

# RECK 基因 3' UTR 荧光素酶报告基因载体的构建

伊丽娜<sup>1</sup>, 刘睿<sup>2</sup>, 张焯<sup>2</sup>, 昌妍希<sup>1</sup>, 孙鹏<sup>2</sup>

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 RECK(reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs)基因 mRNA 3'非编码区(3'-untranslated region, 3'UTR)全长及两个截短片段的荧光素酶报告基因载体, 以进一步研究 microRNA 对 RECK 基因的调控。方法 以人乳腺癌细胞系 MCF-7 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 RECK 基因 mRNA 的 3'UTR 全长及两个截短片段, 利用双酶切将目的片段定向插入报告基因载体 pGL3-Control 中, 将克隆载体转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞进行扩增, 采用菌落 PCR、双酶切、测序鉴定重组子, 双荧光报告基因检测其表达活性。结果 重组载体中 RECK 3'UTR 序列与 GenBank 序列比对一致且插入方向正确, 3 个重组载体分别命名为 pGL3-RECK 3'UTR-1、pGL3-RECK 3'UTR-2 和 pGL3-RECK 3'UTR-3, 转染细胞后可表达荧光素酶基因。结论 成功构建了 RECK 基因 3'UTR 全长及两个截短片段的荧光素酶报告基因载体, 为进一步研究 microRNA 对靶基因 RECK 的调控奠定了基础。

**关键词:** RECK 基因; 3'UTR; 荧光素酶报告基因; microRNA

中图分类号: R373.2+3 Q75 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2018)03-0247-05

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.002114

## Construction of luciferase reporter gene vector for RECK 3'UTR

YI Li-na\*, LIU Rui, ZHANG Xuan, CHANG Yan-xi, SUN Peng

\*College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010100, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Corresponding author: ZHANG Xuan, E-mail: zhxuan024@163.com

**Abstract:** **Objective** To construct the luciferase reporter gene vector for full length and two truncated fragments of RECK 3'UTR so as to further study the regulation of microRNA to RECK gene. **Methods** The full length and two truncated fragments of RECK mRNA were amplified by PCR using the genomic DNA of human breast cancer MCF-7 cells as template, digested with two restriction enzymes and inserted into luciferase reporter vector pGL3-Control. The constructed recombinant plasmids were transformed to competent *E. coli* DH5 $\alpha$ . The recombinants were identified by colony PCR, enzyme digestion and sequencing, while the luciferase activity was determined by reporter gene assay. **Results** The RECK 3'UTR sequences in recombinant plasmids named as pGL3-RECK 3'UTR-1, pGL3-RECK 3'UTR-2 and pGL3-RECK 3'UTR-3 respectively were consistent with those in GenBank, and were inserted correctly. Luciferase gene was expressed in the cells transfected by all the recombinant plasmids. **Conclusion** The luciferase reporter gene vector for full length and two truncated fragments of RECK 3'UTR was constructed correctly, which laid a foundation of further study on RECK gene regulation through microRNAs.

**Key words:** RECK gene; 3'UTR; Luciferase reporter gene; microRNA

RECK(reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs)基因是近年来发现的新型基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)抑制剂, 通过对

多种 MMP 表达的抑制, 阻碍新生血管产生, 从而抑制肿瘤细胞的转移。有报道称, RECK 基因表达与肿瘤转移抑制具有较好的相关性<sup>[1-2]</sup>, 但对 RECK 基因的调控机制, 尤其是涉及 microRNA(miRNA)的转录后调控研究较少。

miRNA 通过对靶基因的调控影响肿瘤细胞的生长和迁移, 与多种肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[3-6]</sup>。

miRNA 可与靶基因 mRNA 的 3'非编码区(3'-untran-

基金项目: 国家自然科学基金项目“基于转录组学研究肿瘤转移中骨桥蛋白对肿瘤细胞释放外泌体的调控”(81660482); 内蒙古医科大学科技百万工程项目“靶向 RECK 基因的 microRNA 对乳腺癌转移调控机制研究”(YKD2015KJBW005)。

通讯作者: 张焯, E-mail: zhxuan024@163.com

slated region 3'UTR)部分序列互补结合,抑制其蛋白翻译<sup>[7]</sup>,实现对靶基因的调控。目前已发现有通过靶向 RECK 基因调控肝癌、胃癌、肺癌及乳腺癌转移的 miRNAs<sup>[8-11]</sup>。在众多预测以 RECK 为靶点的 miRNA 中存在许多未被验证的 miRNA,其靶点相关性以及在肿瘤转移中的调控机制尚不清楚。本研究设计构建了 RECK mRNA 的 3'UTR 全长及两个截短片段的荧光素酶报告基因载体,为后续通过双荧光报告基因实验验证靶点相关性及进一步探讨 miRNA 对 RECK 基因的调控提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、载体及菌株** 人乳腺癌细胞系 MCF-7 由内蒙古医科大学微生物与免疫学研究室保存,pGL3-Control 荧光素酶报告基因载体和 pRL-TK 海肾荧光素酶载体由南开大学惠赠;感受态菌株大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  购自天根生化科技(北京)有限公司。

**1.2 主要试剂** 总 RNA 抽提纯化试剂盒、AMV 反转录试剂盒、凝胶染料购自北京全式金生物技术有限公司,T4 DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,限制性内切酶购自美国 NEB 公司,UNI 质粒小提试剂盒购自北京康润诚业生物科技有限公司,Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Thermo 公司,双荧光报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

**1.3 引物设计及合成** 利用 primer premier 5 设计 RECK 3'UTR 全长(1号)及两个截短序列(2号和3号)引物,并在上下游引物 5'端分别添加 Xba 和 Fse 酶切位点(下划线部分)。RECK 3'UTR 1号上游引物序列 5'-GCTCTAGACACCTCACTCTCCTG-CCT-3',下游引物序列 5'-GGGCGCGCCTGACATA-TTCTGAAAGCT-3';RECK 3'UTR 2号上游引物序列 5'-GCTCTAGACAGGCTCACTGGTCACGG-3',下游引物序列 5'-GGGCGCGCCTGACATATTCTGAA-AGCT-3';RECK 3'UTR 3号上游引物序列 5'-GCT-CTAGACACCTCACTCTCCTGCCT-3',下游引物序列:5'-GGGCGCGCCAGTCACAGACACAAATC-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.4 RECK 基因 3'UTR 的 PCR 扩增** 以人乳腺癌细胞系 MCF-7 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,采用 50  $\mu$ L 反应体系。反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 30 s,61  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,共 35 个循环,72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 终止反应。采用 1%

琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物后,切取大小正确的目的条带,凝胶回收试剂盒进行回收,具体操作按试剂盒说明书进行。

**1.5 RECK 基因 3'UTR 荧光素酶报告基因载体的构建** 分别对 pGL3-Control 载体和回收的 PCR 产物进行双酶切(Xba / Fse)。采用 50  $\mu$ L 酶切反应体系:PCR 产物或载体 20  $\mu$ L,Xba 1  $\mu$ L 和 Fse 4  $\mu$ L,10 $\times$  反应缓冲液 5  $\mu$ L,H<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C 反应 4~6 h。反应结束后,酶切产物用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,并切胶回收纯化。用 T4 DNA 连接酶将酶切后的 pGL3-Control 载体与 PCR 产物 16  $^{\circ}$ C 连接过夜,连接产物转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,以氨苄西林筛选阳性克隆,37  $^{\circ}$ C 培养过夜。

**1.6 重组载体的筛选及鉴定** 挑取 3 个单菌落至含氨苄西林的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 振荡过夜。以 2  $\mu$ L 菌液为模板,进行 PCR 鉴定,扩增反应条件同 1.3 项。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,选取 PCR 结果阳性的菌液提取质粒。用内切酶 Xba 和 Fse 对质粒进行双酶切。反应体系为:质粒 15  $\mu$ L,Xba 1  $\mu$ L,Fse 4  $\mu$ L,10 $\times$  反应缓冲液 3  $\mu$ L,H<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C 反应 6 h。阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司进行测序验证。

**1.7 双荧光报告基因的检测** 分别将报告基因载体(pGL3-Control 及 3 个新构建载体)和 pRL-TK 海肾荧光素酶载体(内参)共转染至 MCF-7 细胞中,转染 48 h。按照荧光素酶检测试剂盒说明书进行操作:弃去原培养液,加入裂解缓冲液,室温反应 15 min;加入荧光素酶测定缓冲液(LARII)混匀后测定光输出,加入等量荧光淬灭剂(Stop & Glo reagent),淬灭萤火虫荧光素酶,同时启动海肾荧光素酶反应,测定 10 s 后的光输出。每组试验重复 3 次。

## 2 结果

**2.1 目标序列的鉴定** 以人乳腺癌细胞系 MCF-7 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增得到 RECK 3'UTR 全长(1号)及两个截短片段(2和3号),扩增片段长度分别为 1290、676 和 667 bp,见图 1。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析,可见大小均与设计相符的目的片段,见图 2。

**2.2 RECK 基因 3'UTR 荧光素酶报告基因载体的鉴定** pGL3-Control 载体及回收的 PCR 产物的双酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析显示,酶切后的线性载体与未酶切的环状载体相比,电泳速度较慢,见图 3。3 个单菌落接种至含氨苄西林的 LB 液体培

培养基,以其菌液为模板,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示,1、2、3-2 和 3-3 片段大小均与设计相符,见图 4。PCR 鉴定阳性的菌液提取的质粒的双酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示,质粒均可切出 2 条带,表明目的片段已插入载体,1、2 和 3 号切出的小片段大小分别为 1 290、676 和 667 bp,与设计相符,见图 5。阳性克隆测序结果与 RECK 3'UTR 通过 NCBI 上 BLAST 进行比对分析,其中 1-2、2-2 和 3-3 号克隆显示 100% 匹配,表明序列正确无突变,见图 6。重组载体分别命名为 pGL3-RECK 3'UTR-1、pGL3-RECK 3'UTR-2 和 pGL3-RECK 3'UTR-3。

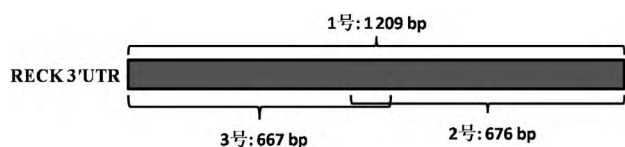
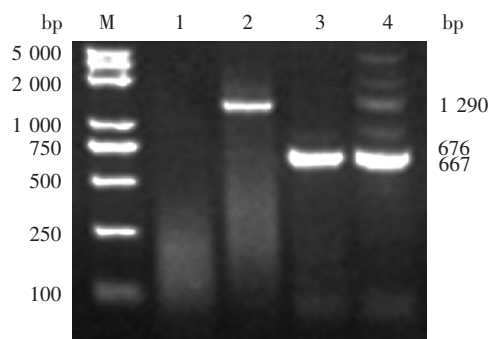


图 1 RECK3'UTR 全长及截短序列模式图

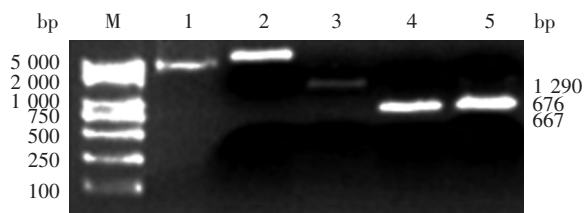
Fig 1. Models of full length and truncated fragments of RECK 3'UTR



M :DNA marker ; 1 :阴性对照(以水为模板) 2 :RECK 3'UTR 全长(1号) 3 :截短片段(2号) 4 :截短片段(3号)。

图 2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

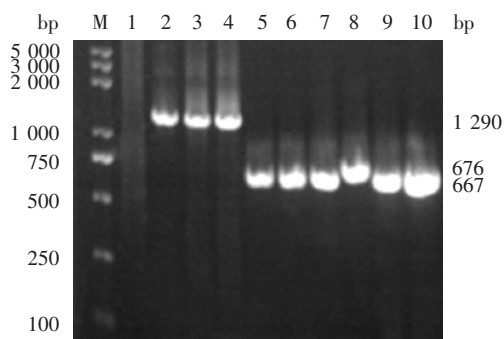
Fig 2. Agarose gel electrophoretic profile of PCR products



M :DNA marker ; 1 :pGL3-Control 载体 2 :pGL3-Control 载体的双酶切产物 3 ~ 5 :分别为 RECK3'UTR 全长(1号)、截短片段(2号)、截短片段(3号)的双酶切产物。

图 3 pGL3-Control 载体及回收的 PCR 产物的双酶切 (Xba /Fse )鉴定

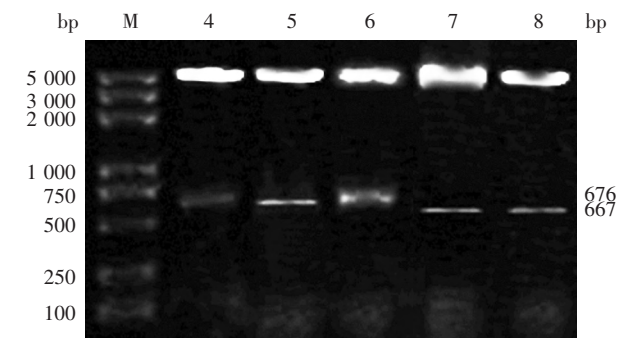
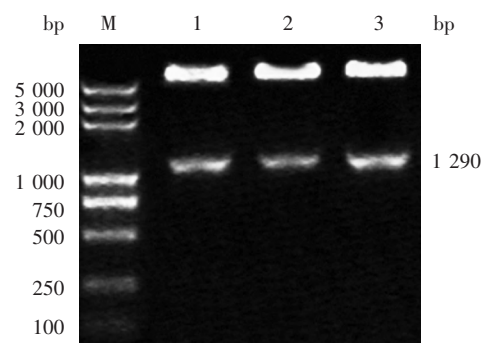
Fig 3. Restriction map of pGL3-control vector and PCR product (Xba /Fse )



M :DNA marker ; 1 :阴性对照(以水为模板) 2 ~ 4 :RECK3'UTR 全长(1-1、1-2、1-3 号) 5 ~ 7 :截短片段(2-1 2-2 2-3 号) 8 ~ 10 :截短片段(3-1 3-2 3-3 号)。

图 4 菌液 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig 4. Agarose gel electrophoretic profile of colony PCR products



M :DNA marker ; 1 ~ 3 :RECK3'UTR 全长(1-1、1-2、1-3 号) 4 ~ 6 :截短片段(2-1 2-2 2-3 号) 7 8 :截短片段(3-2 3-3 号)。

图 5 重组质粒的双酶切(Xba /Fse )鉴定

Fig 5. Restriction map of recombinant plasmids (Xba /Fse )

2.3 重组质粒荧光素酶表达活性 双荧光报告基因检测结果显示,构建的 3 个重组质粒均可在细胞中表达荧光素酶基因,与对照质粒 pGL3-Control 相似,见图 7,表明 3 个重组质粒均可用于后续 miRNA 调控 RECK 基因的靶点相关性研究。

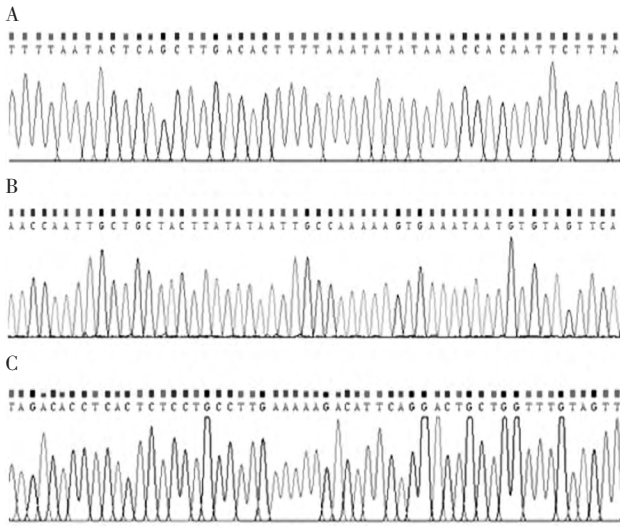


图 6 质粒 pGL3-RECK 3' UTR-1 (A)、pGL3-RECK 3' UTR-2(B)和 pGL3-RECK 3' UTR-3(C)的部分测序图

Fig 6. Partial sequencing map of recombinant plasmids pGL3-RECK 3' UTR-1 (A), pGL3-RECK 3' UTR-2 (B) and pGL3-RECK 3' UTR-3 (C)

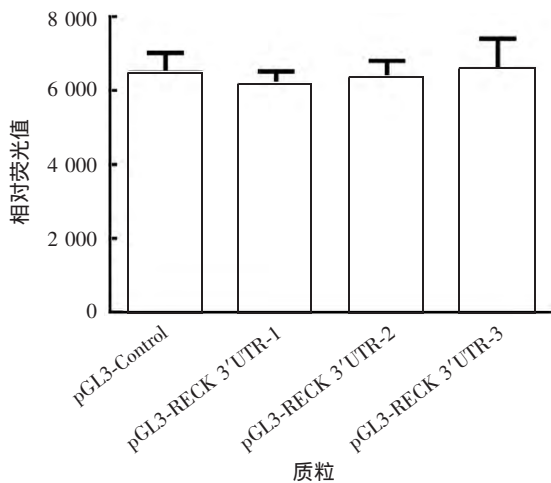


图 7 双荧光报告基因检测

Fig 7. Dual luciferase reporter gene assay

### 3 讨论

肿瘤转移的病理过程非常复杂,其中通过分泌 MMP 对基底膜降解破坏是关键步骤之一,MMP 在肿瘤的侵袭和转移中具有重要作用。RECK 基因是近年来发现的新型 MMP 抑制剂,可通过转录后调控抑制多种 MMP 的表达,也可阻碍肿瘤微环境中新生血管形成,从而抑制肿瘤的侵袭及转移<sup>[12-13]</sup>。RECK 基因缺陷会导致 MMP 过表达,使细胞外基质过度降解,并降低周围组织完整性,诱导形成新生血管,促进肿瘤细胞迁移;相反,RECK 基因高表达时则抑制 MMP 生成,从而阻止肿瘤细胞对基底膜的破坏,抑制

肿瘤细胞迁移。在多数正常组织及细胞中均可检测到 RECK 基因表达,但在多种肿瘤组织及细胞中 RECK 基因不表达或低表达<sup>[14]</sup>。RECK 基因表达与肿瘤转移抑制有很好的相关性。有报道称,RECK 基因可以通过 STAT3 依赖的血管生成开关调控乳腺癌转移<sup>[15]</sup>。因此,研究靶向 RECK 基因 miRNAs 在肿瘤生长及转移过程中的调控网络及其作用机制,对阐明肿瘤转移机制及开发抗肿瘤药物具有重要意义。

miRNA 是真核生物体内约 18 ~ 25 nt 的内源性非编码单链 RNA,在转录后参与调控基因表达。一个转录本的总体结构由 5' 非编码区(5' untranslated Region 5'UTR)、编码区(open reading frame,ORF)和 3'UTR 组成。其中 3'UTR 具转录本特异性,对 mRNA 转录后修饰、维持 mRNA 稳定性及蛋白质翻译效率等方面起重要作用。miRNA 可以与相应靶基因 mRNA 的 3'UTR 区以碱基互补配对原则结合形成二聚体,引起靶基因 mRNA 降解或者翻译抑制。与靶基因 mRNA 3'UTR 完全互补的 miRNA 可直接引起 mRNA 降解,与 3'UTR 不完全互补的 miRNA 则抑制 mRNA 翻译成蛋白质,从而实现靶基因表达的负调控<sup>[7,16]</sup>。同一个 miRNA 可以结合多个靶基因的 3'UTR 区,同一个基因 3'UTR 区也可以结合多个 miRNAs,实现真核生物复杂的转录后调控。因此,以 mRNA 为靶点,通过软件预测可获得能与 mRNA 3'UTR 区结合的大量 miRNAs,但是预测结果需要进一步的实验来验证其靶点结合特异性,从而确认是否具有对靶基因的调控功能。通常采用荧光素酶报告基因系统来验证靶点特异性<sup>[17]</sup>,去除不具功能性的预测结合的 miRNA,其基本原理是 miRNA 与其靶基因 mRNA 3'UTR 区结合后,可抑制报告基因蛋白的表达,只要检测报告基因蛋白即可。将靶基因 mRNA 3'UTR 区定向克隆至荧光素酶报告基因载体,系统中加入待验证的 miRNA,如果 miRNA 可以与重组载体上 3'UTR 区互补结合,则抑制载体上荧光素酶表达,表明该 miRNA 可以实现对靶基因的特异性调控;如果 miRNA 不能与重组载体上 3'UTR 区互补结合,则不能抑制荧光素酶表达,该 miRNA 不具有靶点特异性,从而获得该 miRNA 与靶基因的功能相关性信息。

本研究成功构建了 RECK mRNA 的 3'UTR 全长及两个截短片段的重组荧光素酶报告基因载体,双荧光报告基因检测结果显示,重组质粒可表达荧光素酶,表明构建的重组载体可用于验证预测的 miRNA 与其靶点 RECK 基因的相关性,为后续进一步研究 miRNA 对 RECK 基因的调控奠定基础。

(下转第 256 页)

文库筛选。本研究将针对 T、B 细胞表位的 10 条多肽<sup>[10-11]</sup>混合,经淘筛富集和 Phage ELISA,获得 3 株候选噬菌体抗体。今后可利用独立多肽,深入探讨抗体的结合位点。

筛选中发现,虽然 VH-λ 初级抗体库的库容和 3 轮淘筛后的噬菌体输出量均高于 VH-κ 库,但是从 Phage ELISA 结果来看,VH-κ 库的筛选效果明显优于 VH-λ 库。淘筛的洗脱方法可能是造成 VH-λ 库抗体亲和力低的关键因素,因此可通过优化洗脱液等方式来优化淘筛,以获得更多高亲和力的抗体。

#### 参考文献

- [1] MANNS M P, BUTI M, GANE E, *et al.* Hepatitis C virus infection [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3 : 17006. doi : 10.1038/nrdp.2017.6.
- [2] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015 年版) [J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2015, 7 (3) : 19-35.
- [3] 田姝,郝竟琳,韩杰,等. 国内丙型肝炎治疗药物的临床应用 [J]. *首都食品与医药*, 2017, 24 (8) : 70-72.
- [4] D'AMBROSIO R, DEGASPERI E, COLOMBO M, *et al.* Direct-acting antivirals : the endgame for hepatitis C [J]. *Curr*

- Opin Virol*, 2017, 24 (1) : 31-37.
- [5] SHEN M, REN X. Highlights on immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39 (3) : 1010428317695013. doi : 10.1177 / 1010428317695013.
- [6] FUJIKURA D, IKESUE M, ENDO T, *et al.* Death receptor 6 contributes to autoimmunity in lupus-prone mice [J]. *Nat Commun*, 2017, 8 (1) : 13957. doi : 10.1038/ncomms13957.
- [7] CHAN C E, LIM A P, MACARY P A, *et al.* The role of phage display in therapeutic antibody discovery [J]. *Int Immunol*, 2014, 26 (12) : 649-657.
- [8] CHEN Z, WANG J, BAO L, *et al.* Human monoclonal antibodies targeting the haemagglutinin glycoprotein can neutralize H7N9 influenza virus [J]. *Nat Commun*, 2015, 6 (3) : 6714.
- [9] LI Z, XU L, HE D, *et al.* In vivo time-related evaluation of a therapeutic neutralization monoclonal antibody against lethal enterovirus 71 infection in a mouse model [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (10) : e109391. doi : 10.1371/journal.pone.0109391.
- [10] LI Q, DONG C, WANG J, *et al.* Induction of hepatitis C virus-specific humoral and cellular immune responses in mice and rhesus by artificial multiple epitopes sequence [J]. *Viral Immunol*, 2003, 16 (3) : 321-333.
- [11] HE X S, REHERMANN B, LÓPEZ-LABRADOR F X, *et al.* Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8 (+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (10) : 5692-5697.

收稿日期 : 2017-06-20 编辑 : 何巍

(上接第 250 页)

#### 参考文献

- [1] SHI G, YOSHIDA Y, YUKI K, *et al.* Pattern of RECK CpG methylation as a potential marker for predicting breast cancer prognosis and drug-sensitivity [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (50) : 82158-82169.
- [2] CHEN Y, TSAI Y H, TSENG S H. HDAC inhibitors and RECK modulate endoplasmic reticulum stress in tumor cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (2) : pii : E258. doi : 10.3390/ijms18020258.
- [3] ZHANG W, LIU J, WANG G. The role of microRNAs in human breast cancer progression [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35 (7) : 6235-6244.
- [4] CALLEGARI E, GRAMANTIERI L, DOMENICALI M, *et al.* MicroRNAs in liver cancer : a model for investigating pathogenesis and novel therapeutic approaches [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22 (1) : 46-57.
- [5] ZHOU J J, ZHENG S, SUN L F, *et al.* MicroRNA regulation network in colorectal cancer metastasis [J]. *World J Biol Chem*, 2014, 5 (3) : 301-307.
- [6] CHEN X, BA Y, MA L, *et al.* Characterization of microRNAs in serum : a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Res*, 2008, 18 (10) : 997-1006.
- [7] HEDE K. Studies define role of microRNA in cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97 (15) : 1114-1115.
- [8] LI Y, XU D, BAO C, *et al.* MicroRNA-135b, a HSF1 target, promotes tumor invasion and metastasis by regulating RECK and EVI5 in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (4) : 2421-2433.
- [9] XIE J, TAN Z H, TANG X, *et al.* MiR-374b-5p suppresses

- RECK expression and promotes gastric cancer cell invasion and metastasis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (46) : 17439-17447.
- [10] BAI T, DONG D S, PEI L. Synergistic antitumor activity of resveratrol and miR-200c in human lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31 (5) : 2293-2297.
- [11] ZHANG J, KONG X, LI J, *et al.* miR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31 (3) : 1357-1363.
- [12] RHEE J S, COUSSENS L M. RECK in MMP function : implications for cancer development [J]. *Trends Cell Biol*, 2002, 12 (5) : 209-211.
- [13] ALEXIUS-LINDGREN M, ANDERSSON E, LINDSTEDT I, *et al.* The RECK gene and biological malignancy-its significance in angiogenesis and inhibition of matrix metalloproteinases [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34 (8) : 3867-3873.
- [14] TAKAHASHI C, SHENG Z, HORAN T P, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (22) : 13221-13226.
- [15] WALSH L A, ROY D M, REYNGOLD M, *et al.* RECK controls breast cancer metastasis by modulating a convergent, STAT3-dependent neoangiogenic switch [J]. *Oncogene*, 2015, 34 (17) : 2189-2203.
- [16] BARTEL D P. MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116 (2) : 281-297.
- [17] SHEN B, YU S, ZHANG Y, *et al.* miR-590-5p regulates gastric cancer cell growth and chemosensitivity through RECK and the AKT/ERK pathway [J]. *Oncotargets Ther*, 2016, 9 (10) : 6009-6019.

收稿日期 2017-07-28 编辑 王佳凤