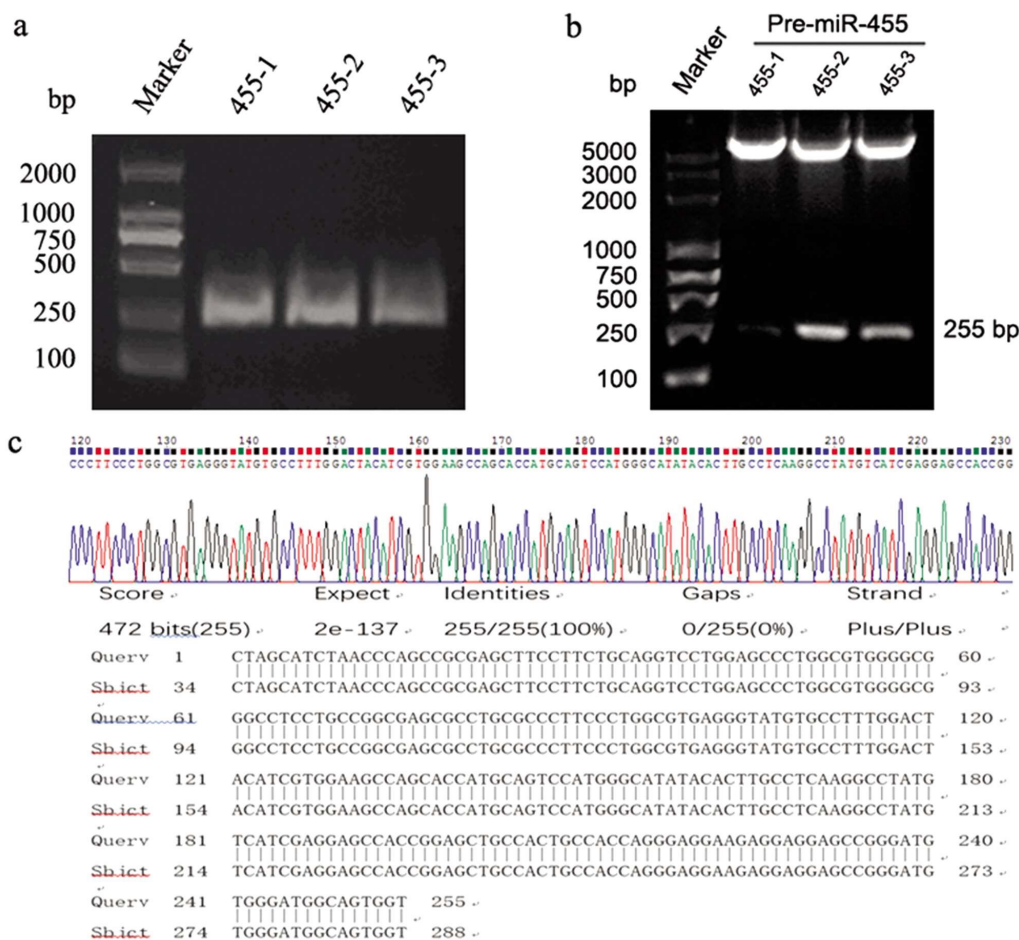


图3 重组质粒鉴定:a.菌液 PCR 电泳图;b.重组质粒双酶切鉴定电泳图;

c.重组质粒部分测序图及比对结果

Fig.3 The recombinant plasmid was identified by colony PCR (a), double enzyme digestion (b) and sequencing (c)

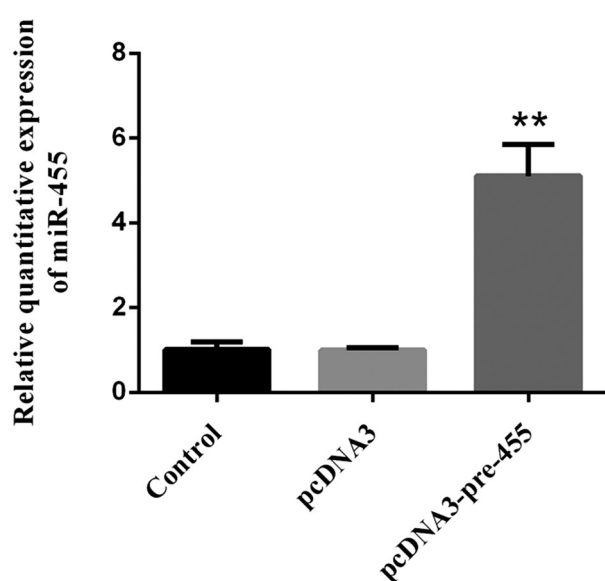


图4 Real-time PCR 检测 miR-455 的表达

Fig.4 miR-455 expression detected by real-time PCR

血管新生对肿瘤细胞的生长和转移具有至关重要的作用

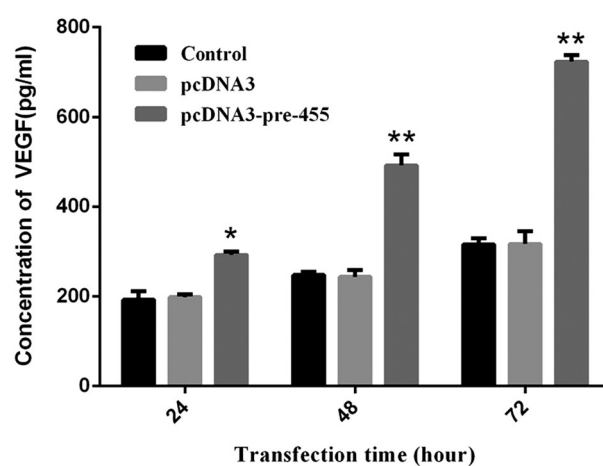


图5 ELISA 法检测 VEGF 的表达

Fig.5 VEGF expression detected by ELISA

[24,25],肿瘤组织生长到 2-3 mm 时,由于内部缺氧会诱导生成新血管为其输送氧气和营养物质;在肿瘤转移中,从原位脱落的肿瘤细胞需要通过微血管迁移到其他部位继续生长,从而形成转移灶。有报道称 miR-455 在结肠癌、乳腺癌等生长、迁移中上

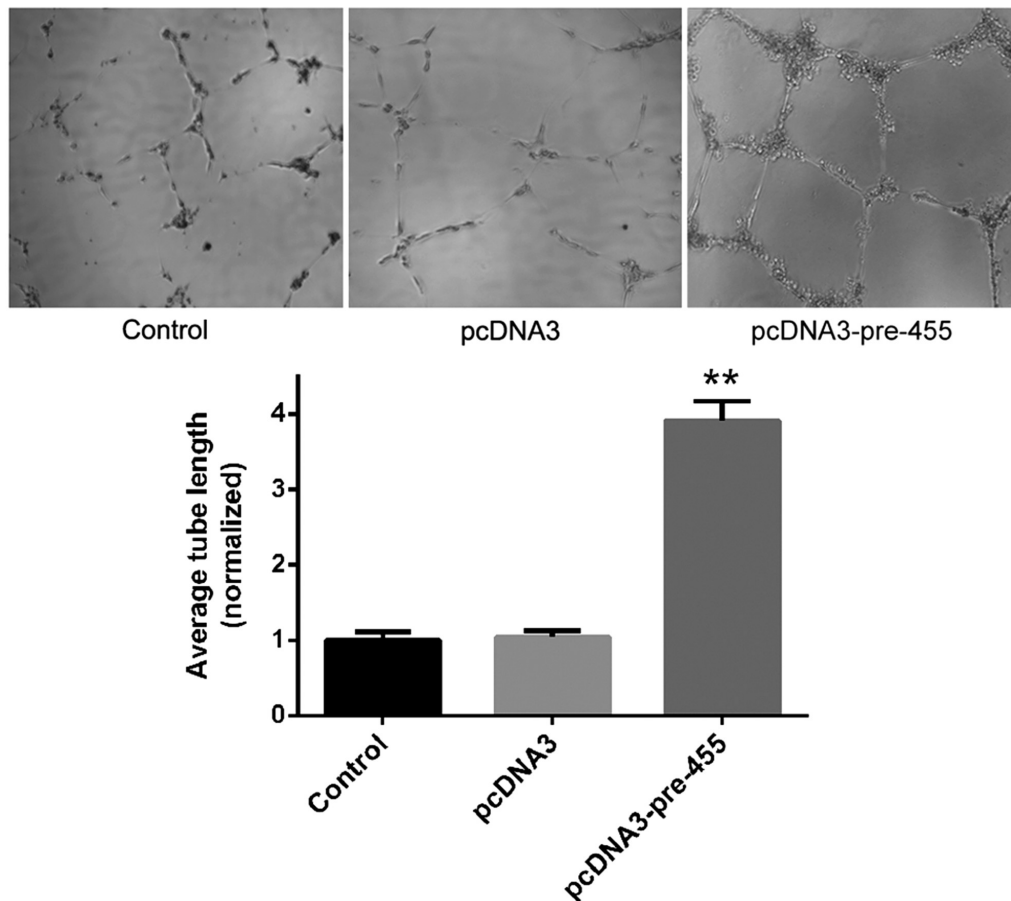


图6 HUVEC 微管形成实验

Fig.6 Tube formation assay of HUVEC

有重要的调控功能^[8,10],但是其对肿瘤细胞血管新生的作用还不清楚。血管内皮生长因子 VEGF 是肿瘤血管生成的主要驱动因子,特异性促进内皮细胞分化形成新血管。VEGF 在许多肿瘤中高表达,并与恶性程度、转移性能及血管密度等有很好的相关性。因此,本研究检测了过表达 miR-455 后肿瘤细胞分泌 VEGF 的情况,发现 miR-455 能上调 VEGF 的表达(图 5)。本研究采用过表达 miR-455 的肝癌细胞 SMMC-7721 培养液上清处理 HUVEC,探讨其对肿瘤细胞诱导血管新生能力的影响,结果表明 miR-455 能够明显增强 HUVEC 的成管能力,促进肿瘤血管新生。

综上所述,本研究成功构建了 miR-455 前体真核表达载体,并发现过表达 miR-455 可促进肝癌细胞诱导的微血管形成,为深入研究 miR-455 在肝癌发生发展中的作用及机制奠定基础。

参考文献(References)

[1] Gardiner AS, Twiss JL, Perrone-Bizzozero NI. Competing Interactions of RNA-Binding Proteins, MicroRNAs, and Their Targets Control Neuronal Development and Function [J]. *Biomolecules*, 2015, 5(4): 2903-2918

[2] He XH, Zhu W, Yuan P, et al. miR-155 downregulates ErbB2 and suppresses ErbB2-induced malignant transformation of breast epithelial cells[J]. *Oncogene*, 2016, 35(46): 6015-6025

[3] Li W, He Z, Zhang L, et al. miRNAs involved in the development and differentiation of fertile and sterile flowers in *Viburnum macro-*

cephalum f. keteleeri[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 783-799

[4] Liu R, Lu Z, Gu J, et al. MicroRNAs 15A and 16-1 Activate Signaling Pathways That Mediate Chemotaxis of Immune Regulatory B cells to Colorectal Tumors [J]. *Gastroenterology*, 2017, pii:S0016-5085(17): 36240-36246

[5] Ryan BM. microRNAs in Cancer Susceptibility [J]. *Adv Cancer Res*, 2017, 135: 151-171

[6] Liang L, Gao C, Li Y, et al. miR-125a-3p/FUT5-FUT6 axis mediates colorectal cancer cell proliferation, migration, invasion and pathological angiogenesis via PI3K-Akt pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e2968

[7] Maj E, Papiernik D, Wietrzyk J. Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(5): 1773-1784

[8] Yang Q, Hou C, Huang D, et al. MiR-455-5p functions as a potential oncogene by targeting galectin 9 in colon cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1958-1964

[9] Qin L, Zhang Y, Lin J, et al. MicroRNA-455 regulates migration and invasion of human hepatocellular carcinoma by targeting Runx2 [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6): 3325-3332

[10] Li Z, Meng Q, Pan A, et al. MicroRNA-455-3p promotes invasion and migration in triple negative breast cancer by targeting tumor suppressor E124[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19455-19466

[11] Zhao Y, Yan M, Yun Y, et al. MicroRNA-455-3p functions as a tumor suppressor by targeting eIF4E in prostate cancer [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(4): 2449-2458

- [11] McKinley T O, McCarroll T, Gaski G E, et al. Shock volume: A patient-specific index that predicts transfusion requirements and organ dysfunction in multiply injured patients [J]. Shock, 2016, 45 (2): 126-132
- [12] 吴超, 顾勤, 虞竹溪. 中心静脉-动脉二氧化碳分压差在反映感染性休克患者组织灌注及氧化代谢状态的临床研究 [J]. 临床急诊杂志, 2016, (5): 353-357
- Wu Chao, Gu Qin, Yu Zhu-xi. The clinical research of central venous-arterial carbon dioxide difference as tissue perfusion and oxygen metabolism in patients with septic shock[J]. Journal of Clinical Emergency, 2016, (5): 353-357
- [13] Crandall C G, Wilson T E. Human cardiovascular responses to passive heat stress[J]. Compr Physiol, 2015, 5(1): 17-43
- [14] Haouzi P. Tissue hypoxia during acute hemorrhage [J]. Crit Care, 2013, 17(2): 423
- [15] Haouzi P, Van de Louw A. Uncoupling mitochondrial activity maintains body [Formula: see text] during hemorrhage-induced O₂ deficit in the anesthetized rat [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2013, 186(1): 87-94
- [16] Vincent J L, De Backer D. Oxygen transport-the oxygen delivery controversy[J]. Intensive Care Med, 2004, 30(11): 1990-1996
- [17] McNarry M A, Harrison N K, Withers T, et al. Pulmonary oxygen uptake and muscle deoxygenation kinetics during heavy intensity cycling exercise in patients with emphysema and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. BMC Pulm Med, 2017, 17(1): 26
- [18] Benedik P S, Hamlin S K. The physiologic role of erythrocytes in oxygen delivery and implications for blood storage[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2014, 26(3): 325-335
- [19] Knoller E, Stenzel T, Broeskamp F, et al. Effects of Hyperoxia and Mild Therapeutic Hypothermia During Resuscitation From Porcine Hemorrhagic Shock[J]. Crit Care Med, 2016, 44(5): e264-e277
- [20] Shoemaker W C, Peitzman A B, Bellamy R, et al. Resuscitation from severe hemorrhage[J]. Crit Care Med, 1996, 24(2 Suppl): S12-S23
- [21] Kopterides P, Theodorakopoulou M, Ilias I, et al. Interrelationship between blood and tissue lactate in a general intensive care unit: a subcutaneous adipose tissue microdialysis study on 162 critically ill patients[J]. J Crit Care, 2012, 27(6): 742-749
- [22] Bursa F, Olos T, Pleva L, et al. Metabolism monitoring with microdialysis in the intensive care [J]. Cas Lek Cesk, 2011, 150 (11): 605-609
- [23] Mallat J, Lemyze M, Meddour M, et al. Ratios of central venous-to-arterial carbon dioxide content or tension to arteriovenous oxygen content are better markers of global anaerobic metabolism than lactate in septic shock patients[J]. Ann Intensive Care, 2016, 6(1): 10

(上接第 1252 页)

- [12] Baigude H, Rana TM. Strategies to antagonize miRNA functions in vitro and in vivo[J]. Nanomedicine, 2014, 9(16): 2545-2555
- [13] Takada S, Asahara H. Current strategies for microRNA research[J]. Mod Rheumatol, 2012, 22(5): 645-653
- [14] Matsukura S, Osakabe Y, Sekiguchi A, et al. Overexpression of microRNA-155 suppresses chemokine expression induced by Interleukin-13 in BEAS-2B human bronchial epithelial cells [J]. Allergol Int, 2016, 65(S): S17-S23
- [15] X Liu, L Tian, H Wang, et al. Overexpression of MicroRNA-29a regulates nucleus pulposus cells apoptosis in human intervertebral disc degeneration[J]. Chongqing Medicine, 2016, 45(14): 1893-1895
- [16] Y Wu, Y Zhang, L Wan, et al. Construction of microRNA-21 and PTEN eukaryotic expression and short hairpin RNA expression vectors[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2013, 30(2): 359-364
- [17] Chen S, Ni M, Yu B, et al. Construction and identification of a human liver specific microRNA eukaryotic expression vector [J]. Cell Mol Immunol, 2007, 4(6): 473-477
- [18] Du P, Wang L, Sliz P, et al. A Biogenesis Step Upstream of Microprocessor Controls miR-17~92 Expression [J]. Cell, 2015, 162(4): 885-899
- [19] Lopes Ide O, Schliep A, de Carvalho AC. The discriminant power of RNA features for pre-miRNA recognition [J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 124-133
- [20] Sablok G, Pérez-Quintero AL, Hassan M, et al. Artificial microRNAs (amiRNAs) engineering - On how microRNA-based silencing methods have affected current plant silencing research [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406(3): 315-319
- [21] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(8): 509-524
- [22] TW Ke, HL Hsu, YH Wu, et al. MicroRNA-224 suppresses colorectal cancer cell migration by targeting Cdc42 [J]. Disease Markers, 2017, 2014(1): 617150
- [23] AD Zhou, LT Diao, H Xu, et al. β -Catenin/LEF1 transactivates the microRNA-371-373 cluster that modulates the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Oncogene, 2017, 31(24): 2968
- [24] Muz B, de la Puente P, Azab F, et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy [J]. Hypoxia, 2015, 3: 83-92
- [25] H Cai, X Liu, J Zheng, et al. Long non-coding RNA taurine upregulated 1 enhances tumor-induced angiogenesis through inhibiting microRNA-299 in human glioblastoma[J]. Oncogene, 2017, 36(3): 318