

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00488

缺失 *mir122* 抑制斑马鱼肝脏前体细胞向肝细胞分化

徐冉冉¹, 张从伟², 曹羽¹, 王强¹

1. 中国科学院动物研究所, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100101;
2. 河北省安国市医院外科门诊, 保定 071200

摘要: 作为机体内最大的脏器之一, 肝脏对于机体的新陈代谢、解毒作用以及内环境的稳定有着重要的作用。FGF、BMP 以及 WNT 信号通路及众多转录因子形成的基因调节网络精密调控着肝脏的发育, 然而小分子 RNA 在肝脏形成中的功能却所知甚少。近年来的研究发现, *mir122* 在肝细胞中高表达, 对于维持肝脏的代谢功能起着至关重要的作用, 但是其在肝脏发育中的功能还不清楚。为了深入探讨 *mir122* 在斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎发育中的作用, 文章首先检测了 *mir122* 在发育过程中的时空表达, 发现 *mir122* 特异表达在肝脏, 并且在肝脏前体细胞向肝细胞分化过程中表达水平显著增高。文章还通过用反义核苷酸 Morpholino (MO) 敲降 *mir122* 的表达, 发现敲降 *mir122* 对肝脏前体细胞的起源、肝原基的形成以及肝脏前体细胞的增殖没有明显的影响, 但是, *mir122* 的缺失导致肝脏前体细胞不能分化为肝细胞。因此, *mir122* 不仅参与了成体肝脏代谢功能的调节, 还在肝脏前体细胞向肝细胞分化过程中不可或缺。

关键词: *mir122*; 肝脏前体细胞; 细胞分化; 肝脏; 斑马鱼

mir122 deficiency inhibits differentiation of zebrafish hepatoblast into hepatocyte

XU Ran-Ran¹, ZHANG Cong-Wei², CAO Yu¹, WANG Qiang¹

1. State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
2. Department of Outpatient Surgery, Anguo City Hospital of Hebei Province, Baoding 071200, China

Abstract: As one of the largest internal organs in the body, liver is very important for metabolism, detoxification and homeostasis. It's reported that liver development is accurately regulated by a gene regulating network consists of FGF, BMP, WNT signal pathways and a lot of transcription factors. However, the functions of microRNA are poorly understood during liver formation. In recent years, it has been reported that *mir122* is highly expressed in hepatocytes, and plays a vital role in the metabolic processes of the liver, but its function in liver development remains unclear. In this study, we report that *mir122* is specifically expressed in zebrafish (*Danio rerio*) embryonic liver, and its expression level is notably increased during the differentiation process of hepatoblast into hepatocyte. *mir122* inactivation by an antisense morpholino has no

收稿日期: 2013-02-05; 修回日期: 2013-03-18

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2011CBA01101)和国家自然科学基金项目(编号: 30971656)资助

作者简介: 徐冉冉, 硕士研究生, 专业方向: 发育生物学。Tel: 010-64807891; E-mail: xuranranhope@gmail.com

通讯作者: 王强, 研究员, 研究方向: 发育生物学。E-mail: qiangwang@ioz.ac.cn

网络出版时间: 2013-3-19 10:13:17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130319.1013.002.html>

influence on the specification, budding and outgrowth of hepatoblast. However, zbrafish hepatoblast can not differentiate into hepatocyte without *mir122*. Therefore, *mir122* is not only involved in liver metabolic functions, but also indispensable for hepatoblast differentiation.

Keywords: *mir122*; hepatoblast; cell differentiation; liver; zebrafish

肝脏是人体重要的器官, 发挥着许多重要的生理机能, 包括新陈代谢、解毒作用及维持内环境的稳定。阐明肝脏的发育机制、生理功能及再生分子机理, 是发育生物学和基础医学的研究热点之一。斑马鱼(*Danio rerio*)和哺乳动物的肝脏有着类似的发育过程和进化上保守的分子机制, 而且早期胚胎的透明性使得可以活体实时观察肝脏的发育过程, 因此非常适合作为研究肝脏发育研究模式动物^[1-3]。斑马鱼肝脏的发育大致可以分为3个阶段: 第一阶段是肝脏前体细胞的起源。精卵结合后, 经过早期的原肠运动, 位于腹侧的前肠内胚层细胞在起源于邻近组织的FGF、BMP以及WNT诱导下分化为肝脏前体细胞(Hepatoblast)。第二阶段是肝脏原基的形成。肝脏原基的形成开始于28 hpf (Hours post fertilization), 首先是第一体节下内胚层的增厚, 然后增厚的区域向左生长, 最终, 连接肝脏和肠道的肝胆管的形成标志着肝脏出芽的完成。第三阶段是肝脏的快速增殖期。细胞数量迅速增加并开始特定的形态发生过程。与此同时, 肝脏前体细胞分化成为有功能的肝细胞及胆管细胞(50 hpf~96 hpf)^[3]。

FGF、BMP以及WNT信号通路在肝脏的发育过程中发挥着重要作用。在前肠内胚层细胞向肝脏前体细胞分化之前, 抑制BMP或FGF信号通路, 斑马鱼中肝脏前体细胞的标识基因*hhex*和*prox1*表达显著降低, 说明BMP和FGF信号通路对肝脏前体细胞的诱导是必需的^[4]。另外, Wnt2bb和Wnt2在肝脏发育的多个阶段, 包括肝脏前体细胞的起源和快速增殖时期, 都具有重要的调控作用^[5]。众多的转录因子也参与了肝脏的发育。Foxa^[6]、Gata^[7]和Hnf^[8]家族转录因子在肝脏发育的多个阶段有着至关重要的调控作用。但是, 小分子RNA在肝脏形成中的功能却所知甚少。MicroRNAs(miRNAs)最早发现于线虫(*Caenorhabditis elegans*)中, 是一种包含大约22个核苷酸的非编码内源性RNA。它们通过与mRNA 3'

端非编码区结合致使其降解或抑制其翻译, 发挥重要的调节作用。miRNAs广泛存在于植物、动物及单细胞的真核生物中, 在细胞增殖、分化和凋亡过程中都发挥着重要的功能^[9], 然而小分子RNA在肝脏发育中的功能却所知甚少。

*mir122*是一种肝脏特异的miRNA, 在肝细胞中的表达量高达50 000拷贝以上, 大约是成熟肝脏中全部miRNA的70%^[10,11]。同时, 在小鼠和人类胚胎发育过程中, 其肝脏中*mir122*表达量急剧增多^[11,12]。已有研究证明, *mir122*可能参与了脂代谢、肝癌以及丙型肝炎病毒和乙型肝炎病毒的感染等生理病理过程, 但是其在肝脏发育中的功能还不清楚^[13-15]。本文以斑马鱼为模式动物, 检测了*mir122*在早期胚胎发育中的时空表达, 并且初步分析了其在肝脏发育过程中的功能。原位杂交的结果表明, *mir122*特异的表达在斑马鱼的肝脏中。抑制*mir122*表达虽然对于肝脏前体细胞的特化、肝原基形成以及快速增殖过程没有明显影响, 但是阻滞了肝脏前体细胞向功能性肝细胞分化。这些发现有助于深入理解脊椎动物肝脏的发育调控分子机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验中所用到的野生型斑马鱼为Tuebingen品系。*lfabp:dsRed*转基因斑马鱼为浙江大学彭金荣教授惠赠, *sox17:GFP*转基因斑马鱼为清华大学孟安明教授惠赠。胚胎在Holtfreter液(0.05 g/L KCl, 0.1 g/L CaCl₂, 0.2 g/L NaHCO₃, 3.5 g/L NaCl, pH值为7.0)中, 28.5℃培养至所需时期。

1.2 方法

1.2.1 探针制备

LNA(Locked Nucleic Acid, LNA)修饰的*mir122*探针由Exiqon公司合成。*foxa2*、*hhex*、*prox1*和*fabp10*

探针质粒为西南大学黄红辉教授惠赠, 利用 MEGAscript 试剂盒(Ambion)进行体外转录, 合成地高辛标记的反义 RNA 探针。

1.2.2 *mir122* 吗啉环修饰反义寡核苷酸(Morpholinos, MO)

本研究根据 *mir122* 的序列, 设计了与其序列完全互补的 MO (*mir122* MO) (5'-ATACAAACACCAT TGTCACACTCCA-3'), 并由 Gene Tools 公司合成。

1.2.3 斑马鱼胚胎显微注射及原位杂交

在斑马鱼胚胎受精后的单细胞时期, 每枚胚胎注射 4 ng MO。发育至所需时期后收集斑马鱼胚胎, 经 4%多聚甲醛固定过夜并复水, 蛋白酶 K 消化适当时间, 随后在杂交液里进行预杂交 2 h 以上, 再加入反义 RNA 探针, 65 °C 杂交过夜。第 2 d, 65 °C 杂交缓冲液洗涤胚胎, 然后杂交阻断液室温封闭 1 h。SSCT 洗脱, anti-dig-AP 孵育过夜, MABT 洗脱, NBT/BCIP 显色。样品 4 °C 保存于 90%甘油中拍照。

1.2.4 石蜡切片及伊红染色

将原位杂交后的胚胎包埋于石蜡中, 石蜡切片机进行切片。温水展片后, 转移至载玻片进行伊红染色, 最后封片拍照。

1.2.5 激光扫描共聚焦显微成像

收集所需时期的转基因胚胎, 用 4%多聚甲醛固定过夜后, 固定于低熔点琼脂糖中, 利用 META Zeiss 510 激光共聚焦显微镜拍摄胚胎肝脏区域, 从而获得共聚焦堆叠图像。

2 结果与分析

2.1 *mir122* 在斑马鱼胚胎肝脏中特异表达

已有研究证明 *mir122* 在受精后 72 h 特异的表达在斑马鱼的肝脏中^[12]。为了进一步确定 *mir122* 在斑马鱼胚胎发育过程中的表达情况, 本研究首先通过原位杂交技术分析了其在斑马鱼多个发育时期的表达。结果显示, 在 36 hpf 可在肝脏位置特异的检测到 *mir122* 的表达, 但表达水平较低。随着胚胎发育的进行, 从 48 hpf 开始, 一直到 96 hpf, *mir122* 的表达量持续升高(图 1A)。为了进一步分析 *mir122* 在胚胎肝脏中表达的部位, 通过石蜡切片技术, 将原位杂交后 72 hpf 的胚胎横切, 进行伊红染色, 发现 *mir122* 表达整个肝脏组织中(图 1B)。*mir122* 在斑马鱼胚胎肝脏中的特异表达, 表明其可能在肝脏早期发育中具有重要功能。

2.2 抑制 *mir122* 的表达不影响斑马鱼肝脏前体细胞的特化、肝原基形成

为了研究 *mir122* 在斑马鱼胚胎肝脏发育中的功能, 本研究合成了与 *mir122* 成熟序列互补的吗啉环修饰寡核苷酸, 即 *mir122* MO。在斑马鱼胚胎受精后单细胞时期注射 4 ng 的 *mir122* MO, 然后在 72 hpf 原位杂交检测 *mir122* 的表达。与对照相比, 大约 80%的胚胎中几乎检测不到 *mir122* 的表达(图 2A), 说明 *mir122* MO 可以有效的抑制内源性 *mir122* 的活性。肝脏起源于前肠内胚层细胞。在 28 hpf, 我们首先检测内胚层标识基因 *foxa2* 及肝脏前体细胞的标识基因 *hhex* 的表达^[16]。结果表明, *mir122* 的缺失

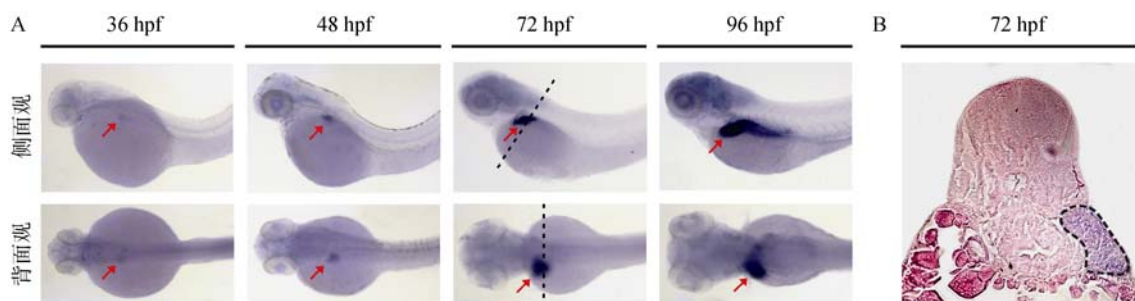


图 1 *mir122* 在斑马鱼胚胎发育过程中在肝脏特异表达

A: 原位杂交检测 *mir122* 在斑马鱼胚胎中的时空表达。胚胎发育时期如图中所示, 红色箭头指向斑马鱼胚胎的肝脏。B: 斑马鱼胚胎在 72 hpf 原位杂交后, 石蜡切片分析 *mir122* 在肝脏的表达部位(垂直于胚胎体轴横切)。A 中黑色虚线为 B 图横切面位置; B 中黑色虚线标出的区域为肝脏。

对于 *foxa2* 和 *hhex* 的表达水平没有明显的影响(图 2B)。为了分析肝原基的形成是否受到 *mir122* 的调控, 本研究进一步在 34 hpf 检测了肝原基细胞迁移的标识基因 *prox1* 和 *hhex* 的表达, 发现抑制 *mir122* 的表达, 在受精 34 h 后 *prox1* 和 *hhex* 的表达也没有明显变化(图 2C)。与上述结果一致, 在 *Tg(sox17:GFP)* 转基因斑马鱼胚胎中敲降 *mir122*, 然后在 34 hpf 发现肝原基仍然可以正常形成(图 2D)。因此, *mir122* 不是斑马鱼前肠内胚层向肝脏前体细胞分化及肝原基形成所必需的。

2.3 敲低 *mir122* 表达抑制肝脏前体细胞向成熟肝细胞分化

由于斑马鱼肝脏的出芽生长过程会持续到 48 hpf 左右, 本文进一步检测了这个时期 *hhex*、*prox1* 的表达(图 3A), 仍然没有观察到明显的变化。而且, 在 *Tg(sox17:GFP)* 转基因斑马鱼胚胎中敲降 *mir122*, 在 48 hpf 发现肝原基于对照胚胎没有明显差别仍然可以正常形成(图 3B)。这些结果说明, 在受精后 48 h, 敲降 *mir122* 没有在细胞数目及发育形态上影响肝脏的发育, 而且进一步表明 *mir122* 不参与斑马鱼前肠

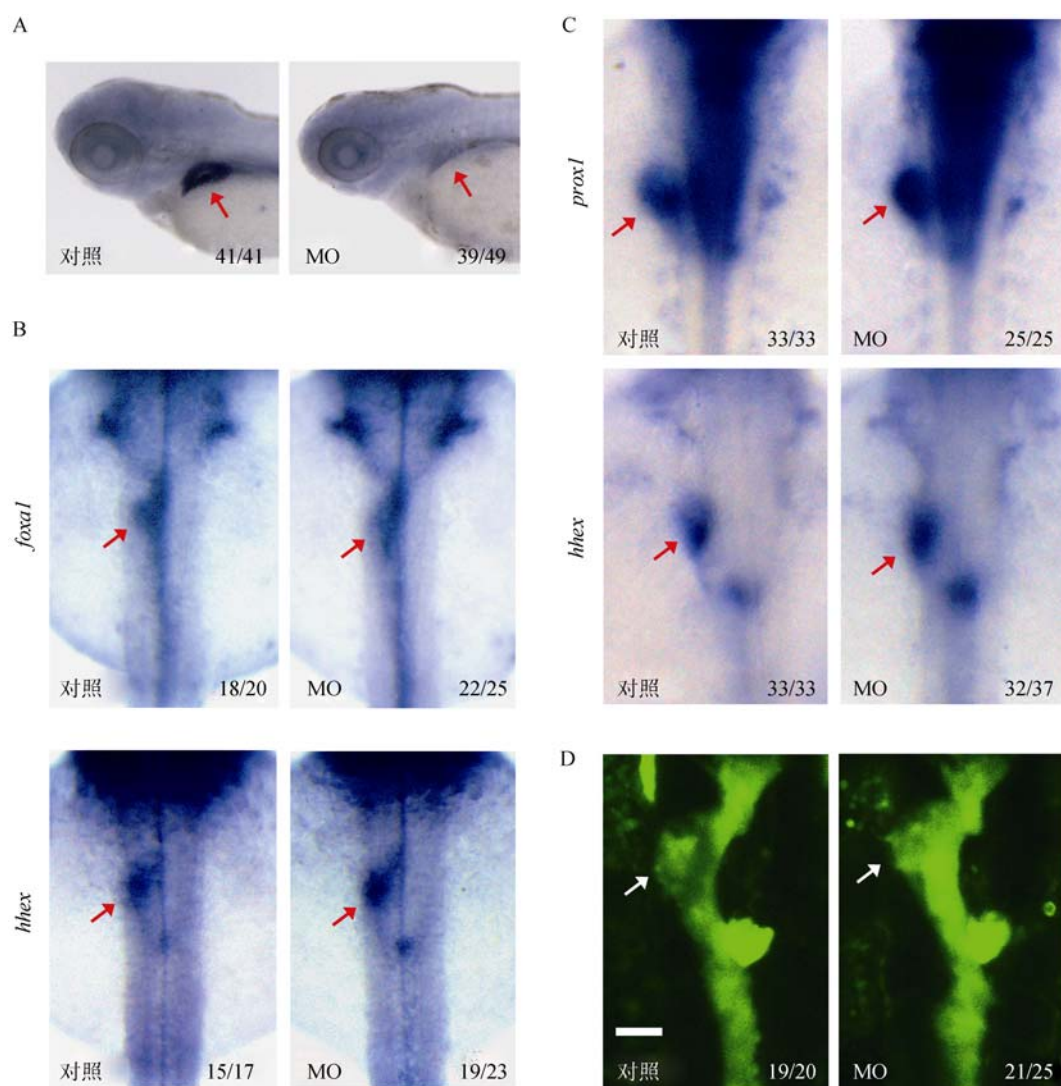


图 2 敲降 *mir122* 对斑马鱼前肠内胚层向肝脏前体细胞分化及肝原基形成没有影响

A: 检测 *mir122* MO 的有效性。在斑马鱼胚胎单细胞时期注射 4 ng *mir122* MO, 72 hpf 收集胚胎原位杂交检测 *mir122* 表达(侧面观)。B: 注射 *mir122* MO 后, 28 hpf 原位杂交检测 *foxa1*、*hhex* 的表达(背面观)。C: 注射 *mir122* MO 后, 34 hpf 原位杂交检测 *prox1*、*hhex* 的表达。D: 注射 *mir122* MO 后, 34 hpf 在 *sox17:GFP* 转基因胚胎中共聚焦成像观察肝原基的形成。红色和白色箭头均指向斑马鱼胚胎的肝脏。标尺长度: 50 μ m。

内胚层向肝脏前体细胞分化及肝原基形成。然而, 在敲低 *mir122* 的胚胎, 其成熟肝细胞的标识基因脂肪酰结合蛋白基因 *fabp10* 表达水平显著降低(图 3C), 说明 *mir122* 可能影响了肝细胞的成熟。为了进一步检测 *mir122* 在肝脏前体细胞向成熟肝细胞分化中的

功能, 在 *Tg(lfabp:dsRed)* 胚胎中注射 *mir122* MO (4 ng), 并在发育至 72 hpf 进行激光扫描共聚焦显微成像。结果发现, 与对照相比, 敲低 *mir122* 的表达后, 几乎检测不到肝脏部位的红色荧光(图 3D)。此外, 本文还在 72 hpf 检测了成熟肝细胞的另一标识基因

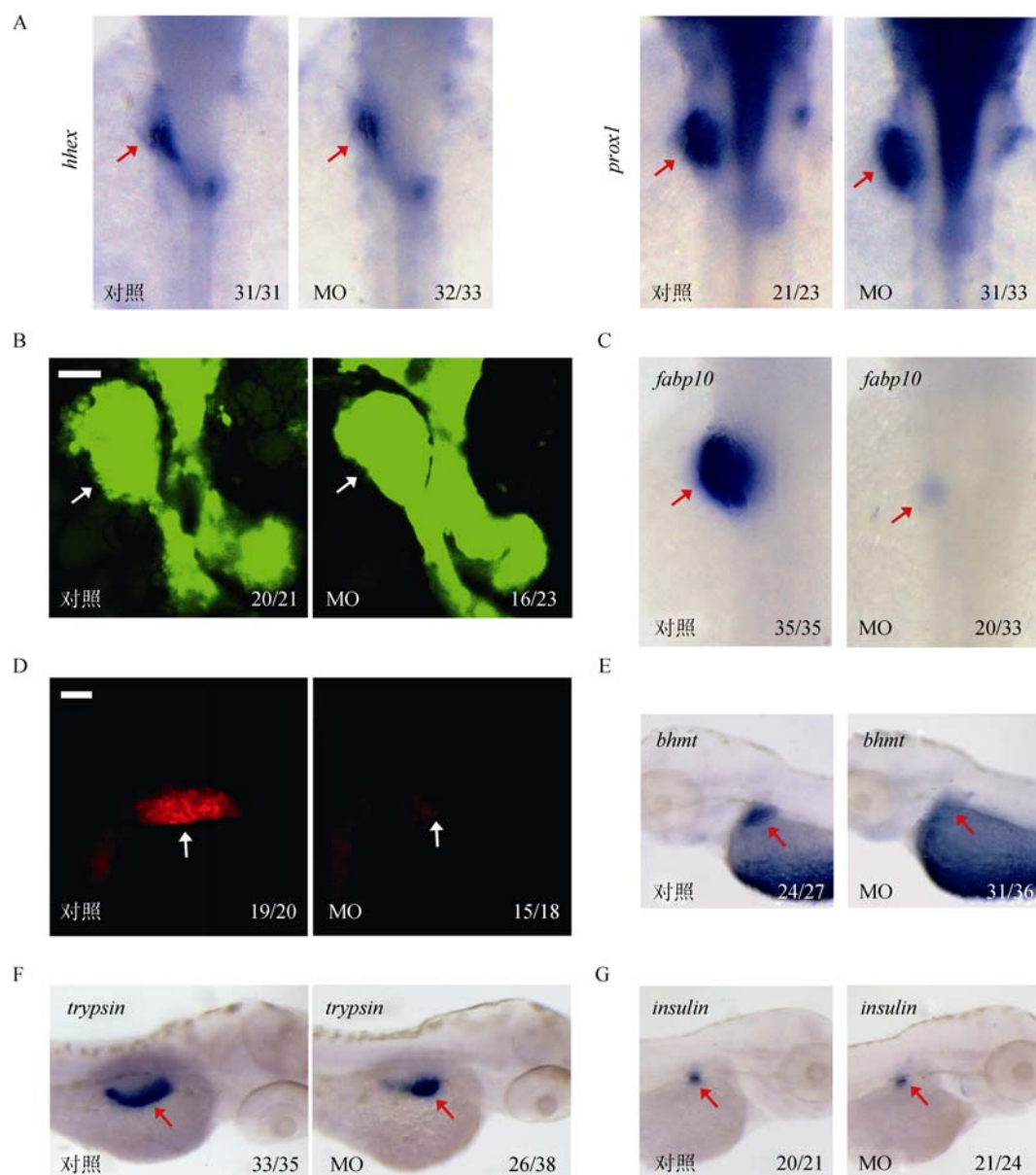


图 3 *mir122* 是肝脏前体细胞分化为成熟肝细胞所必需的

A: 显微注射 4 ng *mir122* MO, 48 hpf 原位杂交检测 *hhx*、*prox1* 的表达。B: 在 *sox17:GFP* 转基因胚胎中显微注射 4 ng *mir122* MO, 48 hpf 共聚焦成像观察肝脏的形态。C: 48 hpf 原位杂交检测敲降 *mir122* 对 *fabp10* 表达的影响。图中 A-C 均为背面观, 头部向上。D: 在 *lfabp:dsRed* 转基因胚胎中显微注射 4 ng *mir122* MO, 72 hpf 共聚焦成像观察肝脏区域红色荧光表达的变化; E: 72 hpf 原位杂交检测敲降 *mir122* 对 *bhmt* 表达的影响。侧面观, 头部在左边。F 和 G: 72 hpf 原位杂交检测敲降 *mir122* 对外分泌胰腺 *trypsin* (F) 和内分泌胰腺标识基因 *insulin* (G) 表达的影响。侧面观, 头部在右边。图 A~E 中, 红色和白色箭头均指向斑马鱼胚胎的肝脏, 图 F 和 G 中, 红色箭头分别指向斑马鱼胚胎外分泌胰腺和内分泌胰腺。标尺长度: 50 μ m。

甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶 *bhmt*(betaine-homocysteine methyltransferase)^[8]。结果显示, 敲降 *mir122*, *bhmt* 在肝脏的表达也显著减少(图 3E)。有研究表明, 肝脏与外分泌胰腺的前体细胞有着相同的起源^[2,17,18]。因此, 本文进一步检测了敲低 *mir122* 对胰腺的影响。在斑马鱼受精后 72 h, 分别用外分泌胰腺 *trypsin* 和内分泌胰腺标识基因 *insulin* 进行原位杂交。结果表明, 敲低 *mir122* 的胚胎中, 外分泌胰腺发育受到一定影响(图 3F), 而内分泌胰腺没有明显变化(图 3G)。以上结果说明, 抑制 *mir122* 的表达阻碍了肝脏前体细胞分化为成熟的肝细胞。

3 讨论

2002 年, Lagos-Quintana 等^[19]通过从不同的小鼠组织中对小分子 RNA 进行克隆和测序, 发现 *mir122* 是肝脏特有的 microRNA。*mir122* 被证明是成年肝脏中含量最丰富的 microRNA, 约占 microRNA 总量的 70%^[10,11]。有研究表明, *mir122* 在肝脏代谢中有重要调控作用。用反义核苷酸抑制 *mir122* 后, 数个参与脂肪代谢的基因表达下调。在高脂小鼠模型中沉默 *mir122* 表达, 肝脂肪变性得以改善, 胆固醇合成率降低, 但其氧化率增强^[13]。*mir122* 具有抑制肝脏肿瘤(Hepatocarcinoma, HCC)发生的作用。在人肝癌组织中, *mir122* 的表达显著降低^[20]。在 HCC 来源的细胞系中, *mir122* 靶向细胞周期蛋白 Cyclin G1。原发性肝癌组织中 *mir122* 表达下降, Cyclin G1 表达升高, 被认为是肝脏肿瘤发生的重要因素^[14]。在病理状态下, *mir122* 与丙型肝炎病毒(HCV)密切相关, 可能通过和 HCV 5' UTR 结合, 正向调控基因表达, 促进 HCV RNA 复制^[15]。另外, 在小鼠胚胎发育的第 12.5 d 即可检测到 *mir122* 的表达, 在 17.5 d *mir122* 的表达水平达到其峰值的一半, 表明 *mir122* 可能参与了肝脏发育的调控^[21]。在 HCC 来源的细胞系中, 发现 *mir122* 可以靶向转录抑制因子 CUTL1, 调控肝细胞功能性基因, 如胆固醇羟化酶 CYP7A1 的表达, 参与肝细胞的增殖和分化^[22]。但是在整体动物水平, *mir122* 在肝脏发育中的功能还不清楚。

本研究发现在斑马鱼受精后 36 hpf 可在肝脏检测到 *mir122* 的表达, 但表达水平较低。前肠内胚层细胞向肝脏前体细胞分化大约开始于 24 hpf, 而肝

脏原基的形成开始于 28 hpf。因此, 敲降 *mir122* 对肝脏前体细胞的特化、肝原基形成没有影响可能是因为此时 *mir122* 没有表达或表达较低。从 48 hpf 开始, 一直到 96 hpf, *mir122* 的表达量持续升高。这个时期是肝脏的快速增殖期, 而且肝脏前体细胞分化成为有功能的肝细胞。在本研究中, 缺失 *mir122* 阻滞了肝脏前体细胞向肝细胞分化, 但没有影响肝脏前体细胞的快速增殖, 说明 *mir122* 可能参与调控了肝脏前体细胞分化相关基因的表达。虽然本研究目前还没有鉴定到 *mir122* 的直接的靶基因, 但这些发现有助于深入理解脊椎动物肝脏的发育调控分子机理。

参考文献(References):

- [1] Lu JW, Hsia Y, Tu HC, Hsiao YC, Yang WY, Wang HD, Yuh CH. Liver development and cancer formation in zebrafish. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2011, 93(2): 157–172. DOI
- [2] Ober EA, Field HA, Stainier DYR. From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mech Dev*, 2003, 120(1): 5–18. DOI
- [3] Tao T, Peng JR. Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). *J Genet Genomics*, 2009, 36(6): 325–334. DOI
- [4] Shin D, Shin CH, Tucker J, Ober EA, Rentzsch F, Poss KD, Hammerschmidt M, Mullins MC, Stainier DYR. Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish. *Development*, 2007, 134(11): 2041–2050. DOI
- [5] Poulain M, Ober EA. Interplay between Wnt2 and Wnt2bb controls multiple steps of early foregut-derived organ development. *Development*, 2011, 138(16): 3557–3568. DOI
- [6] Lee CS, Friedman JR, Fulmer JT, Kaestner KH. The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature*, 2005, 435(7044): 944–947. DOI
- [7] Zhao R, Watt AJ, Li JX, Luecke-Wheeler J, Morrissey EE, Duncan SA. GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(7): 2622–2631. DOI
- [8] Cheng W, Guo L, Zhang ZH, Soo HM, Wen CM, Wu W, Peng JR. HNF factors form a network to regulate liver-enriched genes in zebrafish. *Dev Biol*, 2006, 294(2): 482–496. DOI
- [9] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297. DOI
- [10] Filipowicz W, Grosshans H. The liver-specific microRNA

- miR-122: biology and therapeutic potential. *Prog Drug Res*, 2011, 67: 221–238. [DOI](#)
- [11] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol*, 2008, 48(4): 648–656. [DOI](#)
- [12] Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RHA. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 2005, 309(5732): 310–311. [DOI](#)
- [13] Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*, 2006, 3(2): 87–98. [DOI](#)
- [14] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6092–6099. [DOI](#)
- [15] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 2005, 309(5740): 1577–1581. [DOI](#)
- [16] Wallace KN, Yusuff S, Sonntag JM, Chin AJ, Pack M. Zebrafish *hhex* regulates liver development and digestive organ chirality. *Genesis*, 2001, 30(3): 141–143. [DOI](#)
- [17] Pan FC, Wright C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn*, 2011, 240(3): 530–565. [DOI](#)
- [18] Chung WS, Shin CH, Stainier DYR. Bmp2 signaling regulates the hepatic versus pancreatic fate decision. *Dev Cell*, 2008, 15(5): 738–748. [DOI](#)
- [19] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 2002, 12(9): 735–739. [DOI](#)
- [20] Kutay H, Bai SM, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, 2006, 99(3): 671–678. [DOI](#)
- [21] Chang JH, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu CX, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from *hcr* mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol*, 2004, 1(2): 106–113. [DOI](#)
- [22] Xu H, He JH, Xiao ZD, Zhang QQ, Chen YQ, Zhou H, Qu LH. Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development. *Hepatology*, 2010, 52(4): 1431–1442. [DOI](#)