

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.006

· 基础研究 ·

## MicroRNA-10a 通过调控 MMP 的表达促进胶质瘤细胞侵袭

范立刚, 吴德刚, 孙立华, 王颖毅, 梅赞, 尤永平, 刘宁(南京医科大学第一附属医院 神经外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究 microRNA-10a (miR-10a) 对人脑胶质瘤细胞系 U87MG 侵袭性的影响。方法: 脂质体包被 miR-10a 反义寡聚核苷酸 (miR-10a antisense oligodeoxynucleotide, miR-10a-anti-ODN), 转染胶质瘤 U87MG 细胞, 并设无义 miRNA 转染组和空白对照组, 流式细胞术和荧光显微镜检测 miR-10a-anti-ODN 对 U87MG 细胞的转染效率, 流式细胞术检测转染 miR-10a-anti-ODN 后 U87MG 细胞的凋亡和细胞周期, MTT 法检测 U87MG 细胞的增殖, Transwell 实验检测 miR-10a-anti-ODN 对 U87MG 细胞迁移和侵袭的影响; RT-PCR 和 Western blotting 法分别检测 U87MG 细胞中 *MMP-2*、*MMP-9*、*MMP-14* mRNA 及蛋白的表达。结果: 转染 miR-10a-anti-ODN 后, U87MG 细胞的增殖、周期和凋亡无明显改变, U87MG 细胞的侵袭 [ (87 ± 7.1) vs (155 ± 3.7) ]、(149 ± 6.6) 个细胞,  $P < 0.05$  ] 和迁移 [ (78.0 ± 5.2) vs (150.3 ± 3.7) ]、(147.3 ± 6.6) 个细胞,  $P < 0.05$  ] 能力明显下降, 侵袭相关因子 *MMP-2*、*MMP-9*、*MMP-14* 的 mRNA 及蛋白表达水平也明显下降。结论: miR-10a 通过调控 *MMP-2*、*MMP-9*、*MMP-14* 的表达促进胶质瘤 U87MG 细胞的侵袭, miR-10a 可能是胶质瘤治疗的潜在靶点。

[关键词] microRNA-10a; 反义寡聚核苷酸; 胶质瘤; 侵袭; 迁移; 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R730.2; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0617-07

## MicroRNA-10a promotes invasion of glioma cells by regulating MMP expression

FAN Li-gang, WU De-gang, SUN Li-hua, WANG Ying-yi, MEI Zan, YOU Yong-ping, LIU Ning (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of microRNA-10a (miR-10a) on invasion of glioma cell line U87MG. **Methods:** miR-10a antisense oligodeoxynucleotides (miR-10a-anti-ODN) enveloped with liposome were transfected into glioma cell line U87MG, and nonsense miRNA and blank control were used as control groups. Flow cytometry and fluorescence microscope were employed to determine the transfection efficiency of miR-10a-anti-ODN in U87MG cells; flow cytometry was employed to detect the apoptosis and cell cycle of U87MG cells after miR-10a-anti-ODN transfection; MTT assay were used to detect the proliferation of U87MG cells; Transwell assay were applied to ascertain effect of miR-10a-anti-ODN on migration and invasion of U87MG cells; and RT-PCR and Western blotting were used to examine expressions of mRNA and protein of *MMP-2*, *MMP-9* and *MMP-14*. **Results:** miR-10a-anti-ODN transfection had no obvious effect on proliferation, cell cycle and apoptosis of U87MG cells; however, invasion and migration of U87MG cells was significantly decreased (invasion: [87 ± 7.1] vs [155 ± 3.7], [149 ± 6.6],  $P < 0.05$ ; migration: [78.0 ± 5.2] vs [150.3 ± 3.7] [147.3 ± 6.6]), and mRNA and protein expressions of *MMP-2*, *MMP-9* and *MMP-14* were also significantly decreased. **Conclusion:** miR-10a can promote invasion of glioma cell line U87MG through upregulating *MMP-2*, *MMP-9* and *MMP-14* expressions, which might be a target in glioma therapy.

[Key words] microRNA-10a; antisense oligodeoxynucleotide; glioma; invasion; migration; matrix metalloproteinase

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 617-623]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 3067216, No. 30872657); 江苏省 333 工程重点人才项目(No. 0508RS08); 江苏省医学重点人才项目(No. RC2007061)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672165, No. 30872657), the "333" Key Talent Foundation of Jiangsu Province (No. 0508RS08), and the Medical Major Talent Foundation of Jiangsu Province (No. RC2007061)

[作者简介] 范立刚(1983-), 男, 黑龙江大庆市人, 硕士, 主要从事人脑胶质瘤的分子生物学诊断及基因治疗策略优化的研究。E-mail: flggp2010@yahoo.cn

[通信作者] 刘宁(LIU Ning, corresponding author), E-mail: liuning0853@yahoo.com.cn

[网络出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20111111.1119.006.html

胶质瘤是一种多基因异常疾病, 癌基因异常扩增和(或)抑癌基因的突变或缺失都可能导致肿瘤的无限制生长、侵袭和转移。胶质瘤作为颅内最常见的恶性肿瘤, 由于其恶性程度和复发率较高, 即使经过手术、放化疗等综合治疗后, 患者的预后也极差<sup>[1-3, 8]</sup>。microRNA(miRNA)是一种非编码小RNA(大约20~25 bp), 其在体内稳定存在。Chen<sup>[4]</sup>指出, miRNA参与调控基因表达的多个环节, 包括细胞生长、分化和凋亡。2004年Calin等<sup>[5]</sup>首次证明miRNA与肿瘤存在直接关系, 此后大量研究集中在miRNA与肿瘤的关系上。研究<sup>[4, 7, 11]</sup>表明, 不同的miRNA对肿瘤作用不一, 有的起到抑癌基因的作用, 有的却作为癌基因发挥作用, miRNA的表达异常可能和癌症的发生和发展(包括侵袭和转移)密切相关。Ciafrè等<sup>[6]</sup>报道原发性胶质瘤中miR-10a的表达量上调, 此种异常可能与胶质瘤的发生、发展有关, 可能起到癌基因的作用。本课题用脂质体包被miR-10a反义寡核苷酸(miR-10a antisense oligodeoxynucleotide, miR-10a-anti-ODN), 转染胶质瘤U87MG细胞, 检测其对U87MG细胞增殖、凋亡、周期和侵袭的影响, 探讨miR-10a与胶质瘤的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

人胶质瘤细胞系U87MG购自中科院上海细胞库, 培养于含10% FBS的DMEM高糖培养基, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育, 取对数生长期细胞进行实验。miR-10a-anti-ODN购自上海吉玛公司, 脂质体Lipofectamine 2000、TRIzol试剂和凋亡检测试剂盒购自美国Invitrogen公司, Western blotting试剂盒购自Bio Time公司。MMP-2和MMP-9为羊抗人多克隆抗体(Santa Cruz, USA), MMP-14为兔抗人多克隆抗体(R&D, USA), GAPDH(Kangchen公司)、羊抗兔和兔抗羊二抗(联科公司, 中国)及PCR逆转录试剂盒购自宝生物公司, MTT试剂盒购自凯基公司, 细胞周期检测试剂盒购自联科公司, Matrigel基质胶购自BD Bioscience公司, Transwell小室购自美国Corning Costar公司, DMEM高糖培养基购自Gibco公司。

### 1.2 miR-10a-anti-ODN序列的设计与合成

miR-10a-anti-ODN及miRNA无义序列(miR-NC)委托上海吉玛公司设计与合成, miR-10a-anti-ODN为5'-CACAAAUCGGAUCUACAGGGUA-3', miR-NC为5'-CAGUACUUUGUGUAGUACAA-3', 其中一部分寡核苷酸带有FAM标记以检测细胞转染效率。

### 1.3 荧光显微镜和流式细胞术检测miR-10a-anti-ODN对U87MG细胞的转染效率

转染前一天以每孔约 $5 \times 10^4$ 个细胞接种到24孔板中, 孔中加入含有10% FBS的DMEM高糖培养基, 置于37℃、5% CO<sub>2</sub>温箱中培养, 第2天细胞密度达到40%~50%, 更换培养基。用带有FAM标记的寡核苷酸(浓度梯度为25、50、100、150 nmol/L)和脂质体Lipofectamine™2000混合, 分成4组, 各设4个复孔, 室温孵育20 min后加入各孔中, 48 h后用荧光显微镜观察。PBS悬浮细胞, 上流式细胞仪检测。

### 1.4 MTT法检测转染miR-10a-anti-ODN后U87MG细胞的增殖

按 $1 \times 10^4$ /孔将U87MG细胞接种于96孔板中, 每组各设8个复孔, 分别于转染miR-10a-anti-ODN后12、24、36、48、72 h取出培养板, 每孔加MTT 50 μl, 在37℃、5% CO<sub>2</sub>温箱中继续培养4 h, 吸去上清, 加入500 μl DMSO振荡混匀, 继续孵育至紫色结晶全部溶解, 酶标仪检测各孔光密度值( $D_{570}$ )。实验重复3次。

### 1.5 流式细胞术检测转染miR-10a-anti-ODN后U87MG细胞的凋亡和细胞周期

按说明书将凋亡试剂盒中试剂预混待用, 用不含EDTA的0.5%胰酶消化细胞, 以含10% FBS的DMEM培养基吹打成单细胞悬液, 离心去上清。PBS洗2次,  $1 \times$  Annexin结合缓冲液500 μl重悬, 充分吹打, 使细胞密度约为 $1 \times 10^6$ /ml。加入5 μl Annexin V-FITC和100 μg/ml的PI 1 μl, 轻轻混匀, 室温孵育15 min。流式细胞仪分析U87MG细胞凋亡。检测细胞周期时, 将对数生长期U87MG细胞按 $4 \times 10^5$ /孔接种于6孔板中, 转染48 h后, PBS清洗3遍, 胰酶消化, 收集U87MG细胞, 按试剂盒说明加入相应试剂, 上流式细胞仪检测细胞周期。

### 1.7 Transwell小室侵袭试验检测转染miR-10a-anti-ODN后U87MG细胞的侵袭力

转染48 h后的U87MG细胞用无血清培养基洗3次, 消化后重悬于含0.1%小牛血清培养基中, 取 $5 \times 10^6$ /ml细胞100 μl加入至已铺Matrigel胶的8 μm孔径Transwell小室的上室, 将600 μl 20%小牛血清培养基加入下室。37℃、5% CO<sub>2</sub>培养24 h后, 取出Transwell小室, 棉球擦去上表面细胞, 4%多聚甲醛固定30 min, 0.1%结晶紫染色30 min, PBS洗2遍, 显微镜下观察。

### 1.8 划痕实验检测转染miR-10a-anti-ODN后U87MG细胞的迁移能力

转染48 h后的U87MG细胞种于6孔板中, 细

胞长到 80% 融合后用 100  $\mu$ l 枪头在每孔的中央垂直画线,在 12、24、48 h 时间点拍照,随机选取 5 个孔倒置显微镜观察迁移细胞数。

### 1.9 RT-PCR 检测细胞中 MMPs mRNA 表达

TRIzol 法提取 U87MG 细胞中总 RNA,取 1  $\mu$ g 的 RNA 用 TaKaRa 逆转录试剂盒逆转录 cDNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增所用引物及反应退火温度见

表 1,其余反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min,40 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。2% 琼脂糖电泳鉴定 PCR 扩增产物,用 Bio-Rad 凝胶成像仪成像,用 Quantity One 软件分析相应条带的灰度值,以目的产物与内参的灰度比值表示目的基因 mRNA 相对表达量。

表 1 RT-PCR 引物  
Tab.1 RT-PCR primers

Gene	Direction(5'-3')	Product length (bp)	Annealing temperature ( $t/^{\circ}$ C)
MMP-2	Forward AGATCTTCTTCTCAAGGACCGGTT	224	60
	Reverse GGCTGGTCAGTGGCTTGGGGTA		
MMP-9	Forward AGTCCACCCTTGTGCTCTTCCCTG	224	60
	Reverse CGCACCGTGGGGTTCGCATG		
MMP-14	Forward TCAAGGAGCGCTGGTTCTG	167	60
	Reverse AGGGACGCCTCATCAAACAC		
$\beta$ -actin	Forward TGGCACCCAGCACAATGAA	186	53
	Reverse CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA		

### 1.10 Western blotting 检测细胞中 MMPs 蛋白表达

收集各实验组细胞,用细胞裂解液处理后,加入适量 SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水中加热 5 min,在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳,然后用湿转法转膜至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上;以 5% 脱脂牛奶 37  $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后,孵育一抗 4  $^{\circ}$ C 过夜。MMP-2、MMP-9 为羊抗人多克隆抗体 (1:200),MMP-14 为兔抗人多克隆抗体 (1:2000),内对照 GAPDH (1:2000),4  $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 15 min;然后分别加 HRP 标记的羊抗兔和兔抗羊二抗 (1:10000),37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, TBST 洗 3 次,每次 15 min,用 HRP 标记的化学发光试剂对膜进行处理,用 Bio-Rad 化学曝光系统进行曝光拍照。

### 1.11 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPASS 11.0 统计软件,用单因素方差分析进行检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-10a-anti-ODN 的转染效率

与对照组相比,转染带有 FAM 标记的 miR-10a-anti-ODN,其浓度在 100 nmol/L 时的转染效率已达到最大 (80%),荧光显微镜下可见绿色荧光的 U87MG 细胞基本满视野 (图 1)。

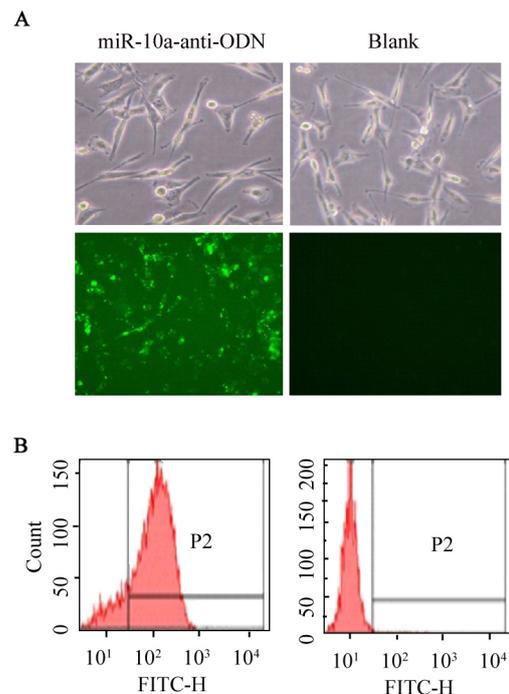


图 1 荧光显微镜 (A,  $\times 200$ ) 和流式细胞术 (B) 检测 FAM 标记的 miR-10a-anti-ODN 对 U87MG 细胞的转染效率

Fig.1 Transfection rate of FAM-labeled miR-10a-anti-ODN in U87MG cells detected by fluorescence microscopy (A,  $\times 200$ ) and flow cytometry (B)

2.2 miR-10a-anti-ODN 不影响 U87MG 细胞的增殖  
 实验结果(图 2)显示, U87MG 细胞转染 miR-10a-anti-ODN 后, 与 miR-NC 转染组和空白组相比, miR-10a-anti-ODN 对细胞的增殖影响不明显, 说明 miR-10a-anti-ODN 不影响 U87MG 细胞的增殖。

2.3 miR-10a-anti-ODN 不影响 U87MG 细胞的凋亡  
 miR-10a-anti-ODN 转染 U87MG 细胞 48 h 后, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。结果(图 3)显示, 空白对照组细胞凋亡率为(1.5 ± 0.025)%, miR-NC 组细胞凋亡率为(1.1 ± 0.013)%, miR-10a-anti-ODN 组细胞凋亡率为(2.1 ± 0.02)%, 各组间细胞凋亡率无明显差异(P > 0.05)。由此表明, miR-10a-anti-ODN 对 U87MG 细胞的凋亡无明显影响。

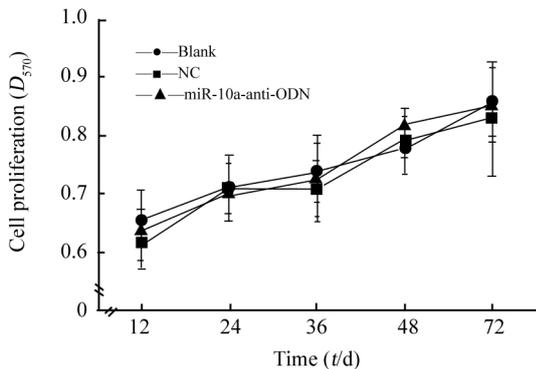


图 2 MTT 检测 miR-10a-anti-ODN 转染后 U87MG 细胞的增殖  
 Fig. 2 Proliferation of U87MG cells after miR-10a-anti-ODN transfection as detected by MTT assay

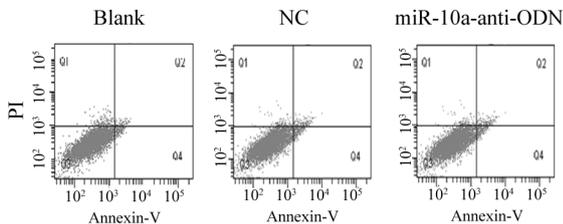


图 3 流式细胞术检测 miR-10a-anti-ODN 转染后 U87MG 细胞的凋亡

Fig. 3 Apoptosis of U87MG cells after miR-10a-anti-ODN transfection as detected by flow cytometry

2.4 miR-10a-anti-ODN 转染不影响 U87MG 细胞的细胞周期

miR-10a-anti-ODN 转染 U87MG 细胞 48 h 后检测结果(图 4)显示, 与空白对照组和 miR-NC 相比,

miR-10a-anti-ODN 组 U87MG 细胞 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 和 G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub> 都无明显的差异, 说明 miR-10a-anti-ODN 对 U87MG 细胞的周期影响不明显。

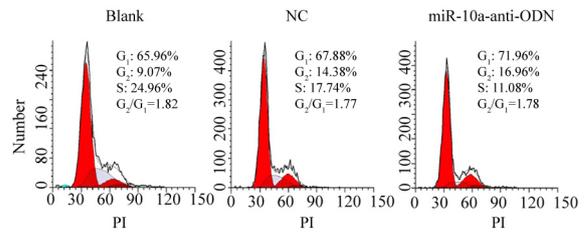


图 4 流式细胞术检测 miR-10a-anti-ODN 转染后 U87MG 的细胞周期

Fig. 4 Cell cycle of U87MG cells after miR-10a-anti-ODN transfection as detected by flow cytometry

2.5 miR-10a-anti-ODN 降低 U87MG 细胞侵袭能力

miR-10a-anti-ODN 转染 U87MG 细胞 48 h 后, 采用 Transwell 侵袭实验检测各组 U87MG 细胞的侵袭能力。结果(图 5)显示, miR-10a-anti-ODN 转染组穿膜细胞数为(87 ± 7.1)个, 显著低于空白组的(155 ± 3.7)个和 miR-NC 组的(149 ± 6.6)个(P < 0.05)。在降低 miR-10a 的表达后, U87MG 细胞的侵袭能力明显降低, 与空白组和 miR-NC 组细胞相比分别下降了 56% 和 58%。

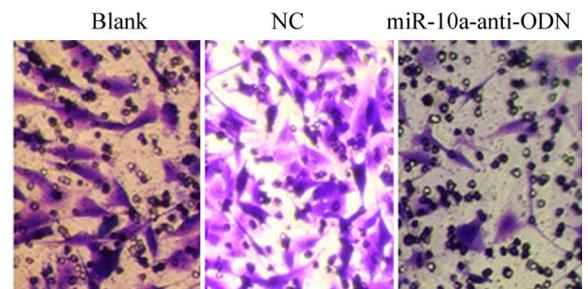


图 5 Transwell 小室实验检测 miR-10a-anti-ODN 转染后 U87MG 细胞的侵袭(×200)

Fig. 5 Invasion of U87MG cells after miR-10a-anti-ODN transfection as detected by Transwell assay (×200)

2.6 miR-10a-anti-ODN 抑制 U87MG 细胞的迁移

miR-10a-anti-ODN 转染 U87MG 细胞 48 h 后, 采用划痕实验检测各组 U87MG 细胞的迁移能力。结果(图 6)显示, miR-10a-anti-ODN 转染组 U87MG 细胞的迁移数为(78.0 ± 5.2)个, 显著低于空白组的(150.3 ± 3.7)个和 miR-NC 组的(147.3 ± 6.6)个(P < 0.05), 分别降低了

52% 和 53%。由此可见,miR-10a 能促进 U87MG 细胞的迁移能力。

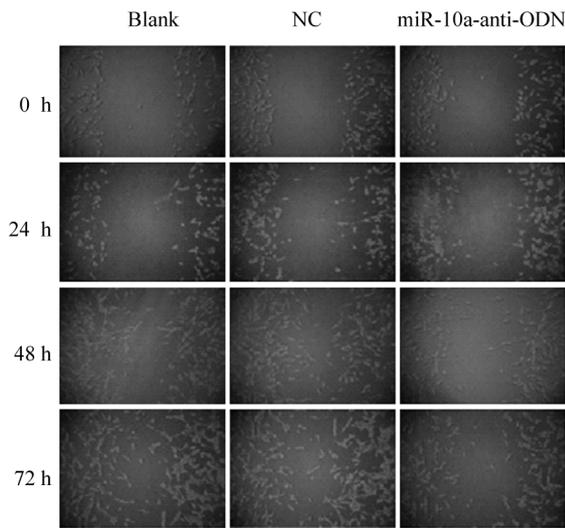


图 6 划痕实验检测 miR-10a-anti-ODN 转染后 U87MG 细胞的迁移 (×50)

Fig. 6 Migration of U87MG cells after miR-10a-anti-ODN transfection as detected by wound-healing assay (×50)

### 2.7 miR-10a-anti-ODN 抑制 U87MG 细胞中 MMPs mRNA 的表达

miR-10a-anti-ODN 转染 U87MG 细胞 48 h 后,用 RT-PCR 检测 U87MG 细胞中 MMPs 家族 mRNA 的表达。图像扫描分析结果(图 7A)显示,与 miR-NC 组和空白组相比,MMP-2 ( $0.61 \pm 0.06$ )、MMP-9 ( $0.25 \pm 0.08$ ) 和 MMP-14 ( $0.26 \pm 0.05$ ) mRNA 的表达量明显下降 ( $P < 0.01$ )。图 7B 为 miR-10a-anti-ODN 转染 U87MG 细胞后 MMP-2、MMP-9、MMP-14 mRNA 的相对表达量。结果表明,miR-10a-anti-ODN 明显抑制 MMPs mRNA 的表达。

### 2.8 miR-10a-anti-ODN 抑制 U87MG 细胞 MMPs 蛋白的表达

Western blotting 法检测 U87MG 细胞中 MMPs 家族蛋白的表达水平。结果(图 8)显示,与 miR-NC 组和空白组相比,MMP-2 ( $1.31 \pm 0.19$ )、MMP-9 ( $0.28 \pm 0.08$ ) 和 MMP-14 ( $0.27 \pm 0.04$ ) 蛋白表达量明显下降 ( $P < 0.05$ )。图 8B 为 miR-10a-anti-ODN 转染 U87MG 细胞后 MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白的相对表达量。由此可见,miR-10a-anti-ODN 明显抑制 MMPs 蛋白的表达。

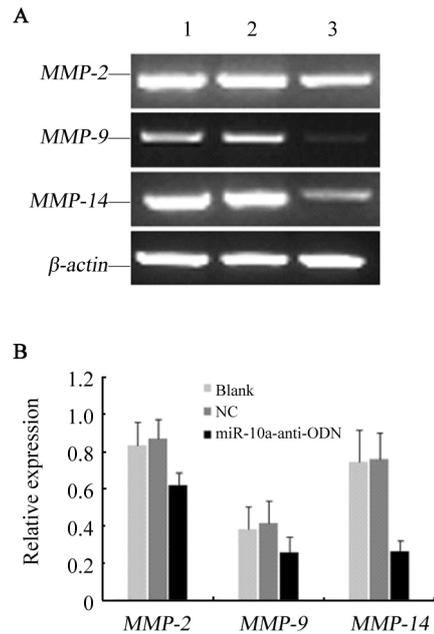


图 7 RT-PCR 检测 U87MG 细胞中 MMPs mRNA 的表达  
Fig. 7 MMPs mRNA expression in U87MG cells as detected by RT-PCR

A: RT-PCR; B: MMPs mRNA relative amount  
1: Blank; 2: NC; 3: miR-10a-anti-ODN

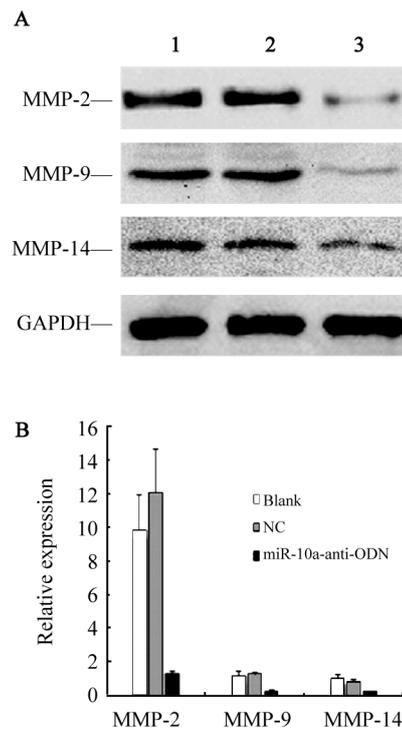


图 8 Western blotting 检测 U87MG 细胞 MMPs 蛋白的表达  
Fig. 8 Expression of MMPs proteins in U87MG cells as detected by Western blotting

A: Western blotting; B: MMPs protein relative amount

### 3 讨论

胶质瘤是成人原发性颅内肿瘤中最常见的一种恶性肿瘤<sup>[7]</sup>。浸润性生长是胶质瘤的重要生物学特性,该肿瘤的恶性程度越高,浸润能力越强<sup>[9]</sup>。miRNA 是一类内源性、保守、稳定的非编码短链 RNA,主要是通过和靶 mRNA 的 3'端非翻译区(3'-untranslated region,3'UTR)进行特异结合,干扰相应 mRNA 的翻译,负调控转录后的基因表达,参与肿瘤发生,如调控细胞周期、凋亡、侵袭和转移<sup>[10]</sup>。miR-10a 除了在胶质瘤中表达增高外,在胶质瘤细胞系中更是增加了 130 多倍<sup>[11]</sup>。运用预测 miRNA 靶基因的软件 Targetscan (<http://genes.mit.edu/targetscan>),Pictar (<http://pictar.Bio.nyu.edu>),Mir-Base (<http://www.mirbase.org/>)和 Human miRNA Targets Search & View (<http://cbio.mskcc.org/cgi-bin/mirnaviewer/mirnaviewer.pl>)对 miR-10a 的下游靶点进行搜索预测,并在 PubMed 上进行文献检索发现,miR-10a 的靶点包括 *HOXD10*<sup>[12]</sup>、*HOXA3*<sup>[12]</sup>、*HOXB1*<sup>[13]</sup>、*HOXB3*<sup>[13]</sup> 等。Mace 等<sup>[14]</sup>研究证实,*HOXA3* 在体内诱导血管生成,并可以增加内皮细胞中 MMP-14 和尿激酶型纤溶酶原激活物受体(urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR)的表达,促进内皮细胞迁移。Weiss 等<sup>[13]</sup>指出,miR-10a 能促进胰腺癌细胞的转移,用维甲酸抑制 miR-10a 能有效消除其侵袭和转移;但当将 miR-10a 的下游靶点 *HOXB1* 和 *HOXB3* 敲除后,胰腺癌细胞转移能力又可以恢复。该研究说明,维甲酸/miR-10a/*HOXB1*、*HOXB3*/ $\alpha$ -catenin、 $\beta$ -catenin、E-cadherin 通路对胰腺癌细胞转移能力的影响具有内在专一性。2007 年 Ma 等<sup>[15]</sup>研究证明,miR-10a 同族的另一成员 miR-10b 通过抑制 *HOXD10* 促进转移基因 *RHOC* 的表达,促进乳腺癌细胞的侵袭和转移。这些研究结果提示,miR-10a 可能在胶质瘤的侵袭和转移中起作用。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是由 20 多种不同的内肽酶组成的家族,在人肿瘤中往往表达增高。研究<sup>[16-18]</sup>表明,MMP 发挥作用必须有锌离子或钙离子存在,对胞外基质和基底膜的蛋白水解起重要作用,促进肿瘤的侵袭和转移。目前已有许多研究证实,MMP-2、MMP-9 和 MMP-14 在胶质瘤和成胶质细胞瘤细胞系 U87MG 中高表达<sup>[17,19-22]</sup>。这 3 种基质金属蛋白酶在功能上存在差别,MMP-2 和 MMP-9 是可溶性的蛋白酶,合成后分泌到细胞外<sup>[23]</sup>;MMP-14 又名 MT1-MMP,为膜型分

子,将 proMMP-2 激活为成熟的 MMP-2,在 MMP-2 的参与下降解细胞外基质。研究<sup>[24]</sup>报道,*MMP-14* 是 *HOXD10* 的直接调控靶点,而 *HOXD10* 是 *miR-10a* 的潜在靶点,说明 *MMP-14* 可能和胶质瘤的侵袭相关。本研究采用脂质体包被 miR-10a-anti-ODN,转染胶质瘤 U87MG 细胞,检测抑制 miR-10a 后对 U87MG 细胞功能,如增殖、周期、凋亡、侵袭和迁移的影响。研究发现,miR-10a-anti-ODN 转染不影响 U87MG 细胞的增殖、凋亡及其细胞周期,但可明显抑制 U87MG 细胞的侵袭和迁移。同时 miR-10a-anti-ODN 转染明显抑制 *MMP-2*、*MMP-9*、*MMP-14* mRNA 和蛋白质的表达,提示 miR-10a 在胶质瘤中作为癌基因促进肿瘤细胞的侵袭和转移。

特定 miRNA 表达有组织特异性,同一种 miRNA 在不同组织或器官中表达可以完全相反,在不同器官中的作用也可能完全相反<sup>[13,25]</sup>,而且一种 miRNA 可调控多种基因,一种基因也可被多种 miRNAs 调控,说明 miRNAs 通过复杂的网络对基因进行调控,但是 miR-10a 是通过什么网络通路调控 U87MG 细胞侵袭及其下游的靶点还有待进一步的研究。

### [参考文献]

- [1] Israel I, Blass G, Reiners C, et al. Validation of an amino-acid-based radionuclide therapy plus external beam radiotherapy in heterotopic glioblastoma models [J]. Nucl Med Biol, 2011, 38(4): 451-460.
- [2] Niyazi M, Siefert A, Schwarz SB, et al. Therapeutic options for recurrent malignant glioma [J]. Radiother Oncol, 2011, 98(1): 1-14.
- [3] Zhao J, Wang Y. Metastatic gliosarcoma due to iatrogenic contamination during the surgery of gliosarcoma [J]. World Neurosurg, 2010, 73(6): 634.
- [4] Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. N Engl J Med, 2005, 353(17): 1768-1771.
- [5] Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(32): 11755-11760.
- [6] Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4): 1351-1358.
- [7] Yue X, Lan F, Yang W, et al. Interruption of  $\beta$ -catenin suppresses the EGFR pathway by blocking multiple oncogenic targets in human glioma cells [J]. Brain Res, 2010, 1366: 27-37.
- [8] Arribas Alpuente L, Menéndez López A, Yayú Tur R. Glioblastoma: Changing expectations? [J]. Clin Transl Oncol, 2011, 13(4): 240-248.
- [9] Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study [J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 6892-6899.

- [ 10 ] Farazi TA, Spitzer JL, Morozov P, et al. miRNAs in human cancer [ J ]. *J Pathol*, 2011, 223( 2 ): 102-115.
- [ 11 ] Gaur A, Jewell DA, Liang Y, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 6 ): 2456-2468.
- [ 12 ] Han L, Witmer PD, Casey E. DNA methylation regulates MicroRNA expression [ J ]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6( 8 ): 1284-1288.
- [ 13 ] Weiss FU, Marques IJ, Woltering JM, et al. Retinoic acid receptor antagonists inhibit miR-10a expression and block metastatic behavior of pancreatic cancer [ J ]. *Gastroenterology*, 2009, 137( 6 ): 2136-2145 ( e1-e7 ).
- [ 14 ] Mace KA, Hansen SL, Myers C, et al. HOXA3 induces cell migration in endothelial and epithelial cells promoting angiogenesis and wound repair [ J ]. *J Cell Sci*, 2005, 118( Pt 12 ): 2567-2577.
- [ 15 ] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer [ J ]. *Nature*, 2007, 449( 7163 ): 682-688.
- [ 16 ] Freije JM, Balbín M, Pendás AM, et al. Matrix metalloproteinases and tumor progression [ J ]. *Adv Exp Med Biol*, 2003, 532: 91-107.
- [ 17 ] Velasco G, Cal S, Merlos-Suárez A, et al. Human MT6-matrix metalloproteinase: Identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors [ J ]. *Cancer Res*, 2000, 60( 4 ): 877-882.
- [ 18 ] Fillmore HL, VanMeter TE, Broaddus WC. Membrane-type matrix metalloproteinases ( MT-MMPs ): Expression and function during glioma invasion [ J ]. *J Neurooncol*, 2001, 53( 2 ): 187-202.
- [ 19 ] Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, et al. Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors *in vivo* and *in vitro* [ J ]. *Cancer Res*, 1996, 56( 2 ): 384-392.
- [ 20 ] Forsyth PA, Laing TD, Gibson AW, et al. High levels of gelatinase-B and active gelatinase-A in metastatic glioblastoma [ J ]. *J Neurooncol*, 1998, 36( 1 ): 21-29.
- [ 21 ] Wild-Bode C, Weller M, Wick W. Molecular determinants of glioma cell migration and invasion [ J ]. *J Neurosurg*, 2001, 94( 6 ): 978-984.
- [ 22 ] Van Meter TE, Broaddus WC, Rooprai HK, et al. Induction of membrane-type-1 matrix metalloproteinase by epidermal growth factor-mediated signaling in gliomas [ J ]. *Neuro Oncol*, 2004, 6( 3 ): 188-199.
- [ 23 ] Chernov AV, Sounni NE, Remacle AG, et al. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells [ J ]. *J Biol Chem*, 2009, 284( 19 ): 12727-12734.
- [ 24 ] Myers C, Charboneau A, Cheung I, et al. Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis [ J ]. *Am J Pathol*, 2002, 161( 6 ): 2099-2109.
- [ 25 ] Matsushima K, Isomoto H, Kohno S, et al. MicroRNAs and esophageal squamous cell carcinoma [ J ]. *Digestion*, 2010, 82( 3 ): 138-144.
- [ 收稿日期 ] 2011-08-05 [ 修回日期 ] 2011-09-22  
[ 本文编辑 ] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 常见参考文献著录格式示例

### 1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[ 文献类型标志 ]. 其他责任者( 例如翻译者 ). 版本项( 1 版不著录 ). 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [ 1 ] Abrams WB, Beers MH, Berkow R. 默克老年病手册 [ M ]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

### 2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[ 文献类型标志 ]// 专著主要责任者. 专著题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [ 1 ] Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms [ M ]// Soderman WA Jr, Soderman WA. *Pathologic physiology: Mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

### 3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[ 文献类型标志 ]. 刊名, 出版年, 卷号( 期号 ): 起页-止页.

- [ 1 ] Nobles KN, Guan Z, Xiao K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: Direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and -2 [ J ]. *J Biol Chem*, 2007, 282( 29 ): 21370-21381.

### 4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[ 文献类型标志 ]. 公告日期或公开日期.

- [ 1 ] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞( PIK )、其制备方法及应用: 中国, 2010101496839 [ P ]. 2010-10-14.

### 5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[ 文献类型标志 ]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

- [ 1 ] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系 [ D ]. 郑州, 郑州大学, 2007.

### 6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[ 文献类型标志/文献载体标志 ]. 刊名, 出版年, 卷号( 期号 ): 起页-止页( 更新或修改日期 ) [ 引用日期 ]. 获取和访问路径.

- [ 1 ] Christine M. *Plant physiology: Plant biology in the Genome Era* [ J/OL ]. *Science*, 1998, 281: 331-332 [ 1998-09-23 ]. <http://www.sciencemag.org/cgi/collection/anatmorp>.
- [ 2 ] Hopkinson A. UNIMARC and metadata: Dublin Core [ EB/OL ]. [ 1999-12-08 ]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.