

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2015.24.1300

•论著•

microRNA-215

对人视网膜母细胞瘤细胞生长及抑癌基因 Rb1 表达的调控作用

杨林声, 王理论, 杜青卫

(延安大学附属医院眼科, 陕西 延安 716000)

【摘要】目的 研究 microRNA-215 (miR-215) 在视网膜母细胞瘤(RB)组织中的表达及其临床意义, 并探讨其对 RB 细胞活力、增殖及凋亡的影响。**方法** 采用 qRT-PCR 检测 51 例 RB 患者及相应癌旁组织中 miR-215 的表达并分析其与患者临床病理特征的相关性。在 RB 细胞中转染 miR-215 类似物或 miR-215 抑制物, 采用噻唑蓝比色法(MTT)、溴脱氧尿苷(BrdU)细胞增殖分析、Caspase3 活性检测及流式细胞仪检测细胞活力、增殖及凋亡的影响。Western blot 检测视网膜母细胞瘤蛋白 1 (Rb1) 表达变化。结果 miR-215 在 RB 组织中的表达水平显著高于对应的癌旁组织($P<0.01$); miR-215 表达与视神经浸润($P=0.002$)及分化程度($P=0.041$)有关; miR-215 在 RB 细胞系 Y79 及 HXO-Rb44 中的表达水平显著高于其在正常视网膜血管内皮细胞 ACBRI-181 中的表达水平($P<0.01$); miR-215 抑制物显著降低 HXO-Rb44 细胞中 miR-215 的表达水平并导致细胞活力降低、增殖能力下降、胞内 Caspase3 活性增加及凋亡细胞百分比增加; miR-215 类似物显著升高 Y79 细胞中 miR-215 的表达水平并导致细胞活力升高、增殖能力增强及凋亡细胞百分比降低。同时, 下调 HXO-Rb44 细胞中 miR-215 水平显著升高细胞内 Rb1 蛋白表达水平, 过表达 Y79 细胞中 miR-215 水平显著降低细胞内 Rb1 蛋白表达水平。**结论** miR-215 在视网膜母细胞瘤组织中表达升高且与恶性临床病理特征相关。miR-215 可增强视网膜母细胞瘤细胞活力、增殖能力并减少细胞凋亡, 并可降低细胞内 Rb1 蛋白表达, 提示 miR-215 在视网膜细胞瘤的发生发展中发挥重要作用。

【关键词】 MicroRNA-215; 视网膜母细胞瘤; 肿瘤生长; 临床意义

【中图分类号】 R739.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2015)24—3592—06

Regulatory effect of MicroRNA-215 on the growth of human retinoblastoma cells and the expression of Rb1.

YANG Lin-sheng, WANG Li-lun, DU Qing-wei. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance and functional role of microRNA-215 (miR-215) in retinoblastoma (RB) tissues and cells, and to analyze the effect of miR-215 on cell viability, proliferation and apoptosis. **Methods** We detected miR-215 expression in 51 samples of RB and the matched normal tumor-adjacent tissues using qRT-PCR. The expression level of miR-215 was altered by corresponding vectors (miR-215 inhibitor and miR-215 mimic) in RB cells. And then MTT, BrdU cell proliferation, Caspase3 activity and flow cytometry assay were performed to examine the viability, proliferation and apoptosis of RB cells. Western blot was used to detect the

基金项目: 陕西省科技厅项目(编号: 2013KJXX31)

通讯作者: 王理论。E-mail: yanglinsheng783@163.com

-
- [10] 季永, 张可璇, 毛洪雅, 等. 缝隙连接蛋白 Cx43 介导硫化氢后处理对大鼠心肌的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(7): 999-1003.
- [11] Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitivem mechanism [J]. Circ Res, 2001, 88(8): 802-809.
- [12] Aronsen JM, Swift F, Sejersted OM. Cardiac sodium transport and excitation-contraction coupling [J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 61: 11-19.
- [13] Ottolia M, Torres N, Bridge JH, et al. Na/Ca exchange and contraction of the heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 61: 28-33.
- [14] Roome CJ, Power EM, Empson RM. Transient reversal of the sodium/calcium exchanger boosts presynaptic calcium and synaptic transmission at a cerebellar synapse [J]. J Neurophysiol, 2013, 109(6): 1669-1680.
- [15] Cuomo O, Gala R, Pignataro G, et al. A critical role for the potassium-dependent sodium-calcium exchanger NCKX2 in protection against focal ischemic brain damage [J]. J Neurosci, 2008, 28(9): 2053-2063.
- [16] Kitao T, Takuma K, Kawasaki T, et al. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-mediated Ca^{2+} influx triggers nitric oxide-induced cytotoxicity in cultured astrocytes [J]. Neurochem Int, 2010, 57(1): 58-66.
- [17] Neef S, Dybkova N, Sossalla S, et al. CaMKII-dependent diastolic SR Ca^{2+} leak and elevated diastolic Ca^{2+} levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation [J]. Circ Res, 2010, 106(6): 1134-1144.
- [18] Chelu MG, Sarma S, Sood S, et al. Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak promotes atrial fibrillation in mice [J]. J Clin Invest, 2009, 119(7): 1940-1951.
- [19] Neef S, Dybkova N, Sossalla S, et al. CaMKII-dependent diastolic SR Ca^{2+} leak and elevated diastolic Ca^{2+} levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation [J]. Circ Res, 2010, 106(6): 1134-1144.

(收稿日期: 2015-04-23)

alteration of Rb1 expression after the over-expression or down-expression of miR-215. **Results** The expression level of miR-215 in RB tissues was significantly higher than that in normal tumor-adjacent tissues ($P<0.01$). The expression of miR-215 in tumor tissues was significantly associated with optic nerve infiltration ($P=0.002$) and differentiation degree ($P=0.041$). The expression levels of miR-215 in RB cell lines Y79 and HXO-Rb44 were significantly higher than that in retinal microvascular endothelial cells ACBRI-181 ($P<0.01$). MiR-215 expression was significantly inhibited by miR-215 inhibitor in HXO-Rb44 cells, and down-expression resulted in significantly decreased cell viability and proliferation, as well as increased apoptosis. On the contrast, MiR-215 expression was significantly improved by miR-215 mimic in Y79 cells, and the over-expression led to significantly increased cell viability and proliferation, as well as decreased apoptosis. Besides, the down-expression of miR-215 in HXO-Rb44 cells significantly increased the level of Rb1, while the over-expression of miR-215 in Y79 cells significantly decreased the level of Rb1. **Conclusion** Increased expression of miR-215 is correlated with the adverse clinicopathological features of retinoblastoma. MiR-215 may regulate cell viability, proliferation and apoptosis of retinoblastoma cells by targeting Rb1, suggesting miR-215 may play a key role in the development and progression of retinoblastoma.

[Key words] MicroRNA-215; Retinoblastoma; Tumor growth; Clinical significance

视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma, RB)是发生于视网膜核层、具有家族倾向、多发于5岁以下婴幼儿的一种恶性肿瘤^[1-2]。该肿瘤易发生颅内和远处转移,常危及患儿生命^[3-4]。因此,寻找RB早期诊断的生物学标志物,探明其发生发展的分子信号机制并发现能有效抑制其发生发展的治疗靶点,对提高RB的诊治水平,改善患儿预后具有重要意义。在RB组织中,抑癌基因*Rb1*存在低表达,是导致RB发生的重要分子基础^[3]。研究表明,*Rb1*在RB组织中的低表达可能与基因突变、表观遗传修饰等多种分子机制有关^[5]。然而,RB组织及细胞中microRNA的异常表达是否会导致*Rb1*低表达,进而参与肿瘤的发生发展,目前仍不明确。

近年来的研究发现,microRNA-215 (miR-215)在多种肿瘤组织中存在异常表达^[6-8],并在肿瘤增殖^[6]、迁移及侵袭^[7]等多种生物学功能中发挥重要功能。然而,miR-215在RB组织及细胞中的表达及生物学功能,以及其是否能够抑制*Rb1*蛋白的表达,目前尚不明确。本课题通过检测miR-215在视网膜母细胞瘤组织中的表达,分析其与RB患者临床病理特征的关系,并应用人工合成的miR-215的抑制物和类似物探明miR-215在RB发生发展中的生物学功能及其对*Rb1*的调控作用,为将miR-215确立为RB的新生生物学标志物和治疗靶点理论基础。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集西安交通大学第一附属医院眼科2001年1月至2014年12月经病理诊断为RB并行手术摘除眼球患者51例。51例患者的就诊年龄为3个月至9岁,平均(3.2±1.9)岁;男性19例,女性32例;单眼20例,双眼31例;分化型14例,未分化型37例;发生神经浸润30例,未发生神经浸润21例。术前

均未接受化疗及局部放疗等治疗。本研究获得所有患者监护人知情同意及医院的伦理学审核。

1.2 实验材料 RNA 提取所用的 TRIzol 购自于美国 Life Technologies 公司; PrimeScript reverse transcription-PCR (RT-PCR) 试剂盒购自 Takara 公司; TaqMan miRNA Reverse Transcription 试剂盒及 TaqMan Human MiRNA Assay 试剂盒购自 Applied Biosystems 公司; 人正常视网膜血管内皮细胞系 ACBRI-181 和视网膜母细胞瘤系 Y79 及 HXO-Rb44 购自于美国模式菌种收集中心(American Type Culture Collection, ATCC); 细胞培养所用的 DMEM 购自 Hyclone 公司; 细胞转染用的脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; MiRNA 质粒包括 miR-215 表达质粒(miR-215 mimics)、miR-215 抑制质粒(miR-215 inhibitor)及其相应的对照质粒购自 Genecopoeia 公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒及 Caspase-3 活性检测试剂盒购自凯基生物公司; 兔抗人*Rb1*多克隆抗体及鼠抗人β-actin 单克隆抗体购自 Cell signaling 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实时荧光定量 RT-PCR 根据 TRIzol® 操作说明书提取总 RNA, 应用 RT-PCR 试剂盒逆转录 cDNA。使用 TaqMan miRNA Reverse Transcription 试剂盒(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)和 TaqMan Human MiRNA Assay 试剂盒 (Applied Biosystems)定量检测 miR-215 表达。△△Ct 法用于计算 miR-215 相对于 U6 的相对表达量。

1.3.2 细胞培养 人正常视网膜血管内皮细胞 ACBRI-181 和视网膜母细胞瘤 Y79 及 HXO-Rb44 培养于含 10% 胎牛血清(Gibco, USA)、1% 青霉素/链霉素(Sigma, USA)的 DMEM 培养基(Gibco)中, 置于

37℃、5% CO₂细胞培养箱中,饱和湿度下培养。稳定传代2~3代后,取对数生长期细胞进行实验。

1.3.3 质粒构建和转染 使用 Lipofectamine 2000 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)将 miRNA 质粒包括 miR-215 表达质粒(miR-215 mimics)、miR-215 抑制质粒(miR-215 inhibitor)及其相应的对照质粒转染视网膜母细胞瘤系细胞,并应用潮霉素筛选稳定表达细胞株用于进一步实验。

1.3.4 MTT 法检测细胞活力 取对数生长期的细胞,用培养基制备细胞数为 1×10^5 /ml 的单细胞悬液,以 200 μl/孔接种于 96 孔板。接种细胞 24 h、48 h、72 h 后 MTT 检测细胞活力。在检测细胞活力前 4 h,每孔加入 20 μl 5 mg/ml 的 MTT;孵育 4 h 后,吸出培养液,每孔加入 DMSO 150 μl,于室温轻微溶解结晶 15 min。每个时间点设 6 个复孔。酶标仪在 490 nm 波长处检测每孔的吸光值。

1.3.5 Brdu-ELISA 法测定细胞增殖 取对数生长期细胞,用培养基制备细胞数为 1×10^5 /ml 的单细胞悬液,以 200 μl/孔接种于 96 孔板并进行细胞转染。培养结束前每孔加入 20 μl BrdU 标记液,继续培养 6 h。ELISA 法检测细胞增殖抑制:加 BrdU 培养结束后,加入 Fix Denat 使 DNA 变性,然后每孔加 100 μl HRP 标记的抗 BrdU 抗体,洗涤 3 次,每孔加入 100 μl TMB 底物液显色,20 min 后加 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应,置振荡器上 1 min,在酶标仪上以 450 nm/630 nm 双波长检测吸光值,即 BrdU 值。每组设 3 个副孔。

1.3.6 Caspase-3 活性检测试剂盒检测 Caspase-3 的活性 胰酶消化转染 48 h 后的细胞,800 r/min 离心 5 min 弃掉胰酶。用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次,2 000 r/min 离心 5 min,收集($3\sim 5$) $\times 10^6$ 个细胞。在收集的沉淀细胞中加入 50 μl 预冷的 Lysis Buffer,并置于冰上裂解 20~30 min,期间涡旋震荡 3~4 次;随后,将上述裂解液于 4℃ 离心机以 10 000 r/min 离心 1 min。吸取裂解液上清至新的 EP 管中,并置于冰上备用;取少量上清液,并用 BCA 法测定其中的蛋白浓度。吸取 50 μl 含有 100~200 μg 蛋白的细胞裂解上清,并加入 50 μl 的 2×Reaction buffer,使用前每 50 μl 的 2×Reaction buffer 加入 0.5 μl DTT;随后加入 5 μl Caspase-3 Substrate,并于 37℃ 避光孵育 4 h。利用酶标仪在 405 nm 波长处测定其吸光值。

1.3.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 取转染后 48 h 后的细胞,用 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞,800 r/min 离心 5 min 后弃去上清,用 1×Binding buffer 重悬细胞并调整细胞数为 1×10^6 /ml,每管加入 500 μl 细胞悬

液、5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI。混匀室温避光孵育 20 min 后,进行流式细胞仪检测,每个样本独立重复 3 次。

1.3.8 Western blot 利用 RIPA 试剂盒提取细胞总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒(BCA kit)检测蛋白样品浓度。取 40 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离后,利用湿转仪将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,加入 5% 牛血清蛋白(BSA)稀释的 Rb1 多克隆抗体(1:1 000)及 β-actin 单克隆抗体(mAb, 1:1 500)4℃ 孵育过夜后,加 HRP 标记二抗(1:10 000),室温孵育 2 h。最后利用 ECL 化学发光剂暗室显影。

1.4 统计学方法 使用 SPSS13.0 和 GraphPad Prism 5 统计软件进行统计学分析。两组间计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料以均数±标准误($\bar{x} \pm s$)表示,组间两两比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-215 在 RB 组织及对应癌旁组织中的表达 应用 qRT-PCR 检测 miR-215 在 51 例骨肉瘤及对应癌旁组织中的表达,结果提示 miR-215 在视网膜母细胞瘤组织中的表达水平显著高于对应的癌旁组织[(1.170 ± 0.255) vs (1.940 ± 0.102), *t*=2.800, *P*<0.05],见图 1。

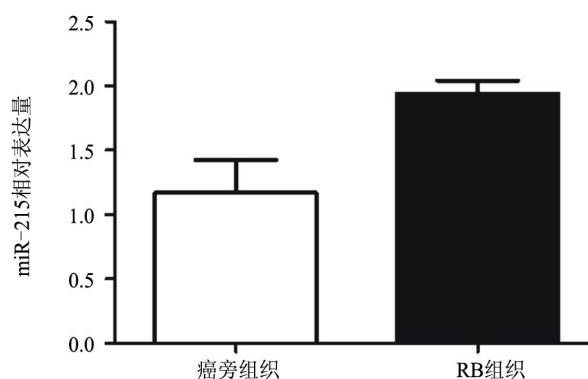


图 1 miR-215 在视网膜母细胞瘤及其对应癌旁组织中的表达水平

2.2 miR-215 表达水平与视网膜母细胞瘤患者临床病例特征的相关性 将 miR-215 在视网膜母细胞瘤组织中的表达水平的中位值定为界值,miR-215 表达水平低于中位值者归为 miR-215 低表达组,miR-215 表达水平等于或高于中位值的患者归为 miR-215 高表达组。miR-215 表达与视网膜母细胞瘤患者临床病理特征之间的相关性详见表 1,结果显示骨肉瘤组织中 miR-215 表达与视神经浸润($\chi^2=9.206$, *P*=0.002)及分化程度($\chi^2=3.878$, *P*=0.041)有显著相关性。

表 1 miR-215 表达与 RB 患者临床病理特征的关系(n=51)

项目	例数	miR-215 表达水平		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
年龄(岁)				0.628	0.555
<3	34	16	18		
≥3	17	10	7		
性别				0.158	0.776
男	19	9	10		
女	32	17	15		
受累眼				0.213	0.645
单眼	20	11	9		
双眼	31	15	16		
视神经受侵				9.206	0.002
有	33	22	11		
无	18	4	14		
分化程度				3.878	0.041
分化	14	4	10		
未分化	37	22	15		
淋巴结转移				1.797	0.180
有	19	12	7		
无	32	14	18		

2.3 miR-215 在人视网膜母细胞瘤细胞中的表达水平 采用 qRT-PCR 检测视网膜母细胞瘤细胞系 Y79、HXO-Rb44 和人正常视网膜血管内皮细胞 ACBRI-181 细胞中 miR-215 的表达。检测结果表明: miR-215 在 Y79 及 HXO-Rb44 中的表达水平显著高于其在 ACBRI-181 细胞中的表达 [(0.977±0.065) vs

(1.770±0.047), $t=9.882$, $P<0.01$; (0.977±0.065) vs (2.510±0.102), $t=12.670$, $P<0.01$], 见图 2。

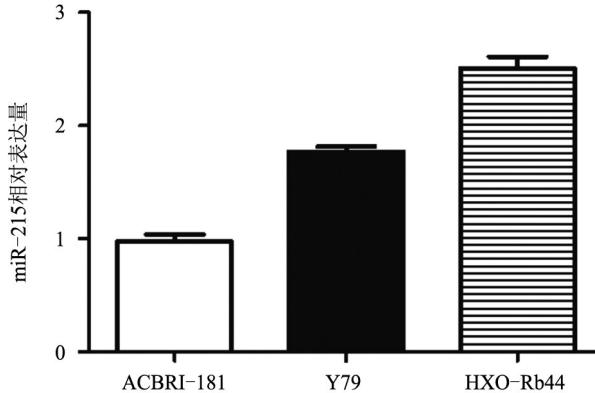


图 2 miR-215 在人视网膜母细胞瘤细胞系及正常视网膜血管内皮细胞中的表达水平

2.4 下调 miR-215 导致 HXO-Rb44 细胞活力及增殖能力减弱,凋亡增加 为进一步研究 miR-215 在视网膜母细胞瘤中的生物学功能,将 miR-215 抑制物转染 HXO-Rb44 细胞,进而检测细胞活力、增殖能力及凋亡的变化。qRT-PCR 检测结果显示:与对照组比较,miR-215 抑制物能够显著下调 HXO-Rb44 细胞中 miR-215 的表达($P<0.01$,图 3A)。MTT 实验结果表明:下调 miR-215 的表达后,HXO-Rb44 细胞活力显著下降($P<0.01$,图 3B);BrdU 细胞增殖分析检测细胞增殖能力变化显示:下调 miR-215 导致 HXO-Rb44 细

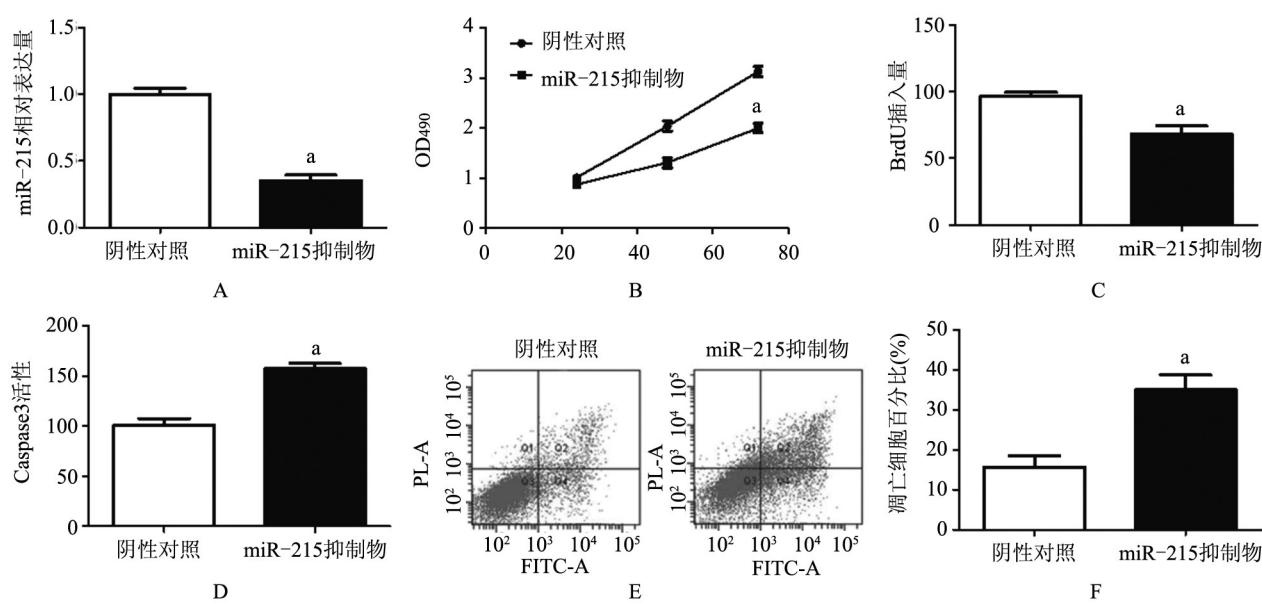


图 3 下调 miR-215 对 HXO-Rb44 细胞活力、增殖能力及凋亡的影响

注:A, miR-215 抑制物显著下调 miR-215 表达水平,(0.997±0.049) vs (0.353±0.041), $t=10.060$, ${}^aP<0.01$; B, 下调 miR-215 显著降低 HXO-Rb44 细胞的活力,(3.127±0.103) vs (1.997±0.093), $t=8.172$, ${}^aP<0.01$; C, 下调 miR-215 显著降低 HXO-Rb44 细胞增殖能力,(96.671±2.850) vs (68.330±5.810), $t=4.378$, ${}^aP<0.05$; D, 下调 miR-215 显著增强 HXO-Rb44 细胞内 Caspase3 活性,(101.302±6.386) vs (157.302±5.239), $t=6.780$, ${}^aP<0.01$; E, 下调 miR-215 显著增加 HXO-Rb44 细胞凋亡细胞百分比,(15.670±2.906) vs (35.000±3.786), $t=4.051$, ${}^aP<0.05$ 。

胞增殖能力显著减弱($P<0.05$,图 3C);另一方面,Caspase-3 活性检测表明:下调 miR-215 的表达后,细胞内 Caspase-3 活性显著增加($P<0.01$,图 3D);同时,流式细胞仪检测细胞凋亡显示:下调 miR-215 表达后,HXO-Rb44 细胞的凋亡比例显著增加($P<0.01$,图 3E)。

2.5 上调 miR-215 导致 Y79 细胞活力及增殖能力增强,凋亡减少 为进一步证实 miR-215 调控细胞活力、增殖及凋亡的影响,进一步利用 miR-215 类似物转染 Y79 细胞,进而检测检测细胞活力、增殖能力及凋亡的变化。qRT-PCR 检测结果显示:与对照组相比,miR-215 类似物转染能够显著升高上调 Y79 细胞内 miR-215 的表达水平($P<0.01$,图 4A);功能学实验进一步表明:上调 miR-215 表达后,MTT 结果显示 Y79 细胞活力显著增强($P<0.05$,图 4B),BrdU 细胞增殖分析表明细胞增殖能力显著增强($P<0.01$,图 4C),

Caspase-3 活性检测提示细胞内 Caspase-3 活性显著降低($P<0.05$,图 4D),同时流式细胞仪检测结果提示凋亡细胞比例显著降低($P<0.05$,图 4E)。

2.6 miR-215 调控视网膜母细胞瘤细胞中 Rb1 蛋白的表达 *RB1* 是重要的抑癌基因,Rb1 蛋白低表达是视网膜母细胞瘤的重要特征,Rb 信号调节途径是一种主要的抑癌方式,在抑制细胞增生方面具有重要的作用。为探明 miR-215 能否下调 HXO-Rb44 细胞中 Rb1 蛋白表达进而发挥促进视网膜母细胞瘤发生发展的作用,进一步利用 Western blot 法检测下调 miR-215 后 HXO-Rb44 细胞中 Rb1 蛋白的表达水平。检测结果表明:下调 miR-215 表达后,细胞内 *Rb1* 蛋白的表达显著增加($P<0.01$,图 5A)。另一方面,miR-215 mimics 转染后 Y79 细胞后,细胞内 Rb1 蛋白的表达显著降低($P<0.01$,图 5B)。

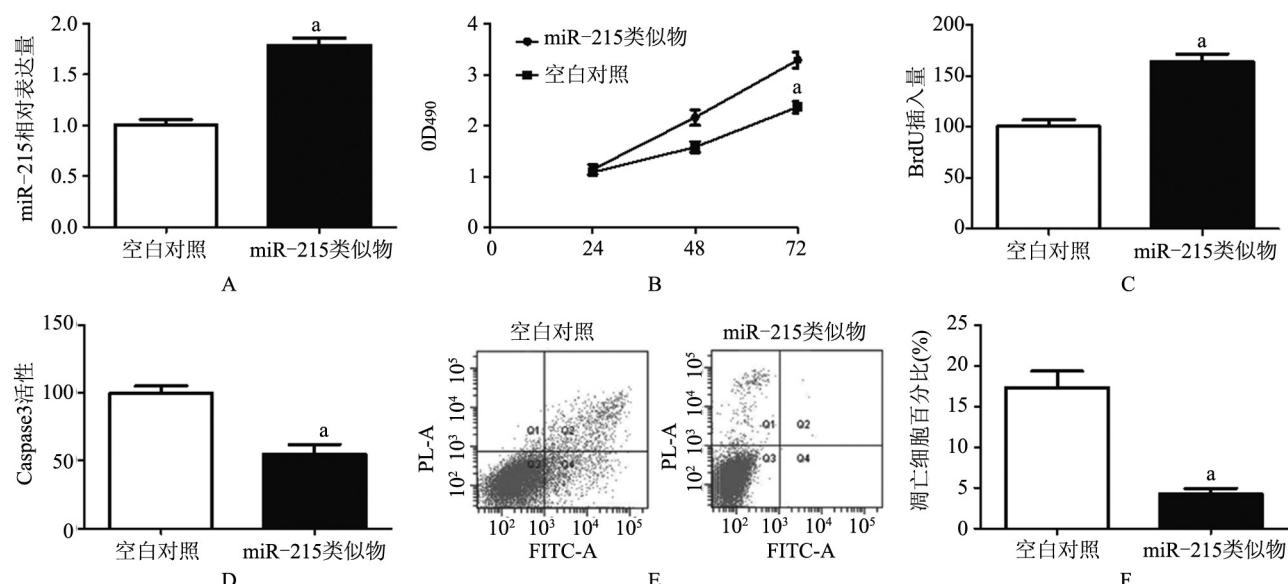


图 4 过表达 miR-215 对 Y79 细胞活力、增殖能力及凋亡的影响

注:A,miR-215 类似物显著上调 miR-215 表达水平,(1.003±0.055) vs (1.790±0.069), $t=8.901$,^a $P<0.01$;B,过表达 miR-215 显著增强 Y79 细胞的活力,(3.290±0.154) vs (2.363±0.119), $t=4.768$,^a $P<0.01$;C,过表达 miR-215 显著增强 Y79 细胞增殖能力,(100.300±6.642) vs (164.000±7.371), $t=6.417$,^a $P<0.01$;D,过表达 miR-215 显著降低 Y79 细胞内 Caspase3 活性,(100.333±5.196) vs (55.667±6.928), $t=5.196$,^a $P<0.01$;E,过表达 miR-215 显著减少 Y79 细胞凋亡细胞百分比,(17.330±2.028) vs (4.267±0.669), $t=6.120$,^a $P<0.01$ 。

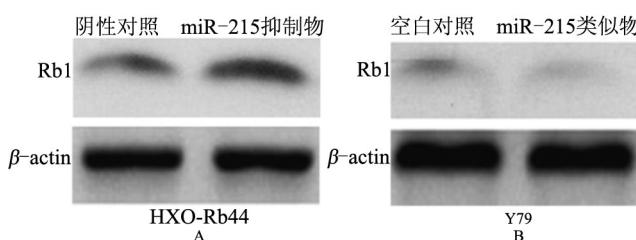


图 5 MiR-215 对视网膜母细胞瘤细胞中 Rb1 蛋白的表达变化

注:A,下调 miR-215 显著增高 HXO-Rb44 细胞中 Rb1 蛋白的表达水平,(1.078±0.125) vs (2.763±0.119), $t=9.763$,^a $P<0.01$;B,过表达 miR-215 显著抑制 Y79 细胞中 Rb1 蛋白的表达水平,(0.978±0.105) vs (0.103±0.058), $t=7.294$,^a $P<0.01$ 。

3 讨论

MiRNAs 是细胞内一组长度较短的(约 22 个核苷酸)内源性非编码 RNA^[9],可通过与靶 mRNAs 的 3' 端非编码区域的识别序列部分互补结合,最终导致 mRNAs 降解或翻译受阻。越来越多的证据表明:miRNAs 在多种细胞进程中发挥决定性作用^[10-11],如分化、形态发生和肿瘤发生。在人类肿瘤发生中,miRNAs 可发挥促癌或者抑癌的生物学功能,并可作为肿瘤早期诊断及预后评估的有效生物学标志物^[12]。本研究表明:相较于正常癌旁组织,miR-215

在视网膜母细胞瘤组织中存在显著高表达;同时,miR-215 的异常高表达与患者的不良病理特征存在显著相关性。这表明:miR-215 可能作为视网膜母细胞瘤患者早期诊断及预后评估的潜在生物学标志物。

增殖能力增强及凋亡减少是肿瘤细胞的重要生物学特征,也是肿瘤发生进展的重要生物学基础^[13]。本研究的功能学实验结果表明:上调 miR-215 后,视网膜母细胞瘤细胞的增殖能力显著增强而凋亡显著减少;下调 miR-215 后,其增殖能力显著减弱而凋亡显著增加。因此,这些研究结果表明:miR-215 可以通过增强细胞增殖能力,减少细胞凋亡,进而发挥促进视网膜母细胞瘤发生发展的生物学功能。

在哺乳动物体内,抑癌基因 RB 缺失、突变及表达减少在多种肿瘤的发生发展中具有重要作用^[5],如视网膜母细胞瘤、肺癌、胃癌、膀胱癌及乳腺癌等。同时,大量研究表明 miRNAs 表达或功能异常是肿瘤发生发展的重要原因^[9-10]。miRNAs 可通过下调肿瘤内抑癌基因的表达或上调促癌基因的表达而促进肿瘤的发生发展。在胃癌中的研究表明,miR-215 能够下调胃癌组织中 Rb1 蛋白的表达,进而发挥增强胃癌细胞增殖的作用^[6]。本研究的实验数据表明:上调 miR-215 后,视网膜母细胞瘤细胞中 Rb1 蛋白的表达显著降低,而下调 miR-215 后,细胞内 Rb1 蛋白表达显著增高。这提示 miR-215 能够通过抑制细胞内 Rb1 蛋白的表达而发挥促进视网膜母细胞瘤发生发展的作用。

总之,本研究证实:在视网膜母细胞瘤组织中 miR-215 表达显著增加且与患者不良临床病理特征相关;miR-215 可发挥促进视网膜母细胞瘤细胞增殖能力及抑制其凋亡的能力;同时,miR-215 能够显著抑制细胞内 Rb1 蛋白的表达。本研究结果表明 miR-215 有望成为视网膜母细胞瘤早期诊断和预后

评估的标志物,并可能成为视网膜母细胞瘤基因治疗的潜在靶点。

参 考 文 献

- [1] Abramson DH. Retinoblastoma: saving life with vision [J]. Annu Rev Med, 2014, 65: 171-184.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] Benavente CA, Dyer MA. Genetics and epigenetics of human retinoblastoma [J]. Annu Rev Pathol, 2015, 10: 547-562.
- [4] Scheffler AC, Cicciarelli N, Feuer W, et al. Macular retinoblastoma: evaluation of tumor control, local complications, and visual outcomes for eyes treated with chemotherapy and repetitive foveal laser ablation [J]. Ophthalmology, 2007, 114(1): 162-169.
- [5] Hilgendorf KI, Leshchiner ES, Nedelcu S, et al. The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria [J]. Genes Dev, 2013, 27(9): 1003-1015.
- [6] Deng Y, Huang Z, Xu Y, et al. MiR-215 modulates gastric cancer cell proliferation by targeting RB1 [J]. Cancer Lett, 2014, 342(1): 27-35.
- [7] Khella HW, Bakhet M, Allo G, et al. miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(10): 2231-2239.
- [8] Zhou SW, Su BB, Zhou Y, et al. Aberrant miR-215 expression is associated with clinical outcome in breast cancer patients [J]. Med Oncol, 2014, 31(11): 259.
- [9] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA [J]. Cell, 2013, 153(3): 516-519.
- [10] Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer [J]. Nature, 2012, 482(7385): 347-355.
- [11] Osman A. MicroRNAs in health and disease—basic science and clinical applications [J]. Clin Lab, 2012, 58(5-6): 393-402.
- [12] Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(8): 1273-1281.
- [13] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

(收稿日期:2015-07-26)