

miR-31-3p对横纹肌肉瘤细胞增殖和迁移的抑制作用和机制

陈晓燕* 王教 赵云萍 钟佳云

(温州医科大学附属眼视光医院眼视光学和视觉科学国家重点实验室, 温州 325027)

摘要 该文研究了microRNA-31-3p(miR-31-3p)在横纹肌肉瘤细胞中的表达水平及其对细胞增殖和迁移的影响。通过定量RT-PCR法检测miR-31-3p的表达水平。采用脂质体介导法将miR-31-3p成熟体转染入横纹肌肉瘤细胞,通过MTS法、克隆形成实验、流式细胞技术和细胞功能分析仪分别检测细胞增殖能力、生长能力、周期和迁移能力。萤光素酶法和Western blot验证miR-31-3p的靶基因。通过siRNA抑制STAT3检测其对横纹肌肉瘤细胞增殖和迁移的影响。结果显示,横纹肌肉瘤细胞中miR-31-3p的表达水平较正常横纹肌组织显著下调。上调横纹肌肉瘤细胞中的miR-31-3p能显著抑制细胞的增殖、克隆形成和迁移能力,并诱导细胞周期发生G₁期阻滞。萤光素酶和Western blot结果显示,STAT3为miR-31-3p的靶基因。下调STAT3的表达水平能够显著抑制RD细胞的增殖和迁移能力。总之,miR-31-3p可能通过下调STAT3来抑制横纹肌肉瘤细胞增殖和迁移。

关键词 横纹肌肉瘤; microRNA-31-3p; STAT3; 增殖; 迁移

The Inhibition and Mechanism of microRNA-31-3p in the Proliferation And Migration of Rhabdomyosarcoma Cells

CHEN Xiaoyan*, WANG Jiao, ZHAO Yunping, ZHONG Jiayun

(State Key Laboratory of Ophthalmology, Optometry and Vision Science, Wenzhou Medical University Affiliated Hospital of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou 325027, China)

Abstract This paper investigated the level of microRNA-31-3p (miR-31-3p) and the influence of proliferation and migration caused by miR-31-3p in rhabdomyosarcoma cells. Quantitative RT-PCR was performed to determine the level of miR-31-3p in rhabdomyosarcoma cells and striated muscle specimens. miR-31-3p was transfected into rhabdomyosarcoma cells with lipofectamine. The transfected cells were detected the proliferation, growth, migration and cell cycle by MTS assay, clone formation experiments, xCELLigence analysis and flow cytometry, respectively. The target was confirmed by luciferase activity assay and Western blot. Down regulation of STAT3 with siRNA is used to investigate the proliferation and migration influence of STAT3 in rhabdomyosarcoma cells. The results showed that the level of miR-31-3p in rhabdomyosarcoma cells was significantly down regulated compared with striated muscle specimens. Up regulated the level of miR-31-3p inhibited cell proliferation, clone formation and migration, and induced G₁ arrest in rhabdomyosarcoma cells. The luciferase activity assay indi-

收稿日期: 2019-05-20

接受日期: 2019-09-03

温州医科大学附属眼视光医院创新引导课题(批准号: YNCX201102)和国家自然科学基金(批准号: 81301776)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88067930, E-mail: xiaoyan_chen@aliyun.com

Received: May 20, 2019

Accepted: September 3, 2019

This work was supported by the Innovation and Guided Project of Wenzhou Medical University affiliated Hospital of Ophthalmology and Optometry (Grant No. YNCX201102) and the National Natural Science Youth Foundation (Grant No. 81301776)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88067930, E-mail: xiaoyan_chen@aliyun.com

网络出版时间: 2019-12-11 11:31:04

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1130.036.html>

cated that *STAT3* was a target of miR-31-3p, and the Western blot showed that miR-31-3p could inhibit the level of *STAT3* protein. Down regulated *STAT3* inhibited the proliferation and migration of rhabdomyosarcoma cells RD. In conclusion, miR-31-3p inhibited the proliferation and migration in rhabdomyosarcoma cells probably through target *STAT3*.

Keywords rhabdomyosarcoma; microRNA-31-3p; *STAT3*; proliferation; migration

横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RMS)是一种最常见的儿童软组织恶性肿瘤,占儿童和青少年恶性肿瘤5%~8%^[1]。RMS有两个高发年龄阶段,分别为2~6岁和10~18岁。2~6岁患者主要发病于头颈部,10~18岁主要发病于躯干和四肢部位^[2]。横纹肌肉瘤具有恶性程度高、易转移和预后差的特点,目前的主要治疗手段仍然是手术治疗结合化疗方式。近年来,随着遗传和表观遗传方面研究取得重大进展,人们也在考虑采用新型的药物治疗方式来减少患者的治疗副作用、复发率和提高存活率^[3-5]。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性的、含有18~25个碱基的非编码单链小RNA,它通过碱基互补配对的方式结合于靶基因mRNA的3'非编码区域(3' untranslated region, 3'UTR)进而抑制靶基因mRNA的翻译,下调靶基因的表达水平^[6-7]。miRNA在肿瘤发生发展中具有重要的调控作用^[8-9],如miR-34a/137/124a具有抑制葡萄膜黑色素瘤细胞增殖和迁移的作用^[10-12],miR-1在卵巢癌中具有重要的调控功能^[13]。miR-31-3p可作为转移性结直肠癌诊断和转移性结直肠癌的治疗疗效和预后的分子标记物^[14-16]。本文主要针对miR-31-3p在横纹肌肉瘤中的表达水平和生物学功能进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验对象

人横纹肌肉瘤细胞株RD和SJCRH30购于全球生物资源中心(ATCC)。

1.2 实验材料

Trizol试剂、Lipofectamine™ RNAi/MAX Reagent购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(Invitrogen品牌);定量RT-PCR试剂和TaqMan MicroRNA Assay购自美国应用生物系统公司;DMEM(Dulbecco Modified Eagle's Medium)培养基、RPMI-1640(Rosewell Park Memorial Institute)培养基和胎牛血清(FBS)、0.05% Trypsin-EDTA均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(Gibco品牌);miR-31-3p成熟体和随机序列

RNA(阴性对照)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(Ambion品牌);MTS细胞增殖分析试剂购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;细胞周期检测试剂盒购自碧迪医疗器械(上海)有限公司;xCELLigence细胞迁移检测板购自安捷伦生物(杭州)有限公司;*STAT3*的重组质粒委托和元生物技术(上海)股份有限公司进行构建;Dual-Luciferase reporter assay购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;*STAT3*α抗体购自赛信通(上海)生物试剂有限公司;Western blot二抗购自基因有限公司;*STAT3*的siRNA(si-*STAT3*)由上海吉玛制药有限公司定制。

1.3 总RNA提取和定量RT-PCR

按照Trizol试剂说明书的操作步骤,提取正常横纹肌组织和横纹肌肉瘤细胞RD、SJCRH30中的总RNA。采用ABI公司的TaqMan MicroRNA Assay探针进行定量RT-PCR来检测miR-31-3p成熟体的表达水平,*U6*为内参。取20 ng总RNA,根据TaqMan逆转录试剂盒的标准操作流程进行逆转录。根据TaqMan Universal PCR Master Mix的说明书配置定量PCR反应体系,每个反应体系中加入1 μL的逆转录产物,按照标准定量PCR反应程序在ABI的ViiA 7实时荧光定量PCR系统进行检测。结果采用 $\Delta\Delta Ct$ 法计算miR-31-3p的相对表达水平。

1.4 细胞培养和转染

人横纹肌肉瘤细胞RD的培养基为含5% FBS的DMEM, SJCRH30的培养基为含10% FBS的RPMI-1640。细胞置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。将对数生长期的细胞接种于多孔板中,采用Lipofectamine™ RNAi/MAX将miRNA成熟体或阴性对照序列(negative control, NC)转染至细胞中,每个孔转染50 nmol/L的miR-31-3p成熟体或NC。siRNA按照上述同样方法进行转染。

1.5 细胞增殖实验

将对数生长期的细胞接种于96孔板中,每孔接种3 000个细胞。细胞培养24 h后转染miR-31-3p成熟体或NC,转染72 h后每孔加入F12和MTS混合液,

置于37 °C、5% CO₂的培养箱中温育1 h。用酶标仪在490 nm波长下检测光密度值(D_{490})。

1.6 细胞克隆形成实验

将对数生长期的细胞接种于6孔板中,培养24 h后转染miR-31-3p成熟体或NC。转染24 h后用0.05% Trysin-EDTA消化收集细胞并进行计数,以每孔2 000个细胞接种于6孔板,置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养直至出现肉眼可见的克隆。经4%多聚甲醛固定和结晶紫染色后,拍照记录结果。

1.7 流式细胞技术检测细胞周期

将对数生长期的细胞接种于6孔板中,每孔接种 2×10^5 个细胞。细胞培养24 h后转染miR-31-3p成熟体或NC,继续培养48 h后消化和收集细胞。细胞经70%乙醇固定、碘化乙啶(propidium iodide, PI)染色和400目滤膜过滤后,进行流式细胞技术检测,每个样本获取30 000个细胞,通过Modifit软件计算细胞周期各时相的百分率。

1.8 细胞迁移能力实验

将对数生长期的细胞接种于24孔板中,培养24 h后转染miR-31-3p成熟体或NC。转染后细胞继续培养24 h转接至CIM板上层,每孔接种30 000个细胞。利用xCELLigence细胞功能分析仪进行细胞迁移能力监测,选取转接后48 h的细胞指数进行分析。

1.9 荧光素酶检测

首先将包含结合位点的STAT3的3'非编码区(3'UTR)序列插入到荧光素酶载体中构建为野生型荧光素酶重组载体(WT),同时将结合位点经点突变的序列也插入到荧光素酶载体中构建为突变型荧光

素酶重组载体(MUT)。将对数生长期的细胞接种于24孔板中,培养24 h后共转染荧光素酶重组载体(WT或MUT)、参照质粒pRL-SV40和miR-31-3p或者NC。转染48 h后,弃去培养液,每孔加入50 μ L PLB裂解细胞,吸取10 μ L上清液用于荧光素酶活性检测。上清液中加入LAR II后立即检测荧光素酶的荧光值,每孔再加入100 μ L Stop&Glo试剂,检测参照荧光值数据。

1.10 Western blot

将对数生长期的细胞接种于24孔板中,培养24 h后转染miR-31-3p成熟体或NC,继续培养48 h收集细胞并裂解于RIPA蛋白质裂解液中。细胞总蛋白经加热变性和SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移至硝酸纤维素膜(NC膜)。结合了样品蛋白质的NC膜经5%脱脂奶粉封闭液室温封闭3 h后,分别结合一抗STAT3 α 和带有荧光基团标记的二抗。抗体结合完毕后经PBST清洗后,在Odyssey Licor双色红外激光成像仪上进行曝光成像。蛋白质条带经Image Pro Plus软件进行灰度值和条带面积分析。

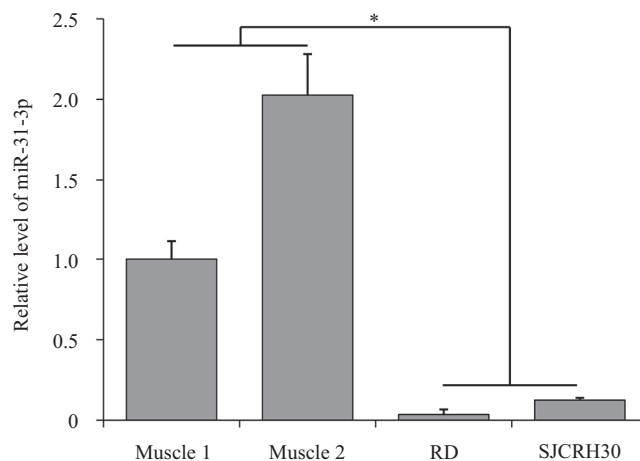
1.11 统计学方法

统计学分析采用SPSS 19.0软件,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 横纹肌肉瘤细胞中miR-31-3p的表达水平

采用定量RT-PCR法检测两株横纹肌肉瘤细胞(RD和SJCRH30)和两例正常横纹肌组织中的miR-31-3p成熟体的水平。结果(图1)显示,两例正常对照、



* $P < 0.05$.

图1 miR-31-3p在正常横纹肌组织和横纹肌肉瘤细胞中的表达水平

Fig.1 The expression level of miR-31-3p in striated muscle and rhabdomyosarcoma cells

RD和SJCRH30细胞中的miR-31-3p的相对表达水平分别为1.00、2.03、0.03和0.13。两株横纹肌肉瘤细胞中miR-31-3p的水平相对于正常横纹肌组织均有大幅度下调。以两株肿瘤细胞为一组,正常横纹肌组织为一组,对两组进行t检验分析,结果显示,肿瘤细胞组中的miR-31-3p水平相对于正常横纹肌组具有显著差异($P=0.018$)。

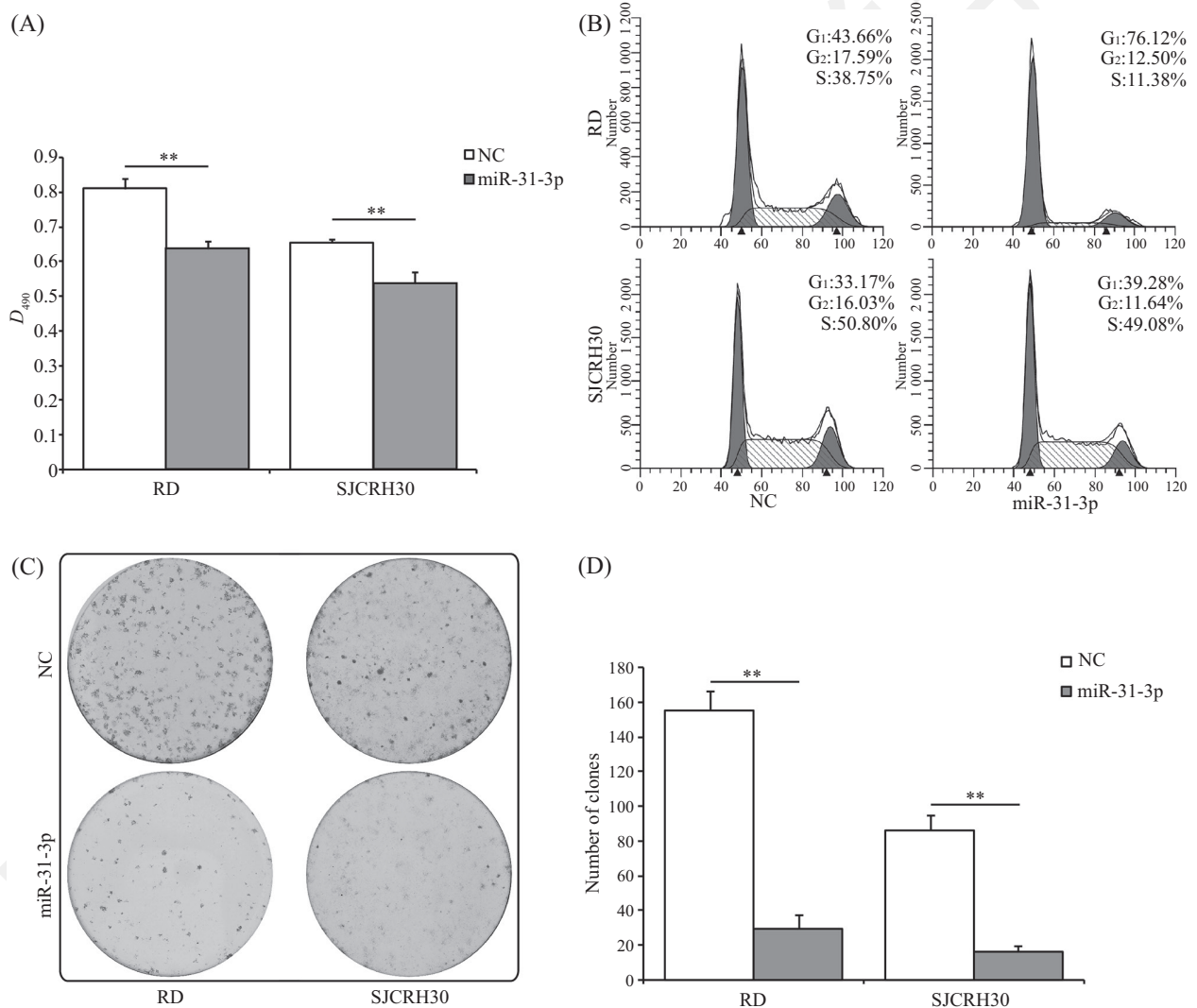
2.2 miR-31-3p抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖

为了研究miR-31-3p在横纹肌肉瘤中的生物学功能,将miR-31-3p的成熟体转染入横纹肌肉瘤细胞RD和SJCRH30中提高其表达水平并进行一系

列的细胞生物学检测。miR-31-3p成熟体转染入横纹肌肉瘤细胞后,采用MTS法检测细胞的增殖能力。结果(图2A)显示,转染了miR-31-3p的RD和SJCRH30的细胞增殖数量分别为阴性对照(转染阴性对照序列)的80.8%和84.4%,均显著低于阴性对照。MTS实验表明,miR-31-3p能够抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖。

2.3 miR-31-3p对横纹肌肉瘤细胞周期的影响

将miR-31-3p成熟体转染入横纹肌肉瘤细胞后,通过流式细胞技术检测细胞周期各时相的分布情况。结果(图2B)显示,转染了miR-31-3p的RD细



A: miR-31-3p抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖; B: miR-31-3p影响横纹肌肉瘤细胞周期; C: miR-31-3p抑制横纹肌肉瘤细胞的克隆形成; D: 克隆数量统计; NC: 转染阴性对照序列; miR-31-3p: 转染miR-31-3p成熟体; ** $P<0.01$ 。

A: miR-31-3p inhibited the proliferation of rhabdomyosarcoma cells; B: miR-31-3p influenced the cell cycle of rhabdomyosarcoma cells; C: miR-31-3p inhibited the clone formation of rhabdomyosarcoma cells; D: the number of clones; NC: transfected with negative control; miR-31-3p: transfected with miR-31-3p mimics; ** $P<0.01$.

图2 miR-31-3p抑制横纹肌肉瘤细胞增殖

Fig.2 miR-31-3p inhibited the proliferation of rhabdomyosarcoma cells

胞在G₁期数量百分比大幅度提高(由43.66%提高至76.12%), 转染了miR-31-3p的SJCRH30细胞在G₁期的百分比也有明显提高(由33.17%提高至39.28%)。实验表明, miR-31-3p能够使横纹肌肉瘤细胞发生G₁期阻滞, 从而对细胞周期循环和增殖产生影响。

2.4 miR-31-3p抑制横纹肌肉瘤细胞克隆形成

进一步研究miR-31-3p对横纹肌肉瘤细胞增殖和生长能力的影响, 我们将miR-31-3p转染入横纹肌肉瘤细胞后进行了细胞克隆形成实验。结果(图2C和图2D)显示, 转染了miR-31-3p的RD和SJCRH30的细胞克隆数量显著低于阴性对照, 即miR-31-3p能够明显抑制横纹肌肉瘤细胞的克隆形成能力。MTS和细胞克隆形成实验结果表明, miR-31-3p能够显著抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖和生长能力。

2.5 miR-31-3p抑制横纹肌肉瘤细胞的迁移

为了研究miR-31-3p对横纹肌肉瘤细胞迁移的影响, 我们采用xCELLigence细胞功能分析仪对细胞的迁移能力进行检测, 该仪器通过检测细胞的电导率来计算迁移细胞的数量, 以细胞数量指数(cell index)值表示。结果(图3)显示, 转染了miR-31-3p的横纹肌肉瘤细胞RD和SJCRH30的迁移数量均显著低于阴性对照, 下调幅度均大于50%。细胞迁移实验结果证明, miR-31-3p可以显著抑制横纹肌肉瘤细胞的迁移能力。

2.6 miR-31-3p的靶基因验证

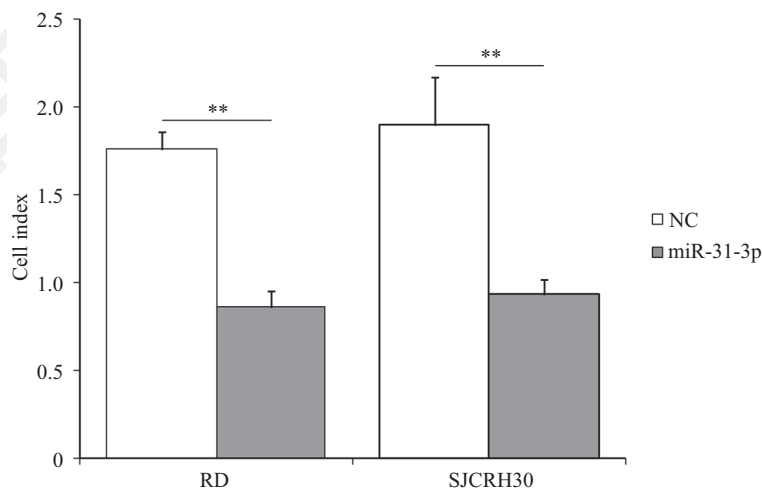
以上结果表明, miR-31-3p能够抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖和迁移, 在横纹肌肉瘤中具有重要的调

控功能。miRNA的作用方式为通过碱基互补配对原则结合于靶基因mRNA的3'UTR区域进而抑制靶基因mRNA的翻译来实行其生物学功能。根据该作用方式, 我们首先通过Target Scan等在线miRNA靶基因预测系统对miR-31-3p的靶基因进行预测。预测结果(图4A)显示, miR-31-3p能够结合于STAT3 mRNA 3'UTR的第652~658位点。进一步通过荧光素酶实验验证靶基因(图4B), 结果表明, miR-31-3p能够与STAT3的3'UTR区域直接结合。因此, STAT3为miR-31-3p的靶基因之一。

为了验证miR-31-3p对靶基因STAT3蛋白质表达水平的抑制作用, 我们进一步进行了Western blot实验。结果(图5)显示, 转染了miR-31-3p的RD和SJCRH30细胞中STAT3的蛋白质水平较阴性对照显著下调。因此, 在横纹肌肉瘤中, STAT3为miR-31-3p的靶基因, 并且miR-31-3p能够显著抑制STAT3蛋白质水平的表达。

2.7 下调STAT3的表达水平可抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖和迁移

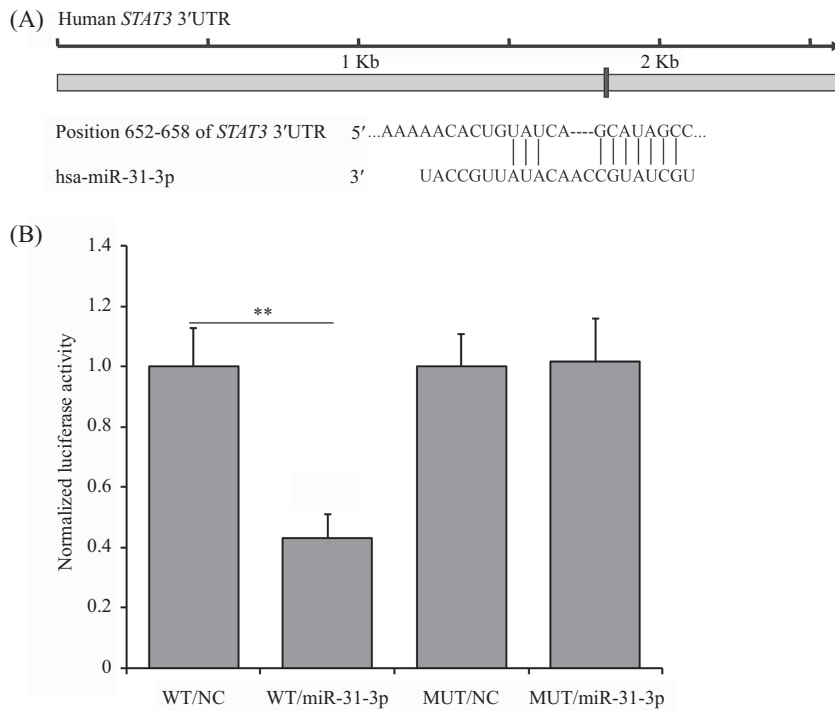
我们通过siRNA抑制横纹肌肉瘤细胞中STAT3的表达水平来检测STAT3对横纹肌肉瘤细胞增殖和迁移的影响。两株横纹肌肉瘤细胞转染si-STAT3后, STAT3的表达水平较阴性对照(NC)分别下调了约60%(RD)和70%(SJCRH30)(图6A)。进一步对转染了si-STAT3的横纹肌肉瘤细胞进行增殖和迁移能力影响的检测, 结果显示, 转染si-STAT3的RD细胞的增殖和迁移能力均被显著抑制, SJCRH30细胞未表现



** $P < 0.01$.

图3 miR-31-3p抑制横纹肌肉瘤细胞的迁移

Fig.3 miR-31-3p inhibited migration of rhabdomyosarcoma cells

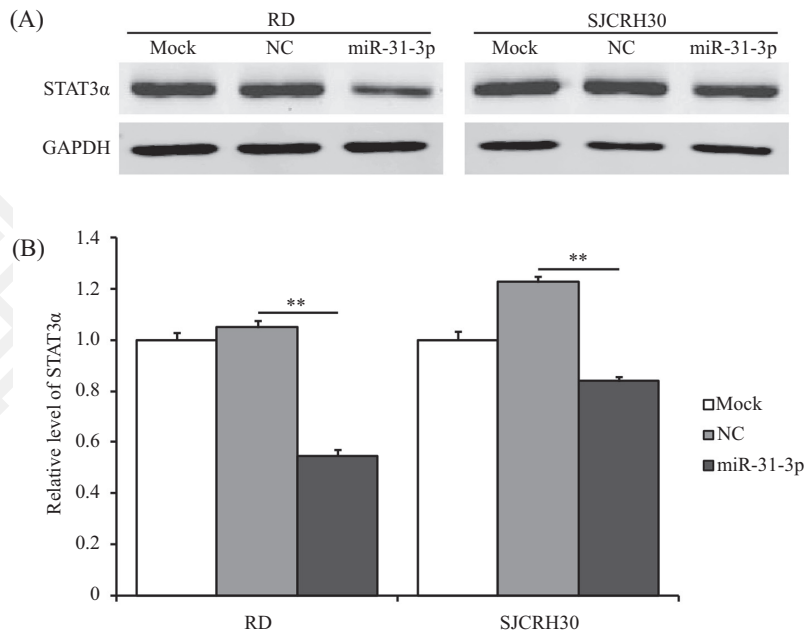


A: miR-31-3p靶基因的预测; B: 萤光素酶检测验证靶基因; WT: 含有正常靶基因结合序列的重组载体; MUT: 含有突变靶基因结合序列的重组载体; NC: 转染阴性对照序列; miR-31-3p: 转染miR-31-3p成熟体; ** $P < 0.01$ 。

A: the target gene prediction of miR-31-3p; B: the confirmation of target gene with luciferase activity assay; WT: the combined vector with wild sequence of target gene; MUT: the combined vector with mutant sequence of target gene; NC: transfected with negative control; miR-31-3p: transfected with miR-31-3p mimics; ** $P < 0.01$.

图4 miR-31-3p的靶基因预测和验证

Fig.4 The target gene prediction and confirmation of miR-31-3p

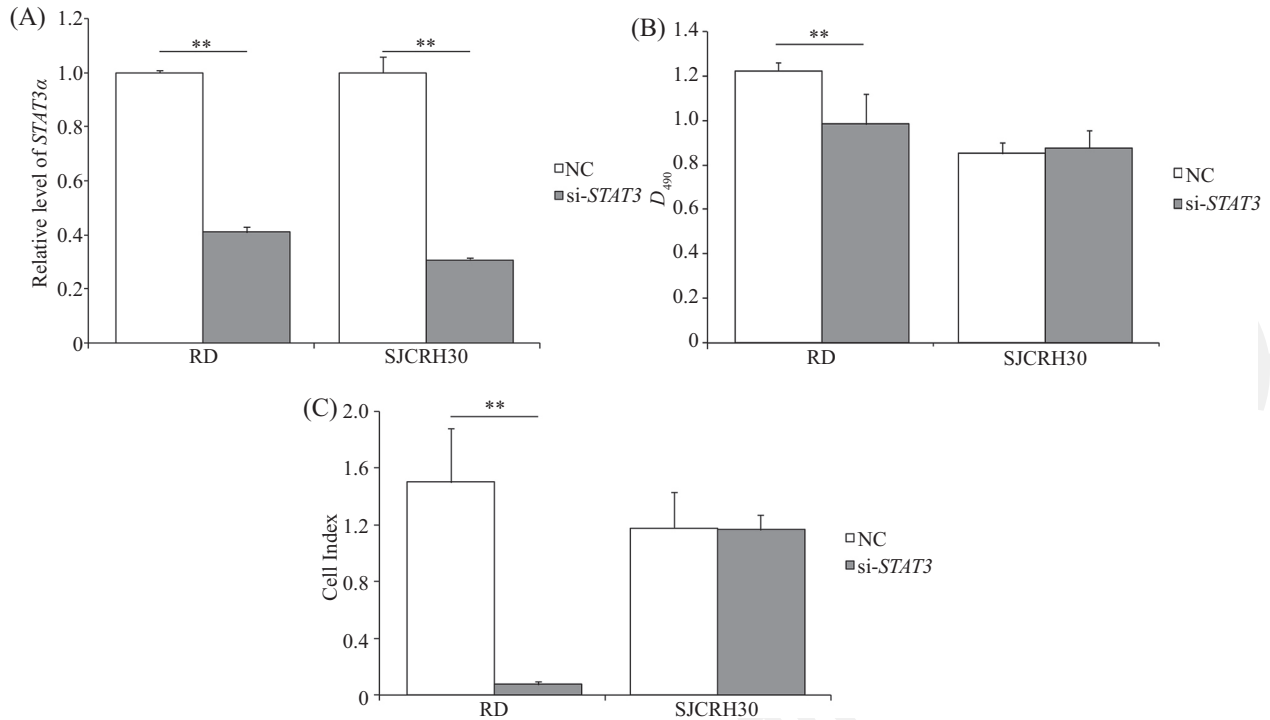


A: miR-31-3p抑制横纹肌肉瘤细胞中STAT3的蛋白质水平; B: STAT3经内参GAPDH校正后的相对灰度值; Mock: 无转染的空白对照; NC: 转染阴性对照序列; miR-31-3p: 转染miR-31-3p成熟体; ** $P < 0.01$ 。

A: miR-31-3p inhibited the level of STAT3 protein in rhabdomyosarcoma cells; B: the relative grey level of STAT3 with corrected by GAPDH; Mock: blank control that was not transfected; NC: transfected with negative control; miR-31-3p: transfected with miR-31-3p mimics; ** $P < 0.01$.

图5 miR-31-3p抑制横纹肌肉瘤细胞中STAT3的蛋白质水平

Fig.5 miR-31-3p inhibited the level of STAT3 protein in rhabdomyosarcoma cells



A: 横纹肌肉瘤细胞中si-STAT3的抑制效率; B: 下调STAT3的表达水平对横纹肌肉瘤细胞增殖的影响; C: 下调STAT3的表达水平对横纹肌肉瘤细胞增殖的影响; NC: 转染阴性对照序列; si-STAT3: 转染STAT3的siRNA; ** $P < 0.01$ 。

A: the suppression efficiency of si-STAT3 in rhabdomyosarcoma cells; B: the proliferation influence of down regulated STAT3 in rhabdomyosarcoma cells; C: the migration influence of down regulated STAT3 in rhabdomyosarcoma cells; NC: transfected with negative control; miR-31-3p: transfected with miR-31-3p mimics; ** $P < 0.01$ 。

图6 下调STAT3的表达水平能够抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖和迁移

Fig.6 The down regulated STAT3 inhibited the proliferation and migration of rhabdomyosarcoma cells

出显著差异(图6B和图6C)。

3 讨论

横纹肌肉瘤的恶性程度高、易转移,一旦发生转移将大大降低患者的存活率。研究横纹肌肉瘤的发生发展分子机制、早期诊断分子标记对于临床诊断和治疗手段改进具有重要意义。miRNA作为一种参与肿瘤发生发展过程的重要分子研究人员对其进行了深入的研究,miRNA不仅可作为早期诊断的分子标记,而且可以作为药物对疾病进行治疗^[7]。本文首先检测了miR-31-3p在横纹肌肉瘤细胞和正常横纹肌中的表达水平,结果显示,miR-31-3p在横纹肌肉瘤细胞中表达显著下调,提示miR-31-3p可能在横纹肌肉瘤中发挥重要作用。关于miR-31-3p的多个研究表明,miR-31-3p的表达水平与结肠癌的预后效果具有显著相关性,miR-31-3p水平越低结肠癌的预后效果越差,可作为结肠癌的治疗方式选择和预后评价的分子标记^[14-16]。miR-31-3p在其他癌症中的研究目前尚未见报道。

为了研究miR-31-3p在横纹肌肉瘤中的生物学功能。我们将人工合成的miR-31-3p成熟体转染入横纹肌肉瘤细胞RD和SJCRH30中,研究其在横纹肌肉瘤中的生物学功能。过表达的miR-31-3p能够抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖、克隆形成能力并使细胞周期发生G₁期阻滞,并且能够抑制横纹肌肉瘤细胞的迁移能力。我们推测,miR-31-3p可能通过抑制肿瘤细胞的增殖和迁移来调控横纹肌肉瘤的发展进程。

为了研究miR-31-3p在横纹肌肉瘤中作用的分子途径,我们对其靶基因进行生物信息学预测和实验验证。结果表明,miR-31-3p能够与STAT3的mRNA 3'UTR直接结合并抑制其蛋白质翻译。Kusaba等^[17]和Ji等^[18]研究者指出,STAT3蛋白质的活性水平与结肠癌的侵袭和预后具有显著相关性,其活性越高预后越差,可作为结肠癌预后效果的一个标记物。STAT3作为miR-31-3p的靶基因,两者的表达水平呈现反向相关性,即miR-31-3p水平越低,STAT3表达水平越高。因此,miR-31-3p表达水平的

显著降低可能作为横纹肌肉瘤预后效果的参考因子。

我们进一步研究了横纹肌肉瘤细胞中STAT3的表达水平被抑制后对细胞增殖和迁移能力的影响,发现下调STAT3的表达水平后, RD的细胞增殖和迁移能力被显著抑制。STAT3是STAT蛋白家族成员,被磷酸化后成为转录激活因子。在口腔鳞状细胞癌中, STAT3的表达水平下调能够抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭, STAT3的抑制剂可能作为治疗口腔鳞状细胞癌的候选药物^[19]。Zhao等^[20]的研究表明, STAT3能够下调miR-202的表达水平,进而上调非小细胞肺癌细胞的迁移和侵袭能力。STAT3通过EZH2降低了胃癌病人的存活率和预后效果,并且下调STAT3的表达水平能够促进胃癌细胞凋亡^[21]。Wnt信号通路能够激活STAT3,从而使卵巢癌细胞对药物产生抗性^[22]。剪接因子hnRNPA2B1通过STAT3和ERK1/2信号通路来促进乳腺癌的发生和发展^[23]。因此, STAT3与多种肿瘤发生发展相关,能够促进肿瘤细胞增殖和抑制肿瘤细胞凋亡。本文的结果也表明,下调STAT3的表达水平能够抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖。综合上述结果,我们认为, miR-31-3p通过STAT3来抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖和迁移可能是其作用途径之一。

下调STAT3的表达水平后, SJCRH30细胞的增殖和迁移能力未表现显著差异,说明SJCRH30细胞中miR-31-3p也可能通过其他靶基因或其他下游途径对横纹肌肉瘤细胞的增殖和迁移能力进行调控。

miRNA最早发现于1993年,如今该领域的研究已经取得了巨大的成就。随着研究的深入, miRNA将被作为分子诊断标记、预后评估标记和临床治疗药物,多种miRNA药物已经开展临床试验^[24-26]。miR-31-3p在横纹肌肉瘤细胞中表达水平的显著差异和重要的生物学功能,将有望成为横纹肌肉瘤的候选分子诊断标记和临床药物。

参考文献 (References)

- 1 Pal A, Chiu HY, Taneja R. Genetics, epigenetics and redox homeostasis in rhabdomyosarcoma: emerging targets and therapeutics. *Redox Biol* 2019; 25: 101124.
- 2 Dasgupta R, Fuchs J, Rodeberg D. Rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg* 2016; 25(5): 276-83.
- 3 Nakagawa N, Kikuchi K, Yagyu S, Miyachi M, Lebara T, Sakai T, *et al.* Mutations in the RAS pathway as potential precision medicine targets in treatment of rhabdomyosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 512(3): 524-30.
- 4 Xu N, Hua Z, Ba G, Zhang S, Liu Z, Thiele CJ, *et al.* The anti-tumor growth effect of a novel agent DMAMCL in rhabdomyosarcoma *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38(1): 118.
- 5 Bhat AV, Palanichamy Kala M, Rao VK, Pignate L, Lim HJ, Surlyamurthy S, *et al.* Epigenetic regulation of the PTEN-AKT-RAC1 axis by G9a is critical for tumor growth in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 2019; 79(9): 2232-43.
- 6 Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J. MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15(2): 200-5.
- 7 Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* 2015; 35(1): 3-11.
- 8 Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2014; 9: 287-314.
- 9 Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med* 2014; 20(8): 460-9.
- 10 Yan DS, Zhou XT, Chen XY, Hu DN, Dong XD, Wang J, *et al.* MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(4): 1559-65.
- 11 Chen XY, Wang J, Shen HJ, Lu J, Li CX, Hu DN, *et al.* Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(3): 1193-9.
- 12 Chen XY, He DD, Dong XD, Dong F, Wang J, Wang LH, *et al.* MicroRNA-124a is epigenetically regulated and acts as a tumor suppressor by controlling multiple targets in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(3): 2248-56.
- 13 Qu W, Chen X, Wang J, Lü J, Yan D. MicroRNA-1 inhibits ovarian cancer cell proliferation and migration through c-Met pathway. *Clin Chim Acta* 2017; 473: 237-44.
- 14 Manceau G, Imbeaud S, Thiébaud R, Liébaert F, Fontaine K, Rousseau F, *et al.* Hsa-miR-31-3p expression is linked to progression-free survival in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res* 2014; 20(12): 3338-47.
- 15 Mlcochova J, Faltejskova-Vychytilova P, Ferracin M, Zagatti B, Radova L, Svoboda M, *et al.* MicroRNA expression profiling identifies miR-31-5p/3p as associated with time to progression in wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Oncotarget* 2015; 6(36): 38695-704.
- 16 Ramon L, David C, Fontaine K, Lallet E, Marcaillou C, Martin-Lannerée S, *et al.* Technical validation of a reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction *in vitro* diagnostic test for the determination of miR-31-3p expression levels in formalin-fixed paraffin-embedded metastatic colorectal cancer tumor specimens. *Biomark Insights* 2018; 13: 1177271918763357.
- 17 Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Inoue K, *et al.* Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep* 2006; 15(6): 1445-51.
- 18 Ji K, Zhang M, Chu Q, Gan Y, Ren H, Zhang L, *et al.* The role of p-STAT3 as a prognostic and clinicopathological marker in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016; 11(8): e0160125.
- 19 Zhou X, Ren Y, Liu A, Han L, Zhang K, Li S, *et al.* STAT3 inhibitor WP1066 attenuates miRNA-21 to suppress human oral

- squamous cell carcinoma growth *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Rep* 2014; 31(5): 2173-80.
- 20 Zhao Z, Lü B, Zhang L, Zhao N, Lü Y. MiR-202 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by targeting STAT3. *Mol Med Rep* 2017; 16(2): 2281-9.
- 21 Pan YM, Wang CG, Zhu M, Xing R, Cui JT, Li WM, *et al*. STAT3 signaling drives EZH2 transcriptional activation and mediates poor prognosis in gastric cancer. *Mol Cancer* 2016; 15(1): 79.
- 22 Chen MW, Yang ST, Chien MH, Hua KT, Wu CJ, Hsiao SM, *et al*. The STAT3- miRNA-92-Wnt signaling pathway regulates spheroid formation and malignant progression in ovarian cancer. *Cancer Res* 2017; 77(8): 1955-67.
- 23 Hu Y, Sun Z, Deng J, Hu B, Yan W, Wei H, *et al*. Splicing factor hnRNPA2B1 contributes to tumorigenic potential of breast cancer cells through STAT3 and ERK1/2 signaling pathway. *Tumour Biol* 2017; 39(3): 1010428317694318.
- 24 Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(3): 203-22.
- 25 Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13(8): 622-38.
- 26 Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12(11): 847-65.