

miR-24 通过靶基因 *Sp1* 调控 β -类珠蛋白表达

马艳妮, 王斌, 巩蓓, 王芳, 赵华路, 张俊武, 余佳

中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

马艳妮, 王斌, 巩蓓, 等. miR-24 通过靶基因 *Sp1* 调控 β -类珠蛋白表达. 生物工程学报, 2013, 29(7): 946-954.

Ma YN, Wang B, Gong B, et al. miR-24 improves β -like globin gene expression through targeting *Sp1*. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 946-954.

摘 要: 为了研究 miR-24 对于珠蛋白表达的调控作用, 并明确其作用机制。首先采用定量 PCR 的方法确定 miR-24 在红系分化过程中的表达变化情况, 以及 miR-24 过表达后珠蛋白的表达变化情况。进而通过报告基因实验以及 Western blotting 的方法确定 miR-24 的靶基因。通过表型回复实验证明 miR-24 是否通过靶基因调控珠蛋白的表达。结果发现在 hemin 诱导的 K562 细胞以及 EPO 诱导的造血干/祖细胞向红系分化过程中, miR-24 表达上调, 在 K562 细胞中过表达 miR-24 可以促进红系分化过程中 ϵ -和 γ -珠蛋白的表达上调, 进一步的研究表明 miR-24 是通过靶基因 *Sp1* 来行使对珠蛋白的调控作用的。以上结果表明 miR-24 通过负调节其靶基因 *Sp1* 促进红系分化过程中珠蛋白的表达上调。

关键词: miR-24, 珠蛋白, *Sp1*, 红系分化, K562 细胞

miR-24 improves β -like globin gene expression through targeting *Sp1*

Yanni Ma, Bin Wang, Bei Gong, Fang Wang, Hualu Zhao, Junwu Zhang, and Jia Yu

State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100005, China

Abstract: We studied the function and mechanism of miR-24 in regulating β -like globin gene expression. We first detected the expression of miR-24 during erythroid differentiation and also detected the globin gene expression in miR-24 overexpressing K562 cells through q-PCR. Dual-luciferase reporter assay and Western blotting were used to identify target genes of miR-24. "Rescue experiment" was further used to investigate the regulation of miR-24 on globin gene expression

Received: January 15, 2013; **Accepted:** March 23, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31201103).

Corresponding author: Jia Yu. Tel: +86-10-69156423; Fax: +86-10-65240529; E-mail: j-yu@ibms.pumc.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31201103) 资助。

网络出版时间: 2013-04-15

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130415.1717.002.html>

whether depending on targeting *Sp1* or not. We found that miR-24 increased during hemin-induced K562 cells and EPO-induced HPCs (hematopoietic progenitor cells) erythroid differentiation. Overexpression of miR-24 in K562 cells promoted the ϵ - and γ -globin gene expression during hemin-induced erythroid differentiation through targeting the negative globin regulator *Sp1*. These results suggested that miR-24 can improve the expression of β -like globin gene through targeting *Sp1*.

Keywords: miR-24, globin, *Sp1*, erythroid differentiation, K562 cells

MicroRNA (miRNA) 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 它们在动植物中参与转录后基因表达调控, 以完全互补或不完全互补的形式与靶 mRNA 结合, 引起靶 mRNA 的降解或抑制靶 mRNA 的翻译进而对靶基因的表达进行负调控^[1-2]。miRNA 作为细胞内一类重要的非编码调控分子, 它所介导的调控作用已经被认为是多细胞生物基因表达转录后水平的一种普遍调节方式^[3-5]。随着被鉴别 miRNA 数量的不断增加和它们功能的陆续阐明, 人们逐渐发现以 miRNA 为主导的基因转录后调控网络几乎参与了各种生命活动的各个环节。

人 β -类珠蛋白基因的表达具有明显的发育阶段时空特异性, 其表达限制在红细胞系内并且由发育程序精确控制^[6-7]。 β -类珠蛋白基因作为研究真核基因表达调控非常好的模型而被广泛研究, 珠蛋白基因的启动子、增强子及位于基因簇上游的位点控制区 (LCR) 等顺式调控元件以及调控珠蛋白表达的各种反式作用因子已经研究得相对清楚, 但调控珠蛋白基因的 miRNA 分子却非常少。因此我们从红系分化过程中差异表达的 miRNA 着手, 希望找到直接或间接调控珠蛋白表达的 miRNA 分子。我们从芯片数据中找到 63 个在红系分化过程中表达变化的 miRNA, 但通过软件预测, 这些 miRNA 都与珠蛋白的

3'UTR 区没有直接的相互作用。而在分化过程中逐渐上升的 miR-24 被预测可以靶向 *Sp1* 这一负调节珠蛋白表达的转录因子。*Sp1* 属于 Sp/Kruppel 转录因子家族, 广泛表达于各种组织, 可与富含 GC 或 GT 盒的 DNA 序列结合行使转录因子功能^[8]。*Sp1* 既可以正向促进靶基因的表达, 也可以通过转录抑制因子的作用负调控一些靶基因^[9-10]。我们在之前的研究中已证明 *Sp1* 对于珠蛋白的负调控作用。而 miR-24 已被广泛报道在多种肿瘤发生过程中具有重要作用, 参与调节细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化等生物学过程^[11-14], 但其在珠蛋白表达中的作用还未见报道。

我们发现 miR-24 在 hemin 诱导的 K562 细胞以及 EPO 诱导的造血干/祖细胞向红系分化过程中表达上升, 且 miR-24 的过表达能够促进 K562 细胞中 ϵ -和 γ -珠蛋白的表达。同时, miR-24 确实可以通过与 *Sp1* 3'UTR 区结合负调节 *Sp1* 的表达, 其对于珠蛋白的调控作用依赖于 *Sp1*。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

K562 细胞和 293T 细胞从中国医学科学院基础所细胞中心购买。淋巴细胞分离液 Ficoll-Hypaque 为 Amersham Biotech 公司产品。CD34+磁珠及分选试剂盒均为 Miltenyi Biotech 公司产品。培养原代细胞所用细胞因子重组人白

介素 3 (rhIL-3), 重组人干细胞因子(rhSCF), 重组人促红细胞生成素(rhEpo) 均购自 R&D 公司。转染试剂 lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品。DharmafectI 转染试剂、miRNA mimic 或 inhibitor 以及 Sp1 siRNA 均为 Dharmacon 公司产品。双荧光检测试剂盒为 Promega 公司产品。提取 RNA 所用 TRIzol 及反转录试剂盒为 Invitrogen 公司产品。实时定量 PCR 所用试剂为 TaKaRa 公司产品。实验中所用抗体分别为: Sp1 抗体 (Milipore); ϵ -珠蛋白抗体 (Santa Cruz); γ -珠蛋白抗体 (Santa Cruz); GAPDH 抗体 (Proteintech)。

1.2 细胞系的培养及诱导分化

人髓性白血病细胞系 K562 细胞培养于 RPMI-1640 培养基中, 293T 细胞培养于 DMEM 培养基中, 每 100 mL 培养液中加入 10 mL 胎牛血清 (FCS), 100 U 青霉素, 100 μ g 链霉素。培养条件均为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 及饱和湿度。K562 细胞于诱导前 1 天更换新鲜的完全培养基, 使其在诱导当天处于对数生长期。于第 2 天向处于对数生长期的 K562 细胞中加入 30 μ mol/L 氯高铁血红素诱导其向红系分化。

1.3 CD34+造血干/祖细胞的分离

将所采集的新鲜脐带血标本以含 2 mmol/L EDTA 的 1 \times PBS 按照 1:4 体积进行稀释, 并用淋巴细胞分离液 Ficoll-Hypaque (密度 1.077 g/mL) 分离得到单个核细胞。单个核细胞进一步经 CD34+磁珠分离得到 CD34+造血干/祖细胞, 具体如下: 2×10^8 单个核细胞重悬于 600 μ L 的分选缓冲液 (含 0.5% BSA 的 PBS) 中, 加入 200 μ L 的 FcR 阻断剂到上清中, 抑制非特异的抗体结

合。进而加入 200 μ L 的 CD34 多重分选微磁珠, 6~12 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 后经分选缓冲液洗涤 1 次, 重悬于适当体积的分选缓冲液中。将 MS 柱放在 MACS 磁铁上, 将细胞悬液加到柱子顶端, 让阴性细胞通过。把柱子移开分离器, 用提供的塞子冲出阳性部分, 分选缓冲液冲洗柱子, 收集阳性细胞。

1.4 CD34+造血干/祖细胞的体外诱导红系分化

分离得到的 CD34+细胞, 按照 1×10^5 cells/mL 的密度将细胞接种于 5 mm 培养皿中, 1 \times IMDM, 30% 进口胎牛血清 (FCS), 1% 牛血清白蛋白 (BSA), 100 μ mol/L β 巯基乙醇 (β -ME), 2 ng/mL 重组人白介素 3 (rhIL-3), 100 ng/mL 重组人干细胞因子 (rhSCF), 60 mg/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素, 2 U/mL 重组人促红细胞生成素 (rhEpo)。

1.5 实时定量 PCR

在分化的不同时间点收集细胞, 根据 TRIzol 操作说明, 提取细胞总 RNA。提取的总 RNA 定量后, 对于蛋白编码基因使用 oligodT 作为逆转录引物, 对于 miRNA 使用 miRNA 特异的逆转录引物, 使用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。使用适量的 cDNA 作为 PCR 模板, BioRad CFX-96 进行 PCR 反应, SYBR 染料实时检测扩增产物的量, 以 GAPDH 为内参分析蛋白编码基因表达情况, 以 U6 为内参分析 miRNA 的表达情况。所使用引物序列见表 1。

1.6 寡核苷酸转染

miR-24 及随机寡核苷酸使用 DharmafectI 转染试剂, 按照操作说明转染 K562 细胞, 终浓度为 60 nmol/L, 转染后 24 h 诱导向红系分化。表

型回复实验使用 miR-24 的抑制型寡核苷酸与 Sp1 siRNA 共转染 K562 细胞, 终浓度各为 50 nmol/L, 转染后 24 h 诱导向红系分化。

1.7 报告基因实验

将 Sp1 3'UTR 区含 miR-24 结合位点的 300~500 bp 序列克隆插入 pMIR-reporter 载体中, 同时构建含与 miR-24 序列完全互补片段的 pMIR-reporter 作为阳性对照。使用搭桥的方法获得 Sp1 3'UTR 区 miR-24 结合位点突变的片段构建相应的突变克隆, 所使用引物见表 1。0.4 μ g pMIR-reporter 质粒, 0.02 μ g pRL-TK, 与 5 pmol

miRNA mimic 或随机寡核苷酸对照共转染 293T 细胞, 转染后 48 h 收集细胞, 按照双荧光检测试剂盒说明书操作, 检测报告基因表达水平。

1.8 Western blotting

收集细胞, 提取总蛋白质, BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离, 并将蛋白样品转移至 PVDF 膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后与兔抗人 Sp1 (1 : 1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后与山羊抗兔二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜后经 ECL 显色, 压片, 显影。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Category	Primer name	Primer sequence (5'-3')
Primers used in reverse transcription	miR-24 RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCTGTTCC
	U6 RT	AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG
Primers used in real-time PCR	miR-24 F	GCTCTGGCTCAGTTCAGCAGG
	miR-24 R	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
	Sp1 F	GCCGTTGGCTATAGCAAATGC
	Sp1 R	CCTCTCCACCTGCTGTGTCA
	U6 F	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT
	U6 R	ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC
	γ -globin F	GCAGCTTGTCACAGTGCAGTTC
	γ -globin R	TGGCAAGAAGGTGCTGACTTC
	ε -globin F	GTCTACCCCTTGACCCAGAGGTTC
	ε -globin R	TGAGCCAGGCCATCACTAAAG
	GAPDH F	TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCA
	GAPDH R	GCTGGTGGTCCAGGGGTCTTACT
Primers used in plasmid construction	SP1_WT F	TTTCCTAAAGCCATCATGCC
	SP1_WT R	TGACAGAAGTGCCTCATCCA
	SP1_MUT S	ATGGCAGTGGATTGTTGTGACAC
	SP1_MUT A	CAACAATCCACTGCCATAGGGAAA

1.9 统计学分析

在数据分析过程中采用双总体 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义, 标注为*, $P < 0.01$ 标注为**, $P < 0.001$ 标注为***。

2 结果与分析

2.1 miR-24 在红系分化过程中表达上升

在 EPO 诱导的造血干/祖细胞向红系分化过程中, 分别于第 4 天、8 天、11 天和 18 天收集细胞检测成熟 miR-24 的表达水平, 发现随着红系分化的进行, miR-24 呈逐渐上升趋势 (图 1A)。在 hemin 诱导的 K562 细胞红系分化过程中, miR-24 也表现出显著的表达上调, 且较原代造血干/祖细胞红系分化过程中的上升更为明显, 如图 1B 所示, 提示其可能对珠蛋白的表达具有一定的调控作用。

2.2 miR-24 的过表达能够促进 K562 细胞中珠蛋白的表达

为了进一步明确 miR-24 对于珠蛋白的调控作用, 我们在 K562 细胞中过表达 miR-24, 从图 2A 中可以看出 miR-24 在 K562 细胞中过表达成

功。进而 hemin 诱导这些细胞向红系分化, 在未诱导以及诱导 48 h 和 72 h 收集细胞检测 γ -及 ϵ -珠蛋白的表达情况。如图 2B 所示, miR-24 的过表达能够明显促进红系分化过程中 γ -珠蛋白的表达, 但在未诱导的情况下, miR-24 的过表达对于珠蛋白无明显影响。同样 miR-24 的过表达也能够促进红系分化过程中 ϵ -珠蛋白的表达 (图 2C)。而且 miR-24 的过表达同样能够促进 γ -及 ϵ -珠蛋白蛋白的表达 (图 2D), 这些结果充分说明 miR-24 确实能够参与调控珠蛋白基因的表达。

2.3 miR-24 靶向转录因子 Sp1

为了明确 miR-24 调节珠蛋白基因表达的机制, 我们通过 Targetscan 预测了 miR-24 的靶基因, 其中之一就是对珠蛋白表达具有负调控作用的转录因子 Sp1, 图 3A 显示 Targetscan 软件预测的 Sp1 3'UTR 区 miR-24 的结合位点。我们进一步通过报告基因实验证明了 miR-24 的过表达能够抑制包含 Sp1 3'UTR 区的报告基因的表达, 而在 Sp1 3'UTR 区 miR-24 的结合位点突变后这种抑制作用消失 (图 3B), 充分说明 miR-24 确实通过与 Sp1 3'UTR 区的相互作用介导了对报告

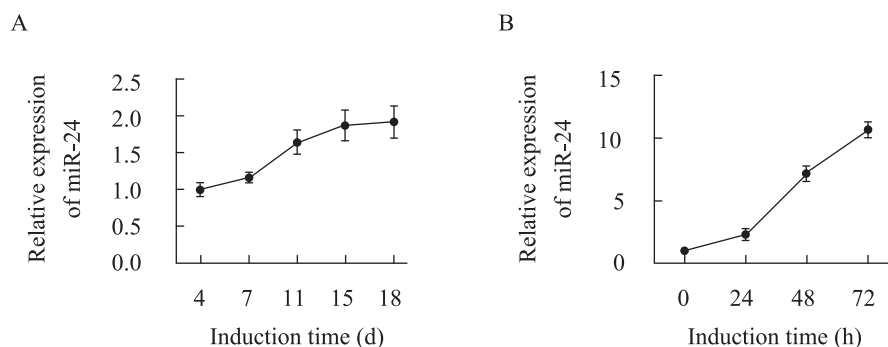


图 1 miR-24 在红系分化过程中表达上升

Fig. 1 miR-24 increased during erythroid differentiation. (A) miR-24 increased during Epo-induced human CD34+ HPCs erythroid differentiation for 4, 8, 11 and 18 days. (B) miR-24 increased during hemin-induced K562 cell erythroid differentiation for 0, 24, 48 and 72 hours.

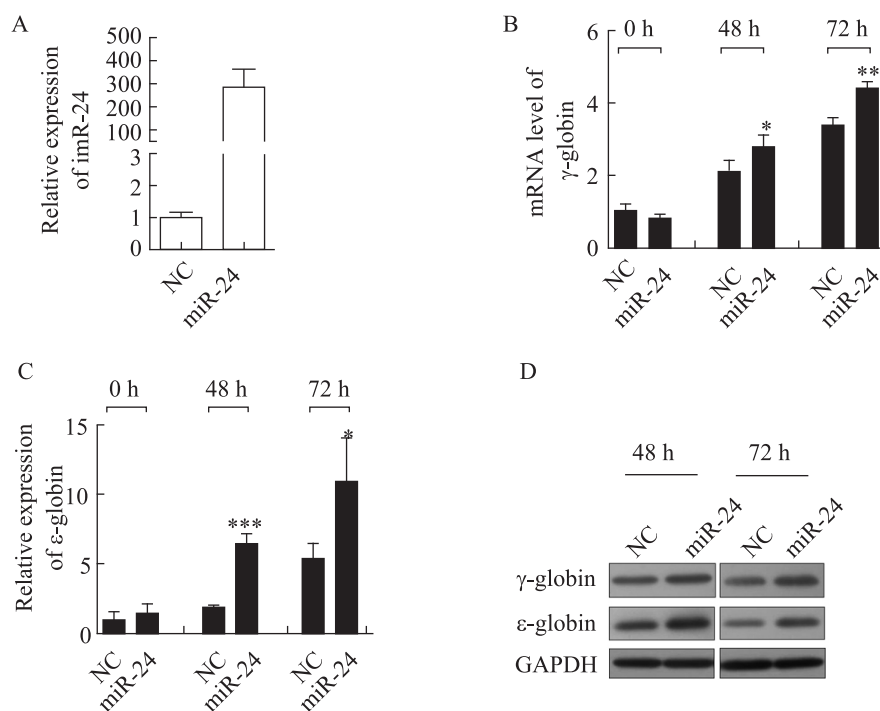


图 2 miR-24 能够促进红系分化过程中 γ -及 ϵ -珠蛋白的表达

Fig. 2 Overexpression of miR-24 improved the γ - and ϵ -globin gene expression during erythroid differentiation. (A) miR-24 was successfully overexpressed in K562 cells. (B) Overexpression of miR-24 improved the γ -globin gene expression in hemin-induced K562 cells for 48 h and 72 h. (C) Overexpression of miR-24 improved the ϵ -globin gene expression in hemin-induced K562 cells for 48 h and 72 h. (D) Overexpression of miR-24 improved the protein level of γ - and ϵ -globin gene expression in hemin-induced K562 cells.

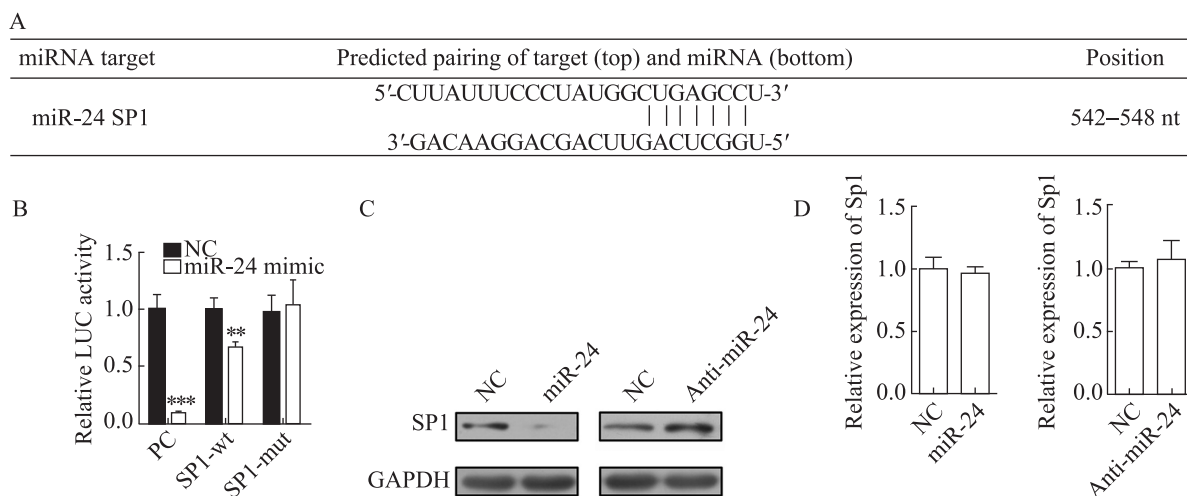


图 3 *Sp1* 是 miR-24 的新靶基因

Fig. 3 *Sp1* was a new target of miR-24. (A) A miR-24 binding site was predicted to be in 3' UTR of *Sp1* by Targetscan. (B) The reporter assay showed that overexpression of miR-24 could repress the activity of luciferase and the repression was depended on the miR-24 binding site. (C) Western blotting of *Sp1* in miR-24 overexpressing or repressing K562 cells. (D) mRNA level of *Sp1* in miR-24 overexpressing or repressing K562 cells.

基因的负调控。为了进一步验证 *Sp1* 是 miR-24 的靶基因,我们在 K562 细胞中过表达 miR-24 或抑制 miR-24 的表达后检测 Sp1 蛋白和 mRNA 水平的变化。如图 3C 所示,miR-24 过表达后 Sp1 的蛋白水平确实出现明显的下降,相反地,miR-24 的抑制却导致 Sp1 蛋白水平的上调。同时,Sp1mRNA 水平变化不明显,说明 miR-24 可能通过抑制 Sp1 翻译影响其蛋白水平(图 3D)。这些结果充分说明 *Sp1* 确实是 miR-24 的新的靶基因。

2.4 miR-24 对于珠蛋白的正调控作用依赖于 Sp1

miR-24 能够促进珠蛋白的表达,又能通过转录后水平抑制 Sp1 这一珠蛋白的负调节因子的表达,那么 miR-24 是否通过靶基因 *Sp1* 行使其对珠蛋白的调控作用呢?我们通过表型回复实验证明了 miR-24 对于珠蛋白的调控作用确实依赖于 Sp1,即我们首先在 K562 细胞中通过抑制型寡核苷酸抑制了 miR-24 的表达,在 miR-24 被抑制后,其靶基因 *Sp1* 的表达上调,同时 γ -及 ϵ -珠蛋白的表达被抑制。而在抑制 miR-24 表达的基础上使用 siRNA 抑制 Sp1 的表达,由 miR-24 抑制所引起的 Sp1 升高被部分抑制,同时 Anti-miR-24 对 γ -及 ϵ -珠蛋白的抑制作用也被回复,充分说明 miR-24 确实通过调节其靶基因 *Sp1* 的表达调控珠蛋白的表达。

3 讨论

miRNA 是非编码 RNA 中研究最为深入,作用机制相对明确的一大类调控分子,其功能广泛,几乎涉及生命活动的各个方面,如组织器官

发育、细胞增殖和凋亡、细菌和病毒感染、细胞代谢和癌症发生与转移等^[15-16]。但关于 miRNA

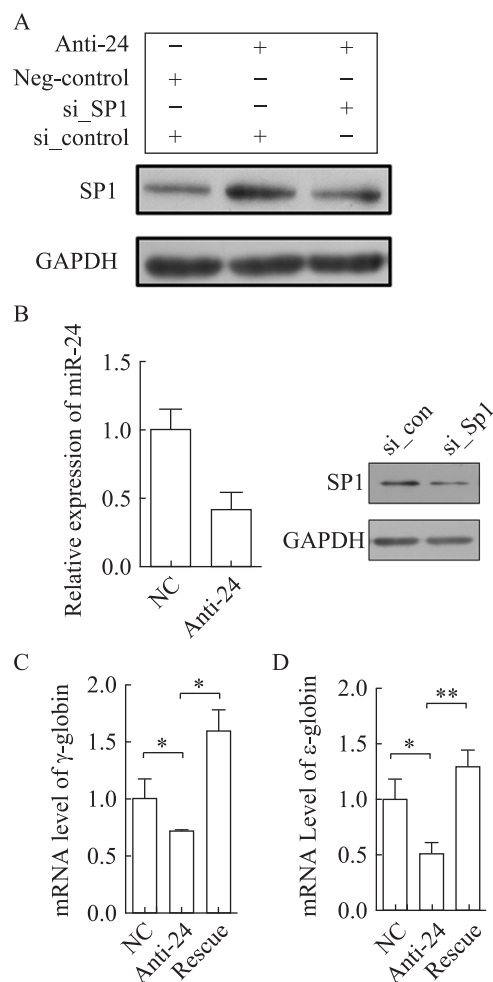


图4 miR-24通过调节 Sp1 的表达发挥对珠蛋白的调控作用

Fig. 4 miR-24 regulated ϵ - and γ -globin gene expression through targeting Sp1. (A) Western blotting of Sp1 in K562 cells which were transfected with miR-24 inhibitors or miR-24 inhibitors combined with si_Sp1 for hemin induction 48 hours. (B) The repression of miR-24 in K562 cells by anti-24 and the suppression of Sp1 by si_Sp1. (C) Real-time PCR analysis of the expression of γ -globin in the above K562 cells. (D) Real-time PCR analysis of the expression of ϵ -globin in the above K562 cells.

在人 β -类珠蛋白基因的表达调控中的报道却非常少,这可能部分因为 β -类珠蛋白基因,包括 ϵ -, γ -, β -珠蛋白基因 3'UTR 非常短,根据软件预测能与之结合的 miRNA 很少,因此限制了 miRNA 在这一领域的研究。miR-96 是唯一一个报道的以 γ -珠蛋白为靶基因的 miRNA 分子,其可以结合至 γ -珠蛋白基因的编码区在转录后水平调节 γ -珠蛋白的表达^[17]。还有一些通过靶向珠蛋白表达相关的转录因子,间接地调节珠蛋白表达,如 miR-144 通过靶基因 *klf4* 特异性地调控 α -珠蛋白的表达^[18], miR-15a 和 miR-16-1 通过靶基因 *MYB* 参与 13 号染色体三体患者中胎儿血红蛋白的高表达^[19]。我们在研究中发现 miR-24 能够促进 hemin 诱导的 K562 细胞中 ϵ -和 γ -珠蛋白的表达,这一发现丰富了 miRNA 在珠蛋白调控领域的研究。且 miR-24 对于珠蛋白的这种促进作用依赖于对转录因子 Sp1 的抑制。转录因子 Sp1 被报道在人鼠杂交细胞系 A181 γ 中可与 β -类珠蛋白启动子区及珠蛋白上游高敏位点结合,并募集组蛋白去乙酰化酶从而抑制珠蛋白的表达^[20]。因此在红系分化起始阶段,Sp1 结合于珠蛋白基因上游,募集组蛋白去乙酰化酶,使得组蛋白去乙酰化而结合区域的染色质丧失转录活性。而 miR-24 能够抑制 Sp1 的表达,使 Sp1 表达下降,珠蛋白基因上游 DNA 区域被释放,进一步通过蛋白相互作用募集 PCAF 组蛋白乙酰化酶使得组蛋白乙酰化从而激活珠蛋白基因的转录。

miR-24 已被广泛报道参与调节细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化等生物学过程,但关于其在珠蛋白表达中的调控作用,我们是首次报道。另外有一篇 miR-24 参与调节红系分化的报道,认为 miR-24 通过靶向 ALK4 (Activin type I receptor)

阻断 K562 细胞对 activin A 的反应,从而抑制 activin A 所介导的红系分化以及红系分化过程中血红蛋白的积累^[21]。但在我们的研究中却发现 miR-24 能够促进 hemin 诱导的 k562 细胞中珠蛋白的表达,说明不同信号所引发的红系分化过程是不同的,而同一个分子也可能在两个不同诱发剂所引起的相似过程中起不同作用。

总之,我们发现 miR-24 在红细胞分化过程表达上调且对于珠蛋白的表达具有重要调控作用,miR-24 的过表达可促进 hemin 诱导的 K562 细胞中 ϵ -、 γ -珠蛋白的表达上升,且 miR-24 对珠蛋白的促进作用是通过抑制负调节珠蛋白表达的转录因子 Sp1 实现的。

REFERENCES

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Borel C, Deutsch S, Letourneau A, et al. Identification of cis- and trans-regulatory variation modulating microRNA expression levels in human fibroblasts. *Genome Res*, 2011, 21(1): 68-73.
- [3] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 597-610.
- [4] Herranz H, Cohen SM. MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems. *Genes Dev*, 2010, 24 (19): 1339-1344.
- [5] Frost RJ, van Rooij E. miRNAs as therapeutic targets in ischemic heart disease. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010, 3(3): 280-289.
- [6] Baron MH. Developmental regulation of the vertebrate globin multigene family. *Gene Expr*, 1996, 6(3): 129-137.
- [7] Stamatoyannopoulos G, Ntenhuis AW. Hemoglobin Switching: Molecular Basis of Blood

- Diseases. 2nd ed. Philadelphia: Philadelphia Press, 1994: 107–156.
- [8] Bouwman P, Philipsen S. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 195(1/2): 27–38.
- [9] Dynan WS, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, 1983, 35(1): 79–87.
- [10] Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biol*, 2003, 4(2): 206.
- [11] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): 1290–1297.
- [12] Lal A, Kim HH, Abdelmohsen K, et al. p16(INK4a) translation suppressed by miR-24. *PLoS ONE*, 2008, 3(3): e1864.
- [13] Lal A, Navarro F, Maher CA, et al. miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to “seedless” 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell*, 2009, 35(5): 610–625.
- [14] Takagi S, Nakajima M, Kida K, et al. MicroRNAs regulate human hepatocyte nuclear factor 4alpha, modulating the expression of metabolic enzymes and cell cycle. *J Biol Chem*, 2010, 285(7): 4415–4422.
- [15] Beezhold KJ, Castranova V, Chen F. Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. *Mol Cancer*, 2010, 9: 134.
- [16] Herranz H, Cohen SM. MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems. *Genes Dev*, 2010, 24(13): 1339–1344.
- [17] Azzouzi I, Moest H, Winkler J, et al. MicroRNA-96 directly inhibits γ -globin expression in human erythropoiesis. *PLoS ONE*, 2011, 6(7): e22838.
- [18] Fu YF, Du TT, Dong M, et al. Mir-144 selectively regulates embryonic α -hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis. *Blood*, 2009, 113(6): 1340–1349.
- [19] Sankaran VG, Menne TF, Šćepanović D, et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (4): 1519–1524.
- [20] Feng D, Kan YW. The binding of the ubiquitous transcription factor Sp1 at the locus control region represses the expression of beta-like globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (28): 9896–9900.
- [21] Wang Q, Huang Z, Xue H, et al. MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood*, 2008, 111(2): 588–595.

(本文责编 陈宏宇)