



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.08.008
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2018.08.008
Chinese Journal of General Surgery, 2018, 27(8):998-1006.

· 基础研究 ·

miR-362-3p 的表达及其靶基因与胆囊癌恶性特征的关系

揭伟, 林江飞, 肖强胜, 聂晚频

(中南大学湘雅三医院 普通外科, 湖南 长沙 410006)

摘要

目的: 探讨 miR-362-3p 在胆囊癌中的表达及功能。

方法: 用 qRT-PCR 检测手术切除的 44 例胆囊癌患者手术标本中 miR-362-3p 的表达, 并分析其表达与胆囊癌临床病理特征及预后的关系。miR-362-3p 模拟物转染胆囊癌细胞后, 分别用 MTT 法、细胞划痕试验及 Transwell 侵袭试验观察细胞增殖、迁移及侵袭的改变。通过生物信息学方法及双荧光素酶报告基因试验分析 miR-362-3p 的靶基因, 并采用补救试验验证。

结果: miR-362-3p 在胆囊癌组织的表达明显低于相应癌旁组织 ($P < 0.05$)。miR-362-3p 的低表达与肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移及远处转移明显有关 (均 $P < 0.05$)。低表达 miR-362-3p 患者总体生存率较高表达 miR-362-3p 患者明显降低 ($P < 0.05$)。转染 miR-362-3p 模拟物后, 胆囊癌细胞的增殖, 迁移及侵袭能力明显减弱 (均 $P < 0.05$)。Nemo 样激酶 (NLK) 被确定为 miR-362-3p 的潜在靶基因, 转染 NLK 过表达载体后, miR-362-3p 模拟物对胆囊癌细胞的上述作用被明显逆转 (均 $P < 0.05$)。

结论: miR-362-3p 在胆囊癌中表达下调, 下调的 miR-362-3p 减少了对靶基因 NLK 的抑制, 从而促进了胆囊癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词

胆囊肿瘤; 微 RNAs; 蛋白激酶类; 细胞增殖; 肿瘤浸润
中图分类号: R735.8

Relations of miR-362-3p expression and its target gene with malignant profiles of gallbladder cancer

JIE Wei, LIN Jiangfei, XIAO Qiangsheng, NIE Wanpin

(Department of General Surgery, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410006, China)

Abstract

Objective: To detect the expression of miR-362-3p in gallbladder cancer and its functions.

Methods: The expressions of miR-362-3p in the surgical specimens from 44 gallbladder cancer patients were determined by qRT-PCR, and the relations of miR-362-3p expression with clinicopathological characteristics and prognosis of the patients were analyzed. In gallbladder cancer cells after transfection with miR-362-3p mimics, the changes in proliferation, migration and invasion were examined by MTT colorimetry, wound healing assay, and Transwell assay respectively. The target gene of miR-362-3p was analyzed by bioinformatics analysis and dual luciferase reporter gene assay, and then was verified through recovery tests.

Results: The expression of miR-362-3p was significantly decreased in gallbladder cancer tissue compared with

基金项目: 中南大学湘雅三医院科学研究资助项目 (2018-S351)。

收稿日期: 2018-06-29; 修订日期: 2018-07-23。

作者简介: 揭伟, 中南大学湘雅三医院硕士研究生, 主要从事普通外科临床与基础方面的研究。

通信作者: 聂晚频, Email: niewanpin@163.com

tumor adjacent tissue ($P<0.05$). The decreased miR-362-3p expression was significantly associated with tumor TNM stage, lymph node metastasis and distant metastasis (all $P<0.05$). The overall survival rate in patients with low miR-362-3p expression was significantly lower than that in patients with high miR-362-3p expression ($P<0.05$). The abilities of proliferation, migration and invasion were significantly reduced in gallbladder cancer cells after transfection with miR-362-3p mimics (all $P<0.05$). Nemo like kinase (NLK) was found potentially to be the target gene of miR-362-3p. After transfection with NLK overexpression vectors, the above effects exerted by miR-362-3p mimics in gallbladder cancer cells were significantly reversed (all $P<0.05$).

Conclusion: The expression of miR-362-3p is down-regulated in gallbladder cancer, and the down-regulated miR-362-3p expression may reduce the inhibition on its target gene NLK, and thereby promote the proliferation, migration and invasion of gallbladder cancer cells.

Key words

Gallbladder Neoplasms; MicroRNAs; Protein Kinases; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.8

胆囊癌 (gallbladder cancer) 是胆道系统最常见的恶性肿瘤, 以恶性程度高, 侵袭力强, 转移快, 预后差为主要临床特征^[1]。手术切除仍是目前胆囊癌治疗的首要方案, 但大多数患者术后肿瘤复发率高, 预后较差^[2]。据报道^[3], 胆囊癌中位生存期低于1年, 5年生存率低于15%。为此, 进一步阐明胆囊癌发生发展的分子机制, 并寻找新的分子标志物对胆囊癌的防治具有重要意义。微小RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度由19~24个核苷酸组成的单链非编码RNA^[4]。miRNA可通过与靶基因信使RNA (mRNA) 3'-非编码区 (UTR) 碱基特异性互补配对而抑制其翻译, 从而在转录后水平发挥对靶基因的直接调控作用^[5]。研究^[6]表明, miRNA与细胞生长、分化、凋亡及免疫反应等过程密切相关。

近年来研究^[7]显示, 一些miRNA的异常表达与人体肿瘤发生发展密切相关。例如, miR-217和miR-23a在胰腺癌中呈现异常表达, 过表达miR-217可抑制胰腺癌细胞增殖和侵袭^[8]; 而上调miR-23a则促进胰腺癌细胞迁移及侵袭^[9]。miR-125a-5p在骨肉瘤呈现低表达, 而体外增加其表达可显著抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭^[10]。miR-106a和miR-20a在胶质瘤中呈现高表达并发挥促癌作用^[11]。miR-200c在膀胱癌中表达上调, 并促进肿瘤细胞的转移^[12]。miR-362-3p定位于人基因组Xp11.23区域, 其在多种人类肿瘤组织中低表达并发挥抑癌作用, 如乳腺癌^[13]、宫颈癌^[14]及肾癌^[15]等。目前关于miR-362-3p在胆囊癌中的功能及分子机制尚不明确。本研拟采用实时荧光定量PCR试验分析

miR-362-3p在胆囊癌中的表达特征, 通过细胞功能试验明确其对胆囊癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响, 并探讨及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 临床标本

收集本院肝胆外科2009年3月—2011年9月手术切除的44例胆囊癌组织及相应癌旁组织标本 (距离肿瘤边缘2 cm外)。所有患者术前均未接受肿瘤放疗和化疗, 标本收集后立即放置于液氮保存备用。所有标本均经本院病理科进行病理确诊, 临床病理分期采用美国癌症联合委员会的第7版肿瘤淋巴结转移 (TNM) 分期。患者术后随访72个月, 总体生存时间定义为手术到死亡或手术到最后观察时间。本研究已获得该院医学伦理委员会批准, 并得到患者和/或其直系家属知情同意。

1.2 相关试剂

胆囊癌细胞系G-415和SGC-996购自中科院上海细胞库。DMEM培养基、胎牛血清 (FBS) 及双抗购自美国Gibco公司。RNA提取试剂盒、引物、转染试剂盒及实时荧光定量PCR试剂盒均购自美国赛默飞世尔公司。miR-362-3p模拟物和模拟物阴性对照购, NLK过表达载体和阴性对照载体均购自苏州赛业生物科技有限公司。MTT和二甲亚砜 (DMSO) 购自美国Sigma公司。

1.3 RNA抽提、逆转录反应及qRT-PCR检测

参照TRIzol说明书提取组织RNA, 并进行逆转录及实时荧光定量PCR试验。逆转录反应条件:

16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 72 °C 10 min, -20 °C 保存。实时荧光定量PCR反应条件为: 98 °C 10 min, 随后98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共40个循环。人miR-362-3p上游引物: 5'-AAC ACA CCT ATT CAA GGA TTC A-3', 下游引物: 通用引物; 以人U6核内小RNA (U6) 为内参, U6上游引物: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 下游引物: 5'-ACG CTT CAC GAA TTT GCG T-3'。待PCR反应结束后, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算胆囊癌组织及细胞系中miR-362-3p的相对表达情况^[16]。

1.4 MTT 法

取对数期生长的G-415和SGC-996细胞, 并于96孔细胞培养板中进行铺板, 使每孔细胞数约为 8×10^3 个/孔。将细胞放置培养箱中过夜, 待每孔细胞融合度达80%左右时转染miR-362-3p模拟物和模拟物阴性对照。随后, 每孔细胞中连续4 d加入15 μ L MTT/d (5 mg/mL), 放置培养箱孵育4 h并去掉上清, 每孔细胞中加入150 μ L DMSO溶解结晶, 置于常温摇床缓慢摇晃20 min, 最后采用测酶标仪测定各孔在450 nm波长时的吸光度 (OD值)。

1.5 细胞划痕试验

取对数期生长的G-415和SGC-996细胞, 并于6孔细胞培养板中进行铺板, 使每孔细胞数约为 4×10^5 个/孔。将细胞放置培养箱中过夜, 待每孔细胞融合度达80%左右时转染miR-362-3p模拟物和模拟物阴性对照。采用无血清DMEM培养基继续培养细胞6 h, 用枪头在每孔细胞中均匀划出4条水平横线, 并以37 °C PBS洗涤各孔细胞, 去除多余杂质及悬浮细胞。随后, 采用含FBS的DMEM培养基继续培养细胞, 每隔6 h进行拍照, 观察和测定各孔细胞划痕宽度。

1.6 Transwell 侵袭试验

取转染后的G-415和SGC-996细胞, 并于BD Matrigel基质胶/基质膜包被的Transwell小室的上室中进行铺板, 使每孔细胞数约为 2×10^4 个/孔, 随后加入200 μ L无血清DMEM培养基; 下室加入500 μ L DMEM含FBS的DMEM培养基, 放置培养箱中培养24 h。随后, 擦掉上室中未侵袭的细胞, 采用多聚甲醛固定下室细胞, 并以吉姆萨染液染色, 最后放置显微镜下观察每个视野中侵袭的细胞个数。

1.7 双荧光素酶报告基因试验

取转染后的G-415和SGC-996细胞, 并于24孔细胞培养板中进行铺板, 使每孔细胞数约为 2×10^4 个/孔。将细胞放置培养箱中过夜, 待每孔细胞融合度达80%左右时转染miR-362-3p模拟物或模拟物阴性对照和野生型或突变型报告基因载体, 并放置培养箱培养48 h。随后, 以PBS清洗各孔细胞3次, 每孔加入100 μ L细胞裂解液, 置于常温摇床缓慢摇晃30 min并收集上清液, 最后采用Modulus™单管型多功能检测仪测量各孔海肾和萤火虫荧光值。

1.8 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件进行统计学分析。每组试验至少重复3次, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用配对t检验比较胆囊癌和癌旁组织中miR-362-3p表达水平, 以四格表 χ^2 检验或Fisher确切概率法分析miR-362-3p表达水平与胆囊癌患者临床病理特征的关系, 以生存分析Kaplan-Meier法讨论miR-362-3p表达水平与胆囊癌患者预后的关系, 其余统计分析采用Student's t或单因素方差分析。 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-362-3p 在胆囊癌和癌旁组织的表达特征

qRT-PCR检测结果显示, miR-362-3p在胆囊癌组织和相应癌旁组织的相对表达量分别为 0.47 ± 0.21 和 1.36 ± 0.45 。统计分析发现, miR-362-3p在胆囊癌组织的表达量明显低于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图1)。

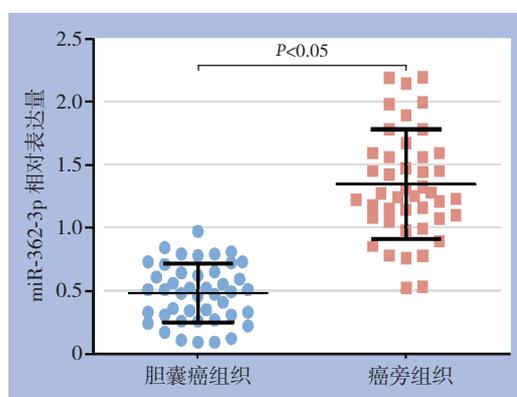


图1 miR-362-3p 在胆囊癌和癌旁组织的表达特征
Figure 1 The expression characteristics of miR-362-3p in gallbladder cancer tissues and corresponding adjacent tissues

2.2 miR-362-3p 的表达与胆囊癌患者临床病理特征之间的关系

以miR-362-3p表达量平均值(1.36)为界, 将44例胆囊癌患者分为低表达miR-362-3p组及高表达miR-362-3p组, 其中低表达miR-362-3p组有25例患者, 高表达miR-362-3p组有19例患者。低表达miR-362-3p与胆囊癌TNM分期、淋巴结转移及远处转移明显有关(均 $P < 0.05$), 而与患者年龄、性别、肿瘤大小及胆囊结石无关(均 $P > 0.05$) (表1)。

表 1 miR-362-3p 表达与胆囊癌患者临床病理特征之间的关系 [n (%)]

Table 1 The relations of miR-362-3p expression with clinicopathologic features of patients with gallbladder cancer [n (%)]

因素	n	低表达 (n=25)	高表达 (n=19)	P
年龄 (岁)				
< 55	30	17 (56.7)	13 (43.3)	0.98
≥ 55	14	8 (57.1)	6 (42.9)	
性别				
女	20	12 (60.0)	8 (40.0)	0.70
男	24	13 (54.2)	11 (45.8)	
肿瘤大小 (cm)				
< 3	18	9 (50.0)	9 (50.0)	0.45
≥ 3	26	16 (61.5)	10 (38.5)	
TNM 分期				
I-II	11	1 (9.1)	10 (90.9)	0.00
III-IV	33	24 (72.7)	9 (27.3)	
淋巴结转移				
否	15	5 (33.3)	10 (66.7)	0.02
是	29	20 (69.0)	9 (31.0)	
远处转移				
否	32	15 (46.9)	17 (53.1)	0.03
是	12	10 (83.3)	2 (16.7)	
胆囊结石				
否	27	14 (51.9)	13 (48.1)	0.40
是	17	11 (64.7)	6 (35.3)	

2.3 miR-362-3p 表达与胆囊癌患者预后的关系

Kaplan-Meier生存曲线显示, 低表达miR-362-3p组胆囊癌患者总体生存率较高表达miR-362-3p组患者明显降低($P < 0.05$) (图2)。

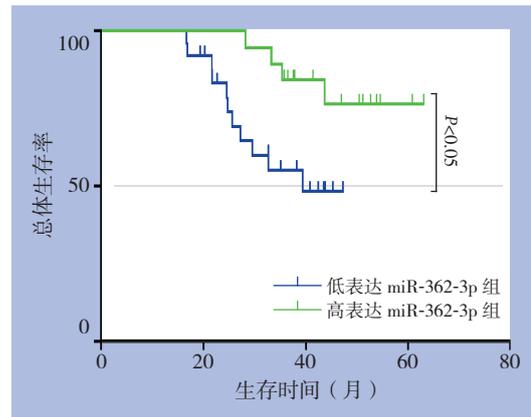


图 2 不同 miR-362-3p 表达状态与胆囊癌患者的生存曲线
Figure 2 The survival curves of gallbladder cancer patients with different miR-362-3p expression statuses

2.4 过表达 miR-362-3p 对胆囊癌细胞增殖的影响

G-415细胞转染miR-362-3p模拟物和模拟物阴性对照后, 细胞中miR-362-3p的相对表达量分别为 10.20 ± 3.16 和 1.0 ± 0.17 ; SGC-996细胞转染miR-362-3p模拟物和模拟物阴性对照后, 细胞中miR-362-3p的相对表达量分别为 13.06 ± 2.97 和 1.0 ± 0.20 。统计分析显示, 体外转染miR-362-3p模拟物可明显提高G-415和SGC-996细胞中miR-362-3p的表达水平, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图3A)。噻唑蓝比色法显示, 体外过表达miR-362-3p可明显抑制G-415和SGC-996细胞增殖(均 $P < 0.05$) (图3B)。

2.5 过表达 miR-362-3p 对胆囊癌细胞迁移的影响

胆囊癌细胞迁移24 h, G-415细胞转染miR-362-3p模拟物和模拟物阴性对照后细胞迁移距离分别为 96.4 ± 26.7 和 $578.3 \pm 75.2 \mu\text{m}$; SGC-996细胞转染miR-362-3p模拟物和模拟物阴性对照后细胞迁移距离分别为 $(391.8 \pm 51.4) \mu\text{m}$ 和 $(704.7 \pm 95.9) \mu\text{m}$ 。统计学分析显示, 过表达miR-362-3p可明显抑制G-415和SGC-996细胞迁移($P < 0.05$) (图4)。

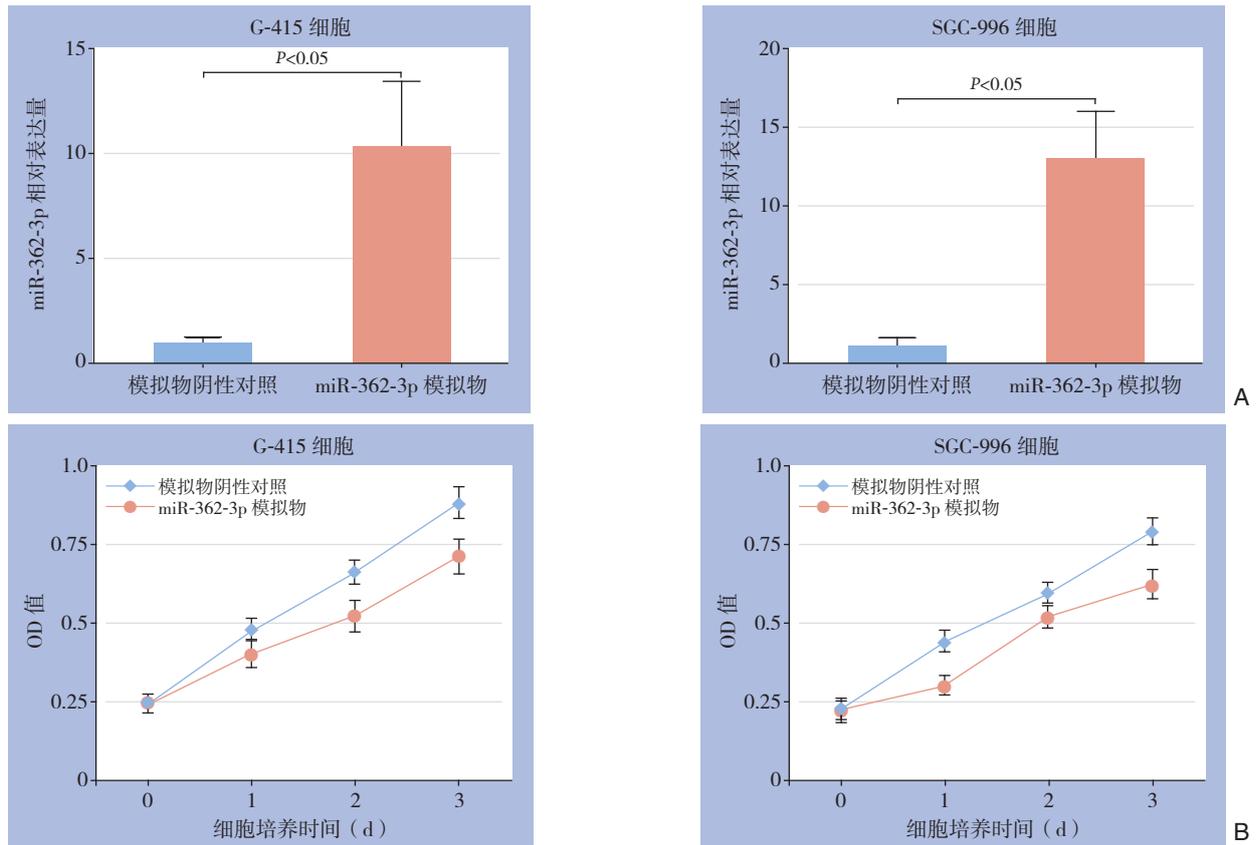


图 3 过表达 miR-362-3p 对胆囊癌细胞增殖的影响 A: miR-362-3p 相对表达量检测; B: 细胞增殖曲线

Figure 3 Effect of miR-362-3p overexpression on proliferation of gallbladder carcinoma cells A: Determination of relative miR-362-3p expression levels; B: The cell proliferation curves

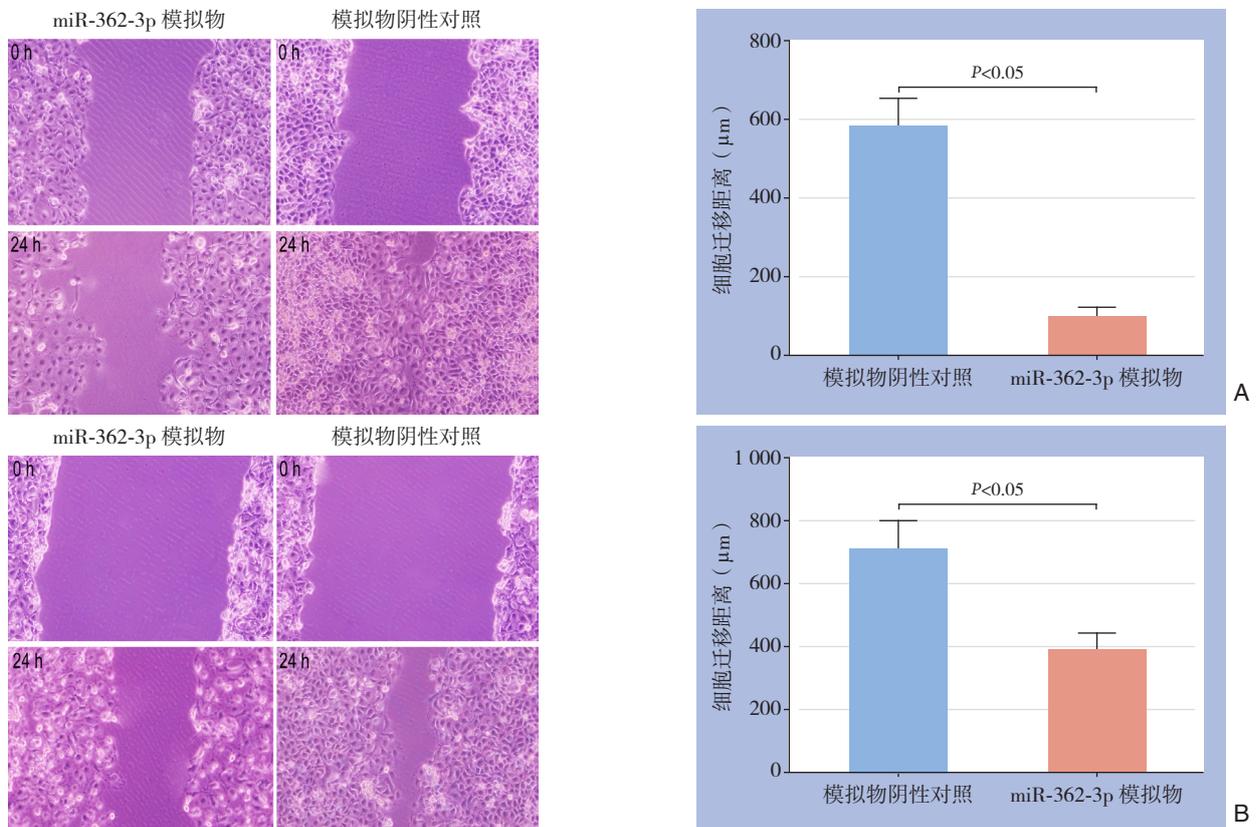


图 4 过表达 miR-362-3p 抑制胆囊癌细胞迁移的影响 A: G-415 细胞; B: SGC-996 细胞

Figure 4 Effect of miR-362-3p overexpression on migration of gallbladder carcinoma cells A: G-415 cells; B: SGC-996 cells

2.6 过表达 miR-362-3p 对胆囊癌细胞侵袭的影响

Transwell侵袭试验如图5所示, G-415细胞转染 miR-362-3p模拟物和模拟物阴性对照后细胞侵袭数分别为 (101.1 ± 30.9) 个和 (261.3 ± 47.8) 个; SGC-996细胞转染 miR-362-3p模拟物和模拟物阴

性对照后细胞侵袭数分别为 (73.5 ± 22.8) 个和 (229.6 ± 54.2) 个。统计学分析显示, 过表达 miR-362-3p可明显抑制G-415和SGC-996细胞侵袭 ($P<0.05$) (图5)。

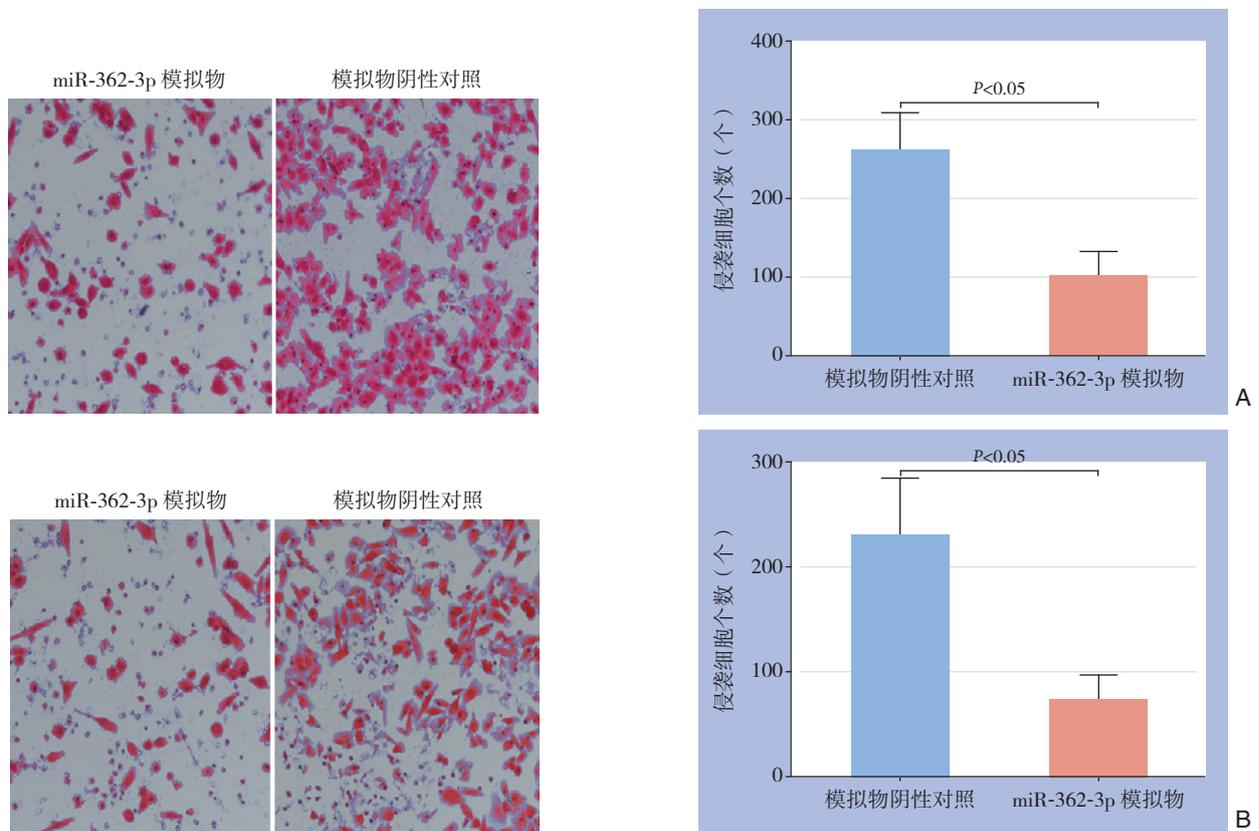


图5 体外过表达 miR-362-3p 抑制胆囊癌细胞侵袭

A: G-415 细胞; B: SGC-996 细胞

Figure 5 Effect of miR-362-3p overexpression on invasion of gallbladder carcinoma cells

A: G-415 cells; B: SGC-996 cells

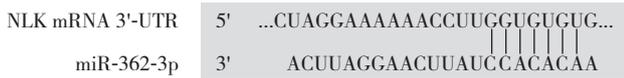
2.7 miR-362-3p 的靶基因分析结果

采用TargetScanHuman 7.2数据库预测 miR-362-3p可能的靶基因, 结果发现Nemo样激酶 (nemo like kinase, NLK) mRNA 3'-非编码区 (UTR) 与 miR-362-3p 存在互补结合位点 (图6A)。双荧光素酶报告基因试验发现, miR-362-3p可直接与NLK mRNA 3'-UTR预测位点结合, 并降低海肾/萤火虫荧光比值; 当人为将上述结合位点突变

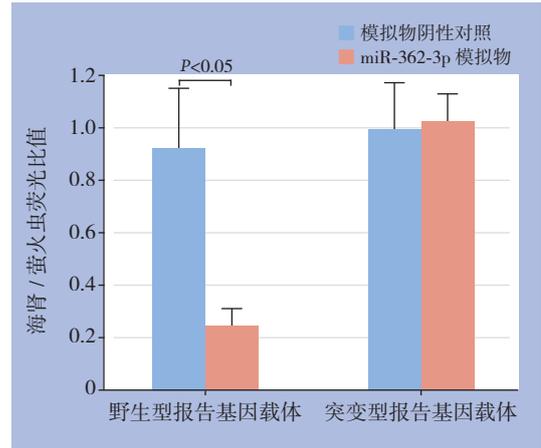
后, miR-362-3p结合能力消失, 相对荧光比值恢复正常 (图6B)。

2.8 miR-362-3p 模拟物与 NLK 过表达载体共转染对胆囊癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响

与共转染 miR-362-3p模拟物和阴性对照载体相比, 同时转染 miR-362-3p模拟物和 NLK 过表达载体可明显促进细胞增殖、迁移及侵袭 (均 $P<0.05$) (图7)。



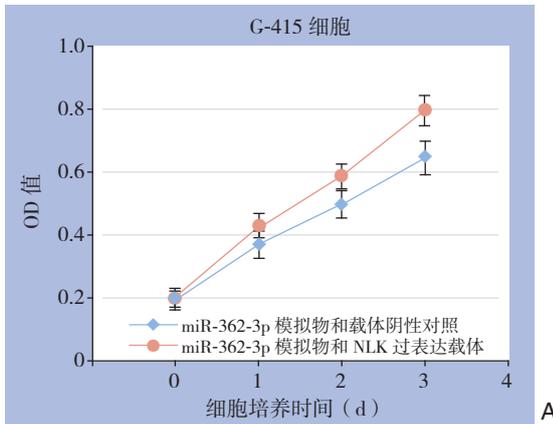
A



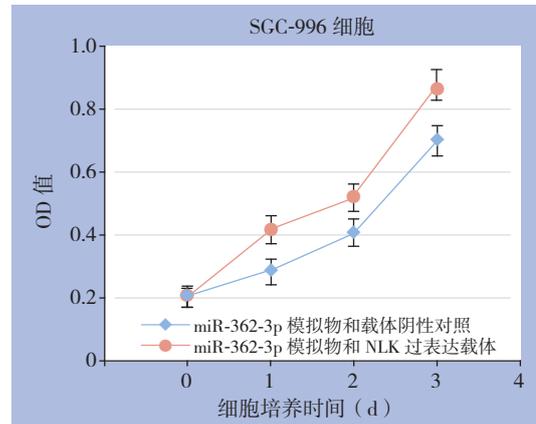
B

图 6 miR-362-3p 的靶基因分析 A: miR-362-3p 与 NLK mRNA 3'-UTR 结合位点预测示意图; B: 双荧光素酶报告基因试验验证 miR-362-3p 对 NLK 的直接调控作用

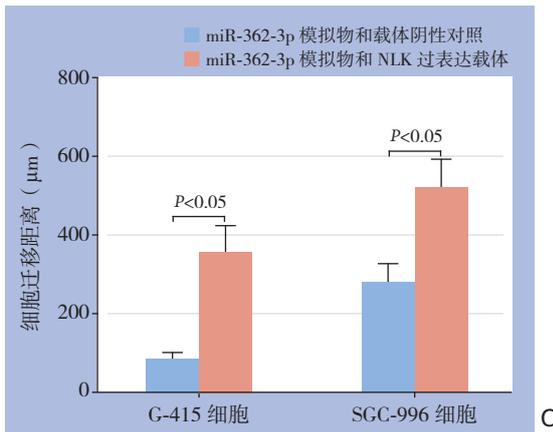
Figure 6 Analysis of target gene for miR-362-3p A: The schematic diagram of NLK mRNA 3'-UTR binding site for miR-362-3p; B: Analysis of the directly regulatory effect of miR-362-3p on NLK by dual luciferase reporter gene assay



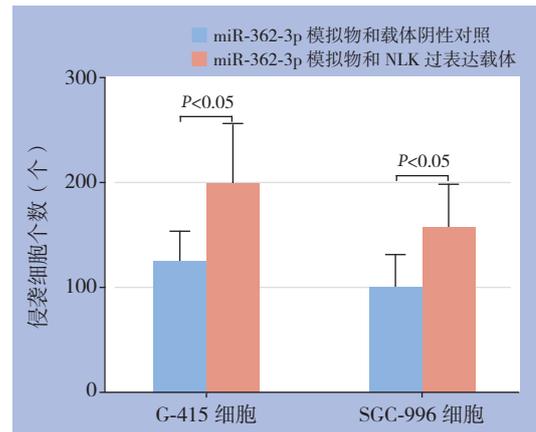
A



B



C



D

图 7 miR-362-3p 模拟物与 NLK 过表达载体共转染对胆囊癌细胞的影响 A-B: 细胞增殖曲线; C: 细胞迁移结果; D: 细胞侵袭结果

Figure 7 Effect of co-transfection of miR-362-3p mimics and NLK overexpression vectors on gallbladder carcinoma cells A-B: Cell proliferation; C: Cell migration; D: Cell invasion

3 讨论

胆囊癌是一种高致命性疾病, 临床预后较差。目前关于胆囊癌发生发展的机分子制尚未完

全阐明, 因此针对该肿瘤机制的研究显得尤为重要。近年来研究发现, 一些 miRNA 的表达与胆囊癌临床病理特征及预后密切相关, 并参与调控肿瘤生长及转移^[17]。例如, 胆囊癌组织中 miR-146b-

5p表达下调,其下调水平与肿瘤大小与生长有显著相关性,过表达miR-146b-5p可抑制肿瘤生长^[18]。低表达的miR-30a-5p与胆囊癌患者无病生存率和总体生存率呈负相关,体外抑制miR-30a-5p可增加胆囊癌细胞生长及转移^[19]。miR-29c-5p在胆囊癌中表达明显下调,并与患者的淋巴结转移、整体生存率和无病生存率相关,过表达miR-29c-5p可显著抑制细胞增殖和转移并增加凋亡^[20]。与邻近正常组织相比,胆囊癌组织中miR-133a-3p的表达明显减少,过表达miR-133a-3p显著抑制胆囊癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[21]。

前面研究^[13-15]报道,miR-362-3p在多种人类肿瘤组织中低表达并发挥抑癌作用,如乳腺癌、宫颈癌及肾癌等。目前关于miR-362-3p在胆囊癌中的表达及功能尚不明确。本研究采用实时荧光定量PCR试验发现,miR-362-3p在胆囊癌组织的表达量显著低于癌旁组织,该结果与miR-362-3p在乳腺癌、宫颈癌及肾癌中表达一致。进一步分析发现,低表达miR-362-3p与胆囊癌TNM分期、淋巴结转移及远处转移密切相关,低表达miR-362-3p组患者总体生存率较高表达miR-362-3p组患者显著降低,因为推测miR-362-3p在胆囊癌中亦发挥抑癌作用。为证实上述科学假说,随后采用噻唑蓝比色法、细胞划痕试验及Transwell侵袭试验观察过表达miR-362-3p对G-415和SGC-996细胞增殖、迁移及侵袭行为的影响。结果发现,体外过表达miR-362-3p可显著抑制胆囊癌细胞的增殖、迁移及侵袭,上述结果表明miR-362-3p在胆囊癌中发挥抑癌功能。

研究表明,miRNA通过碱基互补配对方式与靶基因的3'非翻译区(UTR)结合,进而调控靶基因的表达。为进一步阐明miR-362-3p调控胆囊癌发展发展的分子机制,笔者采用TargetScanHuman 7.2数据库预测其靶基因,发现miR-362-3p可与NLK mRNA 3'-UTR互补结合,提示NLK可能为miR-362-3p靶基因。NLK是一种促生线虫样激酶,亦是Wnt/ β -catenin信号通路一种经典中介,其在癌细胞生长及转移中起重要作用^[22]。已有文献报道,NLK在肿瘤中作为一些miRNA的靶基因发挥重要调控作用,包括miR-221^[23]、miR-101^[24]和miR-92b^[25]等。本研究采用双荧光素酶报告基因试验进一步验证miR-362-3p对NLK的直接调控作

用,结果发现,miR-362-3p可直接与NLK mRNA 3'-UTR预测位点直接结合,并降低海肾/萤火虫荧光比值;当人为将上述结合位点突变后,miR-362-3p结合能力消失,相对荧光比值恢复正常。更为重要的是,采用功能补救试验发现,过表达NLK可部分逆转miR-362-3p对胆囊癌细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用。上述结果充分证明miR-362-3p通过下调NLK抑制胆囊癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

总之,本研究发现miR-362-3p在胆囊癌中表达下调,并与临床病理特征及预后有关。过表达miR-362-3p通过下调NLK抑制胆囊癌细胞的增殖、迁移和侵袭,提示miR-362-3p/NLK通路可能作为胆囊癌新的分子治疗靶点。

参考文献

- [1] Hundal R, Shaffer EA. Gallbladder cancer: epidemiology and outcome[J]. Clin Epidemiol, 2014, 6:99-109. doi: 10.2147/CLEP.S37357.
- [2] Kakaei F, Beheshtirouy S, Nejatollahi SM, et al. Surgical treatment of gallbladder carcinoma: a critical review [J]. Updates Surg, 2015, 67(4):339-351. doi: 10.1007/s13304-015-0328-x.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21332.
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [5] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(7): 522-531. doi: 10.1038/nrg1379.
- [6] Schickel R, Boyerinas B, Park SM, et al. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death[J]. Oncogene, 2008, 27(45):5959-5974. doi: 10.1038/onc.2008.274.
- [7] Tutar L, Tutar E, Tutar Y. MicroRNAs and cancer; an overview[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2014, 15(5): 430-437.
- [8] Yang J, Zhang HF, Qin CF. MicroRNA-217 functions as a prognosis predictor and inhibits pancreatic cancer cell proliferation and invasion via targeting E2F3[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(18): 4050-4057.
- [9] Wu G, Li Z, Jiang P, et al. MicroRNA-23a promotes pancreatic cancer metastasis by targeting epithelial splicing regulator protein 1[J]. Oncotarget, 2017, 8(47):82854-82871. doi: 10.18632/oncotarget.20692.
- [10] Waresijiang N, Sun J, Abuduaini R, et al. The downregulation of

- miR-125a-5p functions as a tumor suppressor by directly targeting MMP-11 in osteosarcoma[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6): 4859–4864. doi: 10.3892/mmr.2016.5141.
- [11] Wang Z, Wang B, Shi Y, et al. Oncogenic miR-20a and miR-106a enhance the invasiveness of human glioma stem cells by directly targeting TIMP-2[J]. *Oncogene*, 2015, 34(11):1407–1419. doi: 10.1038/onc.2014.75.
- [12] Cheng Y, Zhang X, Li P, et al. MiR-200c promotes bladder cancer cell migration and invasion by directly targeting RECK[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9:5091–5099. doi: 10.2147/OTT.S101067.
- [13] Kang H, Kim C, Lee H, et al. Downregulation of microRNA-362-3p and microRNA-329 promotes tumor progression in human breast cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 484–495. doi: 10.1038/cdd.2015.116.
- [14] Wang D, Wang H, Li Y, et al. MiR-362-3p functions as a tumor suppressor through targeting MCM5 in cervical adenocarcinoma[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(3). pii: BSR20180668. doi: 10.1042/BSR20180668.
- [15] Zou X, Zhong J, Li J, et al. MiR-362-3p targets nemo-like kinase and functions as a tumor suppressor in renal cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1): 994–1002. doi: 10.3892/mmr.2015.4632.
- [16] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6):1101–1108.
- [17] Kono H, Nakamura M, Ohtsuka T, et al. High expression of microRNA-155 is associated with the aggressive malignant behavior of gallbladder carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1):17–24. doi: 10.3892/or.2013.2443.
- [18] Cai J, Xu L, Cai Z, et al. MicroRNA-146b-5p inhibits the growth of gallbladder carcinoma by targeting epidermal growth factor receptor[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1):1549–1555. doi: 10.3892/mmr.2015.3461.
- [19] Ye YY, Mei JW, Xiang SS, et al. MicroRNA-30a-5p inhibits gallbladder cancer cell proliferation, migration and metastasis by targeting E2F7[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):410. doi: 10.1038/s41419-018-0444-x.
- [20] Shu YJ, Bao RF, Jiang L, et al. MicroRNA-29c-5p suppresses gallbladder carcinoma progression by directly targeting CPEB4 and inhibiting the MAPK pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(3): 445–457. doi: 10.1038/cdd.2016.146.
- [21] Huang Y, Wu Y, Dong J, et al. MicroRNA-133a-3p exerts inhibitory effects on gallbladder carcinoma via targeting RBPJ[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(11):2448–2462.
- [22] Ishitani T, Ishitani S. Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1):190–197. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.017.
- [23] He XY, Tan ZL, Mou Q, et al. microRNA-221 Enhances MYCN via Targeting Nemo-like Kinase and Functions as an Oncogene Related to Poor Prognosis in Neuroblastoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(11):2905–2918. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1591.
- [24] Shen Q, Bae HJ, Eun JW, et al. MiR-101 functions as a tumor suppressor by directly targeting nemo-like kinase in liver cancer[J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(2):204–211. doi: 10.1016/j.canlet.2013.10.030.
- [25] Liu Z, Diep C, Mao T, et al. MicroRNA-92b promotes tumor growth and activation of NF- κ B signaling via regulation of NLK in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(6): 2961–2968. doi: 10.3892/or.2015.4323.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 揭伟, 林江飞, 肖强胜, 等. miR-362-3p的表达及其靶基因与胆囊癌恶性特征的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(8):998–1006. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.08.008

Cite this article as: Jie W, Lin JF, Xiao QS, et al. Relations of miR-362-3p expression and its target gene with malignant profiles of gallbladder cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2018, 27(8):998–1006. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.08.008