

# miR-181 调控人晶状体上皮细胞凋亡的机制研究

秦宇<sup>1</sup>, 赵江月<sup>1</sup>, 罗文婷<sup>2</sup>, 李晶<sup>1</sup>, 刘佳<sup>1</sup>, 张劲松<sup>1</sup>

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81270988, 81470617);

辽宁省教育厅科学技术研究一般项目 (No. L2014305)

作者单位: <sup>1</sup>(110005) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院眼科 中国医科大学眼科医院 辽宁省晶状体学重点实验室; <sup>2</sup>(110004) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院实验研究中心

作者简介: 秦宇, 毕业于中国医科大学, 医学博士, 讲师, 主治医师, 研究方向: 晶状体疾病。

通讯作者: 张劲松, 毕业于中国医科大学, 医学硕士, 博士研究生导师, 教授, 主任医师, 中国医科大学附属第四医院眼科主任, 中国医科大学眼科医院院长, 研究方向: 白内障临床与基础。zhangjs0331@126.com

收稿日期: 2015-02-25 修回日期: 2015-04-13

## Mechanism research of miR - 181 regulating human lens epithelial cell apoptosis

Yu Qin<sup>1</sup>, Jiang-Yue Zhao<sup>1</sup>, Wen-Ting Luo<sup>2</sup>, Jing Li<sup>1</sup>, Jia Liu<sup>1</sup>, Jin-Song Zhang<sup>1</sup>

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81270988, 81470617); Scientific Research Project of Education Department, Liaoning Province (No. L2014305)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Key Laboratory of Lens, Shenyang 110005, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Experiment Research Center, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Jin-Song Zhang. Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Key Laboratory of Lens, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. zhangjs0331@126.com

Received: 2015-02-25 Accepted: 2015-04-13

### Abstract

• AIM: To investigate the expression of miR-181 in the lens tissue of cataract and the regulating mechanism of miR-181 on apoptosis of human lens epithelial cell.

• METHODS: Real time q-PCR was used to measure the expression of miR-181 in the anterior lens capsules of age-related cataract and human lens epithelial cell apoptosis model. miR-181 mimic and inhibitor were transfected using Lipofectamine 2000 to regulate the expression of miR-181, and then Real time q-PCR was used to verify transfection efficiency. Flow cytometry was used to detect the change of cell apoptosis rate.

• RESULTS: Compared with control group, the expression of miR-181 was significantly higher in both

the anterior lens capsules of age-related cataract and human lens epithelial cell apoptosis model; the relative expression of miR-181 in lens epithelial cells transfected with miR-181 mimic was increased, whereas decreased in cells transfected with miR-181 inhibitor; the apoptosis rate of cells transfected with miR-181 mimic was increased, while reduced in miR-181 inhibitor group. Each result was statistically significant ( $P < 0.01$ ).

• CONCLUSION: High expression of miR-181 is detected in anterior lens capsule of age-related cataract. miR-181 might play a certain role in the pathogenesis of cataract via promoting human lens epithelial cell apoptosis. miR-181 probably becomes a new approach for the nonoperative treatment of cataract, but the concrete mechanism still needs to be further studied.

• KEYWORDS: microRNA; miR-181; cell apoptosis; cataract

Citation: Qin Y, Zhao JY, Luo WT, et al. Mechanism research of miR-181 regulating human lens epithelial cell apoptosis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(5):759-763

### 摘要

目的: 探讨 miR-181 在白内障晶状体组织中的表达情况, 及其对人晶状体上皮细胞凋亡的调控机制。

方法: 利用 Real time q-PCR 方法, 检测年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜和人晶状体上皮细胞凋亡模型中 miR-181 的表达情况; 利用 Lipofectamine 2000 瞬时转染 miR-181 mimic 和 inhibitor 调节人晶状体上皮细胞中 miR-181 的表达, 利用 Real time q-PCR 方法验证转染效率, 利用流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化。

结果: 与对照组相比, 年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜组和人晶状体上皮细胞凋亡模型组, miR-181 的表达显著升高; miR-181 mimic 转染组, miR-181 的表达显著升高, 细胞凋亡率显著升高; miR-181 inhibitor 转染组, miR-181 的表达显著降低, 细胞凋亡率显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

结论: miR-181 在年龄相关性白内障晶状体组织中呈高表达, miR-181 能够促进人晶状体上皮细胞凋亡, 从而可能在年龄相关性白内障的发病过程中发挥一定作用, miR-181 可能成为白内障非手术治疗的一种新途径, 但具体机制有待进一步研究。

关键词: 微小 RNA; miR-181; 细胞凋亡; 白内障

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.5.04

引用: 秦宇, 赵江月, 罗文婷, 等. miR-181 调控人晶状体上皮细胞凋亡的机制研究. *国际眼科杂志* 2015;15(5):759-763

## 0 引言

微小 RNA (microRNA, miRNA, miR) 是一类长约 21 ~ 25 个核苷酸的单链小分子非编码 RNA<sup>[1]</sup>, 通过与靶基因 mRNA 的 3'-非翻译区互补结合, 从而负性调节靶基因的表达与功能<sup>[2]</sup>, 在转录后水平调控着人类整个基因组中 30% 的基因。microRNA 参与生命过程中一系列重要的活动包括发育、器官形成、细胞增殖、凋亡等, 其与疾病的关系日益引起人们关注<sup>[3-6]</sup>, 近年来研究表明 microRNA 与白内障等疾病的发生和发展密切相关<sup>[7,8]</sup>。白内障作为一种常见的衰老相关疾病, 随着世界人口老龄化问题日趋严重, 发病率迅速上升。一直以来, 有关白内障发病机制的研究, 唯一达成共识的是晶状体上皮细胞凋亡是除先天性白内障以外其他类型白内障形成的共同细胞学基础<sup>[9]</sup>, 但具体机制尚不明确。因此, 探索白内障, 特别是年龄相关性白内障的表达调控机制, 揭示其发病的关键环节, 探索一种经济有效的非手术防治新途径, 具有重要的学术意义和社会价值。miR-181 是人类细胞中存在的较为广泛的一种 microRNA。有文献报道, miR-181 能够调控肿瘤细胞凋亡从而在多种肿瘤的发生发展中发挥抑癌基因或癌基因的作用<sup>[10,11]</sup>。miR-181 能够抑制晶状体上皮细胞的增殖、迁移及上皮间质转化从而可能在后发性白内障的预防和治疗中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。因此, 本研究以 miR-181 为研究对象, 利用年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜标本及人晶状体上皮细胞凋亡模型, 通过细胞转染、Real time q-PCR 以及流式细胞术等方法, 探讨 miR-181 对人晶状体上皮细胞凋亡的影响及其在年龄相关性白内障中的作用, 进一步探讨 miR-181 能否成为白内障诊断和非手术治疗的新靶点。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集 2014-07/09 在中国医科大学附属第四医院眼科诊断为年龄相关性白内障的患者, 排除其他眼部疾病, 行超声乳化白内障吸除术时, 收集撕囊的晶状体前囊膜标本 30 例 30 眼, 其中男 16 例 16 眼, 女 14 例 14 眼, 年龄 50 ~ 70 (平均 58.03 ± 5.13) 岁, 作为实验组。收集中国医科大学附属第四医院眼科眼库新鲜人眼透明晶状体前囊膜标本 15 例 15 眼, 其中男 10 例 10 眼, 女 5 例 5 眼, 年龄 50 ~ 70 (平均 56.39 ± 5.60) 岁, 作为对照组。组织标本收集经伦理学委员会批准, 研究对象知情同意并签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和转染** 人晶状体上皮细胞系 (SRA01/04) 由美国 Doheny 眼科研究所 Dr. Yi-sin Liu 惠赠。SRA01/04 细胞利用 DMEM 培养基 (含 10% 新生牛血清, 100U/mL 的青霉素, 100μg/mL 的链霉素), 置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养。miR-181 模拟物 (mimic), 模拟物的阴性对照 (mimic negative control), miR-181 抑制物 (inhibitor), 抑制物的阴性对照 (inhibitor negative control) 由 Ribobio 公司 (中国) 合成。体外培养 SRA01/04 细胞使其进入对数生长期后, 接种于 6 孔细胞培养板中, 培养 24h 后, 使转染时细胞密度达到 30% ~ 50%。利用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) 将 50nmol/L miR-181 mimic 与 miR-181 mimic control, 100nmol/L miR-181 inhibitor 与 miR-181 inhibitor control 分别转染至 SRA01/04 细胞中, 48h 后进行相关检测。

**1.2.2 紫外线照射诱导细胞凋亡** 紫外灯 (XX-15B,

Spectroline, Westbury, NY, USA) 光谱范围 280 ~ 320nm, 峰值为 312nm, 取对数生长期的 SRA01/04 细胞置于紫外光源下照射, 照射强度为 360μW/cm<sup>2</sup>, 照射时间为 25min<sup>[7]</sup>, 建立人晶状体上皮细胞凋亡模型。照射前将培养液吸净, PBS 冲洗 2 次。照射时加入 0.5mL PBS, 打开培养皿盖。照射后置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下继续培养 4h。对照组置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养。

**1.2.3 Real time q-PCR 检测 miR-181 的表达** 利用 Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, NY, USA) 提取总 RNA, PrimerScript<sup>™</sup> RT 5Enzyme Mix (Takara, 日本) 逆转录为 cDNA。利用 SYBR Premix Ex Taq II (Takara, 日本) 检测 miR-181 的表达量, RNU6B 为内参对照。miR-181、RNU6B 的 RT 引物、特异性上游引物和通用下游引物由 Ribobio 公司 (中国) 合成。利用 ABI 7500 (Applied Biosystems, USA), 反应体系为 20μL, 反应条件为 95℃ 30s; 95℃ 5s, 60℃ 34s, 40 个循环; 95℃ 15s, 60℃ 1min, 95℃ 15s, 循环结束后作出溶解曲线保证产物的特异性。经过 3 次独立实验后, 数据利用公式  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行分析。

**1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率** 利用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (KenGEN, 中国), 用胰酶消化收集细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 1 000rpm 离心 5min, 收集 (1 ~ 5) × 10<sup>5</sup> 细胞, 加入 195μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5μL Annexin V-FITC 混匀后, 室温、避光、孵育 10min, 1 000rpm 离心 5min, 收集细胞, 加入 190μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 10μL Propidium Iodide, 混匀, 室温、避光, 在 1h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

统计学分析: 应用 SPSS16.0 统计学软件, 采用独立样本 *t* 检验进行分析, 数据以均值 ± 标准差表示。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-181 在年龄相关性白内障晶状体组织中的表达

利用 Real time q-PCR 方法, 检测 miR-181 在年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜和正常人眼晶状体前囊膜中的表达情况, RNU6B 作为内参对照。结果显示, 与对照组相比, 年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜组 miR-181 的表达显著升高 ( $t = 7.383, P = 0.002$ , 图 1A), 差异有统计学意义。

### 2.2 miR-181 在人晶状体上皮细胞凋亡模型中的表达

利用 Real time q-PCR 方法, 检测 miR-181 在人晶状体上皮细胞凋亡模型和正常人晶状体上皮细胞系 (SRA01/04) 中的表达情况, RNU6B 作为内参对照。结果显示, 与对照组相比, 人晶状体上皮细胞凋亡模型组 miR-181 的表达显著升高 ( $t = 14.303, P = 0.000$ , 图 1B), 差异有统计学意义。

### 2.3 miR-181 mimic 和 inhibitor 转染效率的验证

向 SRA01/04 细胞中转染 miR-181 mimic 和 mimic negative control, miR-181 inhibitor 和 inhibitor negative control, 为验证转染效率, 转染后 48h 收集细胞, 利用 Real time q-PCR 方法, 检测各组 miR-181 的表达情况。结果显示, 与对照组相比, miR-181 mimic 转染组, miR-181 的表达显著升高 ( $t = 6.746, P = 0.003$ , 图 2A), miR-181 inhibitor 转染组, miR-181 的表达显著降低 ( $t = -12.557, P = 0.000$ , 图 2B), 差异有统计学意义。证明转染有效可以进行后续细胞实验。

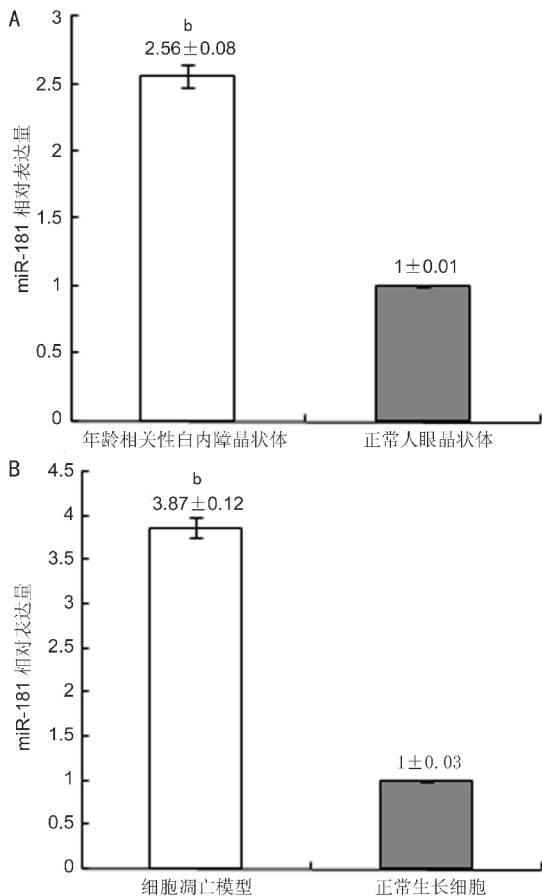


图1 miR-181在年龄相关性白内障晶状体组织和人晶状体上皮细胞凋亡模型中的表达 A:年龄相关性白内障晶状体中miR-181相对表达量,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常人眼晶状体组;B:细胞凋亡模型组中miR-181相对表达量,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常生长细胞组。

**2.4 miR-181 促进人晶状体上皮细胞凋亡** 上述结果提示我们,miR-181可能与人晶状体上皮细胞凋亡密切相关,后续实验中我们进一步探讨了miR-181在人晶状体上皮细胞中的作用。向人晶状体上皮细胞凋亡模型中转染miR-181 mimic和inhibitor,分别上调和下调miR-181的表达,48h后,利用流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化。结果显示,与对照组相比,miR-181 mimic转染组,细胞凋亡率显著升高( $t = 6.905, P = 0.002$ ,图3A),miR-181 inhibitor转染组,细胞凋亡率显著降低( $t = -6.760, P = 0.002$ ,图3B),差异有统计学意义。提示miR-181可能促进人晶状体上皮细胞凋亡。

### 3 讨论

microRNA是一种稳定的非编码小分子RNA,对细胞凋亡、增殖、分化、发育和代谢等生物学过程等进行精细调控。单个microRNA可以作用于多个靶基因,而多个microRNA可以作用于同一靶基因,由此形成了microRNA调控的复杂网络。迄今为止发现的成熟microRNA约一千多种<sup>[13]</sup>。研究表明,microRNA与多种疾病的发生与发展密切相关<sup>[3-6]</sup>。

microRNA在眼部的生长、发育、功能调节等方面发挥着重要作用<sup>[14-16]</sup>。研究表明,microRNA在白内障发病过程中扮演重要角色,其中miR-125b调控人晶状体上

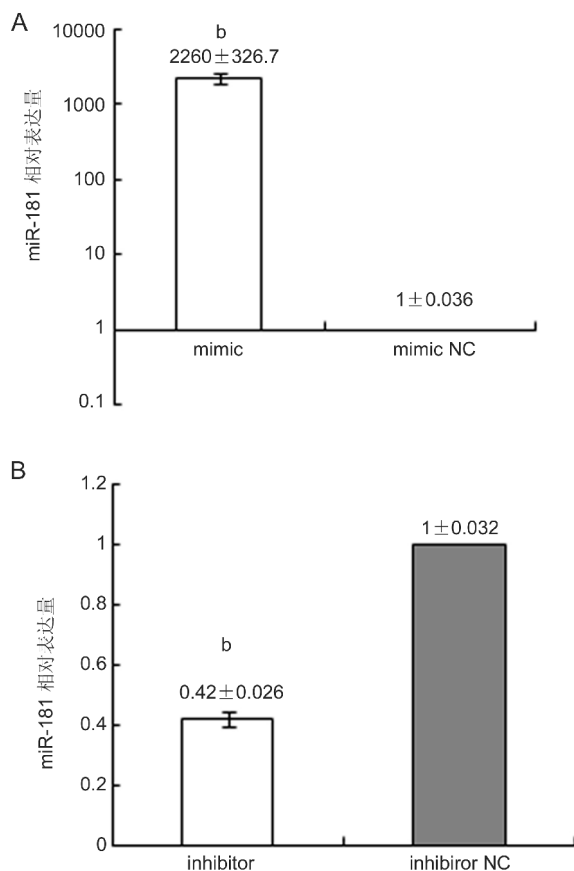


图2 miR-181 mimic和inhibitor转染效率的验证 A:mimic组中miR-181的相对表达量,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs mimic NC组;B:inhibitor组中miR-181相对表达量,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs inhibitor NC组。

皮细胞凋亡影响白内障发病过程<sup>[7]</sup>,let-7家族与年龄相关性白内障的严重程度和发病年龄显著相关<sup>[8]</sup>,miR-31,miR-99可能参与白内障发病机制,miR-184的seed region突变可以导致前极性白内障<sup>[17]</sup>,差异表达的microRNA可能参与晶状体细胞凋亡进而导致白内障的发生发展<sup>[18]</sup>。一些特异性的microRNA在眼部组织包括晶状体、角膜、视网膜中有特定性的表达,并具有一定特点<sup>[19-23]</sup>。其中,miR-181被检测到在晶状体、视网膜及脑组织中有特定的表达<sup>[12,20]</sup>。

miR-181是人类细胞中存在的较为广泛的一种microRNA。有文献报道,miR-181在口腔鳞状细胞癌<sup>[24]</sup>、白血病<sup>[25]</sup>、消化道肿瘤<sup>[26-30]</sup>等多种肿瘤的发生发展中发挥抑癌基因或癌基因的作用。在对子宫颈癌、非小细胞肺癌等疾病的研究中发现,miR-181与细胞凋亡密切相关<sup>[10,11]</sup>。在对后发性白内障的研究中发现,miR-181能够抑制晶状体上皮细胞的增殖、迁移及上皮间质转化<sup>[12]</sup>。

本研究的前期研究中,我们通过TargetScan,Diana-micro T,miRanda等生物信息学软件预测,miR-181可能与凋亡相关蛋白中B淋巴细胞瘤/白血病-2(Bcl-2)家族成员bcl-2,mcl-1等基因存在潜在结合的位点,进一步提示miR-181可能与细胞凋亡密切相关。而晶状体上皮细胞凋亡是除先天性白内障以外其他类型白内障形

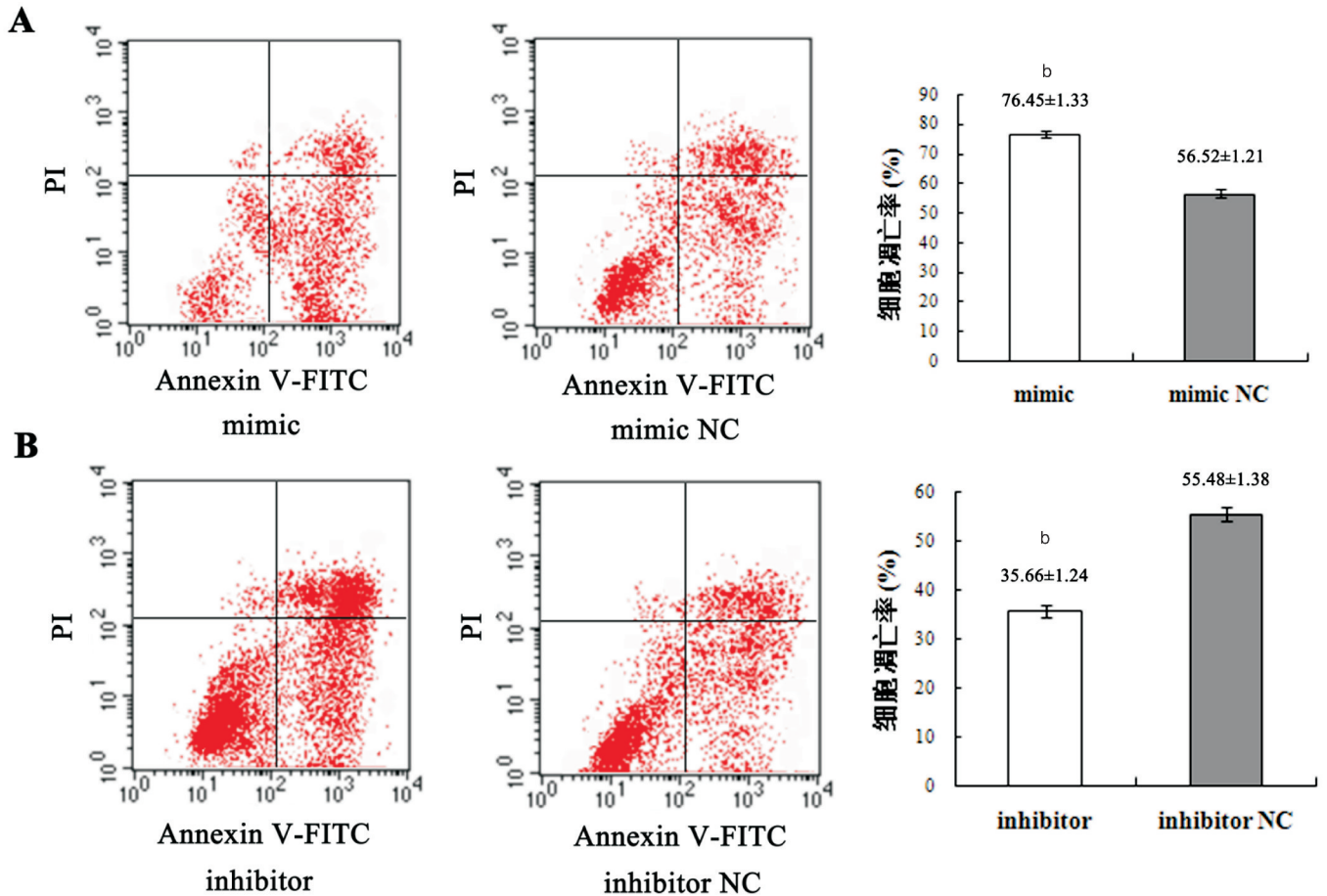


图3 miR-181 对人晶状体上皮细胞凋亡的调控 A:mimic 组流式细胞图及细胞凋亡率,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs mimic NC 组;B:inhibitor 组的流式细胞图及细胞凋亡率,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs inhibitor NC 组。

成的共同细胞学基础<sup>[9]</sup>,因而我们推测,miR-181 很可能调控晶状体上皮细胞凋亡,从而在年龄相关性白内障的发生发展中发挥关键作用。

因此,本研究将 miR-181 调控晶状体上皮细胞凋亡作为研究对象,发现 miR-181 在年龄相关性白内障晶状体组织呈高表达,在我们建立的人晶状体上皮细胞凋亡模型中也呈高表达。接着,我们在人晶状体上皮细胞凋亡模型中调节 miR-181 的表达,进一步观察细胞凋亡的变化。结果发现,miR-181 表达升高时,细胞凋亡率也显著升高,miR-181 表达降低时,细胞凋亡率也显著降低。这一结果提示我们,miR-181 能够促进人晶状体上皮细胞凋亡,在白内障的发病过程中发挥关键的调控作用,可能为白内障非手术治疗提供一条新途径,具有重要的研究价值。

然而 miR-181 调控人晶状体上皮细胞凋亡的具体机制尚不明确。由于一种 microRNA 可以与多种 mRNA 相结合,同时多种 microRNA 可以共同作用于一种 mRNA, microRNA 和靶基因组成了复杂的调节网络<sup>[31-33]</sup>。因此,我们还将进一步探索 miR-181 通过调控哪些靶基因的表达影响人晶状体上皮细胞凋亡,从而在白内障发病过程中发挥作用的。

综上所述,miR-181 在年龄相关性白内障晶状体组织中呈高表达,miR-181 能够促进人晶状体上皮细胞凋亡,从而可能在年龄相关性白内障的发病过程中发挥一定作

用,miR-181 可能成为白内障非手术治疗的一种新途径,但具体机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D109-111
- 2 Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs; how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 2007; 17 (3): 118-126
- 3 Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010; 327(5962): 198-201
- 4 Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 2009; 137(6): 1005-1017
- 5 Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature* 2011; 478(7369): 404-407
- 6 Liu GD, Zhang H, Wang L, et al. Molecular hydrogen regulates the expression of miR-9, miR-21 and miR-199 in LPS-activated retinal microglia cells. *Int J Ophthalmol* 2013; 6(3): 280-285
- 7 Qin Y, Zhao J, Min X, et al. MicroRNA-125b inhibits lens epithelial cell apoptosis by targeting p53 in age-related cataract. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842(12PA): 2439-2447
- 8 Peng CH, Liu JH, Woung LC, et al. MicroRNAs and cataracts: correlation among let-7 expression, age and the severity of lens opacity. *Br J Ophthalmol* 2012; 96(5): 747-751

- 9 Li WC, Kuszak JR, Dunn K, *et al.* Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non – congenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* 1995; 130(1): 169–181
- 10 Zhou WY, Chen JC, Jiao TT, *et al.* MicroRNA–181 targets Yin Yang 1 expression and inhibits cervical cancer progression. *Mol Med Rep* 2015; [Epub ahead of print]
- 11 Huang P, Ye B, Yang Y, *et al.* MicroRNA–181 functions as a tumor suppressor in non–small cell lung cancer (NSCLC) by targeting Bcl–2. *Tumour Biol* 2014; [Epub ahead of print]
- 12 Dong N, Tang X, Xu B. miRNA – 181a inhibits the proliferation, migration, and epithelial–mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(2): 993–1001
- 13 Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, *et al.* A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007; 129(7): 1401–1414
- 14 Li Y, Piatigorsky J. Targeted deletion of Dicer disrupts lens morphogenesis, corneal epithelium stratification, and whole eye development. *Dev Dyn* 2009; 238(9): 2388–2400
- 15 Zhao JJ, Yang J, Lin J, *et al.* Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis. *Childs Nerv Syst* 2009; 25(1): 13–20
- 16 Shen J, Yang X, Xie B, *et al.* MicroRNAs regulate ocular neovascularization. *Mol Ther* 2008; 16(7): 1208–1216
- 17 Hughes AE, Bradley DT, Campbell M, *et al.* Mutation altering the miR–184 seed region causes familial keratoconus with cataract. *Am J Hum Genet* 2011; 89(5): 628–633
- 18 柏凌, 李鹏, 陈凌, 等. microRNA 在氧化应激诱导晶状体上皮细胞凋亡中作用的初步研究. 国际眼科杂志 2014; 14(10): 1770–1772
- 19 Karali M, Peluso I, Gennarino VA, *et al.* miRNeye: a microRNA expression atlas of the mouse eye. *BMC Genomics* 2010; 11: 715
- 20 Ryan DG, Oliveira–Fernandes M, Lavker RM. MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity. *Mol Vis* 2006; 12: 1175–1184
- 21 Xu S, Witmer PD, Lumayag S, *et al.* MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ – specific miRNA cluster. *J Biol Chem* 2007; 282(34): 25053–25066
- 22 Karali M, Peluso I, Marigo V, *et al.* Identification and characterization of microRNAs expressed in the mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(2): 509–515
- 23 Loscher CJ, Hokamp K, Kenna PF, *et al.* Altered retinal microRNA expression profile in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Genome Biol* 2007; 8(11): R248
- 24 Yang CC, Hung PS, Wang PW, *et al.* miR – 181 as a putative biomarker for lymphnode metastasis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011; 40(5): 397–404
- 25 Chen H, Chen Q, Fang M, *et al.* MicroRNA–181b targets MLK2 in HL–60 cells. *Sci China Life Sci* 2010; 53(1): 101–106
- 26 Wang B, Hsu SH, Majumder S, *et al.* TGFβ mediated upregulation of hepatic miR–181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene* 2010; 29(12): 1787–1797
- 27 Jiang J, Zheng X, Xu X, *et al.* Prognostic significance of miR–181b and miR–21 in gastric cancer patients treated with S–1/Oxaliplatin or Doxifluridine/Oxaliplatin. *PLoS One* 2011; 6(8): e23271
- 28 Zhu W, Shan X, Wang T, *et al.* miR–181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. *Int J Cancer* 2010; 127(11): 2520–2529
- 29 Nakajima G, Hayashi K, Xi YG, *et al.* Non–coding MicroRNAs has–let–7g and has– miR–181b are Associated with Chemoresponse to S–1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2006; 3(5): 317–324
- 30 Ji JF, Yamashita T, Budhu A, *et al.* Identification of microRNA–181 by genome – wide screening as a critical player in EpCAM – positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology* 2009; 50(2): 472–480
- 31 Esquela–Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 259–269
- 32 Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs as a potential magic bullet in cancer. *Future Oncol* 2006; 2(1): 73–82
- 33 Kuehbachner A, Urbich C, Zeiher AM, *et al.* Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 2007; 101(1): 59–68