

miR-21 在大肠癌中的表达及其靶基因探讨

熊兵红¹, 马利², 程勇^{1*}, 张才全¹

(¹重庆医科大学附属第一医院普外科, 普外科学重点实验室, 重庆 400016, ²重庆市花溪医院内科, 重庆 400054)

[摘要] 目的:探讨微小RNA(microRNA, miRNA)-21在大肠癌(colorectal cancer, CRC)组织和细胞中的表达,抑制miRNA-21(miR-21)表达对PI3K/PTEN/AKT/mTOR信号通路中各蛋白的影响及miR-21可能调控的靶基因。方法:运用实时荧光定量PCR和免疫组化分别测定CRC组织中的miR-21和PTEN水平。通过反义寡核苷酸技术抑制大肠癌细胞株HCT116中miR-21的表达并加以验证。通过蛋白质免疫印迹法检测HCT116细胞中PTEN、PI3K、Akt、MMP-9、mTOR表达的改变。利用生物信息学分析预测miRNA-21可能的靶基因,荧光素酶双报告基因实验检测PTEN活性。结果:miR-21在CRC组织中增高($P < 0.05$),PTEN在CRC组织中表达减低($P < 0.05$)。而且miR-21与PTEN的表达之间呈负相关($r = -0.396, P < 0.05$)。miR-21在HCT116中表达最高,在SW480中表达最低。miRNA-21在细胞株HCT116中的表达得到有效抑制,并且PTEN蛋白的表达明显上调($P < 0.05$),PI3K、Akt、MMP-9、mTOR表达下调($P < 0.05$)。筛选并确认了PTEN为miR-21的调控靶基因之一。结论:PTEN可作为miR-21的靶基因参与调控CRC过程。miR-21在大肠癌中表达增高,通过抑制PTEN表达促进肿瘤细胞侵袭转移。

[关键词] 大肠癌;miR-21;肿瘤抑制基因;PTEN;Akt;MMP-9

[中图分类号] R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)03-281-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20140302

The expression of miR-21 in colorectal cancer and its target gene study

Xiong Binghong¹, Ma Li², Cheng Yong^{1*}, Zhang Caiquan¹

(¹Department of General Surgery, Key Laboratory of General Surgery of Chongqing City, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; ²Department of Internal Medicine, Chongqing Huaxi Hospital, Chongqing 400054, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of microRNA-21 (miR-21) in colorectal cancer (CRC) tissues and cells, and investigate the inhibition of miR-21 on protein expression of PI3K/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway, and look for the target genes which may be regulated by miR-21. **Methods:** The expressions of miR-21 and PTEN from tissues of CRC were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and immunohistochemistry (IHC). The anti-sense oligonucleotide (ASO) technology was performed to inhibit and verify the expression of miR-21 in HCT116 cells. The changes in PTEN, PI3K, Akt, MMP-9 and mTOR protein expressions were detected by Western blotting. The potential target gene prediction was performed by Bioinformatics. Dual luciferase report gene assay was performed to identify the activity of PTEN. **Results:** The expression level of miR-21 was increased in CRC tissue ($P < 0.05$), and the expression of PTEN was decreased in CRC tissue ($P < 0.05$). However, the expression level of miR-21 was negatively associated with PTEN expression ($r = -0.396, P < 0.05$). The level of miR-21 was the highest in HCT116 cell and lowest in SW480 cell. The expression of miRNA-21 in HCT116 cell lines was significantly inhibited, the expression of PTEN protein was significantly increased and the expressions of PI3K, Akt, MMP-9 and mTOR were down-regulated. PTEN was identified as one of target genes of miR-21 in CRC cell. **Conclusion:** PTEN, as one of target genes of miR-21 in CRC cell, can regulate the process of CRC. miR-21 expression is increased in CRC, and promotes cancer cell invasion and metastasis by inhibiting PTEN.

[Key words] colorectal cancer; miR-21; tumor suppressor gene; PTEN; Akt; MMP-9

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(03):281-286, 342]

[基金项目] 重庆市自然科学基金资助项目(csts2012jjA0038)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xbh791220@163.com

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化道常见肿瘤,在世界多数国家的发病率呈上升趋势。在美国,其在人群中的发病率和病死率均处于第3位^[1]。而在我国,排在恶性肿瘤致死因素的第4位^[2]。现在认为, CRC 的发生是一个多因素、多阶段和多基因改变协同作用的过程,癌基因和抑癌基因的表达失调是 CRC 发生的分子基础。越来越多的证据显示,微 RNA (microRNA, miRNA) 与肿瘤的发生发展密切相关,很可能是一类潜在的癌基因或抑癌基因^[3]。研究发现 miRNA-21(miR-21)在人类多种肿瘤组织中表达上调,例如子宫颈癌、卵巢癌、肺癌、胆管癌、前列腺癌、乳腺癌、脑胶质瘤、肝癌、胰腺癌、胃癌、B 细胞淋巴瘤、白血病等,并可能参与肿瘤的浸润转移。本研究拟通过测定 CRC 组织中 miR-21、人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome 10, PTEN)的表达水平,运用反义寡核苷酸(anti-sense oligonucleotide, ASO)技术抑制 CRC 细胞株 HCT116 中 miR-21 的表达,观察其对 PI3K/PTEN/AKT/mTOR 信号通路中各蛋白的影响,并确定 PTEN 为 miR-21 调控的靶基因之一,从而进一步探索 miR-21 在 CRC 中的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集

选取 2010 年 6 月~2011 年 6 月在重庆医科大学附属第一医院普外科行手术治疗的 CRC 患者标本 30 例。所有患者均为首诊首治,未行术前放疗和化疗。标本分别取正常组织(距癌组织> 5 cm)和癌组织,并迅速转至-80℃保存。CRC 组织参照全国结肠癌协作组结肠癌诊治规范及 AJCC/UICC 的 TNM 分期标准进行诊断和分期。

1.1.2 结肠癌细胞株

结肠癌细胞系 HCT116、SW480、HT29、Lovo、Colo32 细胞由本实验室保存传代。

1.1.3 主要试剂

含 10%小牛血清的 RPMI-1640、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, CCK-8 试剂购自日本 Dojindo 公司, Lipofectamine™2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司, miR-21 抑制剂及其阴性对照品购于美国 Ambion 公司, 引物由上海生工生物工程公司合成。总 RNA 提取试剂盒 (total RNA purification kit)、反转录试剂购自日本 TaKaRa 公司。MiR-21 qPCR 检

测试剂盒 SYBRPremix Ex Taq™、PTEN mRNA qPCR 检测试剂盒 Quantitect SYBRGreen PCR kit 均购自大连 TaKaRa 公司。PTEN、p-AKT、PI3K、MMP-9、p-mTOR 抗体购自美国 Cell Signaling 公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗、兔抗人 β -actin 及 ECL 发光试剂盒均购自美国 Santa Cruz 公司。BCA 法蛋白质定量试剂盒购自海门碧云天公司。pGL3-control 质粒、荧光素酶双报告基因检测系统均购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化测定 PTEN

用已知阳性切片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。结果综合文献进行评价,PTEN 表达于细胞核或质中,按照每个视野中阳性细胞数占全部细胞数的比例将判断标准分 4 级: $\leq 10\%$ 为-, $> 10\%$ 且 $\leq 50\%$ 为+, $> 50\%$ 且 $\leq 75\%$ 为++, $> 75\%$ 为+++。

1.2.2 细胞培养

HCT116、SW480、HT29、Lovo、Colo32 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,细胞株均使用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.3 抑制 miR-21 表达

实验分为 3 组:miR-21 抑制组(IN)、阴性对照组(NC, Scramble)和空白对照组(blank control, MOCK)。各组实验重复 3 次。阴性对照组和空白对照组分别采用 miR-21 抑制剂的阴性对照试剂和 PBS。细胞转染步骤如下:HCT116 细胞经过 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞 2×10^5 个接种于 6 孔板,用 250 μ l 无血清 RPMI-1640 稀释 Lipofectamine™2000 转染试剂 8 μ l 和 miR-21 抑制剂 12.5 μ l,室温静置 5 min,然后将转染试剂与稀释 miR-21 抑制剂混合,室温下静置 20 min 后,铺到 6 孔板中,在 37℃、5%CO₂ 的培养箱培养,供后续实验使用。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)检测

按 TRIzol 说明书抽提 CRC 组织和 HCT116 细胞株中的总 RNA。分别测定 RNA 在分光光度计波长 280 nm 和 260 nm 的吸收值,计算浓度并评估纯度。按照试剂盒说明书测定 miR-21、PTEN mRNA。miR-21 以 U6snRNA 为内参照,PTEN 以 β -actin 为内参照。实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 实验

转染后 72 h 分别进行细胞裂解收集蛋白,行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,并转至硝酸纤维素膜上,常规抗体杂交,增强化学发光剂显色。用 Bio-Rad 凝胶成像显色仪行发光检测,Quantity One 软件显色凝胶图像的光密度值。以 β -actin 蛋白为内参照,以 PTEN 条带与 β -actin 条带光密度值的比值表示。实验均重复 3 次,求其均值与标准差。

1.2.6 荧光素酶试验

根据生物信息学软件多种 miRNA 靶基因在线分析软件,如 TargetScan、miRanda、MiRbase、Pictar 等,预测 miR-21 可能的靶基因,并获取含有作用位点的片段序列。预测设计引物,PTEN-3'-UTR-WT: 上游为 5'-TTGTGGCAACAGATAAGTTTGCAGTTG-GCTAAGAGAGGTT-3',下游为 5'-CATTCCCCTAAC-CCGAATACATGCATTAGAATGTAGCAAA-3';PTEN-3'-UTR-MT: 上游为 5'-TTGTGGCAACAGCTGAAT-CTGCAGTTGGCTAAGAGAGGTT-3',下游为 5'-ATGTAGCAAAACCCTTCGGAAACCTCTCTTAGCCAA-CTGC-3'。扩增出包含有 miR-21 保守性结合位点的 3'-UTR-WT 及 3'-UTR-MT,扩增产物凝胶电泳,然后行目的基因切胶回收,再行目的基因和载体的连

接,构建 pGL3-PTEN-3'-UTR-WT 和 pGL3-PTEN-3'-UTR-MT 载体,再依次行转化感受态菌、目的基因测序、质粒 DNA 抽提,将重组质粒转染 293T 细胞,然后行双荧光素酶分析,实验重复 3 次。

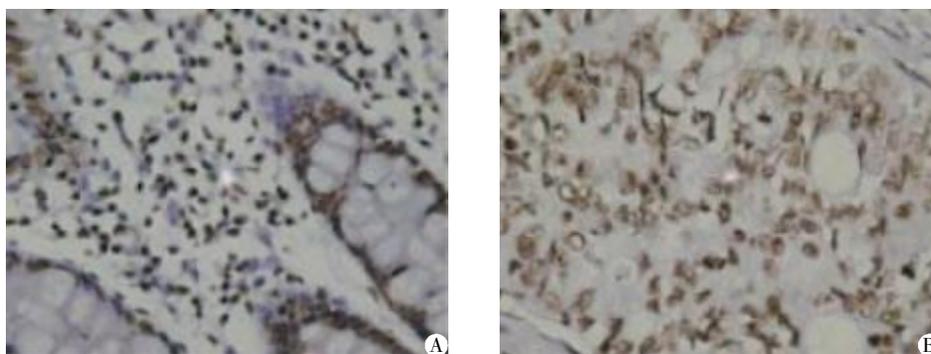
1.3 统计学方法

所有数据均采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两个样本均数比较采用 Independent-Sample *t* test 进行检验,多个样本均数比较采用 One-way ANOVA 分析。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-21 和 PTEN 在 CRC 组织中的表达

miR-21 在 CRC 中的表达明显高于癌旁正常组织($P < 0.05$)。PTEN 表达主要定位于胞核中,呈棕黄色,胞质中偶有少量表达(图 1)。PTEN 在癌旁正常组织、CRC 组织中阳性率分别为 100%(10/10)、46.66%(14/30),组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1),即 PTEN 在 CRC 组织中表达减低。而且 miR-21 与 PTEN 的表达之间呈负相关($r = -0.396$, $P < 0.05$)。



A: 癌旁正常组织;B: CRC 组织。

图 1 PTEN 在 CRC 组织中的表达(免疫组化,×400)

Figure 1 The expression of PTEN in CRC tissue(IHC,×400)

表 1 miR-21 和 PTEN 在 CRC 组织中表达

Table 1 The expressions of miR-21 and PTEN in CRC tissue

组别	miR-21	PTEN 阳性率(%)
癌旁正常组织(n=10)	1.01±0.13	100
CRC 组织(n=30)	4.95±2.25*	46.66*

与癌旁正常组织相比,* $P < 0.05$ 。

2.2 miR-21 在大肠癌细胞中的表达

如图 2 所示,miR-21 在 HCT116 中表达最高,在 SW480 中表达最低。

2.3 PTEN 蛋白在大肠癌细胞中的表达

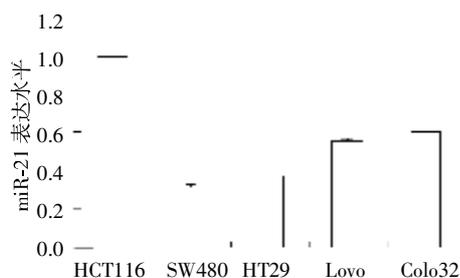


图 2 miR-21 在各大肠癌细胞中的表达(n=3)

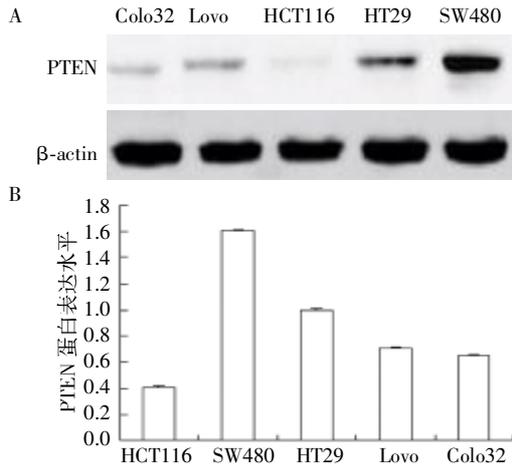
Figure 2 The expression of miR-21 in CRC cell lines(n=3)

如图 3 所示,Western blot 分析表明 PTEN 蛋白在 HCT116 中表达最低,在 SW480 中表达最高。经统计

明,miR-21 和 PTEN 蛋白表达水平呈反比($P < 0.01$)。

2.4 miR-21 下调后在 HCT116 细胞中的表达

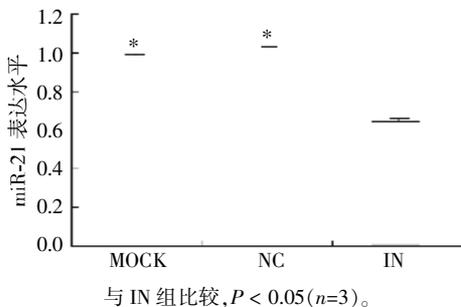
miR-21 在 miR-21 抑制组(IN)及阴性对照组(NC)、空白对照组(MOCK)中的相对表达量分别为 0.643 ± 0.01 、 1.02 ± 0.01 、 1.05 ± 0.02 ($n = 3$)。miR-21 抑制组 miR-21 表达水平明显低于空白对照组和阴性对照组($P < 0.05$,图 4)。



A: Western blot 分析; B: PTEN 蛋白在各细胞株中的相对表达量 ($n=3$)。

图 3 PTEN 蛋白在各大肠癌细胞中的表达

Figure 3 The expression of PTEN protein in CRC cell lines



与 IN 组比较, $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 4 下调 miR-21 对结肠癌 HCT116 细胞 miR-21 mRNA 表达的影响

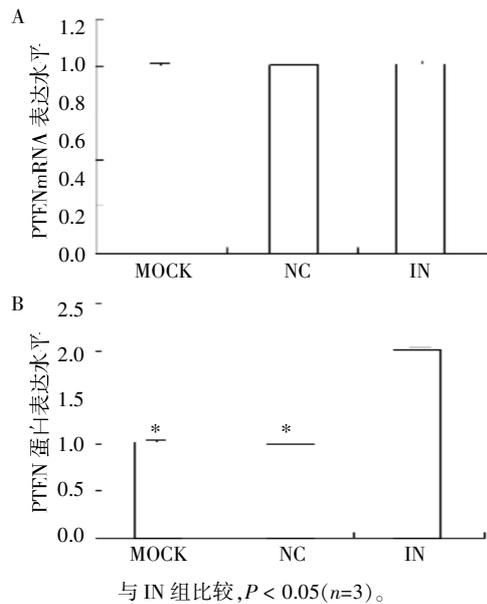
Figure 4 The effect of miR-21 inhibitor on the miR-21 expression of HCT116 cell

2.5 miR-21 下调后 PTEN mRNA 和蛋白在 HCT116 细胞中的表达

miR-21 下调后, PTEN mRNA 的表达量在 miR-21 抑制组(IN)及阴性对照组(NC)、空白对照组(MOCK)中无明显差异 ($n = 3, P > 0.05$,图 5A)。但 PTEN 蛋白在 miR-21 抑制组(IN)中明显升高 ($n = 3, P < 0.05$,图 5B)。

2.6 下调 miR-21 表达后对 PTEN 蛋白及其下游蛋白表达量的影响

结果显示 PTEN 蛋白在 miR-21 抑制组(IN)及

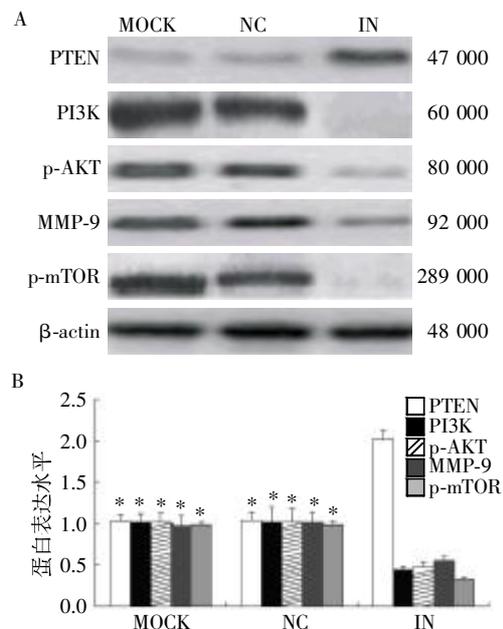


与 IN 组比较, $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 5 下调 miR-21 对结肠癌 HCT116 细胞中 PTEN mRNA (A)和蛋白(B)表达的影响

Figure 5 The effect of miR-21 inhibitor on the PTEN mRNA (A) and protein (B) expression of HCT116 cell

阴性对照组(NC)、空白对照组(MOCK)中的相对表达量分别为 1.02 ± 0.07 、 1.03 ± 0.09 和 2.01 ± 0.12 , 在 miR-21 抑制组表达明显升高 ($n = 3, P < 0.05$)。而 p-AKT、PI3K、MMP-9、p-mTOR 在 miR-21 抑制组中表达量均下降 ($n = 3, P$ 均 < 0.05 ,图 6)。



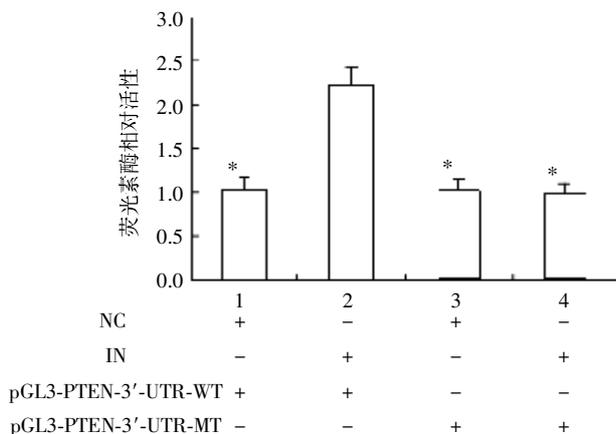
A: Western blot 分析; B: 各蛋白在 HCT116 中的相对表达量 ($n=3$)。与 IN 组比较, $P < 0.05$ 。

图 6 PI3K/PTEN/AKT/mTOR 信号通路中各蛋白在大肠癌细胞 HCT116 中的表达

Figure 6 The expression of proteins of PI3K/PTEN/AKT/mTOR signal pathway in CRC HCT116 cell lines

2.6 下调 miR-21 后荧光素酶相对活性 (PTEN 活性) 改变

pGL3-PTEN-3'-UTR-WT 共转染组, 转染 miR-21 抑制剂后荧光素酶相对活性明显增加, 与对照组及 pGL3-PTEN-3'-UTR-MT 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 7); pGL3-PTEN-3'-UTR-MT 组转染 miR-21 抑制剂后, 荧光素酶相对活性与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明 PTEN 是 miR-21 的一个靶基因。



与第 2 组比较, $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 7 抑制 miR-21 对 PTEN 活性的影响

Figure 7 The effect of miR-21 inhibitor on relative activity of PTEN

3 讨论

目前研究认为, CRC 的发生、发展是多因素、多阶段、多因子的复杂过程, 在此过程中癌基因的激活与抑癌基因的丢失或表达失调是其重要特征。miRNA 是近年发现的一类内源性非编码单链 RNA, miRNA 与肿瘤的发生密切相关, 有人提出了“癌 miRNAs (oncomiRs) 与抑癌 miRNAs (tumor suppressing)”的观点^[3-4], 即 miRNA 在肿瘤的发生与发展过程中既可扮演癌基因也可扮演抑癌基因的角色。miR-21 是 miRNA 中具有代表性的基因, miR-21 是一种癌基因, 它在肿瘤的发生发展过程中扮演着非常重要的角色, 在不同肿瘤中表达明显上升, 与肿瘤细胞的生长、增殖、侵袭转移等生物学行为密切相关。它的编码基因定位于 17q23.2, 即液泡膜蛋白基因 (vacuole membrane protein-1, VMP1) 编码区, VMP1 基因的第 10 内含子。

PTEN 是一个抑癌基因, 在细胞的生长发育、凋亡、迁移、信号传递等方面起着重要的调控作用, 而且在肿瘤发生发展及转移中均起抑制作用^[5]。PI3K/

PTEN/AKT/mTOR 信号转导通路在调节细胞凋亡、增生、分化等活动中起着重要作用, 与恶性肿瘤的发生、发展关系密切。PTEN 作为一种具有双重磷酸酶活性的蛋白, 可依赖其蛋白磷酸酶活性去磷酸化, 也可依赖其脂质磷酸酶活性使磷酸肌醇三磷酸的 D3 位脱磷酸, 从而阻断 AKT 的作用, 阻止细胞进行分裂, 并导致细胞凋亡。PTEN 的突变将使 PI3K 增加, AKT 活性增强。AKT 又称为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), PTEN 通过控制活化的磷脂酰 3,4,5-三磷酸肌醇来调控 Akt 的活性。因此, PTEN 的突变使其丧失了调节 AKT 的能力, 使细胞增殖失去控制, 从而引起癌变。PTEN 功能的下调会引起 PI3K 信号通道下游包括 AKT 等元件的激活, 从而介导肿瘤的进展和远处转移^[6]。PI3K/AKT/PTEN/mTOR 信号转导通路活化可以抑制多种刺激诱发的细胞凋亡, 促进细胞周期进展, 从而促进细胞的生存和增殖, 同时参与血管形成, 在肿瘤的形成中扮演重要角色, 并参与肿瘤的侵袭和转移。

Meng 等^[7-8]最早发现, miR-21 可以在胆管癌、肝癌细胞中作用于肿瘤抑制基因 PTEN 并促进肿瘤细胞侵袭和迁移, 证明 PTEN 是 miR-21 的靶基因, 后陆续在非小细胞肺癌^[9]和乳腺癌^[10]、胃癌^[11]、卵巢癌^[12]、脑胶质瘤^[13]、子宫内膜癌^[14]中被证明是 miR-21 的靶基因。

2006 年, Meng 等^[7]在胆管癌的研究中, 证明了抑癌基因 PTEN 是 miR-21 的一个靶基因, miR-21 通过靶向作用于 PTEN, 促进了胆管癌生长。2007 年, Meng 等^[8]通过 miRNA 表达谱研究发现人肝癌细胞中存在 miR-21 过高表达, 而 PTEN 表达降低, 两者之间存在负相关趋势, 提示 miR-21 可能抑制 PTEN 的表达从而介导了肿瘤进展。抑制 miR-21 可增加 PTEN 表达, 减少肝癌细胞的增殖、侵袭和转移, 增强 miR-21 表达的作用则出现相反的肿瘤生物学效应, 表明 PTEN 是 miR-21 的直接靶基因, 其参与了 miR-21 对肿瘤细胞增殖、侵袭和转移的影响。Zhang 等^[11]发现, 在胃癌细胞 BGC-823 中, miR-21 可通过靶向 PTEN 促进细胞的增殖和侵袭。

许多研究已经表明 miR-21 在 CRC 中高表达^[15-20], 本研究也证明 miR-21 在 CRC 组织和细胞中增高。但 miR-21 在 CRC 中的具体调节机制尚不明了。miRNA 具有调节下游靶基因表达的作用, 因此在大多肿瘤中高表达的 miR-21 很可能是通过调节与增殖、凋亡、侵袭或迁移相关基因的表达而发挥促进肿瘤发生发展的作用。

本研究先通过生物信息学在线软件查询,发现 PTEN 是 miR-21 的一个靶基因,后通过荧光素酶实验进一步证实。抑制 miR-21 后,PTEN mRNA 变化无差异,但 PTEN 蛋白则明显增高,证明 miR-21 在转录后水平调控 PTEN 表达。抑制 miR-21 后,PTEN 下游的 PI3K、AKT、mTOR、MMP-9 水平均降低。miR-21 改变了病灶中黏附激酶的磷酸化和金属蛋白酶 2 和 9 的表达,进而抑制迁移和浸润。证明 miR-21 可通过对 PTEN 的调控进而影响 PI3K/AKT/mTOR 信号通路下游靶点蛋白的表达。

但也有不一致的报道,Medina 等^[21]通过裸鼠试验证明仅仅过表达 miR-21 就可引发肿瘤发生, Hatley 等^[22]却通过体外实验证明 miR-21 过表达并不能导致肿瘤发生,在非小细胞肺癌中 PTEN 并非 miR-21 的靶标。Cheng 等^[23]报道在 HeLa 细胞中抑制 miR-21 时,HeLa 细胞会显著加快生长。Si 等^[24]在乳腺癌细胞 MCF-7 中的研究发现,MCF-7 细胞中 miR-21 与 PTEN 并不存在这样的调节关系。Folini 等^[25]研究发现敲除前列腺癌细胞中 miR-21,不影响其增殖、侵袭能力和放疗敏感性,也不调节肿瘤抑制因子 PTEN、程序性细胞死亡 4(programmed cell death protein 4, PDCD4)的表达,miR-21 在前列腺癌组织和相应正常组织中表达也没有差异。表明 miR-21 的致癌属性存在细胞和组织特异性。特定的 miRNA 作为治疗靶点应该考虑疾病的有关背景环境。Wang 等^[26]发现 miR-21 在 Cdc25A 过表达的结肠癌细胞中低表达。原因可能在于组织样本的数量和质量、特定的细胞株或培养条件。这表明 miRNA 可能参与许多与肿瘤形成、炎症、细胞生长密切相关的信号途径,形成一个复杂的网络。可见,人们对 miR-21 的作用及其与 PTEN 的关系还没有达成共识,故需要进一步研究。本研究中发现 PTEN 3'-UTR 中带有明确的 miR-21 结合位点,可以受到 miR-21 的调控。miR-21 可通过靶向 PTEN 和其他靶基因如 PDCD4 促进肿瘤的发生发展。miR-21 是如何通过其靶基因参与到编码基因的调控网络中,需要在后续研究中得到加强和证实。

[参考文献]

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300

[2] Yang L, Parkin DM, Li L, et al. Time trends in cancer mortality in China: 1987-1999[J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(5): 771-783

[3] Manikandan J, Aarthi JJ, Kumar SD, et al. Oncomirs; the

potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer[J]. *Bioinformation*, 2008, 2(8): 330-334

- [4] Cho WC. OncomiRs; the discovery and progress of microRNAs in cancers[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 60
- [5] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. *Science*, 1997, 275(5308): 1943-1947
- [6] Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(14): 2954-2963
- [7] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(7): 2113-2129
- [8] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer[J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(2): 647-658
- [9] Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, et al. MicroRNA-21(miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(11-12): 846-852
- [10] Wang ZX, Lu BB, Wang H, et al. MicroRNA-21 modulates chemosensitivity of breast cancer cells to doxorubicin by targeting PTEN[J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(4): 281-290
- [11] Zhang BG, Li JF, Yu BQ, et al. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 1019-1026
- [12] Lou Y, Yang X, Wang F, et al. MicroRNA-21 promotes the cell proliferation, invasion and migration abilities in ovarian epithelial carcinomas through inhibiting the expression of PTEN protein[J]. *Int J Mol Med*, 2010, 26(6): 819-827
- [13] Zhou X, Ren Y, Moore L, et al. Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status[J]. *Lab Invest*, 2010, 90(2): 144-155
- [14] Qin X, Yan L, Zhao X, et al. microRNA-21 overexpression contributes to cell proliferation by targeting PTEN in endometrioid endometrial cancer[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(6): 1290-1296
- [15] Xiong BH, Cheng Y, Ma L, et al. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(1): 219-228
- [16] Kulda V, Pesta M, Topolcan O, et al. Relevance of miR-

and coronary artery doses associated with intensity-modulated radiotherapy versus three-dimensional conformal radiotherapy for distal esophageal cancer[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 83(5):1580-1586

[9] 冯永,于长华,仲琴,等. 整同步与序贯化放疗在Ⅲ期食管癌治疗中的应用[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2010, 30(2):274-276

[10] 魏贤顶,赵于天,金建荣,等. 整体调强技术在乳腺癌改良根治术后放疗中的应用[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2013, 33(4):521-524

[11] Mertens AC, Liu Q, Neglia JP, et al. Cause-specific late mortality among 5-year survivors of childhood cancer; the Childhood Cancer Survivor Study[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 1130(19):1368-1379

[12] Heidenreich PA, Hancock SL, Lee BK, et al. Asymptomatic cardiac disease following mediastinal irradiation [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42(4):743-749

[13] 王军,王稀,刘青,等. 三维放疗急性放射性心脏损伤类型及影响因素分析[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2013, 22(3):213-216

[14] Li XA, Tai A, Arthur DW, et al. Variability of target and normal structure delineation for breast cancer radiotherapy: an RTOG multi-institutional and multiobserver study [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 73(3):944-951

[15] Collier DC, Burnett SS, Amin M, et al. Assessment of consistency in contouring of normal-tissue anatomic structures [J]. *J Appl Clin Med Phys*, 2003, 49(1):17-24

[收稿日期] 2013-11-22

(上接第 286 页)

21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 200(2):154-160

[17] Fassan M, Pizzi M, Giacomelli L, et al. PDCD4 nuclear loss inversely correlates with miR-21 levels in colon carcinogenesis [J]. *Virchows Arch*, 2011, 458(4):413-419

[18] Liu K, Li G, Fan C, et al. Increased expression of microRNA-21 and its association with chemotherapeutic response in human colorectal cancer [J]. *J Int Med Res*, 2011, 39(6):2288-2295

[19] Drebber U, Lay M, Wedemeyer I, et al. Altered levels of the onco-microRNA 21 and the tumor-suppressor microRNAs 143 and 145 in advanced rectal cancer indicate successful neoadjuvant chemoradiotherapy [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(2):409-415

[20] Chang KH, Miller N, Kheirleisid EA, et al. MicroRNA-21 and PDCD4 expression in colorectal cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2011, 37(7):597-603

[21] Medina PP, Nolde M, Slack FJ, et al. OncomiR addiction in an *in vivo* model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma [J]. *Nature*, 2010, 467(7311):86-90

[22] Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21 [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(3):282-293

[23] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4):1290-1297

[24] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth [J]. *Oncogene*, 2007, 26(19):2799-2803

[25] Folini M, Gandellini P, Longoni N, et al. miR-21, an oncomir on strike in prostate cancer [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:12

[26] Wang P, Zou F, Zhang X, et al. MicroRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(20):8157-8165

[收稿日期] 2013-10-18