

刘翠华,邓林林,赵方新,等. LGALS3BP 3' UTR 荧光素酶报告基因载体构建及鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(5): 8-14.

Liu CH, Deng LL, Zhao FX, et al. Construction of a luciferase reporter gene vector for the LGALS3BP 3' UTR [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 8-14.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.05.002

LGALS3BP 3' UTR 荧光素酶报告基因载体构建及鉴定

刘翠华¹, 邓林林¹, 赵方新¹, 红 梅¹, 武建强¹, 张 烜^{1*}, 李奕君², 温 琪²,
郭 冉², 刘奕彤², 马启豪²

(1.内蒙古医科大学 基础医学院, 呼和浩特 010059; 2.内蒙古医科大学 第一临床医学院, 呼和浩特 010059)

【摘要】 目的 构建 LGALS3BP (lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein, LGALS3BP) 基因 3' 非编码区 (3'-untranslated region, 3' UTR) 的野生型及突变型荧光素酶报告基因重组载体并进行鉴定, 以备进一步研究 miRNA 对 LGALS3BP 基因的调控。**方法** Targetscan 软件预测 LGALS3BP 3' UTR 上的 miRNA 结合位点; 以人肝癌细胞系 SMMC-7721 基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得野生型 LGALS3BP 基因 3' UTR 片段, 经双酶切将目的片段定向插入报告基因载体 pGL3-Control 中, 将克隆好的重组载体转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞进行扩增, 采用菌落 PCR 及测序鉴定重组子。设计位点突变型 LGALS3BP 3' UTR 扩增引物, 以构建的野生型 LGALS3BP 3' UTR 重组质粒为模板, 采用重叠 PCR 及定点突变 PCR 技术进行扩增分别构建单独位点及双位点突变型重组荧光素酶报告基因载体。**结果** 野生型 LGALS3BP 3' UTR 重组质粒经菌落 PCR 鉴定, 可见 871 bp 的目的基因片段, 大小与预期相符; 测序结果表明, 插入序列与 LGALS3BP 3' UTR 序列完全一致且插入方向正确。Targetscan 软件预测到 LGALS3BP 3' UTR 区有两个感兴趣的 miRNA 结合位点。突变型 LGALS3BP 3' UTR 重组质粒测序鉴定结果表明, 单独位点及双位点突变型重组质粒中均成功引入结合位点突变。**结论** 成功构建 LGALS3BP 的 3' UTR 野生型 (pGL3-LGAL-W-3' UTR)、两个单独位点突变型 (pGL3-LGAL-M1-3' UTR 和 pGL3-LGAL-M2-3' UTR) 及双位点突变型 (pGL3-LGAL-M-3' UTR) 重组荧光素酶报告基因载体, 为后续研究 miRNA 对 LGALS3BP 基因的调控奠定基础。

【关键词】 LGALS3BP; 3' UTR; 报告基因载体构建; 定点突变

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 05-0008-07

Construction of a luciferase reporter gene vector for the LGALS3BP 3' UTR

LIU Cuihua¹, DENG Linlin¹, ZHAO Fangxin¹, HONG Mei¹, WU Jianqiang¹, ZHANG Xuan^{1*}, LI Yijun², WEN Qi²,
GUO Ran², LIU Yitong², MA Qihao²

(1. College of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China.
2. the First Clinical Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059)

【Abstract】 Objective To construct a recombinant luciferase reporter gene vector for wildtype and mutant 3'-untranslated regions (UTRs) of the LGALS3BP gene to study regulation of the LGALS3BP gene and miRNAs. **Methods** TargetScan was used to predict the binding site of miRNAs in the 3' UTR of the LGALS3BP gene. The wildtype LGALS3BP 3' UTR was amplified by PCR using genomic DNA from SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cells as a template. PCR products were digested by two restriction enzymes and inserted into the luciferase reporter vector pGL3-control. Recombinant plasmids were verified by colony PCR and sequencing. Primers for LGALS3BP 3' UTR with binding site

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81660482); 内蒙古医科大学 2021 年大学生科技创新“英才培育”项目 (YCPY2021040); 内蒙古自治区卫生健康科技计划项目 (202202128); 大学生创新创业训练计划项目 (自治区级) (202210132020); 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2022MS08009)。

【作者简介】 刘翠华 (1990—), 女, 硕士, 研究方向: 肿瘤免疫。E-mail: 18610224537@163.com

【通信作者】 张烜 (1975—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 肿瘤免疫。E-mail: zhxuan024@163.com

mutations were designed. Single and double site mutant luciferase reporter gene vectors were prepared by overlapping PCR and site-directed mutagenesis PCR using the wildtype LGALS3BP 3' UTR recombinant plasmid as a template. **Results** Colony PCR showed a target gene fragment of 871 bp, which was consistent with the expected size. The inserted sequence was consistent with the LGALS3BP 3' UTR in sequencing. TargetScan indicated two miRNA-binding sites in the LGALS3BP 3' UTR. The single and double site mutant sequences were successfully inserted into the LGALS3BP 3' UTR.

Conclusions Wildtype LGALS3BP 3' UTR (pGL3-LGAL-W-3' UTR), two single site mutants (pGL3-LGAL-M1-3' UTR and pGL3-LGAL-M2-3' UTR), and a double site mutant (pGL3-LGAL-M-3' UTR) luciferase reporter gene vectors were successfully constructed, which may facilitate studies of LGALS3BP gene regulation through miRNAs.

【Keywords】 LGALS3BP; 3' UTR; reporter gene vector construction; site-directed mutation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

半乳糖凝集素 3 结合蛋白 (lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein, LGALS3BP) 又称巨细胞-2 结合蛋白 (MAC-2bp/90K), 属于富半胱氨酸清道夫受体 (scavenger receptor cysteine-rich, SRCR) 超家族, 是一种分泌性糖蛋白^[1-2], 在正常和癌变组织的细胞粘附、生长、分化、凋亡以及血管生成中起着重要作用^[3-4], 可作为多种癌症的重要预后标志物^[5]。据报道, LGALS3BP 基因在乳腺癌、肺癌、黑色素瘤、卵巢、肝细胞、胰腺、前列腺、口腔鳞状细胞癌、神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤、胃癌和淋巴瘤等多种恶性肿瘤组织和血清中高表达, 与临床预后呈负相关^[6]。有研究证实, LGALS3BP 高表达可促进口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 增殖和迁移^[7]; 诱导乳腺癌细胞转移及内皮血管生成^[8]; 促进肺癌细胞的增殖、转移及菌落形成^[9]。这说明 LGALS3BP 与肿瘤的侵袭转移有着紧密联系, 提示 LGALS3BP 在肿瘤的进展中发挥一定的作用。但涉及 miRNA 的转录后调控研究较少, 有报道称 miR-596 可靶向 LGALS3BP 诱导 OSCC 细胞生长抑制和凋亡^[10]。因此, 研究靶向 LGALS3BP 基因的 miRNAs 在肿瘤发生发展过程中的调控网络及其作用机制, 对阐明其作为癌症新治疗靶点的潜在作用及开发抗肿瘤药物具有重要意义。miRNAs 是一种长约 22 bp 的真核生物内源性小分子单链 RNA^[11], 可与靶基因的 mRNAs 的 3' 非编码区 (3'-untranslated region, 3' UTR) 结合, 调控 mRNA 翻译和/或降解^[12-13], 进而参与肿瘤细胞发生发展^[14]。据报道, LGALS3BP 可参与人类的多种癌症进展^[2], 前期通过生信分析预测出 LGALS3BP 3' UTR 区上游的多个 miRNA 及其作用位点, 但其靶点相关性以及在肿瘤进展中的调控机制尚不清楚。本研究采用重叠 PCR 及定点突变 PCR 技术构建 LGALS3BP 3' UTR 野生型和突变型荧光

素酶报告基因载体, 为后续通过双荧光素酶报告基因实验验证靶点相关性及进一步探讨 miRNA 对 LGALS3BP 基因的调控提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞、载体及菌株

HEK-293T、人肝癌细胞系 SMMC-7721、pGL3-Control 载体均由内蒙古医科大学微生物与免疫学研究室保存; 感受态菌株大肠埃希菌 DH5 α 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

基因组 DNA 提取试剂盒、无内毒素质粒小提试剂盒、Pfu DNA 聚合酶、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京 Transgen 公司; 定点突变试剂盒购自上海翊圣公司; TransTaq[®] DNA Polymerase High Fidelity、转染试剂、凝胶染料、DNA Marker 购自北京 TRANG 公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 FseI 及 XbaI 购自美国 NEB 公司; 1640、DMEM 及 Opti-MEM 培养基、胎牛血清 (FBS) 购于美国 Gibco 公司; PCR 引物由北京擎科公司合成。细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司; 凝胶成像仪购自英国 GE healthcare; 倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司; PCR 扩增仪购自美国 Bio-red 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 预测 LGALS3BP 基因 3' UTR 区的 miRNA 结合位点

Targetscan (http://www.targetscan.org/vert_72/) 软件在线预测 LGALS3BP 3' UTR 上的 miRNA 结合位点。

1.3.2 引物设计及合成

利用 primer premier 5 设计 LGALS3BP 3' UTR 野生型 (W) 和种子序列位点突变型 (M1, M2) 引物, 并在上下游引物 5' 端分别添加 XbaI 和 FseI 酶

的 PCR 产物及载体 pGL3-Control 双酶切后,与未酶切的环状载体相比,电泳速度较慢(图 2B)。酶切后的 PCR 产物经连接、转化后,随机挑取 3 个单克隆进行菌落 PCR 鉴定,目的片段大小均与设计相符(图 2C)。阳性克隆测序结果与 LGALS3BP 3' UTR 通过 NCBI 上 BLAST 进行比对分析后表明序列正确无突变(图 2D),重组载体命名 pGL-LGAL-W-3' UTR。

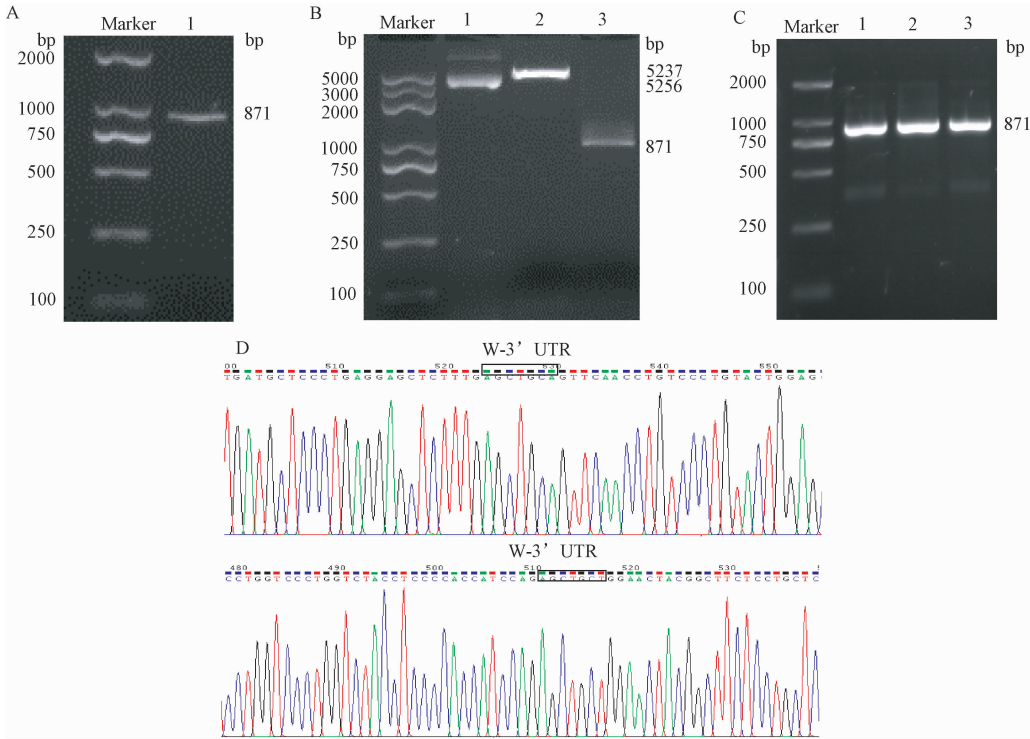
2.3 单突变型荧光素酶报告基因载体的构建及鉴定

以荧光素酶报告载体 pGL3-LGAL-W-3' UTR 为模板,定点突变试剂盒扩增目的质粒(图 3A)。PCR 扩增产物经过 DpnI 消化(图 3B)、环化重组、转化 DH5a 感受态细胞,筛选阳性克隆(图 3C)。测序显示 LGALS3BP 3' UTR 的第 201~206 位的结合位点由 GAGCTC 成功突变为 CGTGAG(图 3D),重组载体命名为 pGL-LGAL-M1-3' UTR。

以荧光素酶报告载体 pGL3-LGAL-W-3' UTR 为模板,重叠 PCR 技术依次扩增 F1、F2、F3 片段(图 4A、4B)。经酶切(图 4C)、连接、转化 DH5a 感受态细胞,筛选阳性克隆(图 4D),测序显示 F3 片段上的 6 个碱基位点(LGALS3BP 3' UTR 的第 590~596 碱基部位),由 GAGCTG 成功突变为 TCTTAT(图 4E),重组载体命名为 pGL-LGAL-M2-3' UTR。

2.4 双位点突变型荧光素酶报告基因载体的构建及鉴定

以位点 2 突变型载体 pGL3-LGAL-M2-3' UTR 为模板,定点突变试剂盒扩增目的质粒(图 5A)。PCR 产物经过 DpnI 消化(图 5B)、环化重组、转化 DH5a 感受态细胞,筛选阳性克隆(图 5C),测序显示该质粒上的结合位点 1(LGALS3BP 3' UTR 的第 201~206 碱基部位),由 GAGCTC 成功突变为 CGTGAG(图 5D),此双位点突变型重组载体命名为 pGL-LGAL-M-3' UTR。

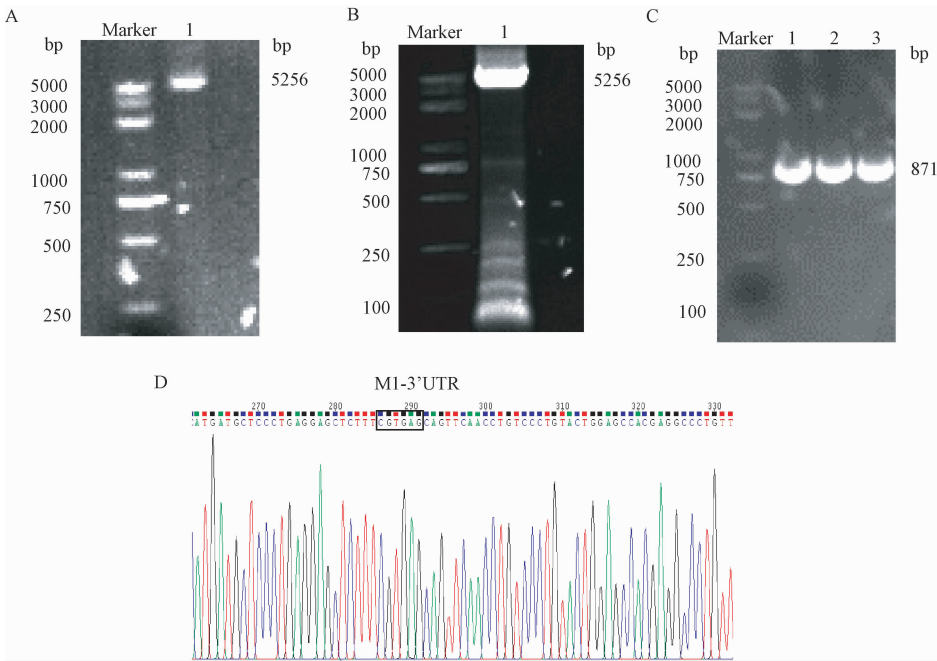


注:A:PCR 扩增 LGALS3BP 3' UTR 序列;B:双酶切 pGL3-Control 载体及回收 PCR 产物(XbaI/FseI);1:未酶切的 pGL3-Control;2:双酶切 pGL3-Control 载体;3:双酶切 PCR 产物;C:菌液 PCR 电泳图(1、2、3 代表 3 个阳性克隆菌落);D:pGL3-LGAL-W-3' UTR 的测序图。

图 2 pGL3-LGAL-W-3' UTR 的质粒构建及鉴定

Note. A, The LGALS3BP 3' UTR were amplified by PCR. B, pGL3-Control vector and PCR product digested by XbaI and FseI. 1, pGL3-Control. 2, Digested pGL3-Control. 3, Digested PCR product. C, Electrophoresis of colony PCR (1, 2 and 3 represent 3 positive colonies). D, The sequencing map of pGL3-LGAL-W-3' UTR.

Figure 2 Construction and validation of pGL3-LGAL-W-3' UTR

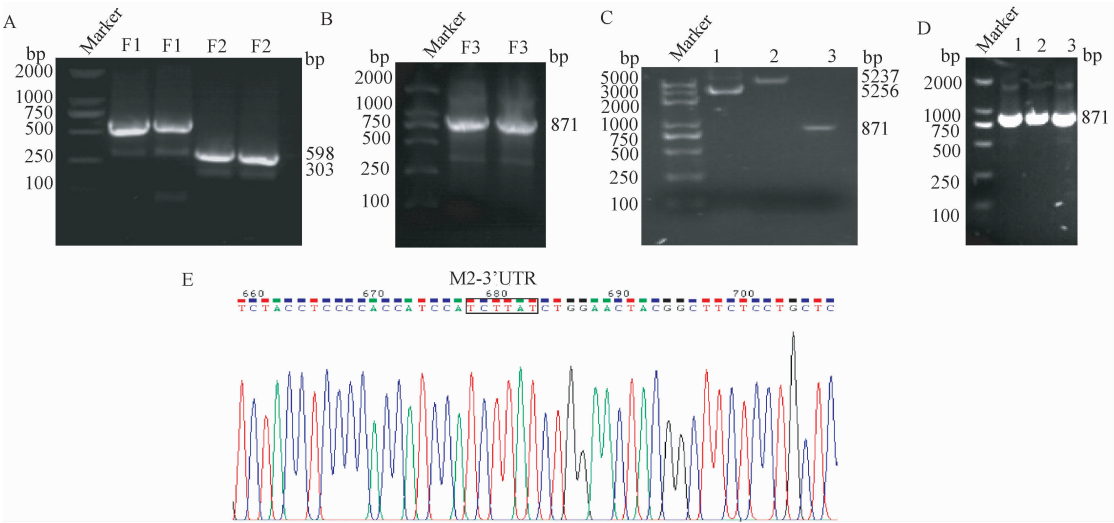


注:A:PCR 扩增 pGL3-LGAL-M1-3' UTR 质粒;B:DpnI 消化 pGL3-LGAL-M1-3' UTR 质粒;C:菌液 PCR 电泳图(1、2、3 代表 3 个阳性克隆菌落);D:pGL3-LGAL-M1-3' UTR 的测序图。

图 3 pGL3-LGAL-M1-3' UTR 的质粒构建及鉴定

Note. A, Plasmid was amplified by PCR. B, Plasmid digested by DpnI. C, Electrophoresis of colony PCR (1, 2 and 3 represent 3 positive colonies). D, The sequencing map of pGL3-LGAL-M1-3' UTR.

Figure 3 Construction and validation of pGL3-LGAL-M1-3' UTR

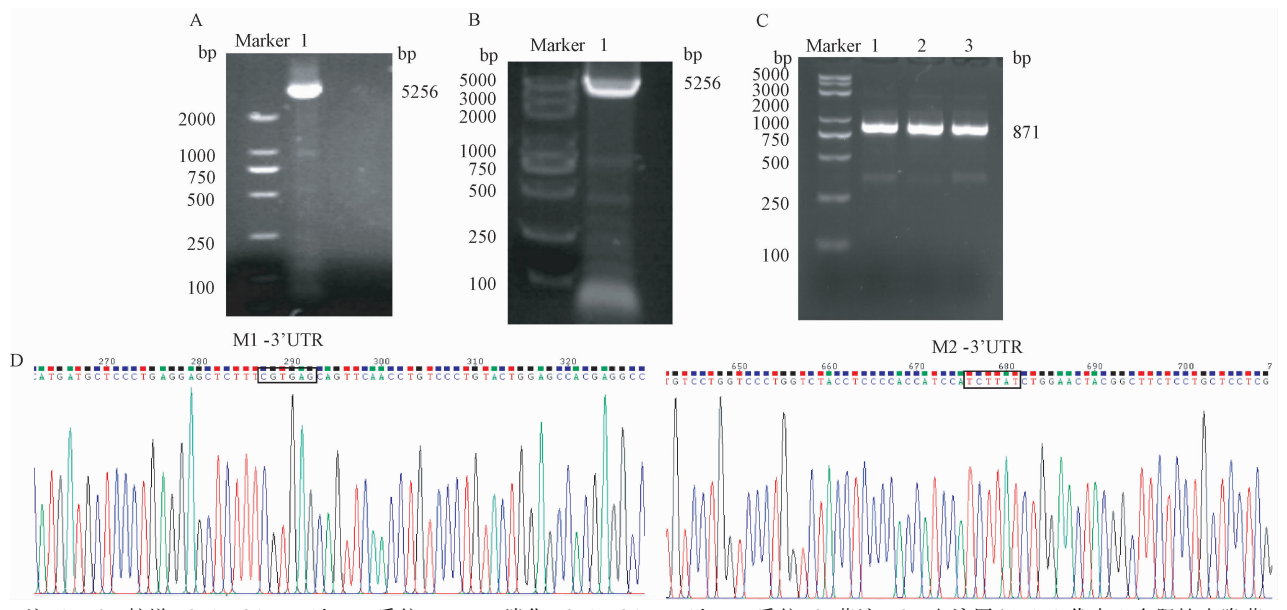


注:A:PCR 扩增 F1、F2 片段;B:重叠 PCR 扩增 F3 片段;C:pGL3-Control 载体及 F3 片段的双酶切(XbaI/FseI);1:未酶切 pGL3-Control 载体;2:双酶切 pGL3-Control 载体;3:双酶切 F3 片段产物;D:菌液 PCR 电泳图(1、2、3 代表 3 个阳性克隆菌落);E:pGL3-LGAL-M2-3' UTR 的测序图。

图 4 pGL3-LGAL-M2-3' UTR 的质粒构建及鉴定

Note. A, F1 and F2 fragments amplified by PCR. B, F3 fragment amplified by overlap PCR. C, pGL3-Control vector and PCR product digested by XbaI and FseI. 1, pGL3-Control. 2, Digested pGL3-Control. 3, Digested PCR product. D, Electrophoresis of colony PCR (1, 2 and 3 represent 3 positive colonies). E, The sequencing map of pGL3-LGAL-M2-3' UTR.

Figure 4 Construction and validation of pGL3-LGAL-M2-3' UTR



注:A:PCR 扩增 pGL3-LGAL-M-3' UTR 质粒;B:DpnI 消化 pGL3-LGAL-M-3' UTR 质粒;C:菌液 PCR 电泳图(1、2、3 代表 3 个阳性克隆菌落);D:pGL3-LGAL-M-3' UTR 的测序图。

图 5 pGL3-LGAL-M-3' UTR 的质粒构建及鉴定

Note. A, Plasmid was amplified by PCR. B, Plasmid digested by DpnI. C, Electrophoresis of colony PCR (1, 2 and 3 represent 3 positive colonies). D, The sequencing map of pGL3-LGAL-M-3' UTR.

Figure 5 Construction of and validation pGL3-LGAL-M-3' UTR

3 讨论

越来越多的研究表明,肿瘤转移是一个多因素、多步骤共同调控的复杂的病变过程^[15-16],其与肿瘤细胞中高表达肿瘤转移相关基因密切相关,如 LGALS3BP 基因。基因的 3' UTR 区不编码氨基酸,但通常含有调控其表达的核苷酸序列,如 miRNA 的结合位点序列,这些特定序列在基因的转录后表达调控中发挥关键作用。因此,本研究构建 LGALS3BP 基因的 3' UTR 重组载体对研究其转录后调控有重要意义。

miRNA 能与其它编码基因 mRNA 的 3' UTR 区以不完全互补配对方式结合^[17],形成 RNA 诱导的沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC),引起靶基因 mRNA 的降解^[18],参与调控癌细胞的分化、增殖、侵袭、凋亡等。相关研究表明,miR-26a 可直接靶向结合高迁移率族蛋白 A2 (high mobility group protein A2, HMG A2)的 3' UTR,抑制肝癌细胞的增殖和迁移^[19]; miR-19a-3p 通过调控 PTEN/AKT 信号通路促进肝细胞癌转移^[20]。miR-532-3p 通过调控 gankyrin/AKT 信号通路影响 KIFC1 表达,并促进肝细胞癌上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和转移^[21]。

通过软件预测可获得与某基因 3' UTR 区的结

合的 miRNAs 及其结合位点序列,为探讨以 LGALS3BP 基因为靶点但尚未进行验证的 miRNA 的靶点相关性及对 LGALS3BP 基因的调控功能,本研究预测到 LGALS3BP 3' UTR 区存在两个感兴趣的 miRNA 靶向结合的位点。预测结果需要通过实验来验证,通常采用的验证方法是荧光素酶报告基因系统^[22]。pGL-Control 是 Promega 公司生产的一个具有 SV40 强启动子和萤火虫荧光素酶基因(Luc+)的报告基因载体,常用于荧光素酶重组质粒构建。其基本原理是将基因 mRNA 3' UTR 区定向克隆到 Luc+下游,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^[23]。本研究以肝癌细胞系 SMMC-7721 基因组 DNA 为模板,采用 PCR 方法扩增出包含两个预测结合位点的 3 野生型 LGALS3BP 基因 3' UTR 片段(图 2A)。随后经双酶切、连接反应将目的片段定向插入荧光素酶报告基因载体 pGL3-Control 中,通过菌液 PCR 及基因测序验证序列正确(图 2D),成功构建了野生型的 LGALS3BP 3' UTR 重组报告基因质粒。

如果 3' UTR 区的 miRNA 结合位点序列发生突变, miRNA 也不能与其结合, 则不能抑制荧光素酶表达, 通常会分别构建野生型及结合位点突变型的 3' UTR 重组载体进行 miRNA 与靶基因的结合验证。因此, 本研究设计了两个结合位点的突变序列, 以构建成功的野生型重组载体为基础, 利用定点突变技术和重叠 PCR 及技术又分别成功扩增出两个单位点突变(图 3、图 4)及双位点突变型(图 5) LGALS3BP 3' UTR 序列并定向插入 pGL3-Control 载体, 经测序鉴定结合位点序列成功突变。单位点及双位点突变型重组质粒的构建有助于后续进一步鉴定 miRNA 是通过哪个位点实现对靶基因 LGALS3BP 的调控。因此, 本研究成功构建了野生型及突变型 LGALS3BP 3' UTR 重组荧光素酶报告基因载体, 为后续进一步研究 LGALS3BP 的功能及 miRNA 对 LGALS3BP 的调控作用奠定基础。

参考文献:

- [1] Kyrrousi C, O'Neill AC, Brazovskaja A, et al. Extracellular LGALS3BP regulates neural progenitor position and relates to human cortical complexity [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6298.
- [2] Traini S, Piccolo E, Tinari N, et al. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by SP-2, an anti-lectin, galactoside-binding soluble 3 binding protein (LGALS3BP) antibody [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(4): 916-925.
- [3] Song Y, Wang M, Tong H, et al. Plasma exosomes from endometrial cancer patients contain LGALS3BP to promote endometrial cancer progression [J]. *Oncogene*, 2021, 40(3): 633-646.
- [4] 朱亚芳, 张志华, 张秀珑, 等. 川芎嗪联合顺铂对小鼠 Lewis 肺癌中 Mac2-BP 和 VEGF 表达的影响 [J]. *军事医学*, 2015, 39(10): 751-754, 764.
- [5] El-Aziz RA, Alnaggar ARLR, Mohamed Nabih MI, et al. Mac-2 binding protein in non-alcoholic fatty liver disease: is it a reliable diagnostic biomarker? A pilot study [J]. *Clin Exp Hepatol*, 2020, 6(1): 28-34.
- [6] Capone E, Iacobelli S, Sala G. Role of galectin 3 binding protein in cancer progression: a potential novel therapeutic target [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 405.
- [7] Zhang X, Ding H, Lu Z, et al. Increased LGALS3BP promotes proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma via PI3K/AKT pathway [J]. *Cell Signal*, 2019, 63: 109359.
- [8] Piccolo E, Tinari N, Semeraro D, et al. LGALS3BP, lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein, induces vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells and promotes angiogenesis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(1): 83-94.
- [9] Woo JK, Jang JE, Kang JH, et al. Lectin, galactoside-binding

soluble 3 binding protein promotes 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin resistance through PI3K/Akt pathway in lung cancer cell line [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(7): 1355-1365.

- [10] Li H. Exploration of alternative mechanism for miR-596-mediated down-regulation of LGALS3BP in oral squamous cell carcinoma [J]. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 2015, 82(2): 55-61.
- [11] Roy B, Ghose S, Biswas S. Therapeutic strategies for miRNA delivery to reduce hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 124: 134-144.
- [12] 李莉红, 庞文彪, 常凯, 等. 中国地鼠口腔颊黏膜癌中 miRNA 与 mRNA 表达谱的关联分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(2): 158-164.
- [13] 刘翠华, 邓林林, 赵方新, 等. miR-4660 对肝癌细胞迁移和侵袭的影响及其机制 [J]. *山西医科大学学报*, 2023, 54(1): 1-8.
- [14] Liu T, Liu D, Guan S, et al. Diagnostic role of circulating miR-21 in colorectal cancer: a update meta-analysis [J]. *Ann Med*, 2021, 53(1): 87-102.
- [15] Osmani N, Follain G, García León MJ, et al. Metastatic tumor cells exploit their adhesion repertoire to counteract shear forces during intravascular arrest [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(10): 2491-2500.
- [16] Zhou X, Sun Z, Zhang M, et al. Deficient Rnf43 potentiates hyperactive Kras-mediated pancreatic preneoplasia initiation and malignant transformation [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(1): 61-71.
- [17] 赵健志, 李欢欢, 刘柯欣, 等. microRNA 与靶基因相互调控机制的研究进展 [J]. *科学通报*, 2021, 66(24): 3123-3140.
- [18] Zhu Q, Zhang X, Zai HY, et al. circSLC8A1 sponges miR-671 to regulate breast cancer tumorigenesis via PTEN/PI3k/Akt pathway [J]. *Genomics*, 2021, 113(1): 398-410.
- [19] 金若珏, 刘三海, 黄强, 等. microRNA-26a 靶向高迁移率族蛋白 A2 抗体对肝癌细胞增殖及迁移的影响 [J]. *中国基层医药*, 2021, 28(10): 1441-1447.
- [20] Jiang XM, Yu XN, Liu TT, et al. microRNA-19a-3p promotes tumor metastasis and chemoresistance through the PTEN/Akt pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 1147-1154.
- [21] Han J, Wang F, Lan Y, et al. KIFC₁ regulated by miR-532-3p promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma via gankyrin/AKT signaling [J]. *Oncogene*, 2019, 38(3): 406-420.
- [22] 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]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 6009-6019.
- [23] 伊丽娜, 刘睿, 张烜, 等. RECK 基因 3' UTR 荧光素酶报告基因载体的构建 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(3): 247-250, 256.