

miR-221 通过作用 DVL2 影响前列腺癌细胞系的侵袭功能*

常 征 张爱民 郝俊文[△] 徐友和 刘 毅

(济南军区总医院 泌尿外科 山东 济南 250031)

摘要 目的:评价 miR-221 在前列腺癌细胞系中表达的变化对其神经内分泌样转化及其侵袭功能的影响。方法:以 Northern blot 检测 LNCaP、LNCaP-AI 两种前列腺癌细胞系中 7 种 microRNA 的表达变化;细胞转染法检测在雄激素剥夺环境中 LNCaP 和 LNCaP-AI 细胞系中 miR-221 的作用;CCK-8 法检测细胞在不同阶段的生长增殖水平;Transwell 法检测转染细胞的侵袭能力;qRT-PCR 和 Western blot 检测转染的细胞中神经元特异性烯醇化酶(NSE)及 dishevelled-2(DVL2)表达的变化。结果:与雄激素依赖性前列腺癌(ADPC)的细胞系 LNCaP 相比,miR-221 在雄激素非依赖性前列腺癌(AIPC)的细胞系 LNCaP-AI 中明显高表达。通过转染使 miR-221 在 LNCaP 细胞系中高表达可促进细胞的 NSE 表达,加速其神经内分泌样分化。而在 LNCaP-AI 细胞系中下调 miR-221 水平则会升高靶基因 DVL2 的表达水平,并增强 LNCaP-AI 细胞的迁移和侵袭能力。结论:该实验验证在 AIPC 和 ADPC 细胞系中 miR-221 存在表达差异。miR-221 可促进前列腺癌细胞的神经内分泌样转化,这可能是导致前列腺癌雄激素非依赖转化的重要原因。MiR-221 可通过作用 DVL2 调节晚期前列腺癌细胞的转移和侵袭。

关键词 前列腺癌 miR-221 DVL2 神经元特异性烯醇酶

中图分类号 R737.25 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)15-2881-06

MiR-221 Expression Affects Invasion Potential of Human Prostate Carcinoma Cell Lines by Regulating DVL2*

CHANG Zheng, ZHANG Ai-min, HAO Jun-wen[△], XU You-he, LIU Yi

(Department of Urology, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan, Shandong 250031, P.R.China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of miR-221 on the neuroendocrine (NE) differentiation and invasive function of prostate cancer cells as a miRNA biomarker candidate for prostate cancer. **Methods:** The expressions of 7 miRNAs in LNCaP, LNCaP-AI prostate cancer cell lines were detected by Northern blotting. LNCaP and LNCaP-AI cells cultured in androgen-depleted medium were transfected with different synthetic miRNAs. Their invasive abilities were evaluated by a matrigel invasion assay. Cell growth was assessed by using the CCK-8 cell proliferation assay at different time points. The expression of neuron-specific enolase (NSE) and Dishevelled-2 (DVL2) during the neuroendocrine differentiation and migration respectively were measured by qRT-PCR and Western blot. **Results:** The miR-221 level increased significantly in androgen-independent prostate cancer (AIPC) cell line LNCaP-AI when compared with androgen-dependent prostate cancer (ADPC) cell line LNCaP. Overexpression of miR-221 in LNCaP cells increased significantly NSE expression and induced their NE differentiation. The suppression of miR-221 expression with anti-miR-221 increased the abilities of migration and invasion in LNCaP-AI cells. Meanwhile, the DVL2 mRNA and protein levels were upregulated after the transfection of anti-miR-221 in LNCaP-AI cells. **Conclusions:** There is a significant difference for miR-221 expression between ADPC and AIPC cells. MiR-221 contributes to NE differentiation of ADPC cells, which may be the reason of androgen-independence. miR-221 may regulate the migration of AIPC cells through DVL2 as a key regulator in advanced prostate cancer.

Key words: Prostate cancer; MiR-221; DVL2; NSE

Chinese Library Classification: R737.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2881-06

前言

前列腺癌(CaP)西方国家一种最常见的恶性肿瘤,近年来在中国的发病率逐年增高^[1]。前列腺癌导致死亡的原因在于最终进展到了雄激素非依赖性前列腺癌(AIPC)。而对于雄激素非依赖性前列腺癌,目前仍没有有效的治疗方案^[2,3]。microRNA

是一种内源性非编码的短链 RNA,它通过负向调节靶基因的表达而发挥作用^[4]。目前已经发现超过 700 种 microRNA 在细胞的生物进化过程中发挥作用,包括生长、分化、信号转导、细胞发育以及肿瘤的发生等^[5,6]。一些 microRNA 在前列腺癌的进展过程中也发挥了重要作用^[7-10]。

已经有证据表明在前列腺癌进展为雄激素非依赖性的阶

* 基金项目:第二军医大学博士创新基金

作者简介:常征(1978-)男,博士研究生,主治医师,主要研究方向:前列腺癌的诊治,
Tel:0531-51665311, E-mail: doctorchangzheng@163.com

△ 通讯作者:郝俊文,电话:0531-51665361, E-mail: doctorjunwenhao@163.com

(收稿日期:2012-02-21 接受日期:2012-03-18)

段中,肿瘤细胞会通过自分泌或旁分泌的途径发挥作用,miR-221在前列腺癌细胞系中则通过调节与生长有关的靶基因如p27等,影响肿瘤的生长及转化^[1]。一些研究者表明可将肿瘤细胞的再生以及神经内分泌样分化作为重要的诊断标志物^[12,13]。本实验旨在探索miR-221在前列腺癌细胞系的神经内分泌样转化以及细胞再生中的诊断价值,及其在肿瘤细胞侵袭转移过程中的作用,从而为前列腺癌诊治标志物的寻找提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

四种化学合成的单链或双链RNA寡核苷酸miR-221,anti-miR-221和对照组miR-NC,anti-miR-NC均购自美国Ambion公司。7种miRNA及GAPDH探针均购自美国Ambion公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞系和细胞转染 本研究用到雄激素非依赖性前列腺癌细胞系LNCaP-AI及雄激素依赖性前列腺癌细胞系LNCaP。LNCaP细胞购自上海中科院,LNCaP-AI细胞则由LNCaP细胞在雄激素剥夺环境中培养而成^[14],两种细胞系均采用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液培养,LNCaP-AI细胞的培养采用的是碳吸附后的胎牛血清。

细胞转染根据脂质体2000试剂盒(购自Invitrogen公司)的说明书进行。当LNCaP和LNCaP-AI细胞培养至60%的融合度时,将50nmol/L的miR-221、anti-miR-221、对照组miR-NC或anti-miR-NC与pEGFP-N1质粒按1:7的浓度比例混合进行转染。细胞转染后48小时,荧光显微镜评估转染效率。

1.2.2 细胞生长曲线(CCK-8)比色试验 将转染后待检测的细胞按 2×10^3 个细胞/孔接种于96孔培养板,在37℃、5%CO₂及饱和湿度环境下静置培养。分别在培养1至5天呈色。每孔加CCK-8溶液(5mg/mL)10μL,移入37℃孵箱中继续孵育4h。用全自动酶标仪测定每孔的光密度(OD)值,测定波长450nm并描绘生长曲线。对照组为miR-NC或anti-miR-NC。

1.2.3 总RNA抽提和Northern Blot分析 细胞总RNA用TRIzol法提取并定量。Northern blot分析根据说明^[15],将15μg的RNA加至15%的Urea-PAGE凝胶,电泳后转移至尼龙纤维膜上。在80℃环境中孵育45分钟,42℃下预杂交45分钟,并用32P标记的探针在35℃杂交过夜。洗膜后用X线曝光,并用凝胶扫描仪定量,通过与内参U6RNA的对比,确认不同miRNA的水平。7种miRNA及GAPDH的探针均购自美国Ambion公司。

1.2.4 实时定量real-time RT-PCR 细胞总RNA用TRIzol法提取。RNA的反转录根据Takara反转录试剂盒说明书进行。采用Real-time PCR定量分析NSE和DVL2的mRNA表达。NSE,DVL2和GAPDH的引物序列如下:NSE上游5'-AGCTGCCCCTGCCTTAC-3',下游5'-GAGACAAACAGCGTTACTTAG-3';DVL2上游5'-GCCTATCCAGGTTCTCCTC-3',下游5'-A-GAGCCAGTCAACCACACATCC-3';GAPDH上游5'-CG-GAGTCAACGGATTTGGTCGTATTGG-3',下游5'-GCTCCTG-

GAAGATGGTGATGGGATTTCC-3'。RT-PCR反应体系:取反转录的cDNA:100ng,上下游引物各10引物10μM;DNA Master SYBR Green I MIX 2μL,加Nuclease-Free水至20μL,Real-Time PCR程序:95℃ 10min,95℃ 15min,60℃ 30s,74℃ 3s,共40个循环,溶解曲线:75-95℃。产物琼脂糖凝胶电泳。使用仪器定量PCR仪,紫外分光光度计,凝胶成像仪等。

根据mirVana miRNA isolation kit试剂盒(购自美国Ambion公司)说明书提取总RNA。miRNA和对照U6RNA用Taqman MicroRNA反转录试剂盒(均购自美国Ambion公司)反转录而成。miRNA水平用miRNA特异的Taqman MGB探针进行检测。Trizol法提取组织、细胞Total RNA,NanoDrop测定Total RNA浓度,1.5%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,逆转录反应体系:Total RNA 100ng,miRNA反转录引物1μL(1μM),DEPC H₂O至12.3μL,65℃变性5min,冰浴5min,5×1st Buffer 4μL,0.1M DTT 2μL,dNTPs 0.5μL(10mM),RNase Inhibitor 0.2μL(40U/μL),M-MLV 1μL(200U/μL),共20μL体系。逆转录程序:16℃ 30min,37℃ 30min,70℃ 10min,4℃保存。取逆转录反应体系20μL中的1μL,MgCl₂ 1.6μL,Primer miRNA通用Sense引物0.6μL(10μM),特异Anti-Sense引物0.6μL(10μM),DNA Master SYBR Green I MIX 2μL,Nuclease-Free水至20μL。RealTime PCR程序:95℃ 10min,95℃ 15min,60℃ 30s,74℃ 3s,共40个循环,溶解曲线:75-95℃。miRNA RealTime PCR产物1.5%非变性(不加甲醛)琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 Transwell 迁移实验 分别将转染了miR-221或miR-NC的LNCaP细胞,和转染了anti-miR-NC或anti-miR-221的LNCaP-AI细胞按照105个/mL的浓度加至Transwell小室(购自美国Corning公司)的上层,加入无血清的RPMI1640培养液。小室下层则加入含15%胎牛血清的RPMI1640培养液。培养32小时后,细胞用甲醇固定15分钟,用棉签擦去未迁移的细胞,小室下层的细胞用1%的甲苯胺蓝染色并拍照,在显微镜下随机挑选4个视野记录迁移的细胞数,进行统计学分析。

1.2.6 Western blot 检测 用M-PER蛋白裂解液收集转染前后的前列腺癌细胞系的总蛋白。用BCA方法绘制标准曲线,进行蛋白定量。将50mg蛋白样品加样在10%的SDS-PAGE胶电泳,蛋白分离后通过转移系统转至PVDF膜,室温下封闭1小时后,在含有一抗的TBS溶液中48℃过夜。二抗选择鼠抗人NSE的单克隆抗体和鼠抗人DVL2的多克隆抗体(购自Santa Cruz公司)。封闭液配置的二抗在37℃摇床1小时,4℃过夜,TBS漂洗滤膜3次,每次10分钟。并用ECL试剂显色,X-光片曝光,用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

1.3 统计学分析

采用SAS9.1.3统计学软件进行数据分析。两组间的差异采用t检验,多组间的差异采用单侧的ANOVA Bonferroni's检验。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MiR-221在不同前列腺癌细胞系中的表达

Northern blot检测了7种miRNA在三种不同的前列腺癌

细胞系中的表达。这 7 种 miRNA 均有文献报道,在前列腺癌或其他类型肿瘤中起重要作用^[8,16-20]。结果表明 雄激素非依赖性前列腺癌细胞系 LNCaP-AI 与雄激素依赖性前列腺癌细胞系 LNCaP 相比较 5 种 miRNA (miR-221, miR-222, miR-21, miR-205 和 miR-125b) 表达明显上调 (1B),而另两种 miRNA (miR-15a 和 miR-101) 的表达则明显下调 (图 1A)。鉴于 LNCaP-AI 细胞系由 LNCaP 细胞在去雄激素环境中培养而得,

这一结果提示这些存在差异性表达的 miRNA 在起前列腺癌细胞的进展中起到重要作用。尤其通过与内参 U6RNA 的对比,用凝胶扫描仪进行定量分析,可见 LNCaP-AI 细胞系中的 miR-221 明显升高达 4 倍之多,提示 miR-221 在雄激素非依赖性前列腺癌的进展及维持中起到重要作用。

2.2 MiR-221 促进 LNCaP 及其亚系的生长

为了验证 miR-221 在前列腺癌细胞进展中的作用,在

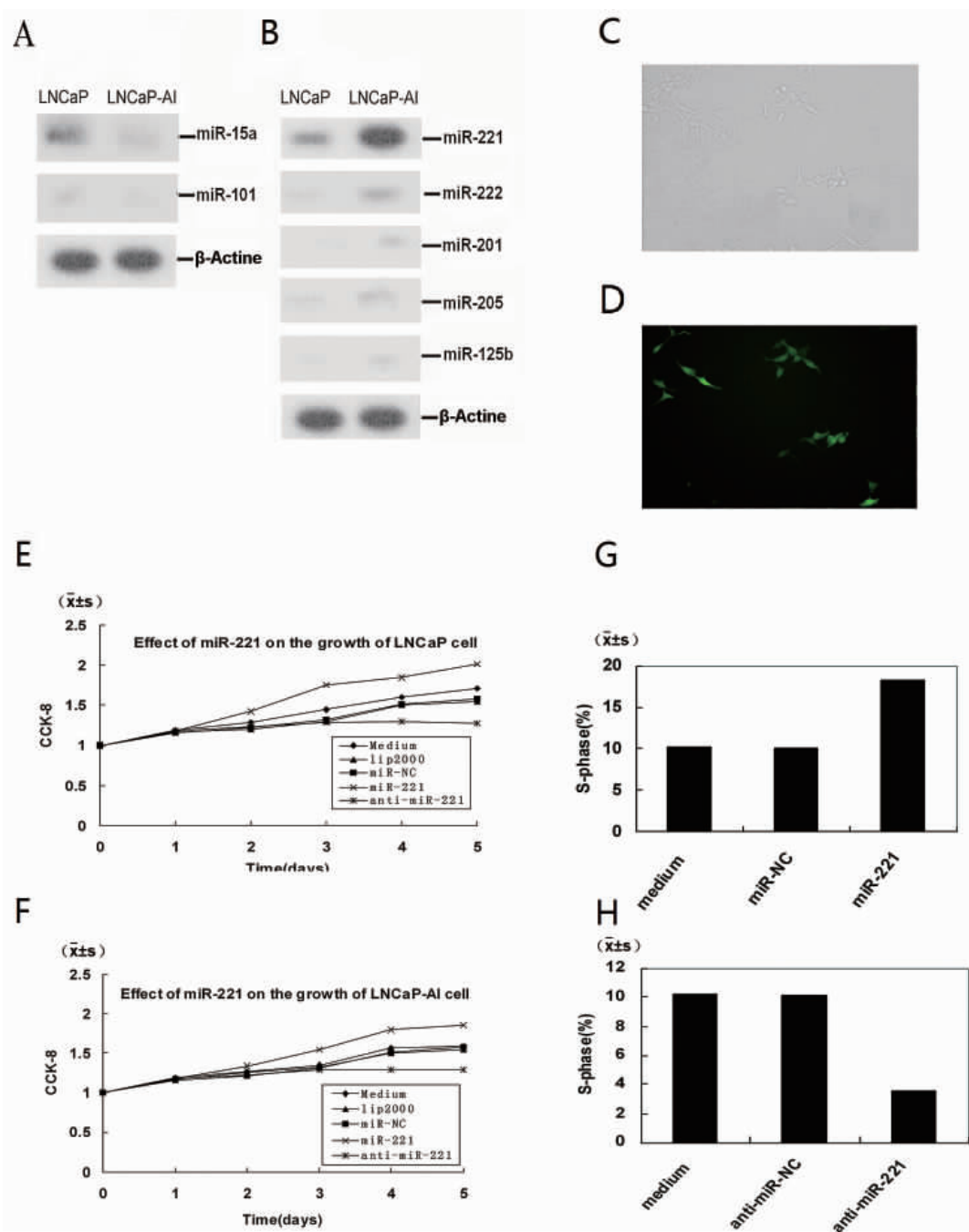


图 1 miR-221 对于不同前列腺癌细胞系生长的影响。(A,B)Northern blot 分析 LNCaP 和 LNCaP-AI 细胞系中 miRNA 的表达。(C,D)通过荧光显微镜检测 LNCaP 及 LNCaP-AI 细胞转染 pEGFP-N1 标记的 miRNA 效率。(E,F)CCK-8 检测 miR-221 对于 LNCaP 细胞和 LNCaP-AI 细胞生长的影响(G)流式细胞仪检测 miR-221 转染后的 LNCaP 细胞(与对照组 miR-NC 比较, S 期细胞明显上升 $P<0.05$) (H)anti-miR-221 转染后的 LNCaP-AI 细胞的 S 期细胞(与对照组 anti-miR-NC 比较, S 期细胞明显下降 $P<0.01$)。

Fig. 1 Effects of miR-221 expression in LNCaP and LNCaP-AI on growth. (A,B)Northern blot analyses of miRNA expression in LNCaP line and LNCaP-AI line. (C,D) Prostate cancer cells were detected for expression of EGFP using fluorescence microscope, which suggested the ratio of transfection. (E,F) CCK-8 analysis effects of miR-221 on the growth of LNCaP and LNCaP-AI cells (G) Flow cytometry assay of S-phase fraction in miR-221-treated LNCaP cells and anti-miR-221-treated LNCaP-AI cells (H).

LNCaP 细胞和 LNCaP-AI 细胞中分别转染 miR-221 和 anti-miR-221, 并通过 CCK-8 增殖实验检测细胞的生长能力。结果显示, 转染了 miR-221 的 LNCaP 和 LNCaP-AI 细胞其生长增殖能力明显增加, 对照组则没有明显改变(图 1E)。而转染了 anti-miR-221 的 LNCaP 和 LNCaP-AI 细胞系其生长及增殖明显受到抑制(图 1F)。并且, 当将 anti-miR-221 在雄激素剥夺的环境下转染到 LNCaP 细胞系时, 其生长没有受到明显的影响(图 1E)。

流式细胞仪检测细胞转染 5 天后的生长周期变化显示, 转染了 50 nM miR-221 的 LNCaP 细胞与对照组(miR-NC)比较, S 期的细胞数量增加 1.5-1.7 倍($P<0.05$, 图 1G)。而转染了 anti-miR-221 的 LNCaP-AI 细胞的 S 期数量则下降 49%($P<0.01$, 图 1H)。这一结果揭示 miR-221 的高表达在维持雄激素非依赖的表型中发挥一定作用。

2.3 LNCaP 细胞的神经内分泌样转化过程中神经特异性烯醇酶(NSE)水平明显上调

通过在 LNCaP 细胞中高表达 miR-221 来检测其在神经内分泌样转化中的作用。LNCaP 细胞中分别转染 miR-221, 和 miR-NC, 并在去雄激素环境中培养 8 小时至 4 天, 在不同时间点通过相差显微镜拍摄细胞形态。转染了 miR-221 的细胞, 在第 4 天时形态逐渐变为圆形, 并伸展出多个树突状分支, 表现为神经元细胞的形态(图 2C)。然而转染 miR-NC 及 anti-miR-221 的 LNCaP 细胞则无上述表现(图 2A, 2B)。LNCaP 细胞的神经源性改变在转染后 8 小时即开始出现, 且 qRT-PCR 检测发现这一改变随着 NSE 的 mRNA 水平升高而逐渐发展。NSE 的 mRNA 水平在第 3 天时迅速增长, 这一结果和细胞形态学改变相一致(图 2D)。对 LNCaP 细胞的 NSE 蛋白水平的进一步检测显示, 在第 3 天时转染了 miR-221 的 LNCaP 细胞中 NSE 蛋白的水平明显上调, 然而转染了 miR-NC 的则无明显变化(图 2E)。

2.4 miR-221 在 LNCaP 及 LNCaP-AI 细胞迁移中的影响

通过侵袭实验来研究这些转染前列腺癌细胞迁移能力的

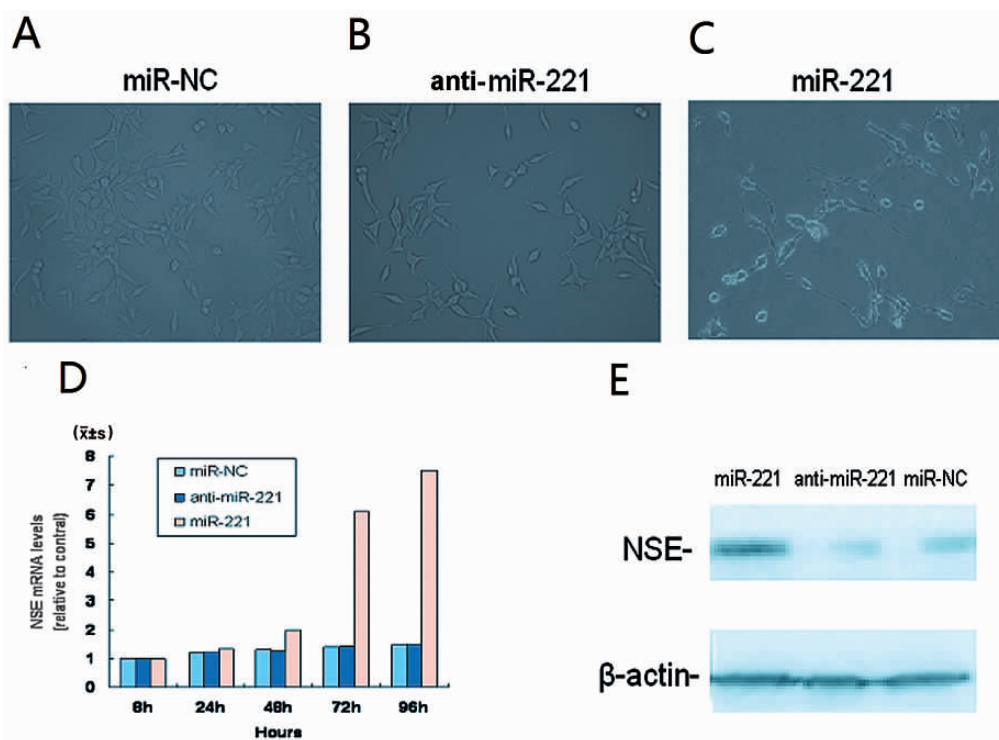


图 2 miR-221 对于 LNCaP 细胞神经内分泌样改变的作用。(A,B,C)miR-221 转染后 LNCaP 细胞的形态学改变 (D)实时定量 RT-PCR 检测 LNCaP 细胞 NSE 的 mRNA 水平。(E)Western blot 检测 anti-miR-221, miR-221 或 miR-NC 转染后的 LNCaP 细胞中 NSE 蛋白的表达水平(与对照组 miR-NC 组及 anti-miR-221 组对比 NSE 水平明显上调, $P<0.01$)。

Fig. 2 Effects of miR-221 in LNCaP cells on NE differentiation. (A,B,C) Morphological changes in LNCaP cells transfected with miR-221. (D) NSE mRNA levels were measured in LNCaP cells by quantitative RT-PCR. (E) Western blot analysis of NSE expression in LNCaP cells that had been transfected with anti-miR-221, miR-221, or miR-NC.

变化。转染了 miR-221 或 miR-NC 的 LNCaP 细胞被置于侵袭小室的上层。经过 32 小时的培养, 细胞被固定并拍照(图 3A, 3B)。对迁徙过侵袭小室的细胞进行计数, 并进行统计学检验, 结果发现转染 miR-221 和 miR-NC 的 LNCaP 细胞其迁移和侵袭能力无明显差异($P>0.05$)(图 3C)。以同样的方法检测转染了 anti-miR-221 或 anti-miR-NC 的 LNCaP-AI 细胞的侵袭能力, 结果表明转染了 anti-miR-221 的 LNCaP-AI 细胞的侵袭能力明显增强($P<0.01$)(图 3F), 提示 miR-221 在前列腺癌的侵袭

和转移过程中发挥重要作用。

2.5 anti-miR-221 通过上调 DVL2 促进 LNCaP-AI 的侵袭

检索 Sanger miRNA 数据库寻找 miR-221 的靶基因发现, DVL2 的 3' 端与 miR-221 有结合区域, 提示 DVL2 mRNA 可能是 miR-221 作用的靶基因之一。RT-PCR 检测发现转染了 anti-miR-221 的 LNCaP-AI 细胞中, DVL2 的 mRNA 水平明显上调(图 4B), 验证了前面的假设。而在转染 miR-221 或 miR-NC 的 LNCaP 细胞中 DVL2 的水平则无明显变化(图 4A)。之后在

蛋白水平上的检测发现, anti-miR-221 转染后的 LNCaP-AI 细胞中, DVL2 的蛋白表达与对照组相比上调了 247%(图 4D), 而在 LNCaP 细胞系中则无明显差异(图 4C)。

3 讨论

神经内分泌样(NE)转化被认为是前列腺癌雄激素非依赖进展中的一个重要机制^[21], 已有多项证据表明 NE 转化是前列腺恶性进展的一项常见特性^[22], 并且伴随肿瘤的转移和预后不良。但对前列腺癌的神经内分泌样转化与 miRNA 表达之间关系的研究报道较少。本研究中, 我们发现 miR-221 能够在雄激素剥夺环境中促进 LNCaP 细胞的神经内分泌样转化, 提示 miR-221 可能在前列腺癌的雄激素非依赖进展中发挥作用。miR-221 可通过某些机制, 使肿瘤细胞在雄激素非依赖进程中表现出自分泌、旁分泌的形式。miRNA 能够调节多个 mRNA 的表达, 这进一步提示我们去寻找其在前列腺癌的雄激素非依赖进展中的调节途径。有报道表明 miR-221 可通过下调前列腺癌细胞系中 p27 基因的表达来促进 LNCaP 细胞的生长^[9]。而本研究发现 miR-221 的高表达确实促进了 LNCaP 和 LNCaP-AI

细胞的生长, 并且 miR-221 通过增加 G1-S 细胞周期的转化来促进 LNCaP 细胞的增殖。

虽然本研究取得了积极的结果, 但目前 miR-221 还很难用于前列腺癌的诊治。miR-221 明显高表达于 LNCaP-AI 细胞, 而 LNCaP-AI 细胞相比 LNCaP 细胞, 其侵袭能力明显增强, 提示 miR-221 的水平与前列腺癌的侵袭能力相关。研究表明 miR-221 对于 LNCaP 细胞的侵袭能力并无明显影响, 而 LNCaP-AI 细胞的侵袭能力则在下调 miR-221 后明显增强。这些相矛盾的结果表明, 还存在其他的调节通道参与前列腺癌细胞侵袭能力的调控。

本研究选择了与前列腺癌的侵袭相关的目的基因 DVL2。DVL2 属于 Dishevelled 家族蛋白, 而 Dishevelled 家族蛋白是 Wnt 信号通路中的关键调节因子。在心脏的 Wnt 通路中^[23,24], 其信号靶基因包括 c-myc, cyclinD1 和 MMP-7。MMP-7 作为细胞粘附分子中的一员与细胞的粘附, 侵袭和转移密切相关。它在肿瘤细胞中可以通过降解细胞周围组织从而增加细胞的侵袭能力。本研究显示, 下调 miR-221 表达可明显增加 DVL2 的表达, 同时促进前列腺癌的侵袭, 因此 miR-221 可能通过 DVL2

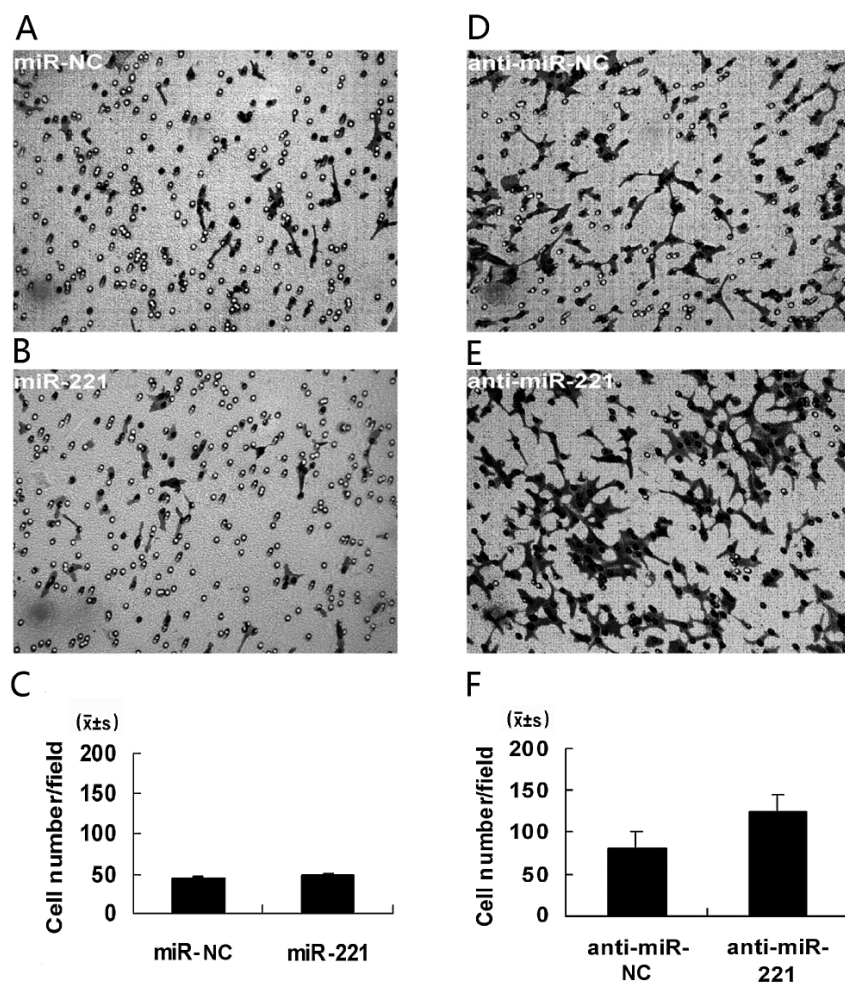


图 3 转染后前列腺癌细胞系的迁徙能力。(A,B)迁徙过侵袭小室的 miR-221 转染后 LNCaP 细胞。(D,E)迁徙过侵袭小室的 anti-miR-221 转染后 LNCaP-AI 细胞。(C)miR-221 转染对 LNCaP 细胞的迁移能力无明显影响。(F)anti-miR-221 转染提高了 LNCaP-AI 细胞的迁移能力(与对照组 anti-miR-NC $P < 0.01$)。

Fig. 3 (A,B)Effects of miR-221 expression in LNCaP on migration.(D,E)Effects of miR-221 expression in LNCaP-AI cells on migration. (C) The two-dimensional size (area) of LNCaP cells aggregates transfected with miR-221 or miR-NC was quantified. Different from control ($P > 0.01$). (F)The two-dimensional size (area) of LNCaP-AI cells aggregates transfected with miR-221 or miR-NC was quantified. Different from control ($P < 0.01$).

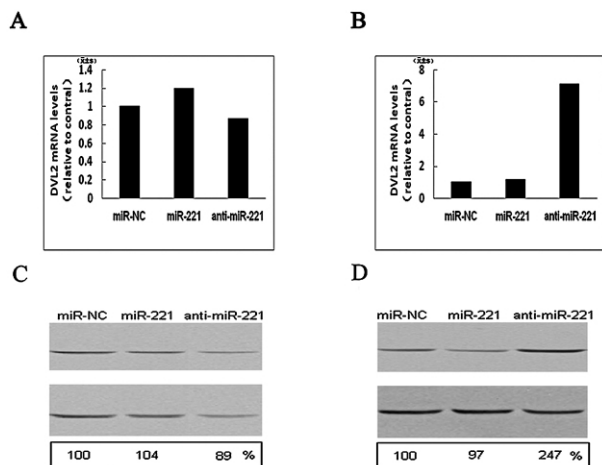


图4 miR-NC, miR-221 或 anti-miR-221 转染后前列腺癌细胞系中 DVL2 的 mRNA(A、B)和蛋白(C、D)表达情况。A、C 示转染后的 LNCaP 细胞; B、D 示转染后的 LNCaP-AI 细胞(与对照组相比, $P < 0.05$)。

Fig. 4 Effects of miR-NC, miR-221 or anti-miR-221 in prostate cancer cells on DVL2. (A) DVL2 mRNA levels were measured in LNCaP cells transfected with miR-NC, miR-221 or anti-miR-221 by quantitative RT-PCR on day 3 ($P > 0.05$). (B) DVL2 mRNA levels were measured in LNCaP-AI cells transfected with miR-NC, miR-221 or anti-miR-221 by quantitative RT-PCR on day 3 ($P < 0.05$). Western blot analysis of DVL2 expression in LNCaP (C) and LNCaP-AI (D) cells transfected with miR-NC, miR-221 or anti-miR-221.

部分参与对前列腺癌侵袭能力的调节。

综上, 我们证明了 ADPC 与 AIPC 中 miR-221 的差异表达, miR-221 在前列腺癌的神经内分泌样转化过程中发挥着重要作用, 这可能是导致前列腺癌雄激素非依赖转化的因素之一。此外我们证实 miR-221 可通过 DVL2 调控 AIPC 的侵袭能力, 是晚期前列腺癌中起关键作用的调节因子。然而, miR-221 对于其他靶基因的作用仍需进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57: 43-66
- [2] Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12: 1665-1671
- [3] Damber JE, Aus G. Prostate cancer [J]. Lancet, 2008, 371: 1710-1721
- [4] Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8: 93-103
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116: 281-297
- [6] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. EMBO J, 2004, 23: 4051-4060
- [7] Ambros S. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer [J]. Cancer Res, 2008, 68: 6162-6170
- [8] Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, et al. MiR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1 [J]. J Biol Chem, 2007, 282: 23716-23724
- [9] Lu J. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. Nature, 2005, 435: 834-838
- [10] Sun T, Wang Q, Balk S, et al. The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines [J]. Cancer Res, 2009, 69: 3356-3363
- [11] Di Sant'Agnese PA, De Mesy Jensen KL. Human prostatic endocrine-paracrine (APUD) cells. Distributional analysis with a comparison of serotonin and neuron-specific enolase immunoreactivity and silver stains [J]. Arch Pathol Lab Med, 1985, 109: 607-612
- [12] Cox ME, Deeb PD, Lakhani S, et al. Acquisition of Neuroendocrine Characteristics by Prostate Tumor Cells Is Reversible: Implications for Prostate Cancer Progression [J]. Cancer Res, 1999, 59: 3821-3830
- [13] Jiborn T, Bjartell A, Abrahamsson PA. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma during hormonal treatment [J]. Urology, 1998, 51: 585-589
- [14] Tso CL. Androgen deprivation induces selective outgrowth of aggressive hormone refractory prostate cancer clones expressing distinct cellular and molecular properties not present in parental androgen-dependent cancer cells [J]. Cancer J, 2000, 6: 220-233
- [15] Calin GA. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 15524-15529
- [16] Bonci D. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities [J]. Nat Med, 2008, 14: 1271-1277
- [17] Varambally S. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer [J]. Science, 2008, 322: 1695-1699
- [18] Li T, Li D, Sha J, et al. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 383: 280-285
- [19] Gandellini P. MiR-205 exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon [J]. Cancer Res, 2009, 69: 2287-2295
- [20] Shi XB. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen independent growth of prostate cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 19983-19988
- [21] Debes JD, Tindall DJ. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer [J]. N Engl J Med, 2004, 351: 1488-1490
- [22] Mercatelli N. The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice [J]. PLoS ONE, 2008, 3: e4029
- [23] Bejsovec A. Wnt pathway activation: new relations and locations [J]. Cell, 2005, 120: 11-14
- [24] Cong F, Varmus H. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101: 2882-2887