中图分类号：R739.41编号：20110135

**承德医学院**

硕士研究生毕业论文

**miRNA-29b抑制U251人脑胶质瘤细胞生长及其机制的初步研究**

**A preliminary study about inhibition action on growth and mechanism of U251 human glioma cells by miRNA-29b**

研究生：刘银凤

导师：冯 继 教授学科专业：肿瘤学

所在系部：秦皇岛市第一医院

研究起止日期：2012年9月～2014年3月论文提交日期：2014年3 月

**承德医学 院**

**学位论文使用授权及知识产权归属承诺**

本学位论文在导师（或指导小组）的指导下，由本人独立完成。本学位论文研究所获的研究成果，其知识产权归承德医学院所有。承德医学院有权对本学位论文进行交流、公开和使用。凡发表与学位论文主要内容相关的论文，第一署名单位为承德医学院，试验材料、原始数据、申报的专利等知识产权均归承德医学院所有。否则，承担相应的法律责任。

研究生签名：导师签章：

年月日

**承德医学院**

**研究生学位论文独创性声明**

本论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢等内容外，文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，指导教师对此进行了审定。本论文由本人独立撰写，文责自负。

研究生签名：导师签章：

年月日

**miRNA-29b抑制U251人脑胶质瘤细胞生长及其机制的初步研究**

**A preliminary study about inhibition action on growth and mechanism of U251 human glioma cells by miRNA-29b**

研究生：刘银凤学号**：**20110135

年级：2011 级

导师：冯继教授学科专业：肿瘤学

所在系部：秦皇岛市第一医院研究方向：颅内肿瘤

研究起止日期：2012年9月～2014年3月论文提交日期：2014年3 月

目 录

[摘要](#_Toc686935091) 3

[结论：](#_Toc686935092) 3

**[Abstract](#_Toc686935093)** 4

[前言](#_Toc686935094) 6

[1. 实验材料](#_Toc686935095) 7

[2. 实验分组](#_Toc686935096) 9

[3. 实验方法](#_Toc686935097) 9

[4 试验结果](#_Toc686935098) 13

[结论](#_Toc686935099) 19

[参考文献](#_Toc686935100) 19

[参考文献](#_Toc686935101) 22

**miRNA-29b抑制U251人脑胶质瘤细胞Th长及其机制的初步研究**

摘要

**目的**：

体外应用has-miRNA-29b mimics瞬时转染U251人脑胶质瘤细胞，观察其对细胞生长的影响，探讨在U251人脑胶质瘤细胞中上调miRNA-29b的表达能否抑制细胞的生长，检测细胞内增殖及凋亡相关蛋白的表达水平，初步探索miRNA-29b抑制U251人脑胶质瘤细胞生长的机制，为临床上治疗胶质瘤提供理论依据。

**方法：**

1. 用Lipofectamine 2000介导终浓度为100nmol/l的cel-miRNA-67mimics和has-miRNA-29b mimics体外瞬时转染的U251人脑胶质瘤细胞分别作为对照组和实验组。根据实验需要在转染miRNA

mimics后不同时间点（24h, 48h或72h）收取细胞，用于细胞形态学观察、MTT、流式细胞学术或Westernbloting实验。

2. 1）细胞形态学观察：在倒置相差显微镜下直接观察培养板中24h、

48h两组细胞的生长情况及细胞形态，比较两组细胞的差异，并拍照记录。重复3次。（2）MTT实验：四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法分别检测24h、

48h、72h实验组和对照组细胞在波长490nm和630nm处的吸光值OD490nm和OD630nm，用A值（A= OD490nm－OD630nm）评价细胞增殖情况。（3）流式细胞术检测细胞周期时相分布及凋亡率：PI单染法检测两组细胞48h的细胞周期，记录处于不同细胞周期时相的细胞比例；Annexin V/PI双染法测转染miRNA mimics 48h后两组细胞凋亡情况，计算凋亡指数AI，

AI(%) =凋亡细胞数/总细胞数×100%。实验重复5次。（4）蛋白印迹

（Western blotting）实验：Western blotting检测24h、48h两组细胞周期相关蛋白CDK6、cyclinD1和凋亡相关蛋白Bcl-2、Mcl-1、Bax的表达水平，IPP 6.0软件对Western条带进行定量分析。实验重复5次。

3. 统计学分析：所得数据资料均以均数±标准差( *x*±S)来表示。采用

SPSS17.0统计学软件对数据进行统计处理，方差齐的两组间采用独立样本t检验，方差不齐则采用Wilcoxon秩和检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

**结果：**

1. 细胞形态学观察：对照组U251人脑胶质瘤细胞生长状态良好，细胞贴壁生长，呈多形性，轮廓清晰，细胞间界限清楚，贴壁良好，胞体透亮，颗粒较少，细胞核清晰可见；实验组细胞24h、48h实验组U251细胞生长相对缓慢，贴壁现象减弱，肿瘤细胞失去原有多形性状态，逐渐变圆趋势，胞体轻度皱缩，胞浆内颗粒增多增粗，小部分细胞脱落死亡

2. MTT实验结果：对照组和实验组细胞在24h、48h、72h的A值分别为（0.14±0.01），（0.25±0.03），（0.36±0.02）和（0.13±0.01），

（0.21±0.02），（0.30±0.02），两组间各时间点差异均具有统计学意义

（P<0.05），且差异在转染后72h最为明显。

3. 流式细胞检测结果：对照组U251细胞48h处于G1、S、G2期细胞数比值分别为（44.78±1.52）%、(50.86±1.52) %和（4.56±0.47）%；实验组分别为（57.27±2.27）%，(39.25±2.12) %，(3.46±0.44) %，两组间差异有统计学意义（p<0.05），实验组细胞周期阻滞在G1期。实验组细胞凋亡率为（14.96±1.27）%，显著高于对照组的（4.52±1.08）%

（p<0.05）。

4. Western bloting结果：实验组24h、48h CDK6、Bcl-2、Mcl-1蛋白的表达水平较对照组减弱，Bax蛋白表达增强, cyclinD1蛋白表达量无明显变化。以上变化均以48h更为明显。

结论：

1、体外上调U251人脑胶质瘤细胞中miRNA-29b的表达可抑制肿瘤细胞的增殖并诱导肿瘤细胞凋亡。

2、miRNA-29b抑制U251人脑胶质瘤细胞增殖的机制与抑制CDK6

蛋白的表达相关，与cyclinD1蛋白的表达无直接相关。

3、miRNA-29b诱导U251人脑胶质瘤细胞凋亡与抑制Bcl-2、Mcl-1

蛋白的表达和促进Bax蛋白的表达相关。

4、miRNA-29b可能成为靶向治疗人脑胶质瘤的靶点。

**关键词**：胶质瘤； miRNA-29b；增殖；凋亡

**A preliminary study about inhibition action on growth and mechanism of U251 human glioma cells by miRNA-29b**

**Abstract**

**Objective:**

To observe the effect on U251 human gliomacell line growth by transfected with has-miRNA-29 bmimics in vitro, and to clarify werther it can modulate the proliferation and/or apoptosis of U251 cells, to explore the expression of protein which are interrelated with proliferation and apoptosis in order to seach its mechanism preliminarily. The ultimate objective of this experimentation is to provide theoretical basis for Clinical treatment of glioma.

**Methods:**

1. Lipofectamine 2000 was used to transfect cel-miRNA-67mimics or has-miRNA-29b mimics into U251 glioma cell line in vitro. The final concentration of cel-miRNA-67mimics or miRNA-29b mimics used to transfect U251 cells is 100nmol/l. The control group was transfected with

Cel-miRNA-67mimics, While the experimental group was transfect with miRNA-29b mimics. According to the need of different experiments, the U251 cells used to MTT assay、flow cyometry and Western bloting were harvested at different points (24h、48h or 72h) after transfection。

2. (1) The observation of cell morphology: Inverted phase contrast microscope directly observe the culture plates with the control group and the experimental group U251 cells form and photographed at 24h 、48h.

Comparing the difference between the two groups cells, and taking pictures

To record. Each group were repeated three times. (2) MTT assay: The optical density value of the U251 cells dyed by four methyl thiazolyl tetrazolium colorimetric method were measured at the wavelength of 490nm and 630nm.

Calculated A value (A= OD490nm-OD630nm) which was used to evaluate the cell

Proliferation ability. (3) Flow cytometry detecte cell cycle phase distribution

And apoptosis: PI single staining method was used to detecte cell cycle phase distribution of the two group cells at 48h, recording different cell cycle cell

Ratio. Annexin V/PI double staining method was used to detecte cell apoptosis at 48h, calculated the apoptosis index which is represented by AI, AI=The number of apoptosis cells/The number of total cells. (4) Western bloting was employed to test the expression of CDK6、cyclinD1、Bcl-2、Mcl-1 and Bax in the two groups of U251 cells at both 24h and 48h. Calculation the protein expression ratio of gray in two groups, used to quantitative analysis by IPP

6.0. The experiment was repeated 5 times.

3. Statistical analysis: All data are expressed as mean±standard deviation ( *x*±S). The data were analyzed by two-sample t-test or Wilcoxon rank sum test through SPSS17.0 statistical software. P <0.05 was statistically significant difference.

**Results:**

1. Cell morphology: It is found that the control group cells were growing well. The adherent phenomenon was obviously. The cell were polygonal, while its transparent was cytoplasm, and nucleus was clear. The growth of

Experimental group cells were inhibited partly. Specifically, cell growth was slow, adherent phenomenon was weaken, cell shrinkage slightly, and cytoplasm particles increased.

2. MTT results: At 24h, 48h, 72h, the value of A in the control group and the experimental group were（0.14±0.01）,（0.25±0.03）, (0.36±0.02) and（0.13±0.01）,（0.21±0.02）, (0.30±0.02 ), there were statistically significant differences between the two groups (P <0.05), it is the most

Significant at 72h.

3. Flow cytometry results: At 48h, the control group cells in the G1, S,

G2 phase respectively wa(s 44.78±1.52) %(50.86±1.52) % and 4.56±0.47) %;

While experimental group cells were (57.27±2.27) %, (39.25±2.12) %，

(3.46±0.44) %, there were statistically significant differences between the two groups (P <0.05). Apoptosis rate in the experimental group was

(14.96±1.27) %, which was significantly higher than (4.52±1.08) % in the

Control group (p <0.05).

4. By Western bloting results showed that: At 24h、48h, the expression levels of CDK6, Bcl-2 and Mcl-1 protein in experimental group were weakened than in the control group, Bax protein expression level was enhanced, while there was no significant changes in cyclinD1. The change was more obvious at 48h.

**Conclusion:**

1. Overexpression of miRNA-29b can inhibit the growth of U251 human glioma cell.

2. Overexpression of miRNA-29b can arrest cell cycle of U251 human glioma cell at G1, its mechanism is related to inhibiting the expression levels of CDK6 protein while unrelated with cyclinD1 protein.

3. Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of U251 glioma cells, its mechanism is related to inhibiting the expression levels of Bcl-2, Mcl-1 protein and enhancing the expression level of Bax.

4. MiRNA-29b may be a target spot in targeted therapy of glioma.

**Key Words:**: Glioma; MiRNA; Proliferation; Apoptosis

**英文缩写**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文译名 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| Cdks | Cyclin-dependent protein kinases | 周期蛋白依赖性蛋白激酶 |
| cel-miRNA-67 | Caenorhabditis elegans  microRNA-67 | 秀丽隐杆线虫 miRNA-67 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| fMRI | functional magnetic resonance  imaging | 功能性磁共振成像 |
| GBM | Glioblastoma multiforme | 多形性胶质母细胞瘤 |
| IFN-γ | Interferon-γ | 干扰素-γ |
| miRNA-29 | microRNA-29 | 微小 RNA-29 |
| MMP16 | Matrix metalloproteinases16 | 基质金属蛋白酶 16 |
| MTT | 3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,  5-diphenyltetrazolium bromide | 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2，  5-二苯基四氮唑溴盐 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸缓冲液 |
| PMSF | Phenylmethanesulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| PVDF | Polyvinylidene difluoride | 聚偏氟乙烯 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基磺酸钠 |
| siRNA | Small interfering RNA | 小干扰 RNA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylene  diamine | 四甲基乙二胺 |
| U251 cells | U251 human glioma cells | U251 人脑胶质瘤细胞 |
| UTR | Untreated Regions | 非翻译区 |

**miRNA-29b抑制U251人脑胶质瘤细胞Th长及其机制的初步研究**

前**言**

胶质瘤(glioma)是最常见的中枢神经系统原发肿瘤[1]。尽管神经外科手术和放化疗等医疗手段不断进步，胶质瘤患者的预后与生存并未得到明显的改善，胶质瘤严重影响患者的正常生活与健康[2]。随着对肿瘤分子遗传学、表观遗传学认识的提高及肿瘤分子流行病学、分子病理学等新兴学科的建立，分子靶向治疗在胶质瘤治疗中展示出了令人鼓舞的美好前景

[3]. 探索胶质瘤增殖、凋亡、侵袭及转移等过程所涉及的分子机制，阐明

胶质瘤发生发展的机制，是建立胶质瘤分子诊断标准、开展胶质瘤分子靶向治疗技术的理论基础。

miRNA是一类内源性、非编码、单链小分子RNA [4]，通过促进靶

mRNA降解和（或）抑制其翻译在转录后水平发挥调控基因表达的作用[5]。

miRNA的异常表达与肿瘤的发生、发展密切相关，是肿瘤细胞无限增殖、凋亡抑制、侵袭、转移及肿瘤细胞间质重塑和肿瘤血管生成的重要因素[6]。研究发现miRNA-29b在多种肿瘤中异常表达，参与抑制肝癌[7、8]、乳腺癌[9、10]、肺癌[11、12]、前列腺癌[13]、皮肤黑色素瘤[14]、多发骨髓瘤[15]、急性髓系白血病[16、17]的发生发展。在SNB19胶质瘤细胞中上调miRNA-29c的表达，或是在U251胶质瘤细胞中上调miRNA-29a的表达，均可抑制胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭，诱导细胞凋亡，但目前尚未见关于miRNA-29b参与调控胶质瘤生物学活性的相关报道[18、19]。

CDK6是CDK家族的重要成员，可与cyclinD1结合形成复合体，催化Rb基因特异性位点的磷酸化，激活下游细胞周期调控基因的转录的启动，诱导细胞从G1期进入S期[20]。研究表明，miRNA-29表达显著下调的淋巴瘤患者预后不良，其机制与miRNA-29抑制CDK6的表达有关[21]；转染miR-29a/b的A375黑色素细胞瘤细胞中，CDK6的表达在mRNA水平和蛋白水平均下调[22]；miRNA-29c可以通过靶作用于CDK6调控胶质瘤SNB19细胞的细胞周期，抑制胶质瘤的生长[18]。

B淋巴细胞瘤-2基因简称Bcl-2（B-cell lymphoma-2）是细胞凋亡中

最受重视的癌基因之一。Bcl-2家族蛋白按功能可分为两类，一类具有抑制凋亡作用，如Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W、Mcl-1、A1等；另一类具有促进凋亡作用，如Bax、Bcl-Xs、Bax、Bak、Bik/Nbk、Bid和Harakiri. miRNA-29在肝细胞癌中能直接靶作用于Bcl-2和Mcl-1，抑制HCC细胞在裸鼠中形成肿瘤的能力[7]。另外，过表达miRNA-29可导致线粒体潜能丧失，促进细胞色素C释放到胞质中，提示miRNA-29还可能通过涉及Bcl-2和Mcl-1的线粒体途径而促进凋亡[7]。研究表明，在心肌细胞中沉默miRNA-29可以对抗心肌损伤引起的促凋亡蛋白Bax的表达上调[23]，但尚未见到miRNA-29调控Bax表达调控肿瘤细胞凋亡的相关报道。

基于miRNA-29b在多种肿瘤中表现出抑癌miRNA的功能，以及miRNA-29a/c在胶质瘤细胞株中表现出来的抑制肿瘤细胞生物学活性的作用，本实验以U251人脑胶质瘤细胞为研究对象，通过脂质体介导瞬时转染上调了miRNA-29b的表达水平，借助MTT、流式细胞术及

Westernbloting等技术对miRNA-29b调控胶质瘤增殖、凋亡能力及其机制做了初步探索，为临床上应用miRNA-29b靶向治疗胶质瘤提供理论依据。

**材料与方法**

# 1. 实验材料

|  |  |
| --- | --- |
| 1.1 实验细胞 |  |
| U251 人脑胶质瘤细胞株 | 中国军事医学科学院 |
| 1.2 主要仪器 |  |
| FRESCO 17 低温离心机 | 芬兰 Thermo 公司 |
| CENTRA CL3-R 低温离心机 | 芬兰 Thermo 公司 |
| Centrifuge 5415D 离心机 | Eppendorf 公司 |
| CO2 孵箱 | Foma Scientific 公司 |
| 流式细胞仪 | 美国 BD 公司 |
| 酶标仪 | 芬兰 Thermo 公司 |
| 电泳仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 半干式蛋白质印迹转模槽 | 美国 Bio-Rad 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| PVDF 膜 | Millipore 公司 |
| 紫外分光光度仪 | 日立公司 |
| ECL 发光仪 | GE 公司 |
| 超低温冰箱 | Millus 公司 |
| 荧光倒置显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| 1.3 主要试剂 |  |
| Lipofectamine 2000 | 北京 Promega 公司 |
| Has-miRNA-29b mimics | 南通 Biomic 公司 |
| cel-miRNA-67mimics | 南通 Biomic 公司 |
| 胎牛血清 | 美国 Invitrogen 公司 |
| MEM 培养基 | 美国 Invitrogen 公司 |
| 胰蛋白酶(trypsin) | Sigma 公司 |
| Annexin V/PI 试剂盒 | 联科生物公司 |
| 蛋白裂解液 | Sigma 公司 |
| ECL 试剂盒 | 美国 Thermo 公司 |
| 兔抗多克隆 CDK6 抗体 | 武汉 Boster 公司 |
| 兔抗多克隆 cyclinD1 抗体 | 武汉 Boster 公司 |
| 兔抗多克隆 Mcl-1 抗体 | 武汉 Boster 公司 |
| 兔抗多克隆 Bcl-2 抗体， | 武汉 Boster 公司 |
| 小鼠抗多克隆 Bax 抗体 | 武汉 Boster 公司 |
| ft羊抗鼠二抗 | 北京中杉金桥公司 |
| ft羊抗兔二抗 | 北京中杉金桥公司 |

## 1.4 常用溶液的配制

##### （1) PBS缓冲液

NaCl 4.0g, KCl 0.1g, Na2HPO4·12H 2O 1.095g, KH2PO4 0.12g, 溶于

双蒸水中，定容至500ml，调整pH值至7.4，高压灭菌，4℃保存。

##### （2) DEPC 水

在999ml双蒸水中加入1ml DEPC，混匀后备用。

##### （3) 5×Tris甘氨酸电泳缓冲液

Tris碱7.55g, SDS 2.5g，甘氨酸47g，溶于双蒸水中，定容至500ml，使用前5倍稀释。

##### （4) PMSF储存液的配制(以100mmol/L为例)

PMSF 17.4mg，溶于1ml异丙醇中后分装，保存于-20℃。

##### （5) 10%SDS

SDS 10g，溶于双蒸水中，定容至100ml，常温保存备用。

##### （6) 1.5MTris-HCl (PH8.8)

Tris碱18.2g，溶于80ml双蒸水中，调定PH为8.8，定容至100ml。

##### （7) 1.0MTris-HCl (PH6.8)

Tris碱12.1g，溶于80ml双蒸水，调定PH为6.8，定容至100ml。

##### （8) 转膜缓冲液

Tris碱1.5g，甲醇100ml，甘氨酸7.2g，溶于双蒸水中，定容至500ml，现用现配。

##### （9) 10%过硫酸胺(APS)

APS 1g，溶于双蒸水中，定容至10ml，分装后-20℃保存，隔周新鲜配制。

##### （10）30%丙烯酰胺(29:1)

丙烯酰胺29g，N，N'-Y亚甲双丙烯酰胺1g，分别溶于温热双蒸水中，补双蒸水定容至100ml，滤纸过滤，4℃棕色试剂瓶中保存，每月新鲜配置。

##### （11) 1×T TBS缓冲液

NaCl 8.8g, 1.0MTris-HCl 20ml, Tween20 0.5ml，溶于双蒸水，定容至1000ml，现用现配。

##### （12) 1×TBS缓冲液

NaCl 8.8g, 1.0MTris-HCl 20ml，溶于双蒸水，定容至1000ml，现用现配。

##### （13) 封闭液（5%脱脂奶粉）

脱脂奶粉5g，加入1×TBST使其充分溶解后，定容至100ml。

# 2. 实验分组

以体外瞬时转染cel-miRNA-67mimics的U251人脑胶质瘤细胞作为对照组，以转染has-miRNA-29b mimics的U251人脑胶质瘤细胞作为实验组。在转染miRNA mimics后24、48、72h收取细胞用于MTT实验，转染后48h收取细胞用于流式细胞仪检测，转染后24h、48h收取细胞用

于Western bloting实验。

# 3. 实验方法

## 3.1 细胞复苏、培养、传代与冻存

### 3.1.1 细胞复苏

##### （1) 4℃冰箱中取出含血清培养基，室温静置30min。

##### （2) 水浴箱预热至37℃~40℃。

##### （3) 液氮灌中取出细胞冻存管，迅速置于预热的温水中，快速摇晃

1~2min完成复温。。

##### （4) 将复温后的细胞悬液移入离心管中，加入5ml完全培养基，反复吹打混匀。

##### （5) 1500rpm∕min，离心10min。

##### （6) 弃上清，重复步骤（4）（5）。

##### （7) 去上清，加入新鲜配制的完全培养基10ml，吹打混匀重悬浮细胞。

##### （8) 将细胞悬液移入培养瓶，加入适量的完全培养基，置于培养箱内进行培养。

### 3.1.2 细胞培养

U251胶质瘤细胞为单层贴壁生长。用含10%胎牛血清的MEM培养基，在37℃、5% CO2饱和度的细胞培养箱内常规贴壁培养。每1~2天换液1次，每隔2~3天按1: 3传代，取对数生长期的细胞进行实验。

### 3.1.3 细胞传代

（1）倒置显微镜下观察，当细胞单层覆盖瓶底达80~90%时进行传代。

（2）弃掉培养瓶中培养基，加入PBS洗涤细胞3次，去除其中血清成分，吸尽PBS。

(3)加入1ml 0.25%胰蛋白酶溶液，轻轻转动培养瓶，使胰蛋白酶溶液浸匀整个瓶底，充分与细胞接触，吸弃胰蛋白酶。

（4）再加入1ml 0.25%胰蛋白酶溶液，将培养瓶置在37℃、5% CO2、饱和湿度的细胞培养箱内2~3min,于倒置显微镜下观察细胞回缩变圆、细胞间隙变大时，立刻小心吸出并弃去胰蛋白酶溶液，加入含10%胎牛血清的MEM培养基，终止消化。

(4)反复轻轻吹打培养瓶底悬浮细胞，制备成单细胞悬液。1: 3传代，各瓶加入培养液2ml，细胞放入37℃、5% CO2培养箱继续培养。

### 3.1.4 细胞冻存

##### （1）取对数生长期的细胞，调整细胞密度到5×10 6/ml以上，收集细胞前换液1次。

##### （2）1000rpm离心5min，弃上清，加入含20%胎牛血清、10%DMSO、

70%无血清MEM培养基的冻存液重悬细胞，细胞悬液分装入无菌冻存管中，封口膜封口。标记细胞名称和冷冻日期。

（3）梯度降温冻存：冻存管依次于4℃放置40min，-20℃放置

30~60min，-80℃放置过夜，最后移入液氮中保存。

## 3.2 细胞的转染（以培养板为例）

### 3.2.1 准备细胞转染前1天将0.5～2×10 5细胞接种于培养板中，加入含

10%胎牛血清MEM培养基，保证转染时细胞汇合达30～50%。

### 3.2.2 准备复合物

(1) 2.5nmol has-miRNA-29b mimics或cel-miRNA-67mimics干粉离心后溶于25ulDEPC水中，混匀，-20℃保存备用。避免反复冻融。

(2)取3ulmiRNA mimics稀释于50ul无血清无抗生素的培养液中轻轻浑匀。

(3)将9ul Lipofectamine2000稀释于50ul无血清培养液中，轻轻浑匀，室温孵育5分。

(4)将两者混合，轻轻摇动浑匀，室温孵育20分。

### 3.2.3 转染

(1)吸去培养孔中的培养基，用无血清培养基清洗细胞3次。

(2)将准备好的复合物（总体积100ul）加入培养板，前后摇动使其分布均匀。

(3)加入无血清培养基，使has-miRNA-29b mimics或

cel-miRNA-67mimics终浓度为100nmol/l。

(4)将细胞放入培养箱孵育4h，更换含血清培养基，转染完成。

## 3.3 细胞形态学观察、MTT试验、流式细胞术、Western bloting试验

### 3.3.1 细胞形态学观察

取对数生长期细胞消化成细胞悬液接种于6 孔板中，每孔约1×105

个细胞进行miRNA转染，对照组和实验组细胞均置于37℃、饱和湿度、

5%CO2培养箱常规培养。培养24h、48h后置于倒置相差显微镜下直接观

察培养板中肿瘤细胞的生长情况及形态特征。每组细胞设3个复孔。

### 3.3.2 MTT试验

##### （1）转染前1天将U251人脑胶质瘤细胞接种于96孔板中，每孔细胞约5×10 3个。共接种48孔，实验组和对照组各24孔。

##### （2）常规培养过夜后进行has-miRNA-29b mimics或

cel-miNA-67mimics转染。

##### （3）将每组的24孔分3个亚组，分别于转染后24h、48h、72h加入

20µL浓度为5mg/ml的MTT溶液继续孵育4h。即实验组和对照组在每个时间点均设有8个复孔。

##### （4）4h后弃原液，各孔加入标准浓度的二甲基亚砜（DMSO）200ul。

##### （5）将培养板移入平板震荡器水平震荡10min，使MTT还原产物充分溶解。

##### （6）用全波长酶标仪在波长490nm和630nm处分别测量各孔的吸光值OD490nm和OD630nm，记录结果，计算A值：A=OD490nm–OD630nm。

### 3.3.3 流式细胞术

#### 3.3.3.1 PI单染法检测细胞周期：

##### （1）取对数生长期的细胞在转染前1天将细胞接种于6孔板中，每孔

lx105/ml个细胞，常规培养过夜，使细胞汇合达30～50%。

##### （2）弃含10%胎牛血清的MEM培养基，无血清MEM培养基冲洗 3

次，无血清培养基培养24h，使细胞同步化在G0期后进行转染。

##### （3）转染后48h用0.25%胰酶消化5min，1500rpm离心5min，PBS

冲洗3遍。

（4）预冷的70%乙醇在-20℃固定24h, PBS清洗，吸弃上清。

（5）细胞沉淀中加入0.1% RNA酶A溶液150ul，重悬细胞，调整细胞数为1x105/ml，37℃孵育30min。

（6）再加入0.1% PI染色液120ul混匀，4℃避光孵育10min。

（7）用200目尼龙膜过滤细胞到流式细胞管中，除去细胞团块；

（8）流式细胞仪检测。

（9）记录处于不同细胞时期的细胞比例。

#### 3.3.3.2 Annexin V/PI双染法测细胞凋亡率：

##### （1）取对数生长期的细胞在转染前1 天将细胞接种于6 孔板中，

lx105/ml，常规培养过夜后进行转染，继续常规培养。

##### （2）转染后48h用0.25%胰酶消化5min，1500rpm离心5min，PBS

冲洗3遍。

（3）预冷的70%乙醇在-20℃固定24h，再用PBS洗3遍，吸弃上清。

（4）细胞沉淀中加入0.1% RNA酶A溶液150ul，重悬细胞，调整细胞数为1x105/ml，4℃30min。

（5）向每管加入5μl Annexin V-FITC和10μl PI，轻轻混匀后避光孵育10min。

（6）用200目尼龙膜过滤细胞到流式细胞管中，除去细胞团块；

（7）流式细胞仪检测。

（8）记录凋亡指数：AI(%) =凋亡细胞数/总细胞数×100% 。

### 3.3.4 Western bloting试验

#### 3.3.4.1 样品制备

##### （1）取对数生长期的U251细胞，0.25%胰蛋白酶消化，接种于25ml培养瓶内，调整细胞密度为5×10 5/ml，完全培养液CO2孵箱内培养过夜，使其贴壁后进行转染，无血清MEM培养基培养4h后更换为含10%胎牛血清的MEM培养基继续培养24、48h后收集细胞于1.5ml的EP管中。

##### （2）1000r/min离心5min，彻底去除上清，收集细胞沉淀备用。

##### （3）每管中加入200μL细胞裂解液，并加终浓度为1mmol/l的PMSF，吹打均匀，冰浴15min，作用期间振荡培养瓶7～8次使细胞充分裂解。

（3）4℃，12000rpm，离心20min，留取上清，转入新的预冷Eppendorf

管中，置于-70℃保存备用。

#### 3.3.4.2 Folin－酚法测定总蛋白浓度

##### （1）原理：Folin－酚试剂在碱性环境中极其不稳定，易被酚类化合物还原成蓝色的复合物，因为蛋白质中含有酚类的氨基酸，故Folin－酚试剂可以与蛋白质反应形成复合物，且复合物颜色的深浅与蛋白的含量成正比。用酶联免疫检测仪测定蓝色复合物的吸光值，即可测定蛋白质浓度。

##### （2）Folin－酚试剂的制备

1）Folin－酚试剂甲：A 0.2MNaOH+4%NaCO3等体积混合；B 2%酒石酸钾钠+GuSO4 5H2O等体积混合；实验当天将100mlA+2mlB混合备用。

2）Folin－酚试剂乙：5ml苯酚+5ml水，0.1MNaOH滴定至酸度为1M。

##### （3）标准曲线的制作

取标准蛋白溶液0.1mL，用生理盐水倍比稀释为0.1、0.08、0.06、

0.04、0.02、0mg/mL，加入Folin－酚试剂甲、乙（10: 1）0.1mL，吹吸混匀，50℃水浴10min，冷却后测定595nm波长处的吸光度值，以各标准蛋白浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。

##### （4）测定样本总蛋白

分别取细胞蛋白提取液5μL、10μL、20μL、稀释至0.1mL代替标准蛋白溶液，按上述方法测定595nm波长处的吸光度值，根据蛋白标准曲线计算出匀浆液的蛋白浓度。

#### 3.3.4.3 蛋白变性

取出保存于-80℃冰箱的蛋白样品，按蛋白样品：5×Loading Buffer =4：

1的比例加入5×Loading Buffer，盖好EP管口，沸水中煮沸5 min。

#### 3.3.4.4 蛋白电泳

##### （1）按下表分别配制分离胶和浓缩胶。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 | 10% 分 离 胶  (6ml) | 5% 浓缩胶  (4ml) |
| 30%凝胶储备液 | 1.98 | 0.66 |
| 分离胶缓冲液  (1.5M Tris-HCl) | 2.25 | 0 |
| 浓缩胶缓冲液  (1.0M Tris-HCl) | 0 | 0.5 |
| 10%SDS | 0.06 | 0.04 |
| 双蒸水 | 1.65 | 2.8 |
| 10%APS | 0.06 | 0.04 |
| 1%TEMED | 0.0038 | 0.004 |

##### （2）） 将分离胶溶液依次加至组装好的电泳板中（注意最后加

1%TEMED），在分离胶上面铺上水层。室温静置30min以上。

（3）待分离胶凝固后，弃去上面的水层，滤纸吸干残留水渍。向电泳板中快速加入浓缩胶，小心插入梳子，避免产生气泡。室温静置至凝固。

（4）待浓缩胶聚合凝固完全后，在电泳槽中加入1×电泳缓冲液，小心移出梳子。

（5）选择1条泳道加入上样Mark3-5µl，余泳道加入变性后的蛋白样品100µl，上槽接负极，下槽接正极，恒流20mA开始电泳，待样品进入浓缩胶后改为40mA电泳，待溴酚蓝迁移至凝胶下端时停止电泳。

#### 3.3.4.5 半干转膜

##### （1）打开电泳板，取出凝胶，依据泳道及目标蛋白分子量大小，比对

Mark裁剪凝胶，转移至缓冲液中浸泡。

##### （2）根据凝胶的大小裁剪等大的1张PVDF膜和2张滤纸，将PVDF膜于甲醇中浸泡30s进行激活，然后将滤纸、PVDF膜于转移缓冲液中浸泡15min。

##### （3）安装转移装置：按照阴极、滤纸、胶、PVDF膜、滤纸、阳极的顺序连接，注意赶走气泡。

##### （4）扣紧转移槽，接通电源，进行转膜，转移电流50～250 mA，依据蛋白样本分子量大小调整转膜时间，一般转膜20~60min。

#### 3.3.4.6 免疫印迹

##### （1）牛奶封闭：将PVDF膜浸泡于新鲜配制的5%脱脂牛奶封闭液中，

37℃恒温箱孵育1h。

##### （2）一抗结合：用TBS液稀释兔抗多克隆CDK6抗体，兔抗多克隆

cyclinD1抗体，兔抗多克隆Bcl-2抗体，兔抗多克隆Mcl-1抗体，小鼠抗多克隆Bax 抗体，稀释比例均为1: 100。取适量稀释后的抗体加入置有

PVDF膜的杂交袋中，使PVDF膜上的蛋白与抗体充分接触，压紧四角。室温下孵育过夜。

（3）洗膜：取出PVDF膜置于盛有适量TTBS的平皿中，室温下摇床清洗3次，每次10min。

（4）二抗结合：用TBS液1: 1000稀释辣根过氧化物酶标记的ft羊抗兔IgG、ft羊抗小鼠IgG。依据一抗的免疫源性取适量稀释后的抗体加于置有PVDF膜的杂交袋中，压紧四角。室温孵育2h。

（5）重复步骤（3）。

（6）避光取等量ECL A、B液，混合均匀，将混和液加于PVDF膜上，使其反应2min。

（7）Image Quant LAS凝胶成像系统采集图像。

（8）所得图片用IPP 6.0软件对Western条带灰度值检测，计算目的条带的相对灰度值（目的蛋白条带相对灰度值=目的蛋白条带灰度值/同一样品β-actin条带灰度值）。

## 3.4 统计分析

实验中所得数据资料均以均数±标准差( *x*±S)来表示。采用SPSS17.0统计学软件对数据进行统计处理，方差齐的两组间采用独立样本t检验，方差不齐则采用Wilcoxon秩和检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

**结果**

# 4 试验结果

## 4.1 细胞形态学观察

对照组U251人脑胶质瘤细胞生长状态良好，细胞贴壁生长，呈多形性，典型细胞发出“突触”，轮廓清晰，细胞间界限清楚，贴壁良好，胞体透亮，颗粒较少，细胞核清晰可见；实验组细胞24h、48h实验组U251细胞生长相对缓慢，贴壁现象减弱，肿瘤细胞失去原有多形性状态，逐渐变圆趋势，胞体轻度皱缩，胞浆内颗粒增多增粗，小部分细胞脱落死亡，以转染后48h表现得较为明显(Figure 1)。对照组和实验组细胞在转染后

72h均较多量死亡。

## 4.2 MTT试验结果

对照组24h、48h、72h的A值分别为（0.14±0.01），（0.25±0.03），

（0.36±0.02）；实验组分别为（0.13±0.01），（0.21±0.02），（0.30±0.02），实验组A值较对照组减小，两组细胞A值在各个时间点的比较均具有统计学意义（p<0.05）（Tablel 1）,且以转染后72h的差异最为明显（Figure 2）。

## 4.3 流式细胞术检测细胞周期时相分布及凋亡率

### 4.3.1 PI单染法检测细胞周期结果显示：

对照组U251 细胞处于G1、S、G2 期分别为（44.78±1.52）%、

（50.86±1.52）%和（4.56±0.47）%；实验组分别为（57.27±2.27）%，

（39.25±2.12）%，(3.46±0.44) %（Tablel 2），在G1期实验组明显高于对照组，两组间差异有统计学意义（p<0.05）（Figure 3）。

### 4.3.2 Annexin V/PI双染法测细胞凋亡率结果显示：

对照组的细胞凋亡率为（4.52±1.08）%，实验组的凋亡率为

（14.96±1.27）%（Tablel 2），两组间差异有统计学意义（p<0.05）(Figure

4）。

## 4.4 、Western bloting结果：

结果显示实验组24h、48h CDK6、Bcl-2、Mcl-1蛋白的表达水平较对照组减弱，Bax 蛋白表达较对照组增强，其中48h 变化更为明显。

cyclinD1蛋白表达量无明显变化（Figure 5）。

### 4.4.1 CDK6结果

对照组CDK6 蛋白在24h、48h 相对灰度值分别为(0.47±0.05),

（0.47±0.02）；实验组分别为（0.16±0.04），（0.08±0.02），实验组CDK6

相对灰度值在24、48h均低于对照组，两组间差异有统计学意义（p<0.05）

（Tablel 3）。

### 4.4.2 cyclinD1结果

对照组cyclinD1蛋白在24h、48h相对灰度值分别为（0.49±0.06）,

（0.50±0.05）；实验组分别为（0.50±0.7），（0.48±0.05），实验组cyclinD1

相对灰度值较对照组无明显差异，两组间差异无统计学意义（p<0.05）

（Tablel 3）。

### 4.4.3 Bcl-2结果

对照组Bcl-2 蛋白在24h、48h 相对灰度值分别为(0.70±0.05),

（0.74±0.06）;实验组分别为(0.37±0.05)，（0.19±0.03），实验组Bcl-2相对灰度值在24h、48h均低于对照组，两组间差异有统计学意义（p<0.05）

（Tablel 3）。

### 4.4.4 Mcl-1结果

对照组Mcl-1 蛋白在24h、48h 相对灰度值分别为(0.67±0.04),

（0.71±0.07）;实验组分别为，(0.36±0.04)，（0.21±0.03），实验组Mcl-1

相对灰度值在24h、48h均低于对照组，两组间差异有统计学意义（p<0.05）

（Tablel 3）。

### 4.4.5 Bax结果

对照组Bax蛋白在24h、48h相对灰度值分别为(0.36±0.04)，(0.37±0.04)；实验组分别为（0.57±0.05）（0.67±0.04），实验组Bax相对

灰度值在24h、48h均高于对照组，两组间差异有统计学意义（p<0.05）

（Tablel 3）。

**附表**

（*x*±s, n=24）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| group | 24h |  | 48h |  | 72h |
| control | 0.14±0.01 |  | 0.25±0.03 |  | 0.36±0.02 |
| miR-29b | 0.13±0.01 △ |  | 0.21±0.02 △ |  | 0.30±0.02 △ |
| △ p<0.05 compared with control group | |  |  |  |  |

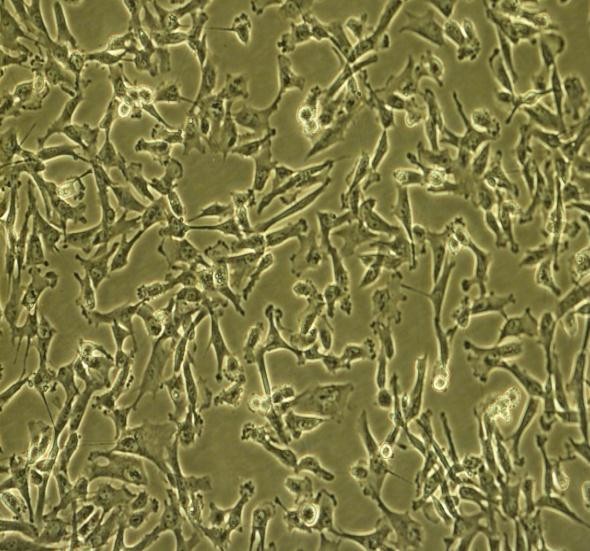
U251 cell at 48h( *x*±s, n=5)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| group | G1 |  | S |  | G2 |  | AI |
| control | 44.78±1.52 |  | 50.86±1.52 |  | 4.56±0.47 |  | 4.52±1.08 |
| miR-29b | 57.27±2.27 △ |  | 39.25±2.12 |  | 3.46±0.44 |  | 14.96±1.27 △ |
| △ p<0.05 compared with control group | | | |  |  |  |  |

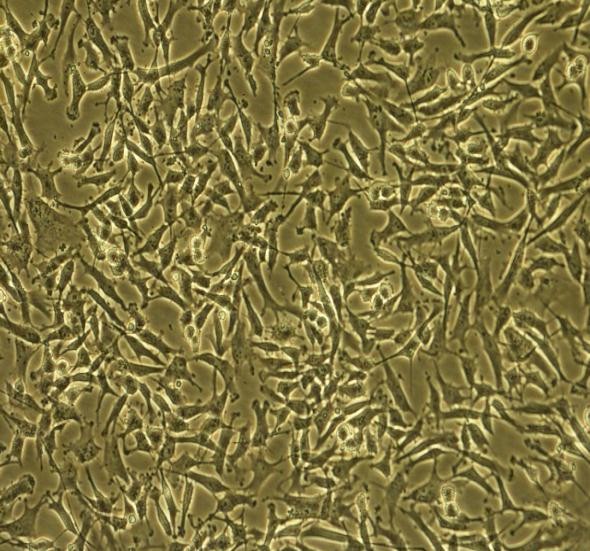
（*x*±s, n=5）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| group | 24h |  | 48h | | |
|  | control | miR-29b |  | control | miR-29b |
| CDK6 | 0.47±0.05 | 0.16±0.04 △ |  | 0.47±0.02 | 0.08±0.02 △ |
| cyclinD1 | 0.49±0.06 | 0.50±0.7 |  | 0.50±0.05 | 0.48±0.05 |
| Bcl-2 | 0.70±0.05 | 0.37±0.05 △ |  | 0.74±0.06 | 0.19±0.03 △ |
| Mcl-1 | 0.67±0.04 | 0.36±0.04 △ |  | 0.71±0.07 | 0.21±0.03 △ |
| Bax | 0.36±0.04 | 0.57±0.05 △ |  | 0.37±0.04 | 0.67±0.04 △ |
| △ p<0.05 compared with control group | |  |  |  |  |

**附图**



**1**



**2**



**3**



**4**

**Fig.1** The U251 cells of control group (Figure 1.1and 1.2) and experimental group (Figure 1.3and 1.4) observed by inverted phase contrast microscope at 24h (Figure 1.1and 1.3) and 48h (Figure 1.2and 1.4) (×400)

MTT

control miR-29b

0.400

0.300

0.200

MEAN

0.100

0.000

24h 48h 72h

TIME

**Fig.** **2** MTT assay determined the value of A in control and experimental group



**1**



**2**

**Fig.** **3** cell cycle phase distribution detection in control(Figure 3.1) and experimental group (Figure 3.2) after transfected 48h



**Fig.** **4** Cell apoptosis detection in control(Figure 4.1) and experimental (Figure 4.2) groups after transfected 48h

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 24h |  | 48h | |  |
|  | | | | CDK6 |
|  | | | | cyclinD1 |
|  | | | | Bcl-2 |
|  | | | | Mcl-1 |
|  | | | | Bax |
|  | | | | β-actin |
| control | miR-29b | Control | miR-29b |  |
| **Fig.** **5** Western blot assay of related protein express level | | | | |

**讨论**

胶质瘤是最常见的原发性颅内肿瘤，我国脑胶质瘤占颅内肿瘤的35.26%-60.96%，平均44.69%[24]。胶质瘤多成浸润性生长，边界不清，通常在瘤周2cm以内的脑组织中均有肿瘤细胞生长，病理级别多呈进行性恶化。肿瘤周围独特的生物学特性和细胞动力学研究显示，肿瘤周围正常脑组织内亚临床区肿瘤细胞具有增殖能力[25]。传统的胶质瘤治疗多采用手术治疗为主，辅助以放射疗法及化学药物疗法的综合治疗，但由于胶质瘤生长的位置特殊、呈浸润性生长、分化程度差、病理级别多呈进行性恶化等特点，使得胶质瘤很难治愈[26]。据不完全统计，GBM患者经肿瘤肉眼全切、放疗、化疗等综合治疗后，2年生存率为10%，仅有不到

5%的病人可长期生存，平均中位生存期仅为1年左右[27]。正是基于神经胶质瘤这种高发病率、高复发率，治疗效果差的原因，神经外科学者对胶质瘤的科研热情从未减退。

上个世纪以来，分子生物学以前所未有的深度和广度变革了神经肿瘤学临床研究和基础研究的各个领域。在临床研究领域，以循证医学为基础而制定的诊断和治疗指南，使胶质瘤的临床诊断和综合治疗有章可循；多中心参与的临床试验为评价各种治疗方法的安全性和疗效提供了平台；功能影像学和皮质电刺激等医学技术，支撑了中枢神经系统外科手术的微侵袭概念，实现了脑功能区肿瘤的安全切除[28]。在基础研究领域，分子遗传学和表观遗传学一直以来都是肿瘤的研究热点，肿瘤分子流行病学及分子病理学等新兴学科的陆续建立，更加深刻的揭示了中枢神经系统肿瘤发生、发展、增殖、侵袭和新生血管形成的分子机制，同时也拉开可分子靶向治疗神经胶质瘤的序幕。神经系统肿瘤干细胞的发现让我们对肿瘤的发生机制有了新的认识，也为胶质瘤的治疗提出了新思路[29]。其中，分子靶向治疗正从最初的单靶点抑制向多靶点治疗发展，多靶点细胞信号通路之间的交互作用和旁路激活成为靶向治疗的研究热点[30]。

miRNA是一类长约20~25nt的内源性、非编码、小分子单链RNA，是重要的表观遗传学调控机制之一。miRNA的成熟过程与非编码小干扰

RNA（siRNA）相似，由长约70~90nt、具有发夹结构的单链pre-miRNA

通过Dicer酶的剪切产生[31]。成熟的miRNA可以通过碱基互补配对的方式与靶mRNA的3′-UTR端特异性结合，在转录后水平促进靶mRNA降解和（或）抑制翻译发挥调控基因表达的作用[5]。miRNA的异常表达与肿瘤的发生、发展密切相关，是肿瘤细胞无限增殖、凋亡抑制、侵袭、转移及肿瘤细胞间质重塑和肿瘤血管生成的重要因素。因此，寻找肿瘤组织中异常表达的miRNA，确定其靶mRNA，明确靶mRNA表达产物的功能是阐明肿瘤发生发展机制关键步骤，也是应用miRNA靶向治疗肿瘤的必要理论基础。miRNA 分为抑瘤miRNA（TS-miRNA）和致瘤miRNA

（onco-miRNA），在人脑胶质瘤胞中已经发现数量较多的一致表达异常的miRNA[26]，如miRNA-21、miRNA-128、miRNA-146b等是胶质瘤的TS-miRNA，可抑制胶质瘤细胞的增殖和转移[32~34]；miRNA-26a是胶质瘤的onco-miRNA，其过表达可以促进胶质瘤的形成[35]。

miRNA -29家族包括miRNA-29a, miRNA-29b和miRNA-29c，其中miRNA-29b又分为miRNA-29b1及miRNA-29b2两种。miRNA-29a最早发现于HELA细胞，随后陆续发现了miRNA-29b和miRNA-29c[36~38]. miRNA-29a和miRNA-29b1由定位于7q32染色体625个碱基总成的模板转录而来，miRNA-29b2和miRNA-29c由定位于1q32染色体的507个碱基组成的模板转录形成[16] [39~41]。成熟的miRNA -29家族具有相同的决定靶mRNA的种子序列，因此miRNA -29家族调控的靶基因基本相同。已有研究表明，miRNA-29高表达于正常组织，低表达于神经纤维瘤、肉瘤、脑肿瘤等等多种实体肿瘤的肿瘤组织及肿瘤细胞株中[42]。miR-29c在胶质瘤组织中低表达，在SNB19胶质瘤细胞系中过表达

miR-29c后可使CDK6在mRNA水平及蛋白水平表达均显著降低，诱导细胞停滞在G1期，从而显著抑制胶质瘤细胞的增殖能力[18]。各级别胶质瘤中miR-29a表达水平均显著降低于对照脑组织，肿瘤级别越高miR-29a表达下调越明显。在U251胶质瘤细胞中上调miR-29a表达可下调

CDC42mRNA及CDC42蛋白的表达，且CDC42蛋白表达量与U251细胞的迁移及侵袭能力成正相关[19]。本实验经体外瞬时转染上调U251胶质瘤细胞中miRNA-29b的表达，通过直接的细胞形态学观察及间接的MTT实验检测细胞生长情况发现过表达miRNA-29b的U251细胞生长受到抑制，提示miRNA-29b是胶质瘤的TS-miRNA。

无限增殖是肿瘤细胞的特性之一，细胞周期紊乱是细胞无限增殖的关键步骤。CDK6是促进细胞增殖的重要细胞周期调节因子，它可与cyclinD1结合成复合体，催化Rb蛋白特异性位点的磷酸化，并进一步激活下游的细胞周期调控基因的转录，诱导细胞从G1期进入S期[20]。研究发现，在黑色素瘤细胞中，miRNA-29a前体、miRNA-29b前体和成熟的

miRNA-29a、miRNA-29b的表达水平均异常升高。广泛的miRNA-29 前

体和miRNA-29a/b表达上调促进了IFN-γ诱导的转录激活因子1 STAT1）

的激活，而STAT1的激活反过来又诱导了microRNA-29家族的表达的上调。进一步研究表明，microRNA-29a/b的表达水平与细胞的增殖率负相关，且IFN-γ诱导黑色素瘤细胞阻滞在G1期与CDK6表达的下调密切相关，CDK6是miRNA-29在黑色素瘤细胞中的直接靶基因[22]。基因检测技术发现miRNA -29在MCL中过度表达[41]，体外上调K562细胞中miRNA

-29b的表达，可引起Rb基因的广泛低甲基化，同样在AML中miRNA

-29b过表达也可引起Rb基因的低甲基化[16][43]，这些说明miRNA-29b引起Rb基因甲基化的异常至少有一部分是通过靶作用于CDK6来实现的。另外，在几乎所有类型的MCL中均过表达cyclin D1，诱导细胞从

G1期进入S期，CDK6表达的下调可协同cyclin D1阻滞细胞周期，抑制肿瘤细胞的增殖[44]。当然，以往文献的观点并不相同，据报道miRNA

-29a在AML中过表达，可通过加速G1期细胞向S/G2期细胞转化来促进髓系祖细胞向自我更新的白血病干细胞转化，从而促进肿瘤的AML的发生[45]。本实验发现上调miRNA-29b的表达可以使U251胶质瘤细胞阻滞在G1期，且同时下调CDK6蛋白的表达水平，但对CyclinD1的表达无明显变化调节作用。因此推测在U251人脑胶质瘤细胞中，miRNA-29可靶作用于CDK6诱导细胞周期阻滞在G1期。这一结果与miR-29c 在

SNB19胶质瘤细胞系中下调CDK6表达，诱导细胞周期G1阻滞的结论相符[18]。至于miRNA-29b阻滞U251细胞周期的机制是单一靶作用CDK6的结果，还是协同其他引起Rb基因低甲基化的因素，亦或是合并有IFN-γ诱导STAT1激活等因素的共同作用，还有待进一步的研究。

分子流行病学认为中枢神经系统肿瘤发生的起始遗传学事件为DNA损伤修复和凋亡基因突变[28]。凋亡是肿瘤发生发展必须克服的一道屏障，肿瘤细胞只有消除了凋亡才能逃过免疫监视，在缺乏营养、低氧等恶劣的

肿瘤生长环境中生存。抑制凋亡蛋白Bcl-2、Mcl-1和促凋亡蛋白Bax均是Bcl-2蛋白家族的重要成员，在肿瘤细胞凋亡中扮演者重要而复杂的作用。研究表明，在多种肿瘤组织和细胞中Bcl-2和Mcl-1是miRNA-29家族的靶基因[7、16、17、46]。在肝癌细胞中沉默Bcl-2和Mcl-1可以模拟miR-29家族的促凋亡作用，上调Bcl-2和Mcl-1的表达可显著逆转miR-29的促凋亡作用[7]。在大多数骨肉瘤中miRNA-29a和miRNA-29b表达水平降低

（30例中23例降低），在U20S和SAOS-2骨肉瘤细胞中，miRNA-29a表现出诱导凋亡的作用，过表达miRNA-29a/b可下调Bcl-2和Mcl-1表达，沉默miRNA-29a/b表达可上调Bcl-2和Mcl-1表达，miRNA-29a/b通过沉默Bcl-2和Mcl-1的表达，协同诱导E2F1和E2F3的表达发挥重要的诱导凋亡的作用[47]。在前列腺癌细胞株中，人髓鞘碱性蛋白可上调miR-29b的表达，间接抑制Mcl-1，胶原蛋白，基质金属蛋白酶2的表达[48]。另外，miRNA-29a/b还可以上调促凋亡基因BIM和PDCD4促进细胞凋亡[16][41]。有研究发现，在心肌细胞中沉默miR-29可以对抗心肌损伤引起的促凋亡蛋白Bax的表达上调[29]，但尚未发现miRNA-29b通过调控Bax诱导肿瘤细胞凋亡的报道。本实验发现，上调miRNA-29b表达在诱导U251细胞凋亡的同时可显著下调抑制凋亡蛋白Bcl-2、Mcl-1蛋白的表达，而上调促凋亡蛋白Bax的表蛋白表达。提示在U251人脑胶质瘤细胞中，miRNA-29b诱导细胞凋亡的机制与Bcl-2、Mcl-1蛋白表达下调相关，与

Bax蛋白表达上调相关。

研究发现，miRNA-29b的表达在肝细胞癌中显著下调，上调miRNA-29b的表达可抑制HCC细胞在裸鼠形成肿瘤能力，提示miRNA-29b在肝细胞癌治疗中的靶点作用和预后判断作用[7]。研究还发

现，在肺癌中miRNA-29b可靶作用于CDK6，Mcl-2，在体内和体外实验中均表现出较强的抑制肿瘤形成的作用，奠定了miRNA-29b在靶向治疗肺癌中靶点的地位[49]。另外，在KMCH胆管癌细胞中，上调miRNA-29b的表达可以通过下调细胞周期因子Mcl-1的表达在临床肿瘤治疗中发挥作用[46]。本实验发现，在U251人脑胶质瘤细胞中体外上调miRNA-29b的表达可以抑制的肿瘤细胞的增殖，诱导细胞的凋亡，提示miRNA-29b可能成为靶向治疗人脑胶质瘤的靶点。

综上所述，体外上调U251人脑胶质瘤细胞中miRNA-29b的表达

可以抑制U251人脑胶质瘤细胞的增殖和凋亡，这种抑制作用与CDK6、Bcl-2、Mcl-1和、Bax的表达水平相关，与cyclinD1蛋白的表达水平无直接相关，miRNA-29b可能成为靶向治疗人脑胶质瘤的靶点。

结**论**

1、体外上调U251人脑胶质瘤细胞中miRNA-29b的表达可抑制肿瘤细胞的增殖并诱导肿瘤细胞凋亡。

2、miRNA-29b抑制U251人脑胶质瘤细胞增殖的机制与抑制CDK6

蛋白的表达相关，与cyclinD1蛋白的表达无直接相关。

3、miRNA-29b诱导U251人脑胶质瘤细胞凋亡与抑制Bcl-2、Mcl-1

蛋白及促进Bax蛋白的表达相关。

4、miRNA-29b可能成为靶向治疗人脑胶质瘤的靶点。

参考文献

[1] Knupfer MM, Pulzer F, Schindler I, et al. Different effect of valproic acid on proliferation and migration glioma cells in vitro[J]. Anticancer Res, 2001, 21: 347-351

[2] Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. Annu Rev Pathol, 2006, 1: 97-117

[3] Berger MS, Chang SM. Current perspectives on nouro-oncology. Neurotherapeutics, 2009, 6: 425-426

[4] eSano JT, Xu L. MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications[J]. AAPS J, 2009, 11(4): 682-692

[5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297

[6] Esquela-Kerscher A, Slack F. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. Nat. Rev. Cancer 2002, 2(8): 616-626

[7] Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2010, 51(3): 836-45

[8] Fang JH, Zhou HC, Zeng C, et al. MicroRNA-29b suppresses tumor angiogenesis, invasion, and metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 expression[J]. Hepatology. 2011, 54(5): 1729-1740

[9] Wang C, Gao C, Zhuang JL, et al. A combined approach identifies three mRNAs that are down-regulated by microRNA-29b and promote invasion ability in the breast cancer cell line MCF-7[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(12): 2127-2136

[10] Chen W, Zhen B, Da W, et al. miR-29b regulates migration of humun breast cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2011(352): 197-207

[11] Rothschild SI, Tschan MP, Federzoni EA, et al. MicroRNA-29b is involved in the Src-ID1 signaling pathway and is dysregulated in human lung adenocarcinomal[J]. Oncogene, 2013, 31(38): 4221-4232

[12] Li G, Zhao J, Peng X, et al. The mechanism involved in the loss of PTEN

Expression in NSCLC tumor cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2012,418(3).547-552

[13] Ru P, Steele R, Newhall, et al. miRNA-29b Suppresses Prostate Cancer Metastasis by Regulating Epithelial—Mesenchymal Transition Signaling[J]. Mol Cancer Ther, 2012(11): 1166-1773

[14] Tung N, Christine K, Michael BN, et al. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma[J]. Epigenetics, 2011, 6(3): 388–394

[15] Yikun Z, Hua W, Yun L, et al. Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells though down regulatingMck-1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011(4414)233-239

[16] Garzon R, Liu S, Fabbri G. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in actue myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1.2009, Blood, 113, 6411-6418

[17] Mims A, Walker AR, Huang X, et al. Increased anti-leukemic activity of decitabine via AR-42-induced upregulation of miR-29b: a novel epigenetic-targeting approach in acute myeloid leukemia[j]. Leukemia. 2013, 27(4): 871-878

[18] Wang Y, Li Y, Sun J, at el. Tumor-suppressive effects of miR-29c on gliomas. European Journal of Cell Biology, 2013, 24(12): 637-645

[19] 王颖, 孙静, 李艳艳, et al. miR-29a对胶质瘤细胞CDC42表达及迁移和侵袭的影响. 中国肿瘤临床, 2013, 40(11): 629-633

[20] Malumbres M, Barbacid M. Cell cyc, CDKs and cancer: a changing paradigm[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(3): 153-166

[21] Zhao JJ, Lin J, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29b as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma[J]. Bood, 2010, 115(13): 2630-2639

[[22] Schmitt MJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schmitt%20MJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23245396), [Philippidou D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Philippidou%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23245396), [Reinsbach SE](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Reinsbach%20SE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23245396), et al. Interferon-γ-induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing microRNA-29 family in melanoma cells[J/OL]. Cell Commun Signal, 2012, 10: 41. [2012-12-17]. [http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC3541122/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3541122/)

[23] Ye YM, Hu ZY, Lin Y, et al. Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-gamma agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury[J]. Cardiovasscular Research. 2010 87(3): 535-544

[24] 王忠诚. 神经外科学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998.397

[25] Tannock IF. The relation between cell proliferation and vscular system in a transplanted mouse mammary tumor[J]. Br J Cancer, 1968, 22; 258-273

[26] Kaveh AM, Chiocca EA, Sean EL. Potential role of miRNAs and theirinhibitorsin glioma treatment[J]. Expert Rev Anticancer Ther. 2010, 10(11): 1753-1762

[27] Sathornsumetee S, Rich JN. New treatment strategies for malignantgliomas[J]. Exert Rev Anticancer Ther, 2006, 6: 1087-1104

[28] 杨学军. 现代神经肿瘤学研究新世纪十年进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10: 103-110

[29] Oh MC, Lim DA. Novel treatment strategies for maligmant gliomas using neural stem cells. Neurotherapeutics. 2009, 6: 458-464

[30] Berger MS, Chang SM. Current perspectives on nouro-oncology[J]. Neurotherapeutics, 2009, 6: 425-426

[31] Zeng Y. Principles of micro-RNA production. Oncogene[J], 2006, 25(46): 6156-6162

[32] Yingyi W, Xiefeng W, Junxia Z, et al. MicroRNAS involved in the EGFR/PTEN/AKT pathway in gliomas[J]. Neurooncol, 2012, (106): 217-224.

[33] Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, at el. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal[J]. Cancer Res, 2008, 68(22): 9125-9130.

[34] Xia H, Qi Y, Chen X, et al. microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs[J]. Brain Res. 20099, 1269: 158-165.

[35] Guo P, Nie Q, Ge J, et al. C-Myc negatively controls the tumor suppressor PTEN by upregulating miR-26a in glioblastoma multiforme cells[J]. 2013, 441(1): 186-190

[36] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identificationg of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science 2001, 294.853-858

[37] Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, et al. Numerrous microRNAs in neuronal cell containing novel microRNAs[J]. RNA, 2003, 9, 180-186

[38] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A et al. Identificationg oftissure-specific micro-RNAs from mouse[J]. Curr Biol, 2002, 12: 735-739

[39] Schneider B, Zagel S, Kaufmann M et al. T(3: 7)(q27; q32) fuses BCL6 to a non-coding Regiom at FRA7H nearmiR-29[J]. Leukemia, 2008, 22: 1262-1266

[40] Mishmar D, Rahat A, Scherer S, at el. Molecular characterization of a common fragile site(FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simius virus 40 integration sitw[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(14): 8141-8146

[41] Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, at el. MicroRNA-29b function in acute myeloid leukemia, Blood, 2009, 114, 5331-5341

[42] Xu H, Cheug IY, Guo HF, et al. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: Potential implications for immune based therapy of human solid tumors[J]. Cancer Res, 2009, 69(15): 6275–6281

[43] Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1[J]. Cell. 1999, 98(6): 859-869

[44] Zhao JJ, Lin J, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. Blood, 2010, 115: 2630-2639

[45] Han YC, Park CY, Bhagat G, et al. microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia[J]. Exp Med, 2010, 207(3): 475-489

[46] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptiosis[J]. Oncogene, 2007, 26: 6133-6140

[47] Zhang W, Qian JX, Yang ZD, et al. The microRNA-29 plays a central role in osteosarcoma pathogenesis and progression[J]. Mol Biol(Mosk), 2012, 46(4): 622-627

[48] Steele R, Mott JL, Ray RB. MBP-1 Upregulates miR-29b, WhichRepresses Mcl-1, Collagens, and Matiix Metalloproteinase-2 in Prostate Cancer Cells. Genes Gancer. 2010, 1(14): 381-387

[49] Wu Y, Melissa C, Mao YC, et al. Therapeutic Delivery of

MicroRNA-29b by Cationic Lipoplexes fpr Lung Cancer[J]. American Society of Gene & Cell Therapy,2013,2, e84: [http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC3650246/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3650246/)

**综述**

**miRNA-29家族与肿瘤的关系**

miRNA（又叫microRNA 或微小RNA）是一组内源性非编码小

RNA，长度约为22个核苷酸[1]，能够特异性结合到靶基因的3′-UTR端，通过碱基互补配对或非精确的碱基配对影响靶mRNA 的稳定性和翻译

[2]。

miRNA -29家族包括miRNA-29a, miRNA-29b和miRNA-29c，其中miRNA-29b又分为miRNA-29b1及miRNA-29b2两种，在人类、大鼠和小鼠中，miRNA-29家族的结构、功能及机制高度一致。miRNA-29a最早发现于HELA细胞[3]，随后陆续发现了miRNA-29b和miRNA-29c[4、5]。miRNA-29a和miRNA-29b1由定位于7q32染色体625个碱基总成的模板转录而来[6]，miRNA-29b2和miRNA-29c由，定位于

1q32染色体的507个碱基组成的模板转录形成[7]。由于成熟的miRNA

-29家族具有相同的决定靶mRNA的种子序列，miRNA -29家族的靶基因基本相同。

众所周知，肿瘤是一种致死性疾病。近年来研究发现，靶向作用相关基因和mRNA可抑制肿瘤细胞的恶性行为，在肿瘤发生和发展过程中起到了重要的作用[8~11]。研究已经表明miRNA -29家族在多种肿瘤中表达异常[9][11~17]，尽管miRNA家族9与肿瘤相关的具体作用机制研究相对较少，但是已有证据表明miRNA -29家族与肿瘤的发生发展密切相关，miRNA -29家族有望作为靶点在肿瘤靶向治疗中发挥重要作用。

本文总结了有关miRNA -29家族在肿瘤中作用的相关文献，对肿瘤相关的miRNA-29家族的研究现状做了简要介绍，内容涉及转录调控，细胞增殖，细胞周期，细胞分化，凋亡、转移及肿瘤发展过程的相关细胞外基质改变和免疫应答等。

**一、转录调控**

大量文献报道了miRNA -29家族在多种肿瘤细胞中表达异常，但是表达异常的机制尚未得知。Chang等通过微距阵和RNA印记技术发现miRNA -29家族在B细胞淋巴瘤中抑制c-Myc表达[18]。根据他们的研究，miRNA29a和miRNA29b1启动子区域存在与Myc基因结合的特

定E-box位点，通过抑制Myc基因表达降低胆管癌细胞的恶性行为，揭示了Myc基因可能部分参与了miRNA-29家族转录的调节。Gli是构成hedgehog信号通路的重要信使，Motts 等证实了在人类miRNA29a和miRNA29b1启动子区域存在特定的Gli结合位点，Gli可以下调miRNA-29家族的表达[19]。CESPA 是重要的粒细胞生成的转录因子，在急性淋巴细胞白血病中经常被阻断的，研究表明，CESPA可直接影响miRNA-29a/miRNA-29b1的表达。NF-kB在炎症相关肿瘤中活跃表达，可在胆管癌或横纹肌肉瘤中通过TLRs或活化转录抑制因子YY1直接抑制miRNA-29a/miRNA29-b1启动子的活性[19、21]。在多种纤维化过程中，TGF-B-Smad可诱导miRNA29a/miRNA29-b1的表达下调[22、23]。与EMT过程相似，TGF-B的负反馈调节使miRNA29与肿瘤的转移相关[9]，另外，DNA的分解下调P53基因的表达，从而进一步上调miRNA-29的表达[24、25]。

**二、细胞增殖和细胞周期**

细胞增殖依赖于细胞周期的调控，细胞周期的紊乱可以引起细胞的死亡或病理性增殖。细胞周期蛋白依赖激酶6(CDK6)和细胞周期相关蛋白D1(cyclinD1)均是调节细胞增殖的重要细胞周期调节因子，它们可以与CDK家族及cyclinD1家族的其他成员形成复合体，催化Rb蛋白特异性位点的磷酸化，激活下游的细胞周期调控基因的转录，诱导细胞从

G1期进入S期。已有研究表明，CDK6是miRNA-29的直接靶基因[26]。基因检测技术发现miRNA-29在MCL中过度表达[26]，体外上调K562细胞中miRNA-29b的表达，可引起Rb基因的广泛低甲基化，在AML中也存在同样的的现象。因此，miRNA-29b引起Rb基因甲基化的异常至少有一部分是通过靶作用于CDK6来实现的[27、28]。另外，在几乎所有类型的MCL中均过表达cyclinD1，诱导细胞从G1期进入S期，CDK6表达的下调可协同cyclinD1阻滞细胞周期，抑制肿瘤细胞的增殖[11]。有趣的是，在HPV阳性的宫颈癌细胞和HPV阴性的的宫颈癌细胞中同时转染miRNA-29后，前者CDK6蛋白的表达水平较后者明显受到抑制，这说明miRNA -29有可能通过靶作用于CDK6协同肿瘤相关病毒促进肿瘤的发生发展[16]。当然，至今为止相关文献的结论并不相同，也有研究指出miRNA-29a在AML中过表达，通过加速G1期细胞向S/G2 期

细胞转化来促进髓系祖细胞向自我更新的白血病干细胞转化，从而促进肿瘤的AML的发生[29]。因此，miRNA-29调节细胞周期的过程极其复杂，具体机制有待进一步研究。

**三、细胞的衰老和分化**

细胞衰老是细胞生长抑制不可逆的过程，细胞衰老受到抑制与肿瘤的发生密不可分。Ugald等发现miRNA-29在早衰综合征小鼠模型中显著的过度表达。miRNA-29通过作用于P53基因抑制Ppm1d磷酸酶的表达使DNA 降解，加快细胞衰老、阻止细胞分化[24]。另外，抑制双链

DNA合成、阻止B-Myb癌基因与Rb基因结合可上调miRNA-29的表达，诱导或促进细胞衰老[30]。

细胞分化障碍是肿瘤发生的必经之路，研究表明miRNA-29可以干扰细胞的分化过程。Kapinas等发现经典Wnt信号通路可诱导miRNA

-29/b/c的表达，促进成骨细胞的分化[8]。miRNA-29可结合到骨粘连蛋白基因片段的3′-UTR端，作用于HDAC4，TGFβ2，ACVR2A，CTNNBiP1和B1DDSP2等抑骨生成因子从而促进成骨细胞的分化[31]。此外，NF-kB-YY1-miRNA-29调控通路亦是miRNA-29影响细胞分化的途径之一。NF-kB表达上调可通过NF-kB-YY1-miRNA-29通路抑制miRNA-29表达，而miRVA-29低表达又引起YY1蛋白高表达，促进肌源性分化不良和横纹肌肉瘤的发生[21]。

**四、细胞凋亡**

细胞凋亡是细胞的程序性死亡，逃避细胞凋亡是肿瘤发生的重要机制。很多证据表明，miRNA-29可通过靶作用多种凋亡相关因子来影响肿瘤细胞的凋亡。在KMCH胆管癌细胞、K562AML细胞及肝细胞癌细胞株中，miRNA-29可以靶作用于抗凋亡因子Bcl-2家族成员Mcl-1[10、

27、28、32]。上调miRNA-29表达可以使Mcl-1的表达显著上调，增强肿瘤细胞对化疗药物诱导凋亡的敏感性，这说明miRNA-29作为Mcl-1的调控基因，在肿瘤治疗方面具有临床价值[10、32]。Tcl-1是致癌因子Akt的激活剂，也是B细胞和T细胞中抗凋亡信号通路转导过程中的重要因子[33、34]。Pekarsky认为Tcl-1在急性发作的B-CLL中高表达，伴或不伴11q染色体缺如，至少部分与miRNA-29的调控相关，说明miR-29与Tcl-1的相互作用在B-CLL的进展中起到了重要作用，miRNA-29 可

能通过靶作用于Tcl-1诱导B细胞凋亡[35]。更多的关于miRNA-29与细胞凋亡相互关系的直接证据在近期的报道中被证实。P53基因是众所周知抑癌基因，与多种肿瘤细胞的凋亡相关。Park等指出，miRNA-29是靶作用于P53基因抑制因子p85a和CDC42的P53基因增强子。间接的功能模型通过阐明miRNA-29作为P53基因上游元件的作用，拓展了目前所知的P53通路相关的miRNAs[36]。另外，miRNA-29a和miRNA-29b不仅直接抑制抗凋亡基因表达，而且还上调BIM及PDCD4等促凋亡基因的表达。因此，通过靶作用于抗凋亡基因及上调肿瘤抑制基因的表达，大大加强了miRNA-29促进肿瘤细胞凋亡的作用[27、28]。

**五、肿瘤转移**

在很多器官中，miRNA-29b家族参与调控多种细胞外基质基因，包括胶原蛋白，层粘连蛋白，MMP2，原纤维蛋白，分泌蛋白，酸性蛋白和Sparc 基因[9、37]，对器官的纤维化过称起到了决定性作用[8、22、23、

38~41]。失去miRNA-29b对胞外基质的调控，不仅可能影响纤维化过程，也可能促进肿瘤细胞的迁徙和转移。例如，在鼻咽癌细胞中下调miRNA-29c的表达，可下调细胞外基质或金属相关蛋白导致肿瘤细胞的迁移[9]。EMT是肿瘤细胞迁移的关键性步骤，miRNA-29家族可参与

EMT的调控。研究表明，miRNA-29c可以抑制子宫内膜癌间充质细胞的表型[13]。另外，miRNA-29还与TGF-B通路负相关，而TGF-B通路又可显著抑制EMT过程。在小梁细胞中增强miRNA-29表达直接抑制TGF-B，TGF-B2的表达，显著下调细胞外基质的表达水平[24]。Smads蛋白是TGF-B通路中的关键成员，miRNA-29可通过调节Smads蛋白的表达干预TGF-B通路的表达，诱导HDAC的高表达[43]。miR-29家族通过TGF-B—Smads通路调节EMT过程注意发现为肿瘤转移机制提出了新视点[44]。当然也有学者持有不同的观点，Christoph等指出miRNA-29a通过与Ras癌基信号通路因共同作用，抑制TTP，引起EMT和肿瘤转移，Christoph等认为miRNA-29家族在肿瘤中的作用依赖于环境[45]。

**六、表观遗传调节**

表观遗传改变是基因表达的改变，包括：DNA甲基化，组蛋白修饰和RNA相关沉默[46~48]. DNA甲基化是指甲基共价结合到DNA 的

CpG序列的胞嘧啶残基上[48]。DNA甲基化通过影响特定的基因表达和基因的稳定性导致肿瘤的发生或拮抗肿瘤的生物学行为。近期研究发现，miRNA-29可靶作用DNMT，与DNA甲基化有着密切的关系，影响肿瘤相关基因的甲基化状态。Filkowski指出，在暴露于致病性射线的动物体内，miRNA-29a和miRNA-29b高表达，同时伴随着DNMT低表达[49]。在肺癌细胞中，抑瘤基因FHIT和WWOX被甲基化而沉默表达，高表达miRNA-29家族可使DNMT3a和DNMT3b在mRNA和蛋白水平均显著降低，从而引起FHIT和WWOX甲基化的显著降低[14]。miR-29c在上皮间皮肿瘤和皮肤黑色素瘤细胞中可下调DNMT的表达、上调甲基化基因的表达，从而调控甲基化过程，miRNA-29c和DNMT3b的异常表达与黑色素瘤的预后密切相关，可以作为黑色素瘤结局的有价值的标志[17]。另外除了作用于DNMT3a和DNMT3b外，在急性粒细胞白血病中miRNA-29c的过表达可作用于DNMT1基因的转录增强子Sp1基因，使DNMT1的表达间接受到抑制，进一步抑制DNA甲基化，并使抑癌基因P15INK4B及ESR1表达异常[27]。另外，近期研究还涉及长链非编码RNA（lncRNA）和miRNA之间的相互关系。肝细胞癌组织过度甲基化常常引起lncRNA MEG3的低表达，而MEG3的重表达可增强miRNA-29的表达，抑制细胞生长、诱导细胞凋亡[50]。总的来说，这些研究揭示了在肿瘤中miRNA和异常过度甲基化之间的关系，让我们看到了应用合成miRNA-29寡糖核苷酸消除过度甲基化从而治疗肿瘤的美好前景[27、28]。

**七、免疫调控**

研究发现，除了与肿瘤发生和发展的多种细胞活动相关，miRNA-29家族还与免疫细胞的增殖和辅助T细胞细胞因子的形成密切相关，尤其是IFN-r的合成密不可分。miRNA-29可直接作用于T-bet和Eomes基因，减少IFN-r的表达并抑制辅助T细胞的分化，从而引起免疫系统功能失调，影响多种生物过程，包括肿瘤的发生[51]。分歧杆菌的入侵会增加IFN-r和产IFN-r细胞的生成，Ma等成功的设计了表达anti-miRNA基因的转基因小鼠（GS29），证明了敲低了miRNA-29的表达可以抑制TH1适应L-产核细胞基因及分歧杆菌的细菌入侵引起的免疫应答，为肿瘤的免疫治疗打开了新的局面[52]。表面免疫糖蛋白基因B7-H3 是

miRNA-29的直接靶基因，而B7-H3是自然杀伤细胞和T细胞的强有效的抑制子，那么，可以认为miRNA-29是通过自然杀伤细胞和T细胞共同作用，增强肿瘤细胞的免疫逃逸功能[53]。毋庸置疑，靶作用miRNA或联合作用于其协同因子使肿瘤的免疫治疗前景广阔。

**八、肿瘤相关纤维化**

除了直接调控肿瘤的发生发展，miRNA-29还与肿瘤相关疾病的发生发展密不可分，间接起到促进/抑制肿瘤的发生发展。研究证明，miRNA-29能调节细胞外基质基因的表达，影响多种纤维化相关的信号转导途径。miRNA-29可靶作用于TGF-b/Smads, Wnt/B-catenin和MAPK通路[42][43]，或是抑制EMT作用，参与肝脏、心脏、肾脏等多种器官及系统性红斑狼疮、小梁细胞和骨重构等多种过程的纤维化[8、22、23、38、39、

41]. 众所周知，肝纤维化与肝癌之间密切相关，回顾性研究显示，4353

名肝癌患者中有80%作用的患者患有肝纤维化。miRNA-29在肝脏纤维化患者或肝星形细胞作用中低表达，转染miRNA-29后的肝细胞中多种胶原纤维的表达被减弱[23、54]。近期研究已经证明miRNA-29可作为肝纤维化患者的一个生物学标记[23]。虽然还没有可靠的证据表明肺纤维化和肺癌之间的关系，但矽肺和石棉沉滞症是高癌基因相关疾病已被公认，而纤维化恰恰是这两种疾病的主要的病理过程。由此可见，miRNA-29s可能是治疗肿瘤相关纤维化疾病的重要的靶点。

miRNA与mRNA之间的非完全的碱基配对，使一种miRNA可以靶作用于多种mRNA，尤其是同一信号通路和/或同一疾病中具有协同功能的mRNA。随着研究的深入，我们对miRNA-29家族在肿瘤中相关作用的认识也逐渐增加。miRNA-29家族靶作用细胞增殖和周期、细胞衰老、分化、凋亡和转移相关基因，从基因及细胞水平发挥作用，使miRNA-29成为肿瘤发生和发展的重要调控因子。当然，miRNA-29在乳腺癌和AML中的致癌作用以及在恶性惰性慢性粒细胞白血病中具有双重作用使其抑瘤基因的地位受到了质疑，并引发了miRNA-29家族在肿瘤中作用的深入讨论[29、36、45、55]，其作用是否具有组织特异性，抑或是依赖于肿瘤微环境仍需进一步的研究。在关注miRNA-29家族生物学作用的同时，miRNA-29的临床应用价值也引起了越来越多的关注，miRNA-29 的异常表达可能为生物标记物的研究拓展新的前景，尽管

miRNA-29作为某些肿瘤预后的生物标志的作用已被初步证实[10、11、17]，还有更多的样本及更复杂的工作迫切需要完成。针对miRNA-29的生物调节机制，近期研究表明应用miRNA-29模拟物及miRNA-29抑制剂干扰miRNA-29的表达，使miRNA-29作为靶点治疗肿瘤成为可能。但是，更多更有力的证据需要进一步关于miRNA-29家族影响肿瘤的生物学作用的机制以及其临床意义的研究来提供。

参考文献

[1] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell,2009,139(2) 215-33

[2] Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms[J]. TrendsCell

Biol,2007,17:118-126

[3] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identificationg of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science 2001,294.853-858

[4] Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, et al. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs[J]. RNA,2003,9(2):180-186

[5] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A et al. Identificationg of

Tissure-specific micro-RNAs from mouse[J]. Curr Biol, 2002,12.735-739 [6]Mishmar D, Rahat A, Scherer SW, Nyakatura G et al. Molecular

Characterization of a common fragile site(FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site[J]. Proc Netl Acag Sci USA,1998,95:8141-8146

[7] Schneider B, Nagel S, Kaufmann M, et al. T(3:7)(q27; q32) fuses BCL6 to a non-coding Regiom at FRA7H near miR-29[J]. Leukemia,

2008,22,1262-1266

[8] Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. MiR-29 supression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling[J]. Cell Biochem,2009,108(1):216-224

[9] Sengupta S, Boon JA, Chen IH, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. Rroc Natl Acad Sci USA,2008,105:5874-5878

[10] Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of microRNA-29 on appotosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. Hepatology,2010,51:836-845

[11] Zhao JJ, Lin J, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma

[J]. Blood,2010,115:2630-2639

[12] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia[J].2005,353(17):1793-1801

[13] Castilla MA, Moreno-Bueno G, Romero-Perez L, et al. Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma[J]. Pathol,2011,223(1):72-80

[14] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B[j]. Pro Natl Acad Sci USA,2007,104(40):15805-15808

[15] Iorio MV, Ferractin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res.2005,65(16):7065-7070

[16] Li Y, Wang F, Xu J, et al. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29[J]. Pathol,2011,224:484-495

[17] Nguyen T, Kuo C, Nicholl MB, et al. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma[J]. Epigenetics,2011,6:1916-1924

[18] Chang TC, Yu D, Lee YS, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis[J]. Nat Genet,2008,40(1):43-50

[19] Mott JL, Kurita S, Cazanave SC, et al. Transcriptional suppression of

Mir-29b-1/mir-29a promoter by cMyc, hedgehog, and NF-kappaB[J]. Cell Biochem,2010,110:1155-1164

[20] Eyholzer M, Schmid S, Wilkens L, et al. The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML[J]. Cancer.2010,103(2):275-284

[21] Wang H, Garzon R, Sun H, et al. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma[J]. Cancer Cell.2008,14:369-381

[22] Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, et al. microRNA-29, a key regulator of

Collagen expression in systemic sclerosis[J]. Arthritis Rheum.2010,62:1733-1743

[23] Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis[J]. Hepatology,2011,53:209-218

[24] Ugalde AP, Ramsay AJ, de la Rosa J, et al. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 an p53[J]. EMBO,2011,30:2219-2232

[25] Park SY, Lee JH, Ha M, et al. miR-29b mi RNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42[J]. Nat Struct Mol Biol.2009,16:23-29

[26] Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1[J]. Cell.1999,98(6):859-869

[27] Garzon R, Liu S, Fabbri M, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1[J]. Blood,2009,113:6411-6418

[28] Garzon R, Heaphy, CE, Havelange V, el at. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia[J]. Boold,2009,114:5331-5341

[29] Han YC, Park CY, Bhagat G, et al. microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia[J]. J Exp Med,2010,207(3):475-489

[30] Martinez I, Cazalla D, Almstead LL, et al. miR-19 ang miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2011,108:522-527

[31] Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, et al. Biological functiong of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation[J]. Biol Chem,2009,284:15676-15684

[32] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptiosis[J]. Oncogene,2007,26:6133-6140

[33] Laine J, Kunstle G, Obata T, et al. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator[J]. Mol Cell,2000,6:395-407

[34] Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, et al. Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. Proc Acad Sci USA,2000,97:3028-3033

[35] Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181[J]. Cancer Res.2006,66:11590-11593

[36] Pekarsky Y, Croce CM. Is mir-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL[J]. Oncotarget,2010,1:224-227

[37] Liu Y, Taylor NF, Lu L, et al. Renal medullary microRNAs in Dahl salt-senstive rats: miR-29b regulates several collagens ang related genes[J]. Hypertension.2010,55:974-982

[38] Cushing L, Luang PP, Qian J, et al. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis[J] Am JRespir Cell Mol Biol.2011,45(2):287-294

[39] Villarreal GJ, Oh DJ, Kang MH, et al. Coordinated Regulation of Extracellular Matrix Synthesis by the MicroRNA-29 Family in the Trabecular Meshwork. Invest Ophthalmol Vis Sci,2011,52(6):3391-3397

[40] Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. Dysregulation of microRNAS after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA.2008,105:13027-13032

[41] Wang B, Komera R, Carew R, et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF-beta1 promotes collagen expression and renal fibrosis[J]. Am Soc Nephrol,2012,23:252-265

[42] Luna C, Li G, Qiu J, et al. Cross-talk between miR-29 and transforming growth factor-betas in trabecularmeshwork cell[J]. invest Ophthalmovl Vis Sci,2011,52(6):3567-3572

[43] Winbanks CE, Wang B, Beyer C, Koh P, et al. TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogentic differentiation through regulation of HDAC4[J]. Biol Chem,2011,286:13805-13814

[44] Wang Y, Zhou BP. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer

Progression and metastasis[J]. Chin J Cancer,2011,30:603-611 [45] Gebeshuber CA, Zatloukal K, MartineZ J. miR-29a suppresses

Tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis[J] EMBO Rep,2009,10(4):400-405

[46] Egger G, Liang G, Aparicio A, at el. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy[J]. Nature.2004,429(6990):457-463

[47] Feinberg AP. Epigenetics at the epicenter of modern medicine[J]. JAMA.2008,299(11):1345-1450

[48] Jaenusch R, Bird A. MiR-29 supression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals[J]. Nat Genet,2003,33:245-254

[49] Filkowski JN, Llnytskyy Y, Tamminga J, et al. Hypomethylation and genome instability in the germline of exposed parents and their progeny is associated with altered miRNA expression[J]. Carcinogenesis.2010,31(6):1110-1115

[50] Braconi C, Kogure T, Valeri N, et al. microRNA-29 can regulate

Expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer[J]. Oncogene,2011,30(47):4750-4756

[51] Steiner DF, Thomas MF, Hu JK, et al. MicroRNA-29 regulates T-box transcription factors and interferon-gamma production in helper T cells. Immunity,2011,35:169-181

[52] Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon-gamma in cancer[J]. Clin Cancer Res.2011,17:6118-6124

[53] Xu H, Cheung IY, Guo HF, et al. MiroRNA MiR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based thetapy of human dolid tumors[J]. Cancer Res.2009,69:6275-6281

[54] Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, et al. Suppression of hepaticstellate cell activation by microRNA-29b[J]. Biochem Biophys Res

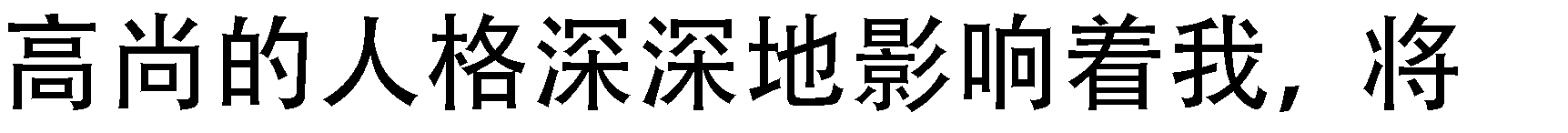
Commun,2011,412:74-79

[55] Santanam U, Zanesi N, Rassenti L, et al. Chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted miR-29 expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2010,107,12210-12215

致**谢**

三年的研究生学习生活即将结束，回首三年时光，心中充满无限感激。首先向我的导师冯继教授表示衷心的感谢和深深的敬意！我的课题是

在导师悉心指导下完成的，无论是课题设计，实验的具体实施，还是论文的撰写与修改都凝聚着恩师的心血。三年来导师对我的成长倾注了大量心血，导师培养我独立从事科研的能力，教育我为人处事的道理。导师渊博的学识，严谨求实的治学态度和使我受益终生。导师严谨的治学态度，一丝不苟的科研作风和诲人不倦的育人精神使我受益匪浅。导师对我学习上的教诲和生活上的关心与帮助，让我终生难忘。



衷心感谢秦皇岛市第一医院神经外科的全体老师和师兄们对我学习和生活中的无微不至的关心和照顾。

衷心感谢河北省生物化学研究中心及河北省实验动物中心全体老师在我实验上的大力帮助。特别感谢孙绍光老师、苗穗兵老师对我课题的实验过程和论文撰写等方面给予最无私的帮助。

衷心感谢秦皇岛市第一医院中心实验室齐曦明老师对我的无私帮助和指导。

衷心感谢我的同学们在实验中的热心帮助和生活中真诚的关怀，才使我的实验顺利进行，生活丰富多彩。

衷心感谢承德医学院科技处的乔跃兵老师、张晓英老师、李德臣老师周颖老师在研究生学习阶段给予我的真切关怀。

深深的感谢我的家人一如既往的支持和理解，是他们无私的爱使我顺利完成学业，鞭策我不断前行。

感谢所有关心和帮助过我的人。

**个人简历**

**一．个人基本情况**

姓名刘银凤性别女民族 满

出生日期1986年03月20日籍贯河北省秦皇岛市

**二．个人经历**

2006.09-2011.07承德医学院临床医学大学本科

2011.09-至今承德医学院肿瘤学硕士研究生

**三．发表论文情况**

凤尾草总黄酮抑制U251细胞迁移的体外研究

miR-29b抑制U251人脑胶质瘤细胞生长初探

**四、承担或主研课题情况**

miRNA-29b抑制U251人脑胶质瘤细胞生长及其机制的初步研究