

miR-130b 在人视网膜母细胞瘤中的表达及促癌机制研究

杨夏, 吴涛

引用: 杨夏, 吴涛. miR-130b 在人视网膜母细胞瘤中的表达及促癌机制研究. 国际眼科杂志 2019; 19(2): 214-220

作者单位: (550025) 中国贵州省贵阳市, 贵州医科大学附属医院眼科

作者简介: 杨夏, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼眶肿瘤、眼眶病。

通讯作者: 杨夏.yx6873021@163.com

收稿日期: 2018-09-17 修回日期: 2019-01-02

摘要

目的: 检测 miR-130b 在人视网膜母细胞瘤(RB)中的表达并初步探究其促癌机制。

方法: 采用 qRT-PCR 检测 miR-130b 在人 RB 癌组织及癌旁组织、人 RB 细胞系 (HXO-Rb44 与 Y79) 中的表达; 采用 qRT-PCR、Western Blot 及免疫荧光实验检测 miR-130b 过表达及干扰前后 HXO-Rb44 与 Y79 细胞中 PTEN 的表达水平; 采用双荧光素酶报告基因试验验证 miR-130b 与 PTEN 的靶向关系; 采用共转染实验考察 PTEN 与 miR-130b 影响 RB 细胞系 PI3K/Akt 信号通路表达的关系。

结果: miR-130b 在 RB 癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。与 ACBRI-181 细胞比较, miR-130b 在 HXO-Rb44 与 Y79 细胞中的表达水平显著增高 ($P < 0.05$)。与 RB 癌组织比较, PTEN 在其癌旁组织中的表达水平显著增高 ($P < 0.05$); miR-130b 表达水平与 PTEN 表达水平呈负相关性 ($P < 0.001$)。过表达 miR-130b 后的 HXO-Rb44 细胞 PTEN mRNA 与蛋白表达水平均显著降低, 而干扰 miR-130b 后的 Y79 细胞 PTEN mRNA 与蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与 miR-130b mimics+PTEN-NC 组比较, miR-130b mimics+wt-PTEN 组荧光素酶活性明显降低 ($P < 0.05$)。共转染 miR-130b mimics+PTEN-NC HXO-Rb44 细胞 p-Akt 308 与 p-Akt 473 蛋白表达水平显著增高 ($P < 0.05$), PTEN 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 共转染 miR-130b mimics+PTEN HXO-Rb44 细胞中, 以上三种蛋白表达水平均未发生明显改变。

结论: miR-130b 在 RB 组织及细胞系中呈高水平表达, PTEN 为 miR-130b 的靶基因, miR-130b 可能是经负向调控 PTEN 对 PI3K/Akt 信号通路的表达产生影响, 最终发挥促癌作用。

关键词: 人视网膜母细胞瘤; miR-130b; PTEN; PI3K/Akt 信号通路

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.2.07

Study on the expression and cancer-promoting mechanism of miR-130b in human retinoblastoma

Xia Yang, Tao Wu

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

Correspondence to: Xia Yang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China. yx6873021@163.com

Received: 2018-09-17 Accepted: 2019-01-02

Abstract

• AIM: To study the expression and cancer-promoting mechanism of miR-130b in human retinoblastoma (RB).

• METHODS: Detected the expression levels of miR-130b in human RB carcinoma tissues, adjacent tissues and human RB cell lines (HXO-Rb44 and Y79) by qRT-PCR; detected the expression levels of PTEN in HXO-Rb44 and Y79 cells by qRT-PCR, Western Blot and immunofluorescence; verified the target relationship between miR-130b and PTEN by dual-luciferase reporter gene test; the co-transfection test was used to investigate the relationship between PTEN and miR-130b on the expression of PI3K/Akt signaling pathway in RB cell line.

• RESULTS: The expression level of miR-130b in cancer tissue of RB was significantly higher than that of paracancerous tissue ($P < 0.05$). Compared with axben-181 cells, the expression level of miR-130b in HXO-Rb44 and Y79 cells was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with RB cancer tissue, the expression level of PTEN in its paracancerous tissue was significantly increased ($P < 0.05$). The expression level of miR-130b was negatively correlated with the expression level of PTEN ($P < 0.001$). The mRNA and protein expression levels of PTEN in HXO-Rb44 cells overexpressing miR-130b were significantly reduced, while the mRNA and protein expression levels of PTEN in Y79 cells after miR-130b interference were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with miR-130b mimics+PTEN-NC group, the luciferase activity of miR-130b mimics+wt-PTEN group was significantly reduced ($P < 0.05$). In the HXO-Rb44 cells co-transfected with miR-130b mimics+PTEN-NC, the expression levels of p-Akt 308 and p-Akt 473 protein were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression levels of PTEN protein were significantly decreased ($P < 0.05$). In the HXO-Rb44 cells co-transfected with miR-130b mimics+PTEN, no significant changes were observed in the above three proteins.

• CONCLUSION: miR-130b is highly expressed in RB tissues and cell lines. PTEN is the target gene of miR-130b, and miR-130b may negatively regulate PTEN to affect the expression of PI3K/Akt signaling pathway and ultimately play a role in promoting cancer.

• KEYWORDS: retinoblastoma; miR-130b; PTEN; PI3K/Akt signaling pathway

Citation: Yang X, Wu T. Study on the expression and cancer-promoting mechanism of miR-130b in human retinoblastoma. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019;19(2):214-220

0 引言

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是一种起源于视网膜胚胎性核层细胞的恶性肿瘤, 其患病群体主要为 5 岁以下的婴幼儿。相关流行病学研究显示, RB 在 5 岁以下儿童中的发病率为 11.8/100 万, 占同龄儿童恶性肿瘤的 6.1%^[1]。RB 的死亡率在欧美发达国家为 3%~5%, 而在亚洲与非洲则高达 40%~70%^[2]。RB 严重危害患儿的视力、生活质量乃至生命。近年来, 随着肿瘤综合治疗相关技术的革新与进步, 趋于更微观层次的分子靶向治疗显示了愈发理想的治疗前景, 其中小分子核糖核酸 (microRNA, miRNA) 对其靶基因表达的调控对肿瘤发生及病情进展的影响逐渐成为该领域的研究热点之一。新近研究表明, miR-130b 在不同肿瘤组织中均存在表达异常的情况, 且与肿瘤细胞增殖、浸润、转移、化疗抵抗以及多项不良预后具有密切关联^[3-6]。但 miR-130b 是否对 RB 也同样存在某种影响, 目前国内外就此方面研究相对较少。本研究通过检测 miR-130b 在 RB 组织中的表达水平并初步探讨其可能性促癌机制, 以期对 RB 的发生机制提供新的理论基础, 继而为临床治疗开辟新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 选取 2013-07/2017-08 期间在我院眼科中心接受眼球摘除术治疗的 RB 患儿 29 例 29 眼, 其中男 16 例 16 眼, 女 13 例 13 眼; 年龄 3mo~6 岁, 平均 2.5±0.8 岁。所有患儿在入选本研究前均未接受过化疗与局部放疗。取每例患儿 RB 癌组织及相应癌旁组织 (距肿瘤边缘 1~2cm 范围内组织) 标本, 每份标本均经我院病理科进行病理检查确诊。将收集到的标本放至液氮中保存待用。相关标本的收集程序、方法及后续各项实验方案均已通过我院医学伦理委员会审查, 入选患儿家属均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂: 人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN) 过表达及对照、PTEN 干扰及对照购自 RiboBio 公司; RNeasy Mini Kit (50) 试剂盒购自 MULTI SCIENCES 公司、mRNA 反转录试剂盒、miRNA 反转录试剂盒购自美国 Ferments 公司; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒购自德国 Qiagen 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司; Akt、p-Akt 308、p-Akt 473 兔抗人多克隆抗体购自 Bio-Rad 公司; Triton X-100 购自美国 Dow Chemical 公司; PTEN 抗体购自英国 Abcam 公司; Lipofectamine™ 2000 Reagent 购自美国 Invitrogen 公司。主要仪器: 5% CO₂ 培养箱 371 型购自 Thermo Fisher 公司; 低温超速离心机 ALLEGRA X-15R 型购自 Beckman Coulter 公司; 倒置荧光显微镜 Axio Observer A1/D1/Z1 型购自德国 Carl Zeiss 公司; 电泳仪、湿转仪、摇床购自美国 Bio-Rad 公司; 荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 与 MCDB-131 培养基分别于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内培养人 RB 细胞系 HXO-Rb44 与 Y79 (上海子实生

物) 及人正常视网膜血管内皮细胞系 ACBRI-181 (ATCC)。采用 miR-130b mimics 对 HXO-Rb44 细胞中的 miR-130b 进行过表达, 对照物为 miR-NC。采用 anti-miR-130b 对 Y79 细胞中的 miR-130b 进行下调处理, 对照物为 anti-miR-NC。分别采用 miR-NC+PTEN-NC、miR-130b mimics+PTEN-NC、miR-NC+PTEN、miR-130b mimics+PTEN 对 HXO-Rb44 细胞进行共转染。分别采用 anti-miR-NC+siSCR、miR-130b inhibitor+siSCR、anti-miR-NC+siPTEN、miR-130b inhibitor+siPTEN 对 Y79 细胞进行共转染。转染后的细胞培养条件同前。

1.2.2 qRT-PCR 检测 参照试剂盒说明书提取总 RNA (包括 miRNA), 根据试剂盒操作说明检测组织样本及相关细胞系 miR-130b 表达水平, 以 U6 小 RNA 为内参对照, 采用 2^{-ΔΔCt} 相对定量法处理数据。采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 混合液与 GAPDH 为内参检测 PTEN 基因的相对表达量, 同时采用 2^{-(Ct_{miRNA}-Ct_{内参})} 计算 PTEN 靶基因的相对表达量。相关引物序列分别为: miR-130b (5'-CAGGCAAGAGAAAGGGCA-3'); PTEN (5'-TGCAGATAATGACAAG-3'); GAPDH (5'-CGGAGTCAACGGATTTGTCGTAT-3'); U6 (5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3')。

1.2.3 Western Blot 检测 采用 RIPA 裂解缓冲液 (含 1% PMSF) 裂解总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白煮沸变性, 上样 40μg/孔。12% SDS-PAGE 电泳分离, 恒流条件下 PVDF 转膜。采用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液在 37℃ 条件下封闭 2h。一抗 (1:1000) 孵育, 4℃ 过夜。TBST 洗膜 3 次。二抗 (1:5000) 孵育, 37℃ 2h。TBST 洗膜 3 次。最后采用 ECL 免疫印迹发光试剂盒进行检测。

1.2.4 免疫荧光染色分析 重悬对数生长期细胞, 调整密度约为 1×10⁵/mL, 平皿 (d=3.5cm) 接种后于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内培养。细胞贴壁后去培养基, 预温 PBS (37℃) 清洗 3 次。采用 10% 甲醛固定 40min, PBS 清洗 3 次, 每次 10min。采用浓度为 0.2% Triton X-100 透化处理 5min, 清洗。采用 5% BSA (500μL/孔) 室温封闭 1h。加一抗 (1:100), 放置到湿盒内 4℃ 过夜, 复温 45min 后采用 PBS 摇洗 3 次; 加二抗 (1:400), 37℃ 避光放置 30min, PBS 摇洗 3 次。室温条件下 DAPI 染色 5~10min, 去 DAPI 后采用 PBS 避光摇洗 3 次。最后进行荧光显微镜镜检。

1.2.5 双荧光素酶报告基因试验 合成序列 miR-130b: 3'-GGAAAGUAGUAACGUGA-5', 携带 PTEN-3' 非翻译区 (3'UTR) 目的片段的质粒: 野生型 PTEN 3'UTR (PTEN 3'UTR WT): 5'-UCCUACCCCUUUGCACU-3', 突变型 PTEN 3'UTR (PTEN 3'UTR MUT): 5'-UCCUACCCCUUAGGAGU-3'。将两种序列分别构建到 pmirGLO 双荧光素酶报告基因载体质粒上。取对数生长期 HEK293T 细胞, 以每孔 7.5×10⁴ 个细胞接种于 24 孔板中, 细胞培养箱培养 1d。更换为无血清培养基。将 miR-130b mimics 及 miR-130b control 分别与 PTEN 的空质粒 (PTEN-NC)、野生质粒 (wt-PTEN) 以及突变质粒 (mut-PTEN) 进行组合, 共计 6 组, 每组包括 4 个副孔。将 100μL 无血清培养基、2μL Lipofectamine™ 2000、20pmol RNA (1μL)、0.4μg 质粒 (4μL) 等物质加至 EP 管内并配匀, 室温静置 20min 再分别加至相应孔板。根据双荧光素酶检测试剂盒说明书, 48h 后加 20μL PLB 裂解液, 裂解后加到 96 孔板, 加 100μL 荧光素酶检测试剂 II (luciferase assay reagent II, LAR II) 后进行萤火虫荧光酶活性检测。最后加 100μL

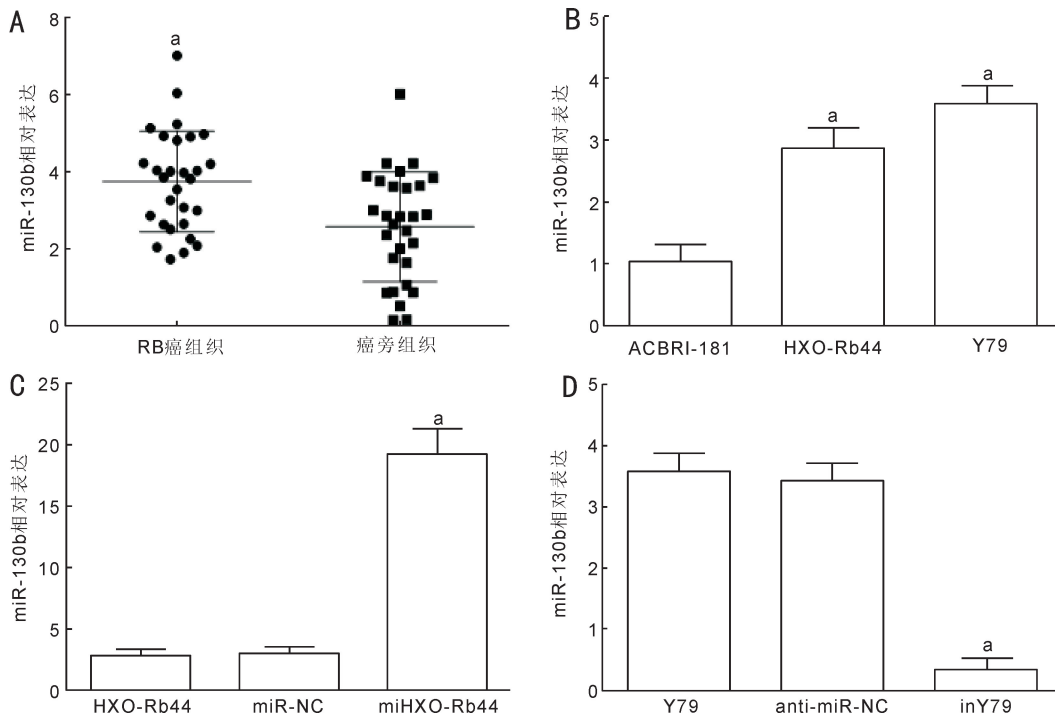


图1 qRT-PCR检测miR-130b在人RB癌组织和癌旁组织及人RB细胞系中的表达 A:miR-130b在人RB癌组织与癌旁组织中的表达($^aP<0.05$ vs 癌旁组织);B:miR-130b在ACBRI-181、HXO-Rb44、Y79三种细胞系中的表达($^aP<0.05$ vs ACBRI-181);C:miR-130b在经miR-130b mimics转染后的HXO-Rb44细胞中的表达($^aP<0.05$ vs HXO-Rb44);D:miR-130b在经miR-130b inhibitor转染后的Y79细胞中的表达($^aP<0.05$ vs Y79)。

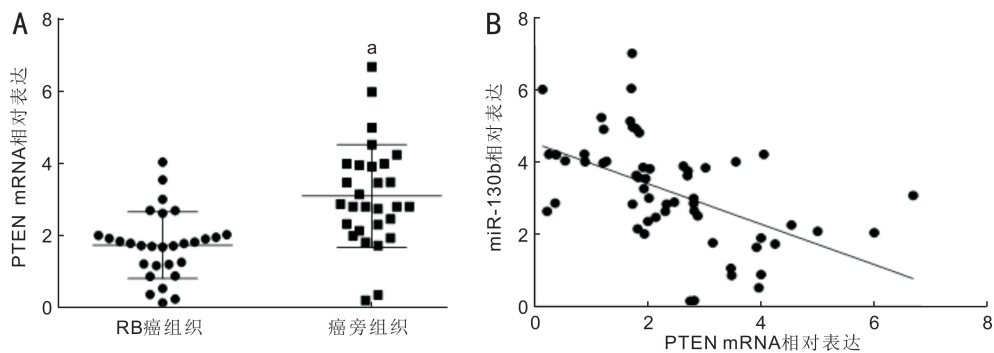


图2 PTEN在人RB癌组织和癌旁组织中的表达及其与miR-130b的相关性 A:qRT-PCR检测PTEN在人RB癌组织与癌旁组织中的表达($^aP<0.05$ vs RB癌组织);B:miR-130b表达与PTEN表达的相关性。

Stop & Glo[®]试剂湮灭萤火虫荧光素酶活性并激活海肾荧光素酶活性,检测miR-130b mimics+wt-PTEN与miR-130b mimics+mut-PTEN组的萤火虫荧光素酶活性变化情况。

统计学分析:采用SPSS19.0软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD- t 检验。相关性分析采用Pearson相关分析法。采用GraphPad Prism 6软件进行制图。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-130b在人RB癌组织和癌旁组织及人RB细胞系中的表达

miR-130b在人RB癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织($t=3.273, P=0.002$,图1A)。与ACBRI-181细胞比较,miR-130b在HXO-Rb44与Y79细胞中的表达水平显著增高,其中miR-130b在Y79细胞中的表达水平最高(3组比较: $F=549.619, P<0.001$;ACBRI-181 vs HXO-Rb44; $t=-23.208, P<0.001$;ACBRI-181 vs Y79; $t=-32.109, P<0.001$;HXO-Rb44 vs Y79; $t=-8.901, P<0.001$,图1B)。HXO-Rb44细胞转染miR-130b mimics后,

miR-130b表达水平显著增高(3组比较: $F=1725.913, P<0.001$;miR-NC vs HXO-Rb44; $t=-0.489, P=0.626$;HXO-Rb44 vs miHXO-Rb44; $t=-51.124, P<0.001$;miR-NC vs miHXO-Rb44; $t=-50.635, P<0.001$,图1C)。Y79细胞转染miR-130b inhibitor后,miR-130b表达水平显著降低(3组比较: $F=1427.198, P<0.001$;Y79 vs anti-miR-NC; $t=2.159, P=0.034$;Y79 vs inY79; $t=47.307, P<0.001$;anti-miR-NC vs inY79; $t=45.148, P<0.001$,图1D)。

2.2 PTEN为miR-130b的靶基因

2.2.1 PTEN在人RB癌组织和癌旁组织中的表达及其与miR-130b的相关性

与人RB癌组织比较,PTEN在其癌旁组织中的表达水平显著增高($t=-4.329, P<0.001$,图2A)。相关性分析显示,miR-130b表达水平与PTEN表达水平呈负相关性($r=-0.5608, P<0.001$,图2B)。

2.2.2 PTEN在人RB细胞系中的表达

Y79细胞中PTEN mRNA与蛋白的表达水平均显著低于HXO-Rb44细胞(qRT-PCR检测结果: $t=-12.071, P<0.001$,图3A)。过表达miR-130b后的HXO-Rb44细胞中PTEN mRNA与蛋白表达水平均显著降低,而干扰miR-130b后的Y79

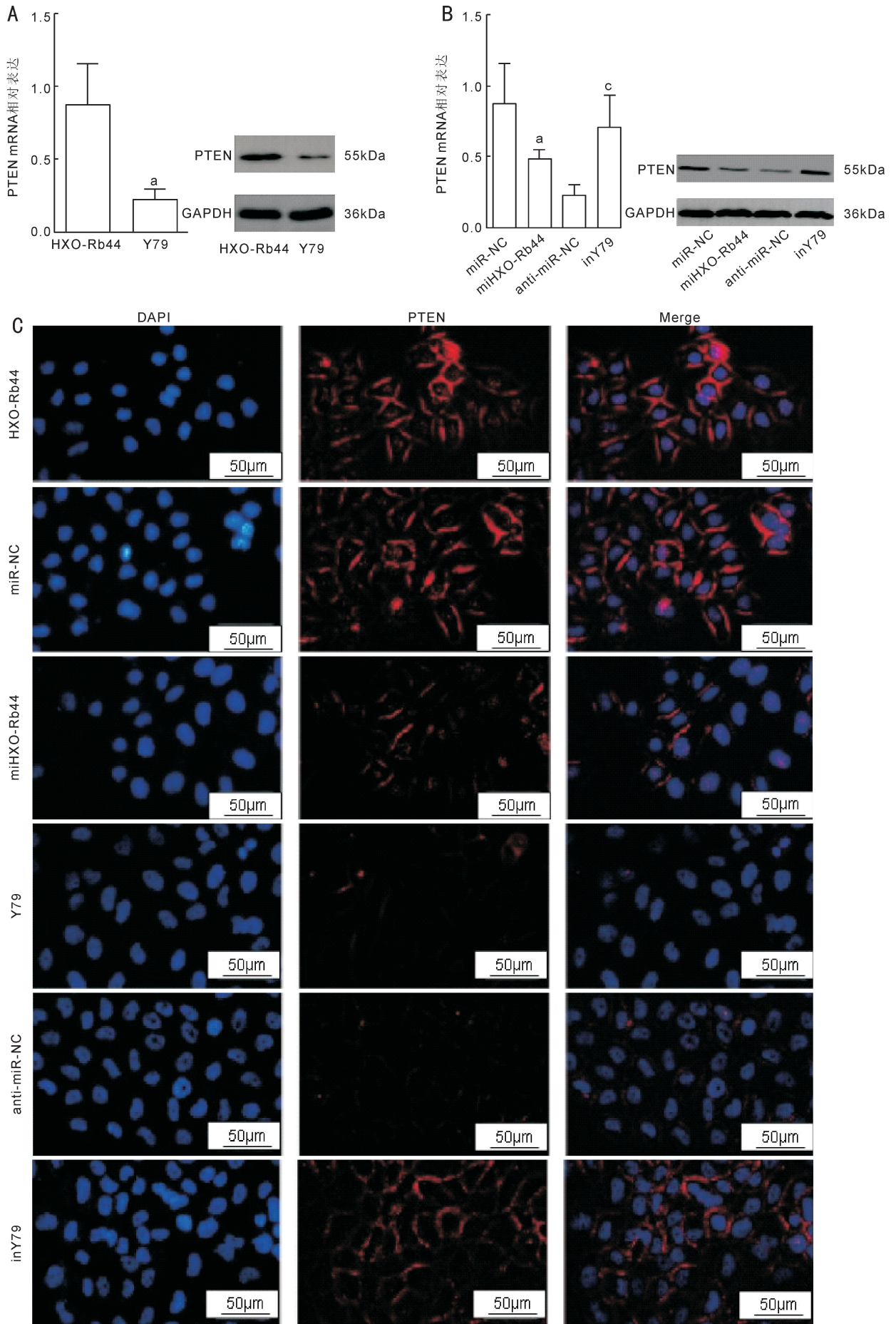


图3 PTEN在人RB细胞系中的表达 A;qRT-PCR和Western Blot法检测HXO-Rb44与Y79细胞中的PTEN表达(^a $P < 0.05$ vs HXO-Rb44);B;qRT-PCR和Western Blot法检测转染后HXO-Rb44与Y79细胞中的PTEN表达(^a $P < 0.05$ vs miR-NC;^c $P < 0.05$ vs anti-miR-NC);C:免疫荧光法检测HXO-Rb44和Y79细胞中PTEN表达($\times 400$)。

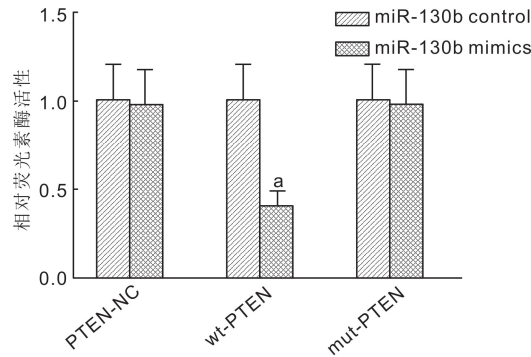


图4 双荧光素酶报告基因试验结果 ^a $P < 0.05$ vs miR-130b mimics+PTEN-NC。

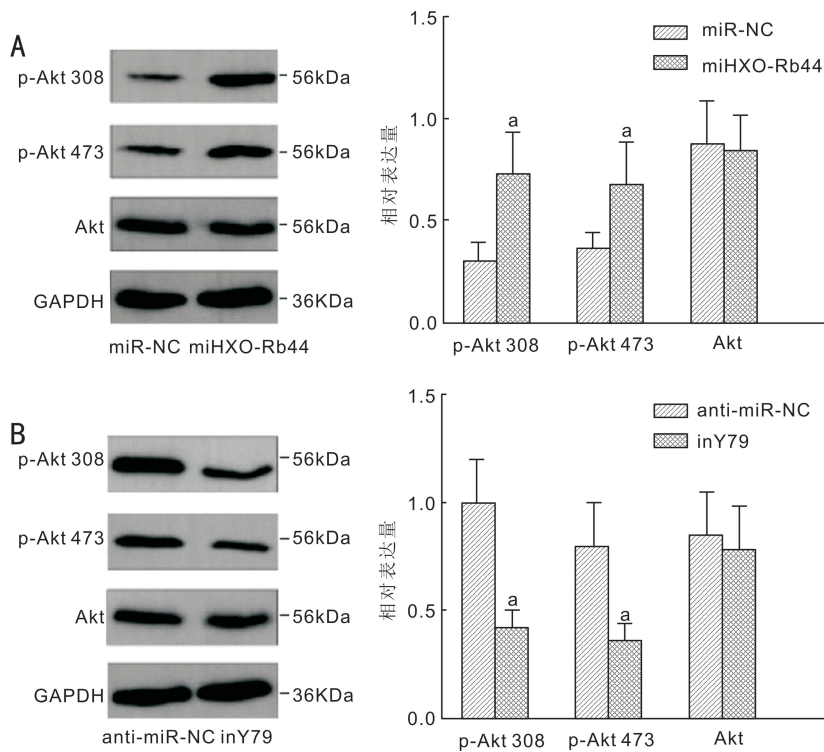


图5 Western Blot 法检测 miR-130b 对 RB 细胞系 PI3K/Akt 信号通路表达的影响 A: 过表达 miR-130b 对 HXO-Rb44 细胞 PI3K/Akt 信号通路表达的影响 (^a $P < 0.05$ vs miR-NC); B: 下调 miR-130b 对 Y79 细胞 PI3K/Akt 信号通路表达的影响 (^a $P < 0.05$ vs anti-miR-NC)。

细胞 PTEN mRNA 与蛋白表达水平均显著升高 (qRT-PCR 检测结果: miR-NC vs miHXO-Rb44: $t = 7.951, P < 0.001$; anti-miR-NC vs inY79: $t = 9.588, P < 0.001$, 图 3B、C)。

2.2.3 双荧光素酶报告基因试验结果 与 miR-130b mimics+PTEN-NC 组比较, miR-130b mimics+wt-PTEN 的萤火虫荧光素酶活性大幅度降低 ($t = 7.298, P < 0.001$), 但 miR-130b mimics + mut-PTEN 组未发生明显改变 ($t = 0.228, P = 0.820$, 图 4)。

2.3 miR-130b 对 RB 细胞系 PI3K/Akt 信号通路表达的影响 过表达 miR-130b 后的 HXO-Rb44 细胞 p-Akt 308、p-Akt 473 蛋白的表达水平相较 miR-NC 组均显著升高 ($t = -11.724, -9.225$, 均 $P < 0.001$), 总 Akt 蛋白表达水平无显著差异 ($t = -0.773, P = 0.443$), 见图 5A。下调 miR-130b 后的 Y79 细胞 p-Akt 308、p-Akt 473 蛋白的表达水平相较 anti-miR-NC 组均显著降低 ($t = 14.260, 10.821$, 均 $P < 0.001$), 总 Akt 蛋白表达水平无显著差异 ($t = -1.317, P = 0.193$), 见图 5B。

2.4 PTEN 与 miR-130b 对 RB 细胞系 PI3K/Akt 信号通路表达的影响 四种共转染的 HXO-Rb44 细胞 p-Akt

308、p-Akt 473、PTEN 蛋白表达水平有明显差异 ($F = 83.043, 62.943, 111.091$, 均 $P < 0.001$), 总 Akt 蛋白表达水平无明显差异 ($F = 0.978, P = 0.406$); 共转染 miR-130b mimics+PTEN-NC HXO-Rb44 细胞 p-Akt 308 与 p-Akt 473 蛋白表达水平显著增高 (均 $P < 0.05$), PTEN 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 共转染 miR-130b mimics+PTEN HXO-Rb44 细胞中, 以上三种蛋白表达水平均未发生明显改变 (均 $P > 0.05$), 见图 6A。四种共转染的 Y79 细胞 p-Akt 308、p-Akt 473、PTEN 蛋白表达水平有明显差异 ($F = 193.123, 369.911, 274.311$, 均 $P < 0.001$), 总 Akt 蛋白表达水平无明显差异 ($F = 0.568, P = 0.637$); 共转染 miR-130b inhibitor+siPTEN Y79 细胞 p-Akt 308 与 p-Akt 473 蛋白的表达水平无明显差异 (308: $t = 0.244, P = 0.808$; 473: $t = -0.271, P = 0.808$), 图 6B。

3 讨论

RB 是当前最为常见且危害程度最高的儿童眼内恶性肿瘤。随着 RB 治疗理念的进步, 其国内治疗发展趋势正逐步朝发达国家靠拢, 尽量避免行患眼眼球摘除术或眼眶内容物剜出术。常用的保守治疗方法则主要包括放疗、经

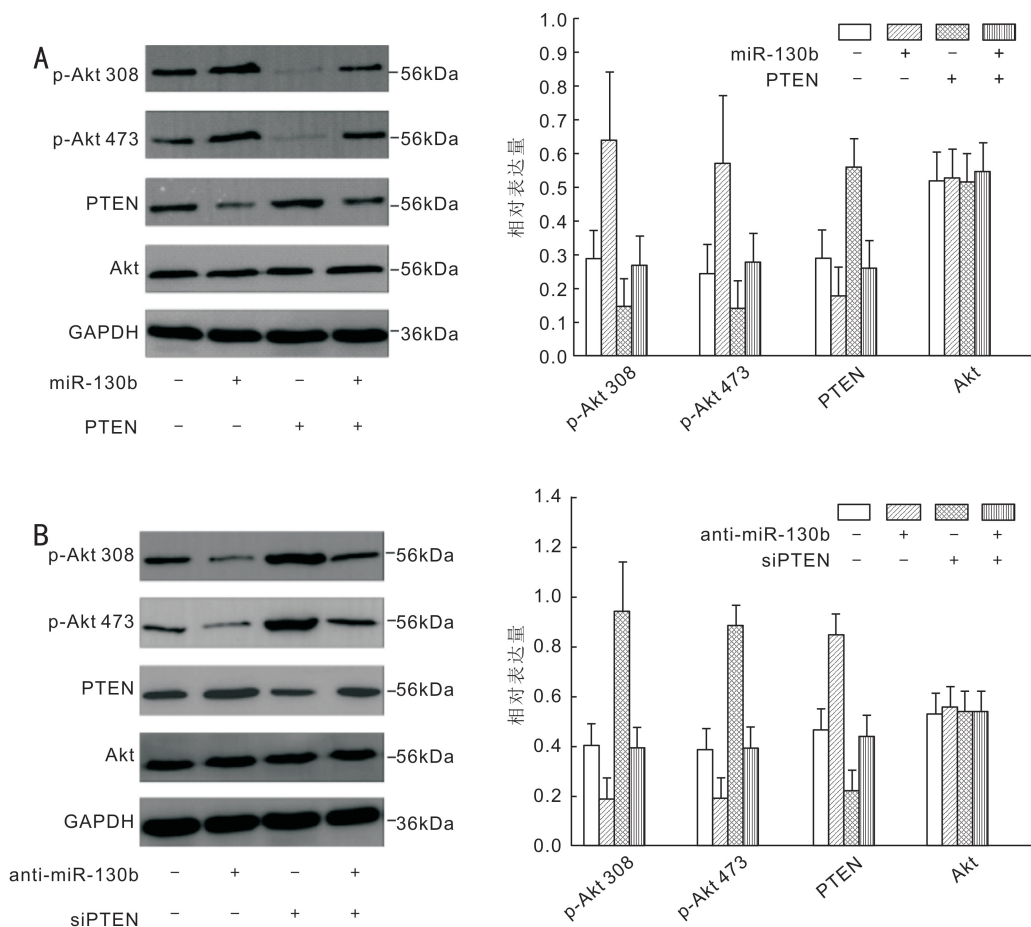


图6 Western Blot法检测PTEN与miR-130b对RB细胞系PI3K/Akt信号通路表达的影响 A:PI3K/Akt信号通路相关蛋白在HXO-Rb44细胞中的表达;B:PI3K/Akt信号通路相关蛋白在Y79细胞中的表达。

瞳孔温热疗法、化学减容疗法以及激光光凝等,但各种保守疗法均存在不足^[7-8]。随着分子生物学研究的深入,针对已明确的由肿瘤细胞内部某一个蛋白分子或基因片段所形成的致癌位点开展分子靶向治疗,为改善RB的整体临床治疗效果增加了可能性。

miRNA是一类具有进化高度保守特征的小分子非编码RNA,约含22个核苷酸,广泛存在于动植物及某些病毒体内。成熟miRNA分子能与靶基因mRNA的3'UTR区域进行完全或不完全互补配对,继而促使靶基因mRNA降解或阻滞蛋白表达^[9]。miR-130b家族因被发现在某些癌症中发挥重要作用而受到广泛关注,该家族成员包括分别位于人染色体11q12.1与22q11.21上的miR-130a和miR-130b。其中miR-130b在不同类型肿瘤中的作用具有差异性,表现出类似原癌基因或抑癌基因的生物学功能^[10]。研究发现,miR-130b在食道癌组织与胃癌组织中呈高表达,能促进肿瘤细胞的增殖与转移或降低凋亡,可视为致癌基因^[11-12];在胰腺癌组织和细胞中呈异常低表达,能减少肿瘤细胞的增殖与转移,可视为抑癌基因^[3]。本研究经qRT-PCR检测发现,miR-130b在RB癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织($P < 0.05$),且其在RB细胞系中的表达水平较正常视网膜血管内皮细胞也显著增高($P < 0.05$)。提示miR-130b在RB中可能发挥促癌作用,故研究miR-130b的靶基因有利于更加明确其在RB中的作用机制。

PTEN为一种位于染色体10q23区域的具有双特异性

磷酸酶活性的抑癌基因,研究发现多种恶性肿瘤的发生发展均与PTEN结构与功能异常具有密切关联^[13-14]。Meng等^[15]在肝癌中首次证实了PTEN mRNA 3'UTR可直接与miR-21结合,继而使PTEN的抑癌功能被抑制。之后陆续有研究发现在多种肿瘤组织中均有不同miRNA与PTEN靶向结合的情况^[16-17]。可以认为在这些特定的肿瘤中,表达异常的miRNA参与了PTEN的表达调控。故本实验选择PTEN作为miR-130b在RB作用机制研究的准靶基因。基于靶基因预测的假阳性率普遍较高,本研究不仅考察了PTEN在HXO-Rb44细胞与Y79细胞中的表达水平以及与miR-130b表达的相关性,同时也采用了双荧光素酶报告基因试验进行证实,结果表明miR-130b表达水平与PTEN表达水平呈负相关性,miR-130b在基因水平与蛋白水平均可对PTEN的表达产生影响,且miR-130b可直接靶向结合PTEN mRNA 3'UTR。进一步机制则可能与Akt信号通路的激活有关。已有研究发现,miR-221/222与miR-22等miRNA分子均在靶向作用PTEN后继而激活Akt信号通路产生促癌作用^[16-17]。另一项关于膀胱癌的报道指出,PTEN为PI3K/Akt信号通路的负调节剂,可将PI3K/Akt通路的调节元件作为其潜在的治疗靶点^[18]。本研究结果显示,在共转染miR-130b mimics+PTEN-NC的HXO-Rb44细胞中,p-Akt 308与p-Akt 473蛋白表达水平显著增高($P < 0.05$),PTEN蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),而在共转染miR-130b mimics+PTEN的HXO-Rb44细胞中,以上三种蛋白表达

水平均未发生明显改变。提示在RB中,miR-130b也可能是通过负向调控PTEN对PI3K/Akt信号通路的表达产生影响。

综上所述,本研究发现miR-130b在RB组织及细胞系中呈高水平表达,miR-130b可能是经负向调控PTEN对PI3K/Akt信号通路的表达产生影响,最终发挥促癌作用。miR-130b有望成为RB基因治疗的有效分子靶点。

参考文献

- 1 李佳桐,常莉. microRNAs在视网膜母细胞瘤的研究进展. 解剖科学进展 2016;22(4):439-441
- 2 高亚莉,李劲.MEG3抑制视网膜母细胞瘤细胞增殖. 肿瘤 2016;36(3):294-302
- 3 Zhao G,Zhang JG,Shi Y, et al. MiR-130b is a prognostic marker and inhibits cell proliferation and invasion in pancreatic cancer through targeting STAT3. *PLoS One* 2013;8(9):e73803
- 4 Tu K, Zheng X, Dou C, et al. MicroRNA-130b promotes cell aggressiveness by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci* 2014;15(11):20486-20499
- 5 Zhao Y, Miao G, Li Y, et al. MicroRNA-130b suppresses migration and invasion of colorectal cancer cells through downregulation of integrin β 1. *PLoS One* 2014;9(2):e987938
- 6 Sun B, Li L, Ma W, et al. MiR-130b inhibits proliferation and induces apoptosis of gastric cancer cells via CYLD. *Tumour Biol* 2016;37(6):7981-7987
- 7 Liu J, Zhu Y. Recent advances in retinoblastoma treatment. *Rec Adv Ophthalmol* 2013;33(1):91-94
- 8 Mendoza PR, Grossniklaus HE. The biology of retinoblastoma. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;134:503-516

- 9 Rabani M, Pieper L, Guo L C, et al. A Massively Parallel Reporter Assay of 3'UTR Sequences Identifies *In Vivo* Rules for mRNA Degradation. *Molecular Cell* 2017;68(6):1083-1094
- 10 Chen C, Hu Y, Li L. NRP1 is targeted by miR-130a and miR-130b, and is associated with multidrug resistance in epithelial ovarian cancer based on integrated gene network analysis. *Mol Med Rep* 2016;13(1):188-196
- 11 Yu T, Cao R, Li S, et al. MiR-130b plays an oncogenic role by repressing PTEN expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *BMC Cancer* 2015;15(1):29
- 12 Lai KW, Koh KX, Loh M, et al. MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2010;46(8):1456-1463
- 13 Gillard M, Lack J, Pontier A, et al. Integrative Genomic Analysis of Coincident Cancer Foci Implicates CTNNB1 and PTEN Alterations in Ductal Prostate Cancer. *Eur Urol Focus* 2017;12(3):1-10
- 14 Xin R, Bai F, Feng Y, et al. MicroRNA-214 promotes peritoneal metastasis through regulating PTEN negatively in gastric cancer. *Clin Res Hepatol Gastroent* 2016;40(6):748-754
- 15 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133(2):647-658
- 16 Romano G. MiR-221&222 regulate TRAIL-resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 down-regulation. *Cancer Cell* 2009;16(6):498-509
- 17 Bar N, Dikstein R. miR-22 forms a regulatory loop in PTEN/AKT pathway and modulates signaling kinetics. *PLoS One* 2010;5(5):e10859
- 18 Carneiro BA, Meeks JJ, Kuzel TM, et al. Emerging therapeutic targets in bladder cancer. *Cancer Treat Rev* 2015;41(42):170-178