

MicroRNA-10b 调控乳腺癌细胞生长增殖与凋亡的研究

顾 忆, 李小曼, 郑禄枫, 杨 珏, 奚 涛*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘 要 研究 MicroRNA-10b(miR-10b)对乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 的生长增殖和凋亡的调控作用。采用能模拟内源 miR-10b 的 miR-10b 模拟物以及能特异靶向敲除内源 miR-10b 的 miR-10b 抑制剂分别转染乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231。RT-PCR 测定转染后细胞中 miR-10b 的表达水平,MTT 检测 miR-10b 对细胞增殖活力的影响,流式细胞仪检测 miR-10b 对细胞周期和凋亡的影响。生物信息学软件预测 miR-10b 潜在的靶基因,3'UTR 荧光素酶报告法验证其靶向性,Western blot 检测 caspase-3、P21 的蛋白表达水平。研究证实,miR-10b 模拟物上调乳腺癌中 miR-10b 的表达水平,与对照组相比,细胞增殖能力提高,细胞周期加速,细胞凋亡率降低;反之 miR-10b 抑制剂能显著下调 miR-10b 的表达,与对照组相比,细胞增殖能力降低,细胞周期阻滞,细胞凋亡率上调。初步探讨 miR-10b 的作用机制可能是通过靶向作用于 TP53INP1,抑制细胞周期与凋亡关键蛋白 caspase-3、P21 的表达水平,从而促进乳腺癌的发生发展。

关键词 MicroRNA;miR-10b;乳腺癌;增殖;细胞周期;凋亡;TP53INP1

中图分类号 R737.9 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)02-0242-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150218

MicroRNA-10b regulates proliferation, cell cycle and apoptosis in human breast cancer cells

GU Yi, LI Xiaoman, ZHENG Lufeng, YANG Jue, XI Tao*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To investigate the effects of miRNA-10b(miR-10b) on breast cancer proliferation and apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231, the miR-10b mimics used to increase the endogenous expression of miR-10b, and miR-10b inhibitor used to decrease the endogenous expression of miR-10b, were stably transfected into MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. The expression level of miR-10b was determined by real-time PCR. The effects of miR-10b on proliferation were evaluated by MTT assay, while cell cycle assay and the apoptosis rate were measured by flow cytometry. Bioinformatic software was used to predict the potential targets of miR-10b, and 3'UTR luciferase reporter and qRT-PCR assay were used to verify a direct target of miR-10b. The expression levels of caspase-3 and p21 protein were measured by Western blot. Results confirmed that over-expression of miR-10b could promote the proliferation of breast cancer cells and inhibit the apoptosis by up-regulating the endogenous miR-10b, while the miR-10b inhibitor could restrain the proliferation of breast cancer cells and increase the apoptosis by reducing the endogenous miR-10b. In conclusion, miR-10b could negatively regulate the expression of caspase-3 and p21 by targeting TP53INP1, hence highlighting its potential as an oncogene in breast cancer cells.

Key words MicroRNA; miR-10b; breast cancer; proliferation; cell cycle; apoptosis; TP53INP1

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率占女性肿瘤的第1位,每年夺走全球约50万女性的生命,且病死率以3%速度增长。据统计,2012年乳腺癌占美国女性新确诊肿瘤的首位,占女性肿

瘤相关病死率第2位,严重威胁着女性的生命健康^[1-2]。随着分子生物学研究的深入,学者们期待可以找到一个新的治疗靶点,能够从细胞或者基因水平对乳腺癌的发生发展进行预防、诊断以及

治疗。

MicroRNA (miRNA) 是近年来研究的热点之一。miRNA 作为真核生物中存在的一类长度约 17~25 个核苷酸的非编码小分子单链 RNA, 可通过与靶 mRNA 的特异碱基配对引起靶 mRNA 的翻译抑制或降解, 调控基因转录后表达^[3], 从而参与肿瘤的生长、凋亡、侵袭以及转移等过程^[4]。miR-10b 定位于 HOX 基因簇, 而 HOX 家族作为一类特殊的转录调节因子, 不仅维持正常组织的增殖分化, 而且在肿瘤的发生发展过程中也起到十分重要的作用^[5-6]。有研究表明, miR-10b 在多种常见恶性肿瘤中存在异常表达^[7], Ma 等^[8]研究发现, 在乳腺癌细胞系中, miR-10b 能通过阻遏抑癌蛋白 HOXD10 mRNA 的翻译, 提高细胞转移蛋白 RHOC 的表达水平, 促进乳腺癌细胞的转移与侵袭。而 miR-10b 是否对人乳腺癌细胞的增殖、细胞周期以及凋亡具有显著调控作用, 此方面的研究尚未见报道。

本研究在证实了 miR-10b 对乳腺癌细胞的生长增殖与凋亡具有显著调控作用以后, 利用生物信息学软件预测到 miR-10b 的多个作用靶点并从中进行筛选得到 TP53INP1, 从而对 miR-10b 靶向 TP53INP1 调控乳腺癌发生发展的作用机制展开了初步研究。TP53INP1 最早由 Okamura 等^[9]发现, 通过将 P53 蛋白 46 位丝氨酸 (Ser-46) 磷酸化从而增强 P53 蛋白的稳定性, 引起一系列 p53 靶基因如 p21、PIG3 等基因的转录水平上调, 参与调控细胞生长以及细胞凋亡的发生, 是 P53 调控细胞凋亡网络中起到关键作用的分子之一^[10-11]。近年来的一些研究表明, TP53INP1 在多种常见恶性肿瘤如乳腺癌^[12]、胃癌^[13]、胰腺癌^[14]中显著下调甚至缺失, 提示其在肿瘤的发生发展过程中可能扮演着十分重要的角色。

1 材 料

1.1 试 剂

DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基以及胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 青霉素、链霉素 (上海生物工程技术服务有限公司); miR-10b 模拟物 (miR-10b mimics) 和模拟物的参照物 (MNC)、miR-10b 抑制剂 (miR-10b inhibitor) 和抑制剂的参照物 (INC)、EzOmics™ SYBR qPCR Kit (南通百奥迈科

生物技术有限公司); 转染试剂 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司); 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶 (立陶宛 Fermentas 公司); 荧光素酶检测试剂、 β -半乳糖苷酶检测试剂、pMIR-reporter 报告质粒和 β -半乳糖苷酶表达质粒 (Promega 北京生物技术有限公司); caspase-3 抗体 (美国 Epitomics 公司); p21 单克隆抗体 (沈阳万类生物科技有限公司); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗 (北京中杉金桥公司)。

1.2 仪 器

PCR 仪、酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 实时荧光 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); CO₂ 培养箱 (上海 Thermo Fisher 公司); 电泳仪、水平电泳槽 (南京大学仪器厂)。

1.3 细 胞

人乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231, 人胚胎肾上皮细胞 HEK-293T 均由中国药科大学江苏省肿瘤发生与干预重点实验室保存。

2 方 法

2.1 细胞培养

MCF-7 细胞使用 RPMI 1640 培养基 (含 100 U/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素) 培养, MDA-MB-231 和 HEK-293T 细胞使用 DMEM 培养基 (含 100 U/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素) 培养, 放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度环境的孵箱培养。

2.2 细胞转染以及转染效率检测

将 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞平均接种至 6 孔板, 每孔 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞。当细胞生长至融合度到达 50% ~ 80% 时, 用 Lipofectamine 2000 与 DNA 4 μ g 或 RNA 50 nmol 混合孵育, 转染细胞, 具体操作方法参照转染试剂说明书。采用 RT-PCR 法, 提取转染 48 h 以后的细胞的总 RNA, 逆转录合成 cDNA 第一链作为模板, 使用 EzOmics SYBR qPCR Kits 试剂盒来扩增目的基因, 实验结果利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

2.3 MTT 法检测细胞增殖能力

将转染 8 ~ 12 h 后的细胞, 经胰酶消化后, 按每孔 5×10^3 个细胞, 将单细胞悬液 200 μ L 加入 96 孔板, 边缘加入 PBS 防止出现边缘效应。每组设立 5 ~ 10 个复孔, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度

环境下分别培养 12, 24, 48, 72 h。取出 96 孔板, 每孔加入 MTT 20 μ L, 培养 3~4 h 后取出 96 孔板并将各孔中上清液吸出, 向其中加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μ L, 轻轻拍打使底部晶体溶解, 酶标仪检测并绘制生长曲线。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率

各组转染 48 h 后的细胞经 0.25% 胰酶消化后, 离心收集细胞并用 PBS 洗涤 2 次, 按照凋亡检测试剂盒操作步骤处理细胞, 并用流式细胞仪检测细胞凋亡率。70% 预冷乙醇将收集下来的细胞 4 $^{\circ}$ C 固定过夜, 用流式细胞仪检测细胞周期。

2.5 Western blot 检测 miR-10b 对 caspase-3、p21 蛋白表达水平的改变

收集转染 48 h 后的细胞, 利用蛋白裂解液 (RIPA) 冰上裂解 30 min, 蛋白定量后取蛋白样品 50 μ g 进行 12% SDS-PAGE, 湿转法将凝胶中蛋白质转移到 PVDF 膜上, PVDF 膜用 5% 的牛奶室温封闭 2 h 后, 分别加入兔抗人 caspase-3 单抗 (1:1 000 稀释)、兔抗人 p21 单抗 (1:1 000 稀释), 放置于 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 然后用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10~15 min。分别加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:5 000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, ECL 发光液显影。

2.6 荧光素酶报告法验证 miR-10b 与 TP53INP1 的靶向性

根据靶点预测软件 microRNA.org 预测 miR-10b 的结合位点, 设计并合成野生型和突变型 TP53INP1 的 3'UTR 基因片段并引入 pMIR-reporter 中, 合成序列如下 (划线部分为 miR-10b 结合位点): 野生型上下游引物分别为 5'-CTAGTA-ATCTTTTAAGCAAGCAAAAATTTATTCTCAGGCT CAGCTGTACACTTTATTA-3' 和 5'-AGCTTAATA-AAGTGACAGCTGACCCTGAGAATAAAATTTT-GCTTGCTTAAAAGATTA-3'; 突变型上下游引物分别为 5'-CTAGTAATCTTTTAAGCAAGCAAGGGAAA CAAGAGTCCCACAGCTGTACACTTTATTA-3' 和 5'-AGCTTAATAAAGTGACAGCTGTGGGACTCTTGTT TCCCTTGCTTGCTTAAAAGATTA-3'。

引物退火后, 通过限制性内切酶酶切及 T4 DNA 连接酶连接, 把目的片段插入到 pMIR-reporter 荧光素酶报告质粒中。测序验证构建成功后, 将构建好的荧光素酶报告质粒野生型、突变型分别与 miR-10b 模拟物或其阴性对照 (MNC) 及 β -半乳糖苷酶

表达质粒 (β -gal) 共转染 HEK-293T 细胞。待转染 48 h 后收集且裂解细胞, 使用荧光素酶检测系统以及 β -半乳糖苷酶检测系统, 检测荧光素酶和 β -半乳糖苷酶活性, 最后计算各样品的相对荧光素酶活力水平。

2.7 数据统计和处理

结果先采用 One-Way ANOVA 检验各组之间差异, 随后进行 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 代表具有显著性差异, $P < 0.01$ 代表具有统计学极显著差异。

3 结 果

3.1 转染 miR-10b 模拟物或 miR-10b 抑制剂对乳腺癌细胞中 miR-10b 表达量的影响

RT-PCR 结果显示, 在乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 中, 转染了 miR-10b 模拟物组与对照组比较, 前者的 miR-10b 表达量显著上调 (图 1); 转染 miR-10b 抑制剂组与对照组组比较, 前者的 miR-10b 表达量显著下调 (图 2)。因此, miR-10b 模拟物和 miR-10b 抑制剂能分别显著上调和下调乳腺癌细胞中 miR-10b 的表达水平, 是研究 miR-10b 功能的有效工具。

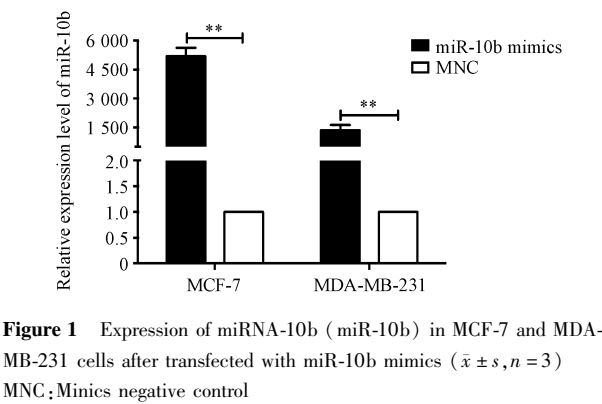


Figure 1 Expression of miRNA-10b (miR-10b) in MCF-7 and MDA-MB-231 cells after transfection with miR-10b mimics ($\bar{x} \pm s, n = 3$) MNC: Mimics negative control

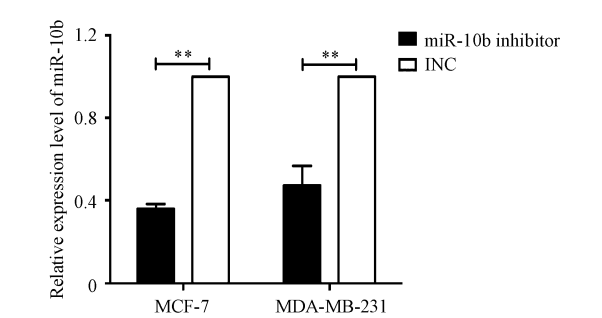


Figure 2 Expression of miR-10b in MCF-7 and MDA-MB-231 cells after transfection with miR-10b inhibitor ($\bar{x} \pm s, n = 3$) INC: Inhibitor negative control

3.2 上调 miR-10b 对乳腺癌细胞增殖能力的影响

MTT 法检测转染 miR-10b 模拟物对于乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 增殖能力的影响,流式细胞术检测细胞周期与凋亡率的改变。MTT 结果显示,在 MCF-7 和 MDA-MB-231 中,通过转染 miR-10b 模拟物上调 miR-10b 的表达,能显著促进细胞增殖(图 3、图 4),促进细胞周期进行(图 5、图 6),凋亡结果显示上调 miR-10b 的表达可抑制细胞凋亡发生(图 7)。Western bolt 检测细胞周期与凋亡通路中的关键蛋白 caspase-3 和 p21,并使用 Quantity One 软件进行图像分析,发现随着 miR-10b 表达量上升,caspase-3 的激活型以及 p21 蛋白表达量都显著下调(图 8),这些结果一致证明 miR-10b 具有促进乳腺癌细胞生长增殖,抑制乳腺癌细胞凋亡的作用。

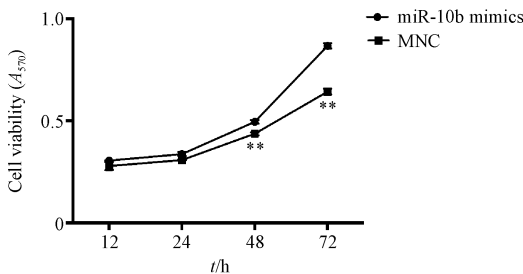


Figure 3 Cell proliferation of MCF-7 cells after transfection with miR-10b mimics at differential times ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

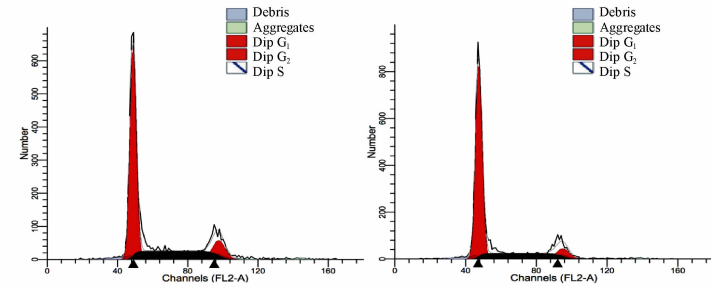


Figure 5 Flow cytometry (FCM) analysis of cell cycle of MCF-7 after transfection with miR-10b mimics, and average of G_1 , S, and G_2/M phase populations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

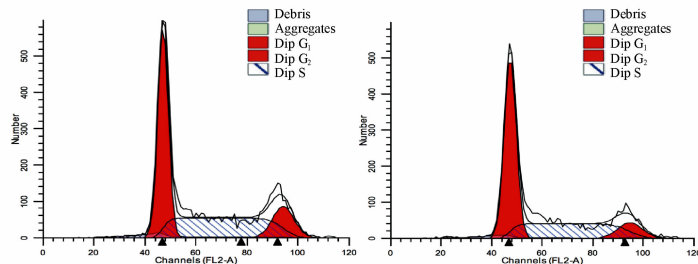


Figure 6 FCM analysis of cell cycle of MDA-MB-231 after transfection with miR-10b mimics, and average of G_1 , S, and G_2/M phase populations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 下调 miR-10b 对乳腺癌细胞增殖能力的影响

同样应用 MTT 法检测 miR-10b 表达水平下调对该两株乳腺癌细胞增殖能力的影响,流式细胞术检测细胞周期与凋亡率的变化。MTT 和细胞周期结果显示,在 MCF-7 和 MDA-MB-231 中,通过转染 miR-10 抑制剂下调 miR-10b 的表达,能显著抑制细胞生长增殖(图 9),造成乳腺癌细胞 S 期阻滞(图 10、图 11)。凋亡结果显示下调 miR-10b 的表达可促进细胞凋亡发生(图 12)。Western bolt 检测细胞周期与凋亡通路中的关键蛋白 caspase-3 和 p21,发现随着 miR-10b 表达量下调,caspase-3 的激活型以及 p21 蛋白表达量都显著上调(图 13),这些结果证明下调 miR-10b 能抑制乳腺癌细胞生长增殖,促进细胞凋亡。

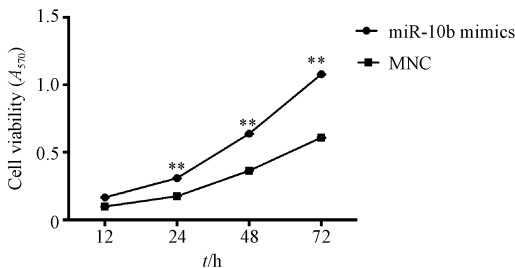
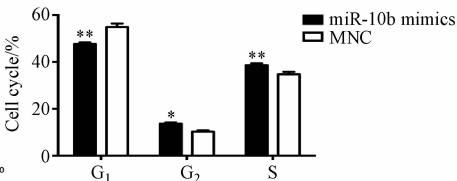
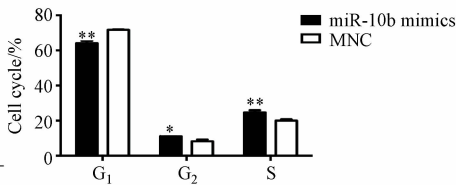


Figure 4 Cell proliferation of MDA-MB-231 cells after transfection with miR-10b mimics at differential times ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



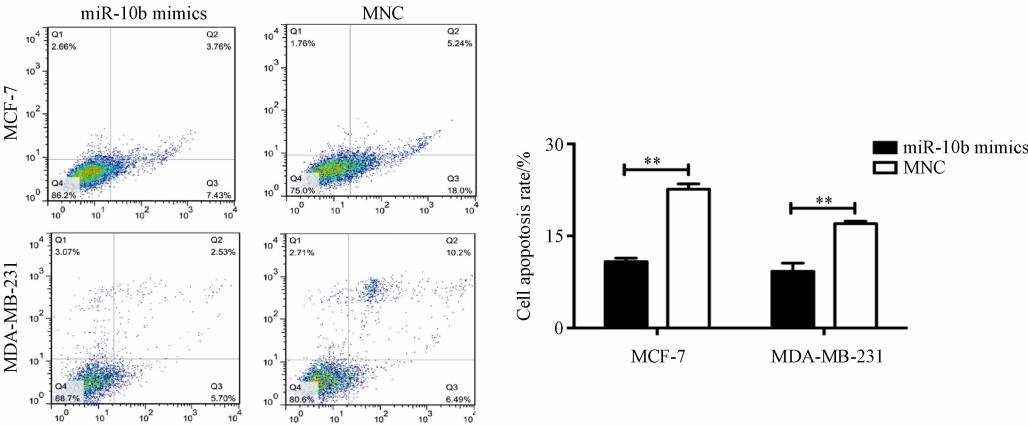


Figure 7 Cell apoptosis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells after transfection with miR-10b mimics ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

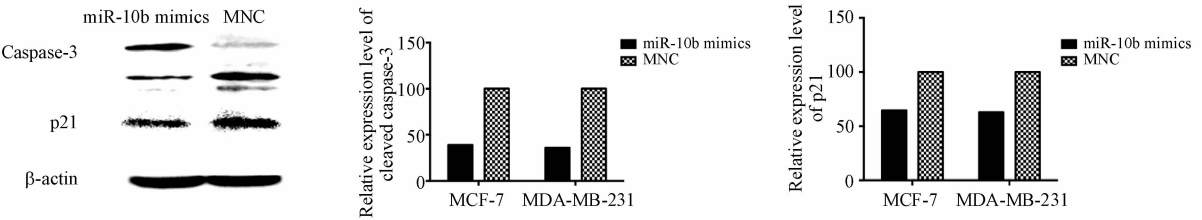


Figure 8 Protein expression levels of caspase-3 and p21 after transfection with miR-10b mimics ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

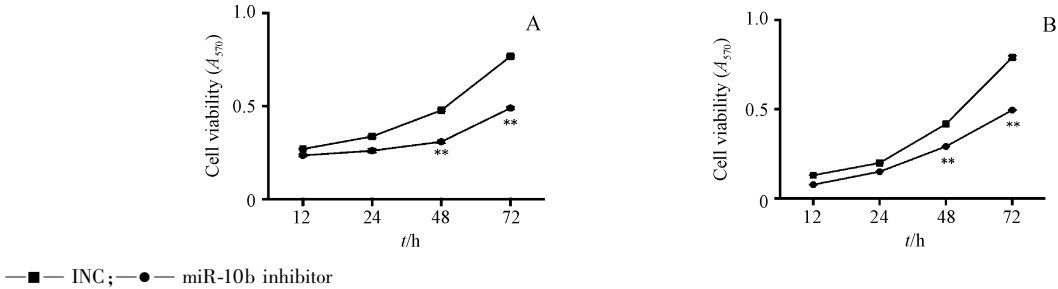


Figure 9 Cell proliferation of MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) cells after transfection with miR-10b inhibitor at differential times ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

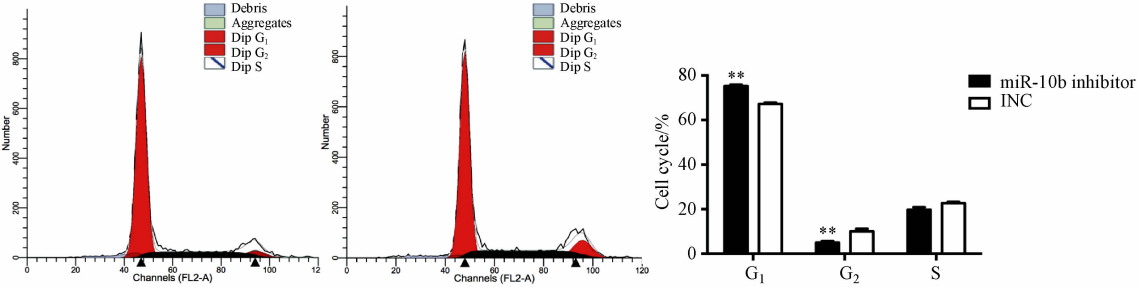


Figure 10 FCM analysis of cell cycle of MCF-7 after transfection with miR-10b inhibitor, and average of G₁, S, and G₂/M phase populations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

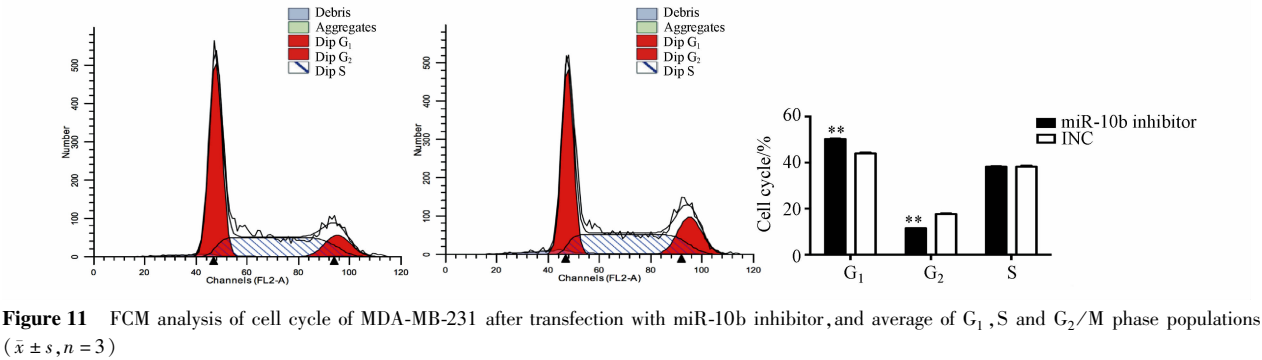


Figure 11 FCM analysis of cell cycle of MDA-MB-231 after transfection with miR-10b inhibitor, and average of G₁, S and G₂/M phase populations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

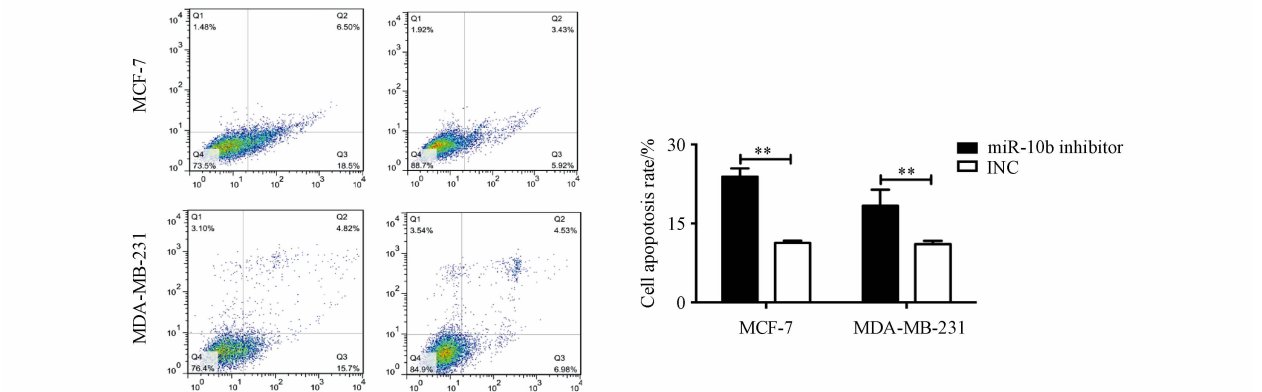


Figure 12 Cell apoptosis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells after transfection with miR-10b inhibitor ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

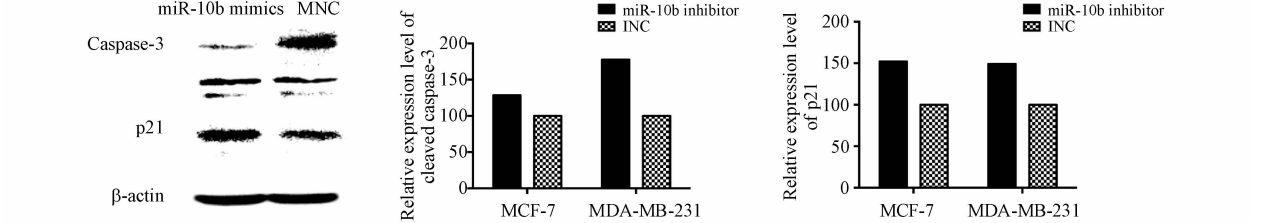


Figure 13 Protein expression levels of caspase-3 and p21 after transfection with miR-10b inhibitor ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.4 miR-10b 与 TP53INP1 的靶向性验证

为了进一步研究 miR-10b 对乳腺癌细胞增殖和凋亡的作用机制,通过 microRNA. org, targetsan 等一系列靶点预测工具,筛选得到 TP53INP1 这个与 p53 联系密切的基因,并根据结合位点设计荧光素酶报告质粒的插入序列。荧光素酶报告法结果显示,与 NC 组相比,miR-10b 可显著抑制 TP53INP1 野生型 3'UTR 的荧光素酶活性,但是对种子序列突变型 3'UTR 的荧光素酶活性没有明显抑制作用(图 14)。在乳腺癌细胞 MCF-7 以及 MDA-MB-231 中上调和下调 miR-10b 的表达量对 TP53INP1 的 mRNA 水平起到相反的调控作用(图 15、图 16)。这些结果首次提出并证明了 miR-10b 能够靶向作用于 TP53INP1,在转录水平抑制靶基因的表达,从而促进乳腺癌的发生发展。

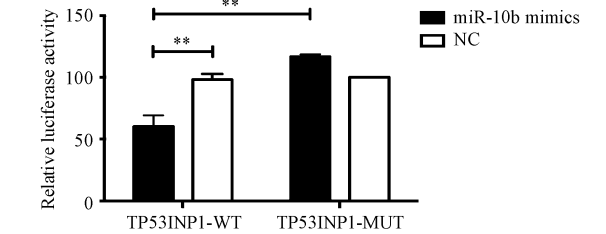


Figure 14 miR-10b directly targeting 3'UTR of TP53INP1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

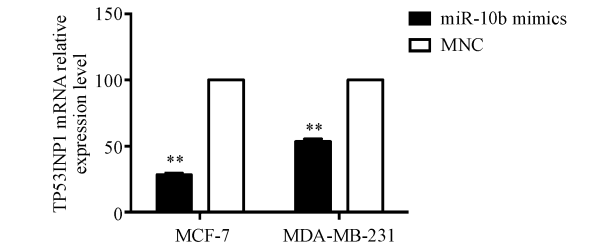


Figure 15 TP53INP1 mRNA expression was reduced after transfection with miR-10b mimics ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

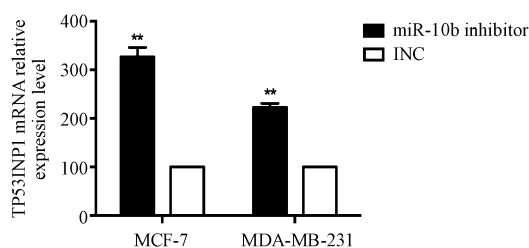


Figure 16 TP53INP1 mRNA expression was promoted after transfection with miR-10b inhibitor ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

MicroRNA 是一类近年来发现的短序列、非编码、具调控功能的单链小分子 RNA, 在恶性肿瘤的发生发展过程中发挥着癌基因或抑癌基因的作用^[15–16]。研究发现 miR-10b 表达上调可促进乳腺癌的侵袭和转移, 异位表达的 miR-10b 可将体内无侵袭性的乳腺癌细胞获得其侵袭能力^[17]。本研究将 miR-10b 模拟物和 miR-10b 抑制剂分别转染 MCF-7、MDA-MB-231 细胞, 首次验证了 miR-10b 能够增加乳腺癌细胞的增殖活性, 促进细胞周期进行并且抑制细胞凋亡, 并对细胞周期与凋亡通路中的关键蛋白 caspase-3^[18]、p21 具有显著的下调作用, 这些研究结果表明 miR-10b 在乳腺癌的发生发展中扮演了类似癌基因的调控角色, 对乳腺癌的诊断与治疗有着重要的研究价值。

为了进一步探索 miR-10b 调控乳腺癌细胞生物学行为的作用机制, 利用生物信息学预测软件筛选得到 TP53INP1 这个细胞周期监测点 p53 的靶基因^[19]。近年来研究发现, TP53INP1 能够受到多种 miRNA 的调控^[20–21], 参与肿瘤的增殖、迁移^[22]、凋亡、分化^[23]等过程, 同时也与肿瘤化学耐药性相关^[24]。本研究首次证明了 miR-10b 靶向作用于 TP53INP1, 在转录水平抑制其表达。而由于 miRNA 的调节是一个十分复杂而庞大的网络, miR-10b 可以调节多个靶基因, TP53INP1 作为一个靶基因, 也可能同时受到多个 miRNA 的调控, miR-10b 在乳腺癌发生发展的过程中更多的功能和作用机制尚需进一步研究阐明。2011 年 Pandolfi 提出了竞争性内源 RNA 假说 (competing endogenous RNA, ceRNA 假说), 解释了各靶点之间如何通过 microRNA 反应元件 (MRE) 进行“对话”, 并且通过一系列实验验证了这个假

说^[25–27]。相信随着研究的深入, microRNA 与疾病的发生发展关系将进一步得到明确, 其参与形成的调控作用网络在疾病的诊断和治疗中也将提供新的研究思路。

参考文献

- [1] Downs-Holmes C, Silverman P. Breast cancer: overview & updates [J]. *Nurse Pract*, 2011, **36**(12): 20–26.
- [2] Singer A, Tresley J, Velazquez-Vega J, et al. Unusual aggressive breast cancer: metastatic malignant phyllodes tumor [J]. *J Radiol Case Rep*, 2013, **7**(3): 24–37.
- [3] Liu J, Zheng M, Tang YL, et al. MicroRNAs, an active and versatile group in cancers [J]. *Int J Oral Sci*, 2011, **3**(4): 165–175.
- [4] Andorfer CA, Necela BM, Thompson EA, et al. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2011, **17**(6): 313–319.
- [5] Ladeiro Y, Couchy G. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene tumor suppressor gene mutations [J]. *Hepatology*, 2008, **47**(15): 1955–1963.
- [6] Takashi S, Masamitsu N, Takeshi K, et al. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors uPAR and RhoC [J]. *Int J Cancer*, 2009, **125**(12): 1407–1413.
- [7] Garzon R, Garofalo M. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(10): 3945–3950.
- [8] 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.
- [9] Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, et al. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2001, **8**(1): 85–94.
- [10] Tomasini R, Samir AA, Carrier A, et al. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(39): 37722–37729.
- [11] Le MT, Shyh-Chang N, Khaw SL, et al. Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-125b occurs through evolving miRNA-target gene pairs [J]. *PLoS Genet*, 2011, **7**(9): 1–11.
- [12] Ito Y, Motoo Y, Yoshida H, et al. Decreased expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) in breast carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2006, **26**(6B): 4391–4395.
- [13] Jiang PH, Motoo Y, Garcia S, et al. Down-expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 in human gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, **12**(5): 691–696.
- [14] Gironella M, Seux M, Xie MJ, et al. Tumor protein p53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development [J]. *Proc Natl*

Acad Sci U S A, 2007, **104**(41):16170–16175.

- [15] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, **123**(2):215–233.
- [16] Zhang B, Pan X, Cobb GP. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. *Dev Biol*, 2007, **302**(28):1–12.
- [17] Negrini M, Calin GA. Breast cancer metastasis: a microRNA story [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, **10**(2):303–307.
- [18] Yananadala V, Negoro H, Denker BM. Heterotrimeric G proteins and apoptosis: intersecting signaling pathways leading to context dependent phenotypes [J]. *Curr Mol Med*, 2009, **9**(5):527–545.
- [19] Seillier M, Peugeot S, Gayet O, et al. TP53INP1, a tumor suppressor, interacts with LC3 and ATG8-family proteins through the LG3-interacting region (LIR) and promotes autophagy-dependent cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2012, **19**(9):1525–1535.
- [20] Yeung ML, Yasunaga J, Bennasser Y, et al. Roles for micro RNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53 induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1 [J]. *Cancer Res*, 2008, **68**(21):8976–8985.
- [21] Ma S, Tang KH, Chan YP, et al. miR-130b promotes CD133(+) liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1 [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(6):694–707.
- [22] Jiang F, Liu T, He Y, et al. MiR-125b promotes proliferation and migration of type II endometrial carcinoma cells through targeting TP53INP1 tumor suppressor *in vitro* and *in vivo* [J]. *BMC Cancer*, 2011, **5**(11):425–437.
- [23] Shibuya H, Linuma H, Shimada R, et al. Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer [J]. *Oncology*, 2010, **79**(3/4):313–320.
- [24] Yamamoto Y, Yoshioka Y, Minoura K, et al. An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2011, **10**(1):135–151.
- [25] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language [J]? *Cell*, 2011, **146**(3):353–358.
- [26] Tay Y, Kats L, Salmena L, et al. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs [J]. *Cell*, 2011, **147**(2):344–357.
- [27] Sumazin P, Yang X, Chiu HS, et al. An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma [J]. *Cell*, 2011, **147**(2):370–381.

· 校园信息 ·

中国药科大学与企业合作开发的抗血栓一类新药获得临床批件

近日,由中国药科大学与江苏威凯尔医药科技有限公司联合申报的化药1.1类抗血栓新药“维卡格雷片”(Vicagrel Tablets)一次性获得了国家食品药品监督管理总局颁发的I至III期药物临床试验批件(批件号:2015L00539等)。

维卡格雷是由中国药科大学药物科学研究所“长江学者”特聘教授孙宏斌课题组开发研制、并与江苏威凯尔医药科技有限公司通过产学研合作共同开发的抗血小板聚集新药。临床前研究表明,维卡格雷与临床上广泛使用的抗血栓药氯吡格雷的活性代谢物及作用机制相同,但有所不同的是,维卡格雷的关键代谢激活步骤是在肠道中进行,因而可避开氯吡格雷的肝脏CYP2C19代谢激活途径,进而可防止CYP2C19弱代谢患者的药物抵抗及其诱发的支架内血栓形成等血栓性心血管事件。维卡格雷除了可适用于CYP2C19弱代谢患者外,也可适用于CYP2C19正常代谢患者,且具有起效快、剂量低和副作用小的特点。部分前期研究结果发表在Journal of Medicinal Chemistry (2012),并获Nature旗下刊物SciBX的重点报道。

该项目获得了“十二五”国家“重大新药创制”科技重大专项等基金的资助。参与临床前研究的单位还包括中国科学院上海药物研究所、国家上海新药安全评价研究中心和山东大学药学院等。这是中国药科大学与企业进行产学研合作及多个单位协同创新开发新药的又一范例。

据悉,项目团队计划在今年6月份正式启动维卡格雷的I期临床试验。

(本刊编辑部)