

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.003

· 基础研究 ·

TLR4 信号通过对 miR-21 的表达调控影响乳腺癌 4T1 细胞的凋亡和增殖

张悦¹, 韩丹², 孙国荣¹, 乔珊珊¹, 步晓秋¹, 王忠锐¹, 梁春立¹ (1. 同济大学附属东方医院 普外科, 上海 200120; 2. 浙江大学医学部 免疫学研究所, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 目的: 探讨 TLR4 信号对乳腺癌 4T1 细胞株中 miR-21 表达的影响及调控机制, 研究 miR-21 对乳腺癌细胞凋亡和增殖的影响。方法: 体外培养乳腺癌细胞株 4T1, 以 TLR4 配体 LPS 刺激 6、12、18、24 h, 实时荧光定量 PCR 检测 4T1 细胞中 miR-21 的表达变化。Western blotting 检测 TLR4 信号活化后 4T1 细胞中 NF- κ Bp65 的表达和磷酸化情况; 应用 NF- κ B 抑制剂 PDTC 预处理 30 min, 实时荧光定量 PCR 检测 4T1 细胞中 miR-21 的变化。转染 miR-21 抑制剂和阴性对照后, Annexin-V/PI 双标法检测 4T1 细胞凋亡情况, MTT 法检测 4T1 细胞增殖情况。结果: LPS 刺激致 TLR4 信号活化能够时间依赖性地上调 miR-21 的表达 (18 h 时: 2.07 ± 0.33 vs 1; $t = 5.61$, $P = 0.03$), TLR4 信号能够时间依赖性地上调 NF- κ B 的活化, NF- κ B 抑制剂 PDTC 能明显抑制 TLR4 信号诱导的 4T1 细胞的 miR-21 上调 (0.70 ± 0.10 vs 2.14 ± 0.32 ; $t = -7.357$, $P = 0.002$)。与阴性对照组相比, miR-21 抑制剂组 4T1 细胞的凋亡率明显增高 [$(24.2 \pm 2.4)\%$ vs $(14.8 \pm 5.1)\%$; $t = 2.891$, $P = 0.044$], 4T1 细胞的增殖能力明显降低 (0.42 ± 0.02 vs 0.55 ± 0.01 ; $t = -8.528$, $P = 0.001$)。结论: TLR4 信号通路的活化能够上调乳腺癌 4T1 细胞中 miR-21 的表达, 其机制与 NF- κ B 的活化有关; 靶向抑制 miR-21 能有效促进 4T1 细胞的凋亡、抑制 4T1 细胞增殖。

[关键词] 乳腺癌; 4T1 细胞; miR-21; TLR4 信号; 凋亡; 增殖

[中图分类号] R730.2; R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)01-0014-06

TLR4 signaling in miR-21 expression and proliferation/apoptosis in breast carcinoma 4T1 cells

Zhang Yue¹, Han Dan², Sun Guorong¹, Qiao Shanshan¹, Bu Xiaoqi¹, Wang Zhongrui¹, Liang Chunli¹ (1. Department of General Surgery, East Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China; 2. Institute of Immunology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of TLR4 signaling on breast cancer cell proliferation/apoptosis and the underlying mechanism *in vitro*. **Methods:** Breast carcinoma 4T1 cells were stimulated with 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) after a preincubation with DMSO or NF- κ B inhibitor PDTC for 30 min. At 6, 12, 18 and 24 h after LPS stimulation, levels of miR-21 were measured by qRT-PCR, phospho-NF- κ Bp65 was determined by Western blotting analysis. Apoptosis and cell viability in 4T1 cells transfected with mock (control) or an miR-21/inhibitor were assessed by Annexin-V/PI staining and MTT assay, respectively. **Results:** LPS induced significant increasement of miR-21 level and NF- κ B activation in 4T1 cells in a time-dependent manner (18 h: 2.07 ± 0.33 vs 1; $t = 5.61$, $P = 0.03$), which were significantly attenuated by NF- κ B inhibitor PDTC. Transfection of 4T1 cells with miR21 inhibitor resulted in a significant increase in apoptosis (0.70 ± 0.10 vs 2.14 ± 0.32 ; $t = -7.357$, $P = 0.002$) and a significant decrease in cell growth (0.42 ± 0.02 vs 0.55 ± 0.01 ; $t = -8.528$, $P = 0.001$), as compared with transfection with mock. **Conclusion:** Activation of TLR4 signaling pathways may up-regulate miR-21 through NF- κ B activation in breast carcinoma 4T1 cells. Targeted inhibition of miR-21 with a sequence-specific inhibitor can effectively induce apoptosis and suppress 4T1 cell growth, thus having a great potential in the treatment of breast carcinoma.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81172515)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81172515)

[作者简介] 张悦 (1979 -), 男, 上海市人, 主治医师, 硕士生, 主要从事外科肿瘤临床和基础研究。E-mail: magiczhangyue@163.com

[通信作者] 梁春立 (Liang Chunli, corresponding author), E-mail: liang2006718@sina.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140218.1058.003.html>

[**Key words**] breast carcinoma; 4T1 cell; miR-21; TLR4 signaling; apoptosis; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(1): 14-19]

炎症是肿瘤免疫微环境的重要特征之一,是导致肿瘤发生和发展的主要原因^[1]。局部微环境中致炎信号的长期存在,可能会导致慢性炎症的发生,继而诱导形成肿瘤^[2],对炎症诱发肿瘤发生的分子机制的了解目前仍有许多空白^[3]。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)作为一类重要的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),能够选择性地识别病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),构成机体免疫系统抵御病原体入侵的第一道屏障,TLRs 信号过度活化或活化不足会导致机体功能异常和疾病的发生^[4]。最初,TLRs 被认为只表达在免疫细胞表面,但现有大量研究^[5-6]发现,肿瘤细胞也高表达该类受体,在其相应配体的刺激下,同样能分泌大量炎症细胞因子和趋化因子,因此近年来肿瘤细胞表面表达的 TLRs 与肿瘤发生机制的关系也倍受关注。小分子 RNA(miRNA)是一类具有多重功能的非编码 RNA,能够在转录后水平调控基因的表达,从而在器官发育、细胞分化和细胞凋亡等多种生物过程中发挥非常重要的作用^[7]。miRNA 与肿瘤发生的关系也非常密切,参与肿瘤发生的多个环节^[8]。有的 miRNA 通过靶向癌基因抑制癌基因的表达,发挥类似抑癌基因的作用;有的 miRNA 通过靶向抑癌基因导致抑癌基因的失活,发挥类似癌基因的作用^[9-10]。Iorio 等^[11]发现,miR-21 在乳腺癌中表达明显上调,提示其在肿瘤发生、发展中可能发挥癌基因的作用。一个 miRNA 可能调控了若干个靶基因,而多个 miRNA 也可作用于同一个靶基因。既然 miRNA 可通过与靶基因 mRNA 的结合来调节其表达水平,参与肿瘤发生、发展,那么又是什么因子来调节 miRNA 的表达呢? 本研究通过观察致炎症因子引起的 TLR4 信号活化对乳腺癌 4T1 细胞中 miR-21 表达的调控及相关的分子机制,进一步探讨 miR-21 对乳腺癌 4T1 细胞凋亡和增殖的影响,为了解炎症相关肿瘤的发生机制并为探索乳腺癌基因治疗新的切入点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

RPMI-1640、胎牛血清(FBS)均购自 PAA 公司,脂多糖(lipid polysaccharides, LPS)、TRIzol、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒等购自 Sigma 公司, Pri-

meScript™ RT 试剂盒购自 TaKaRa 公司。SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒购自 TOYOBO 公司,引物由上海生物工程有限公司合成。LPS 含量经鲎试剂检测,鲎试剂购自湛江安度斯生物有限公司,LPS(0111: B4)和蛋白酶抑制剂购自 Calbiochem 公司,细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司,抗 NF-κBp65 和 Phospho-NF-κBp65 购自 CST 公司,INTERFERin 转染试剂购自 Polyplus-transfection 公司, miR-21 抑制剂(miR-21 inhibitor)及其阴性对照(negative control)购自广州锐博生物公司。所有试剂均按说明书存放和使用。

1.2 细胞培养

乳腺癌细胞株 4T1 购自中国科学院细胞库,用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养液置 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中常规培养。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的制备

总 RNA 提取按 TRIzol 试剂说明书进行。贴壁细胞用预冷 PBS 洗两遍,按 1 × 10⁷ 个细胞加入 1 ml 细胞总 RNA 抽提试剂 TRIzol,充分匀浆,加入 0.2 ml 氯仿混匀,室温静置 3 min,4 ℃、12 000 × g 离心 15 min,吸取上层水相至新管中;加入 0.5 ml 异丙醇,室温静置 10 min,4 ℃、12 000 × g 离心 10 min,弃上清;沉淀以 75% 乙醇洗涤,4 ℃、7 500 × g 离心 5 min 后,空气干燥,溶解于 40 μl DEPC 处理的水溶液,进行浓度和纯度测定(GeneQuant II , Pharmacia Biotech)后进行反转录或保存于 -80 ℃。

每个样本各取 300 ng 总 RNA 置于 10 μl 体系中,用 PrimeScript™ RT 试剂盒反转录,于 42 ℃作用 15 min、85 ℃作用 5 s、降温至 4 ℃。反转录所得产物加入 EASY Dilution 20 μl 稀释,作为下一步荧光实时定量 PCR(Q-PCR)的模板。反转录引物为各种 miRNA 或 U6 小核 RNA 的特异发夹状结构引物(表 1)。

表 1 miRNA 的反转录引物

Tab.1 Primers of reverse transcription of miRNA

Primer	DNA sequence
miR-21	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT
	TCGCACTGGATACGACTCAACA-3'
U6	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.4 Q-PCR 检测 miRNA 的表达

使用 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒,在 Roche Light Cycler 1.5 荧光定量 PCR 仪上检测,熔链曲线显示产物均特异。用 Light Cycler software 4.1 软件处理数据,将目的基因的 Ct 用小鼠 U6(针对 miRNA)的 Ct 值进行标准化,样品扩增的倍数变化的计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。引物如表 2 所示。

表 2 Q-PCR 引物序列
Tab.2 Primers sequence of Q-PCR

Primer		DNA sequence
miR-21	Forward	5'-CTGTTAGCTTATCAGACTGA-3'
	Reverse	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	Forward	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	Reverse	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

用 TLR4 的配体 LPS(100 ng/ml) 刺激乳腺癌 4T1 细胞 6、12、18、24 h 后,通过 Q-PCR 对 miR-21 表达丰度进行检测。用 NF- κ B 的抑制剂 PDTC(100 μ mol/L) 处理 4T1 细胞 30 min,再用 100 ng/ml LPS 刺激 18 h 后,Q-PCR 对 miR-21 表达丰度进行检测。

1.5 Western blotting 检测乳腺癌细胞内 NF- κ Bp65 的表达和磷酸化水平

收集细胞,用预冷 PBS 洗 1 遍,加入适量含蛋白酶抑制剂(1 nmol/L PMSF)的细胞裂解液,4 $^{\circ}$ C 裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times g$ 离心 10 min 后收集上清。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,调整浓度,加入 6 $\times$ 上样缓冲液(0.5 mol/L Tris-HCl 2.5 ml,甘油 5 ml,20% SDS 2 ml,5% 溴酚蓝 0.5 ml,临用前每 1 ml 缓冲液加入 100 μ l β -mercaptoethanol),95 $^{\circ}$ C 煮 5 min,制备好的样品 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。根据待测蛋白分子量大小配制相应浓度的 SDS-PAGE 胶,电泳分离后以 100 V 恒定电压于冰浴下将蛋白转至硝酸纤维素膜上,丽春红染色并标记大小和方向,用含 5% 脱脂奶粉或 5% BSA 的 TBST(Tris 121.14 g, NaCl 87.66 g,加浓盐酸调整 pH 至 7.5,加水至 1 000 ml,为 10 $\times$ TBS;临用前用水稀释至 1 $\times$ TBS,加 Tween 20 1 ml/1 000 ml)封闭 2 h,加入适当浓度的一抗稀释液室温放置 2 ~ 3 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min;然后加入 HRP 标记的二抗稀释液室温放置 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min;最后 ECL 法显影。100 ng/ml

LPS 刺激 4T1 细胞 15、30、60 min,设立非刺激对照组,然后分析其细胞内 NF- κ Bp65 的表达及其磷酸化水平,用 β -actin 作为内参照。

1.6 miR-21 抑制剂转染 4T1 细胞

miR-21 抑制剂和阴性对照抑制剂的转染参照 INTERFERin 试剂说明书进行。将适量的 miR-21 抑制剂和阴性对照抑制剂分别溶于无血清 RPMI-1640 培养基,终浓度为 20 nmol/L,然后加入转染试剂充分混匀,37 $^{\circ}$ C 培养 15 min,即将混合物加入待转染的细胞中,继续培养细胞 72 h 后进行后续实验。

1.7 流式细胞仪检测 4T1 细胞的凋亡

收集转染 72 h 后的 4T1 细胞,Annexin V/PI 双标法检测凋亡。收集细胞后,用标记缓冲液 500 μ l 洗 1 遍,再加入 FITC 标记的 Annexin V 至 5 μ g/ml,4 $^{\circ}$ C 标记 10 min,标记缓冲液 500 μ l 洗 1 遍后,加 PI(5 μ g/ml),2 min 后放置冰上,加入标记缓冲液 200 μ l 重悬,用 BD LSR II 流式细胞仪(FACS caliber, BD 公司)检测,以 BD FACSDiva 软件分析。

1.8 MTT 法检测 4T1 细胞的增殖

取对数生长期 4T1 细胞,按每孔 1×10^4 个细胞接种 96 孔平底培养板,各设 3 个复孔,参照 INTERFERin 试剂说明书进行转染。转染后分别再培养 24、48 h。培养结束前 4 h 时每孔加入 20 μ l MTT(5 mg/ml),37 $^{\circ}$ C 继续培养。结束时小心将培养上清吸出,每孔加入 200 μ l DMSO,震荡 10 min。以无细胞的完全培养基作为空白对照,未处理 4T1 细胞作为阴性对照。处理结束后,在酶联免疫分析仪上测定 570 nm 波长处的光密度(D)值。

1.9 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计学软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结 果

2.1 TLR4 信号活化能够时间依赖性上调乳腺癌 4T1 细胞内 miR-21 的表达

用 TLR4 的配体 LPS(100 ng/ml) 刺激乳腺癌 4T1 细胞 6、12、18、24 h 后,Q-PCR 对 miR-21 表达丰度检测结果(图 1)显示,4T1 细胞在 TLR4 配体刺激 12 h 后 miR-21 出现明显上调,在 18 h 表达丰度最高(2.07 ± 0.33 vs 1; $t = -5.61$, $P = 0.03$)。

2.2 TLR4 信号活化能够时间依赖性地上调 NF- κ B 的活化

Western blotting 结果(图 2)显示,4T1 细胞中 NF- κ Bp65 磷酸化的出现时间在 LPS 刺激后 15 min

时,60 min 时到达最大。而 NF-κBp65 的表达在 LPS 刺激前后没有明显变化。

[(24. 2 ± 2. 4)% vs (14. 8 ± 5. 1)% ; t = 2. 891, P = 0. 044]。

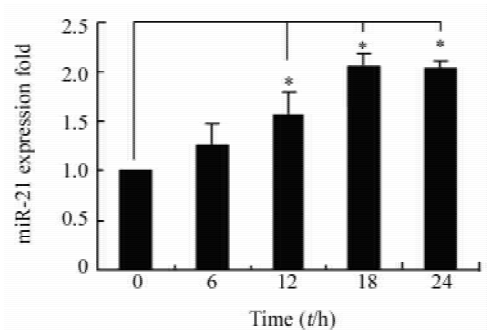


图 1 Q-PCR 检测 LPS 刺激 4T1 细胞不同时间点的 miR-21 表达的丰度

Fig.1 Expression of miR-21 in 4T1 cells stimulated with LPS at indicated time points was measured by Q-PCR

* P < 0. 05 vs 0 h group

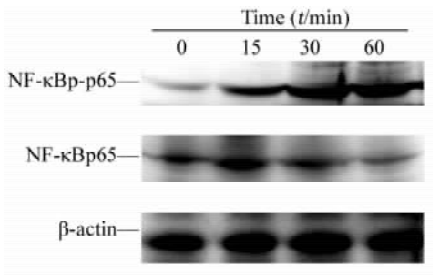


图 2 Western blotting 检测 LPS 对 4T1 细胞内 NF-κBp65 表达水平及其磷酸化的影响

Fig. 2 Effects of LPS on the expression of NF-κBp65 and its phosphorylation in 4T1 cells were detected by Western blotting

2.3 NF-κB 抑制剂 PDTC 明显抑制 TLR4 信号活化后 4TI 细胞中 miR-21 的上调

用 NF-κB 的抑制剂 PDTC 100 μmol/L 处理 4T1 细胞 30 min 后,再用 100 ng/ml LPS 刺激 18 h, Q-PCR对 miR-21 表达丰度检测结果(图 3)显示, PDTC 对 LPS 作用后 4T1 细胞中 miR-21 表达的上调有较明显的抑制作用(0. 70 ± 0. 10 vs 2. 14 ± 0. 32 ; t = - 7. 357, P = 0. 002)。

2.4 转染 miR-21 抑制剂能够明显促进 4T1 细胞的凋亡

用 Annexin V/PI 双标法检测转染阴性对照和 miR-21 抑制剂后 4T1 细胞的凋亡情况,凋亡细胞包括 Annexin V⁺ 细胞、PI⁺ 细胞和 Annexin V⁺ PI⁺ 细胞。结果(图 4)显示,与阴性对照组相比,转染 miR-21 抑制剂能够明显促进 4T1 细胞的凋亡

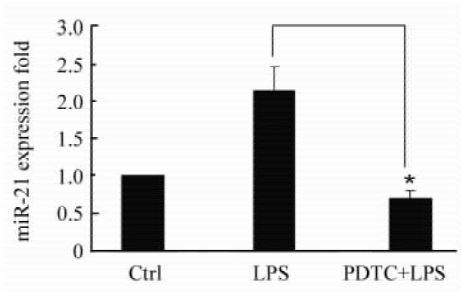


图 3 Q-PCR 检测 NF-κB 抑制剂 PDTC 对 LPS 诱导的 4T1 细胞内 miR-21 表达上调的影响

Fig.3 Effects of NF-κB inhibitor PDTC on the LPS-induced up-regulation of miR-21 in 4T1 cells were measured by Q-PCR

* P < 0. 05 vs LPS group

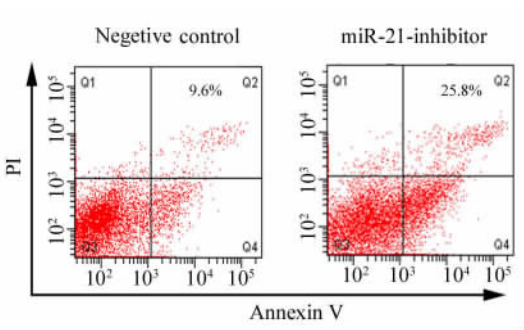


图 4 转染 miR-21 抑制剂能够明显促进 4T1 细胞的凋亡

Fig.4 Transfection of miR-21-inhibitor promotes apoptosis of 4T1 cells

2.5 转染 miR-21 抑制剂对 4T1 细胞体外增殖能力的抑制

MTT 实验结果(图 5)显示,与转染阴性组 4T1 细胞相比较,转染 miR-21 抑制剂后 24 h,两组细胞的增殖能力差别不大。但 48 h 后,4T1 细胞的生长明显缓慢,而阴性对照组 4T1 细胞生长相对稳定(0. 42 ± 0. 02 vs 0. 55 ± 0. 01 ; t = - 8. 528, P = 0. 001)。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,全球每年约有 120 万新发病例、50 万死亡病例^[11]。近年来,我国乳腺癌的发病率呈逐年上升趋势,严重危害女性的生命和健康。然而,乳腺癌发生、发展的分子机制至今仍不清楚。研究^[12]表明,感染、炎症与一

些肿瘤的发病有着密切的关系,炎症与癌症间关联的研究也逐步受到重视。miRNA 能够调控基因的表达,在细胞的生长、分化及死亡的过程中具有重要作用。miRNA 的表达异常又与多种肿瘤相关,其在肿瘤的发生过程中发挥癌基因或抑癌基因的作用。在乳腺癌中,各种 miRNA 的功能不尽相同,一般把乳腺癌相关 miRNA 分为具有癌基因作用的 miRNA 和具有抑癌基因作用的 miRNA 两类:当某些miRNA 的表达在肿瘤中升高时,就被看作是癌基因;反之,则为抑癌基因^[13]。既然慢性感染和炎症被认为是导致肿瘤发生和发展的主要原因之一,局部微环境中炎性因子的长期存在和反复的炎症反应可能诱导肿瘤的发生,而 miRNA 的表达失调更是与白血病、乳腺癌、肺癌等疾病直接关联^[14-15]。但目前对于炎症如何调控 miRNA 参与肿瘤发生和发展的相关机制并不十分清楚。

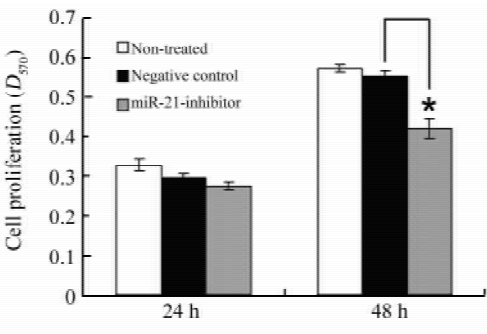


图5 转染 miR-21 抑制剂对 4T1 细胞增殖能力的影响
Fig.5 Effect of miR-21-inhibitor transfection on the proliferation of 4T1 cells
* P<0.05 vs negative control

研究^[16]发现,在乳腺癌肿瘤中 miR-21 的表达明显升高,提示 miR-21 的表达与乳腺癌细胞的高生长、低凋亡相关。临床研究^[17]发现,miR-21 高表达的患者由于早期症状不明显和癌细胞易通过淋巴转移,表现为愈后较差、生存期较短。因此,miR-21 可以作为具有癌基因作用的 miRNA,从而成为乳腺癌预后效果和疾病进展的一项监测指标。在炎性因子刺激的情况下,固有免疫细胞内 miR-21 的表达能够在 TLR4 活化时显著增高,并且靶向作用于 PDCD4 (programmed cell death 4),从而反馈性负向调控 TLR 信号途径^[18]。本研究发现,当肿瘤局部微环境中存在炎性因子 LPS 时,乳腺癌 4T1 细胞可通过 TLR4 信号的活化,上调 miR-21 的表达。该结果提示,在炎性因子的作用下,乳腺癌细胞内具有癌基因

作用的 miR-21 的表达能被进一步活化,从而更有效地反馈性抑制 TLR 信号途径,但是该过程中更加精细的调控机制尚不知晓。

NF- κ B 是目前被认为调节肿瘤基因表达的关键分子,同时也是细胞信号转导通路中的重要环节,具有多向性调节作用,参与调控多种因子的基因表达,在免疫调控、炎症、应激反应及细胞凋亡中发挥重要作用^[19]。细胞在静息状态下,NF- κ B 以无活性状态存在于细胞质中,它与一种抑制因子 I-B 结合组成一个三聚体 p50-p65-I-B。三聚体中 I-B 类抑制因子的存在可阻碍 p50-p65 复合物的二聚体化和使 NF- κ B 的活性丧失。当细胞受到 NF- κ B 激活剂刺激时,I-B 即从三聚体中解离出来,暴露出 p50 亚基上的易位信号和 p65 亚基上的 DNA 结合位点,从而使此异二聚物表现出 NF- κ B 活性,并从细胞质中易位到细胞核,最终发挥转录调控作用^[20]。本研究发现,致炎性因子 LPS 能够时间依赖性地促进 NF- κ Bp65 的磷酸化水平,从而上调 NF- κ B 的活化,提示 NF- κ B 信号通路可能参与了 LPS 对乳腺癌 4T1 细胞内 miR-21 表达的诱导作用。研究结果提示,miR-21 的上调为 NF- κ B 所依赖。为了进一步验证在乳腺癌 4T1 细胞内 LPS 诱导的 miR-146a 和 miR-21 上调是否也为 NF- κ B 所依赖,本研究以 NF- κ B 抑制剂 PDTC 预处理 4T1 细胞 30 min,结果发现与对照组相比,PDTC 能明显抑制 LPS 诱导的 4T1 细胞中 miR-21 的上调,从而提示在促炎性因子的作用下,TLR4 信号能够通过 NF- κ B 的活化促进 miR-21 上调。

某些肿瘤细胞能够通过上调 miR-21 的表达发挥抗凋亡作用,而在有些肿瘤中则对凋亡没有影响。Chan 等^[21]研究发现,抑制 miR-21 的表达能够激活成胶质细胞瘤内的凋亡信号而促进细胞凋亡。Frankel 等^[22]发现,miR-21 可以通过抑制 MCF-7 细胞内肿瘤抑制蛋白 p53 的表达而拮抗 p53 的凋亡途径。而 Cheng 等^[23]发现,miR-21 对 Hela 细胞的凋亡没有影响。本研究发现,靶向抑制 miR-21 能够有效促进乳腺癌 4T1 细胞的凋亡,并抑制 4T1 细胞增殖,提示 miR-21 在乳腺癌 4T1 细胞中可发挥抗凋亡和促增殖作用,其作用机制可能是促进凋亡抑制蛋白的表达参与凋亡调控,其精细调控机制还有待于进一步研究。

总之,当肿瘤局部微环境中存在炎性因子 LPS 时,乳腺癌 4T1 细胞可通过 TLR4 信号引起 NF- κ B 的活化,导致 miR-21 表达上调,而靶向抑制 miR-21 能够有效促进 4T1 细胞的凋亡、抑制细胞增殖。炎

症可以进一步引起肿瘤内 miRNA 的表达失调,进而对肿瘤病理、疾病分型、患者预后等发挥重要作用。通过对致炎信号因子的调节,有可能作为一种新的治疗策略来实现对肿瘤免疫微环境的精细调节,从而改善炎症相关癌症的治疗,为抗肿瘤基因治疗和药物筛选奠定良好基础。

[参考文献]

[1] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer [J]. Nature, 2002, 420(6917): 860-867.

[2] Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development [J]. Mol Cancer Res, 2006,4(4): 221-233.

[3] Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer [J]. Curr Mol Med, 2010, 10(4): 369-373.

[4] Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function [J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(3): 168-179.

[5] Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance [J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5009-5014.

[6] Basith S, Manavalan B, Yoo TH, et al. Roles of Toll-like receptors in cancer: A double-edged sword for defense and offense [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(8):1297-1316.

[7] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of micro-RNA [J]. Cell, 2013,153(3): 516-519.

[8] Profumo V, Gandellini P. MicroRNAs: Cobblestones on the road to cancer metastasis [J]. Crit Rev Oncog, 2013, 18(4): 341-355.

[9] Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer [J]. Mol Oncol, 2012, 6(6): 590-610.

[10] 薛逸荃,曹雪涛. RNA 异常与肿瘤调控研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(1): 1-12.

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

[12] Keibel A, Singh V, Sharma MC. Inflammation, microenviron-

ment, and the immune system in cancer progression [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(17): 1949-1955.

[13] Mendell JT. MicroRNAs: Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy [J]. Cell Cycle, 2005, 4(9): 1179-1184.

[14] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation [J]. Nature, 2008, 454(7203): 436-444.

[15] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(12): 861-874.

[16] Mar-Aguilar F, Luna-Aguirre CM, Moreno-Rocha JC, et al. Differential expression of miR-21, miR-125b and miR-191 in breast cancer tissue [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2013, 9(1): 53-59.

[17] 颜黎栩,黄马燕,吴秋良,等. miR-21 表达异常与乳腺癌临床病理特征及预后的关系 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(4): 676-681.

[18] Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21 [J]. Nat Immunol, 2010,11(2): 141-147.

[19] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression [J]. Nature, 2006, 441(7092): 431-436.

[20] Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-kappaB signaling [J]. Annu Rev Biophys, 2013, 42: 443-468.

[21] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an anti-apoptotic factor in human glioblastoma cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6029-6033.

[22] Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283(2): 1026-1033.

[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.

[收稿日期] 2013 - 10 - 20

[修回日期] 2013 - 12 - 10

[本文编辑] 韩丹

• 读者 • 作者 • 编者 •

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 $\bar{x}$,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 $\bar{x}$ 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)