

miRNA-21 种子序列反义核酸 及抗多发性骨髓瘤应用

骆小闯, 丰茂晓, 古春明, 朱容萱, 陈欣然, 费嘉*

(暨南大学 医学院, 中国广东 广州 510632)

摘要: 成熟 microRNA 的种子序列通过与其靶 mRNA 的 3'-UTR 区完全互补结合, 发挥负性调节作用. 针对 miR-21 的种子序列设计并合成 8 个碱基的微小反义核酸 (tiny anti-miR-21, t-antimiR-21), 研究 t-antimiR-21 对多发性骨髓瘤的抑制效应. 利用 Lipofectamine™ 2000 转染多发性骨髓瘤 RPMI-8266 细胞系, 激光共聚焦显微镜检测荧光标记的反义寡核苷酸的细胞内定位, 流式细胞仪检测转染效率; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测细胞增殖抑制率; 台盼蓝拒染法测活细胞数; Annexin V/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率. 结果显示: t-antimiR-21 主要定位于细胞质, 与 antimiR-21 具有相同的转染效率, 但是 t-antimiR-21 转染后降解较快. t-antimiR-21 显著抑制细胞增殖和促进细胞凋亡, 最佳作用浓度为 0.4 μmol/L, 最佳作用时间为 48 h. 结果表明 t-antimiR-21 可用于血液系统相关肿瘤的实验治疗, miRNA-21 可作为多发性骨髓瘤基因治疗的潜在靶点.

关键词: miRNA-21; 多发性骨髓瘤; 种子序列; t-antimiR-21; RPMI-8266 细胞; 反义核酸

中图分类号: R34

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2013)06-0502-06

Antisense Oligonucleotides Targeting Seed Sequence of miR-21 and its Applications in Multiple Myeloma

LUO Xiao-chuang, FENG Mao-xiao, GU Chun-ming, ZHU Rong-xuan,
CHEN Xin-ran, FEI Jia*

(Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China)

Abstract: The seed sequence of mature miRNA took negative effects through perfectly binding with 3'-UTR of target mRNA. According to the seed sequence of miR-21, tiny antimiR-21 (t-antimiR-21) was designed and synthesized to investigate the inhibition effects of multiple myeloma. t-antimiR-21 was transfected by Lipofectamine™ 2000 into RPMI-8266 cells. The localization and transfection efficiency were detected by LSCM and FCM, respectively. The growth-inhibitory potencies were measured by MTT assay. Cell viability was counted by trypan blue assay. The cell apoptosis was assessed by flow cytometry. The results showed that t-antimiR-21 was almost localized in cytoplasm, and t-antimiR-21 has the same transfection efficiency with antimiR-21. However, compared with antimiR-21, it degraded rapidly. The best concentration and time are 0.4 μmol/L and 48 h, respectively. The t-antimiR-21 significantly inhibited cell growth and promoted apoptosis. Taken together, t-antimiR-21, as an inhibitor of miR-21, could be an experimental method to treat hematological cancer. miR-21 was a potential target for the treatment of multiple myeloma.

Key words: miRNA-21; multiple myeloma; seed sequence; t-antimiR-21; RPMI-8266 cell; antisense oligonucleotides

(Life Science Research, 2013, 17(6): 502~507)

收稿日期: 2013-08-16; 修回日期: 2013-09-24

基金项目: 国家自然科学基金资助面上项目(81170496)

作者简介: 骆小闯(1987-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事生物化学方面的研究; * 通讯作者: 费嘉(1964-), 男, 安徽合肥人, 暨南大学医学院教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤非编码 RNA 功能研究, Tel: 020-85220256, E-mail: efeijia@163.com.

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是来源于终末分化的 B 淋巴细胞的恶性肿瘤,以患者骨髓中大量浆细胞的克隆性增生为显著特征,存在多步骤、多阶段的复杂发病机制,多种因子和途径参与其发生和进展,是血液科恶性肿瘤中死亡率较高的疾病^[1]。目前研究表明,miRNA 调节的多种基因及信号通路的异常导致 MM 的发生与发展,因此,作为癌基因或抑癌基因的 miRNA 在 MM 的发病机制中起着重要的作用^[2]。

MicroRNA (miRNA)是一类长度约 22 个核苷酸的内源性非编码单链小分子 RNA,参与细胞的分化、增殖和凋亡、个体发育、机体代谢等生理过程^[3]。miRNA 5'端的“种子序列”(miRNA 5'端 7~8 个核苷酸序列)与其靶基因 mRNA 的 3'非翻译区(3'untranslated region, 3'UTR)进行碱基完全互补配对,促进靶基因 mRNA 降解或抑制 mRNA 翻译,从而对靶基因的表达水平进行转录后调控^[4-6]。有研究发现属于 ncRNA 范畴的 miRNA 中,约有 50%集中于肿瘤基因组的脆性位点区^[7]或者与癌症相关的区域^[8]。已有报道,miRNA 的异常表达在 MM 的发病机制中起着重要的作用^[9-11],其中,在上调的 miRNA 中,miR-21 在 MM 中具有癌基因的潜能,其过量表达促进 MM 的存活。

Chan 等^[12]首次发现 miR-21 在人恶性胶质瘤中高表达,并通过抑制细胞凋亡促进肿瘤的发生^[13]。对肿瘤样本或细胞株中的 miRNAs 的表达水平进行转录图谱研究,发现 miR-21 负性调节 STAT3、PTEN、PDCD4、AP1、TGF β 等多种靶基因,在多种实体瘤(肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、头颈部肿瘤、食管癌等)以及非实体瘤(慢性淋巴细胞性白血病、B 细胞性淋巴瘤等)中高表达^[14-17],发挥着癌基因的作用。miR-21 与肿瘤的转移侵入也有密切关系^[8]。所以,敲除或抑制 miR-21 的表达,使其失去癌基因的功能,就可以在某种程度上治疗相关癌症。研究表明,miR-21 是可以作为癌症诊断以及通过药理学抑制 miR-21 来治疗癌症的一种新的生物标志物^[19,20]。因此,miRNA-21 可能成为多种癌症治疗新的靶点。

目前,研究 miR-21 的表达调控的方法有 RNA 干扰技术、反义核酸技术和 miRNA 海绵技术等。由于成熟 miRNA 是长度只有 21 nt 左右的小核酸,所以反义核酸技术被认为是最好的,可能是根据其功能进行特殊的药理学抑制的唯一可行性方法^[21]。基于 miRNA 的作用机制,使用 seed-

targeting tiny LNA^[22]作用于 microRNA 取得一定成效。本研究针对 miR-21 的种子序列合成 t-antimiR-21,靶向作用于多发性骨髓瘤细胞 RPMI-8266 的 miR-21,探究 t-antimiR-21 对肿瘤细胞的抑制效应,为治疗相关肿瘤疾病寻找新的方法。同时,由于 t-antimiR-21 只有 8 nt,具有转染效率高和毒副作用小的优势,为反义核酸药物开发创造有利条件。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

人多发性骨髓瘤细胞系 RPMI-8226 获赠于南方医科大学珠江医院血液科;MTT 及 DMSO 购自 Sigma-Aldrich(美国)公司;澳洲胎牛血清、Opti-MEM 及 RPMI-1640 培养基购自 GIBCO(美国)公司;Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen(美国)公司。

1.2 反义寡核苷酸的设计与合成

从 microRNA Families 数据库中获取人 microRNA-21 种子序列,根据序列互补原理设计针对种子序列的反义核酸序列(t-antimiR-21),并采用 BLAST 软件分析确定其反义核酸序列及随机对照序列(图 1)。反义核酸序列(t-antimiR-21): 5'-ATAAGCTA -3'; 随机序列(scramble, SCR): 5'-TCATACTA-3',均由上海生物工程有限公司合成,全硫代修饰、3' 6-FAM(FITC)修饰, HPLC 纯化。

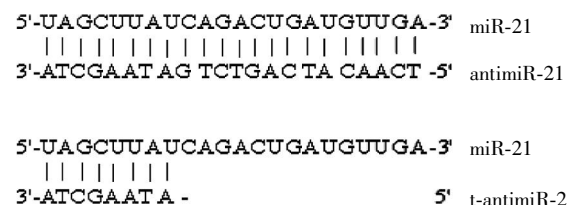


图 1 antimiR-21 及 t-antimiR-21 序列

Fig.1 The sequences of antimiR-21 and t-antimiR-21

1.3 细胞培养

将 RPMI-8266 细胞培养于 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 °C、体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱,饱和湿度下培养。每 2~3 d 换液传代。实验选用处于对数生长期、0.2%台盼蓝拒染率>95%的细胞。

1.4 激光共聚焦显微镜及流式仪确定反义核酸的胞内定位及转染效率

实验分空白对照组(Blank)、3' 6-FAM (FITC)修饰的 antimiR-21、t-antimiR-21 组,取对数生长期的 RPMI-8266 细胞,各组细胞以 5×10⁵/孔的密度接种于 6 孔板,每孔 1.5 mL,转染终体积 2 mL。

转染 6 h 后, 每孔加入 2 mL 含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基; 然后立即 DAPI 染色, 使用激光共聚焦显微镜观察反义核酸在细胞内的定位. 分别于 6、24、48 h 后使用流式仪检测转染效率.

1.5 MTT 法筛选反义核酸的最佳作用浓度

本实验分 t-antimiR-21 组、随机对照组(SCR)和空白对照组, 每组设 5 个复孔. t-antimiR-21 组中 t-antimiR-21 的核酸终浓度为 0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6 $\mu\text{mol/L}$, 随机对照组中随机序列的核酸终浓度为 0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6 $\mu\text{mol/L}$. 取对数生长期的 RPMI-8266 细胞, 各组细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板, 每孔 50 μL , 转染终体积 100 μL (转染方法参照 Invitrogen 公司 Lipofectamine™ 2000 说明书), 空白对照组加入 50 μL 的无血清的 Opti-MEM 培养基. 转染 6 h 后, 每孔加入 100 μL 含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 使每孔终体积为 200 μL . 48 h 后每孔加入 MTT 液 20 μL , 于培养箱中培养 4 h 后, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO), 震荡 10 min, 使结晶充分溶解, 在多功能酶标仪上测定吸光度 $A_{570 \text{ nm}}$, 以 A_{570} 间接反映存活细胞量. 实验重复 3 次, 计算增殖抑制率. 增殖抑制率 = $(1 - (A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}})) \times 100\%$.

1.6 台盼蓝拒染法检测不同时间段细胞的生长状况

实验分组及处理同前, 反义寡核苷酸组和随机对照组的核酸终浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$. 于 24、48、

72 h 将每组细胞充分混匀后用台盼蓝拒染法计数每组活细胞数, 重复 3 次, 取均值.

1.7 流式细胞仪计量分析 RPMI-8266 细胞凋亡情况

实验分组同前, 各组细胞以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 24 孔板, 每孔 400 μL , 转染终体积 500 μL , 空白对照组加入同体积的无血清的 Opti-MEM 培养基. 6 h 后加入 500 μL 20% 血清的 RPMI-1640 培养基置于培养箱中培养. 反义核酸组和随机对照组的核酸终浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$. 48 h 后离心收集细胞, 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 1 mL 结合缓冲液(binding buffer)洗 1 次, 离心去上清, 加入 200 μL 结合缓冲液重悬细胞后, 分别加入 10 μL Annexin 和 5 μL PI, 轻轻混匀, 避光反应 30 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况.

1.8 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 使用 SPSS13.0 统计软件, 采用单因素方差分析法分析各组数据差异的显著性. 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 激光共聚焦显微镜检测核酸细胞定位

为了确定反义核酸转染细胞后于细胞内的定位, 使用 3'6-FAM(FITC)修饰的 antimiR-21、t-antimiR-21 转染 RPMI-8266 细胞, 激光共聚焦显微镜显示 antimiR-21、t-antimiR-21 位于细胞质, 两者荧光信号强度相当.

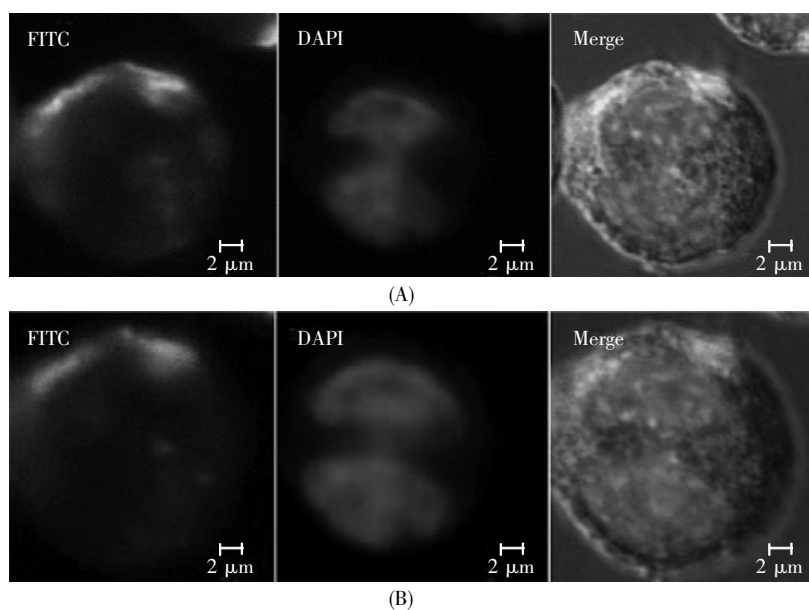


图 2 antimiR-21 及 t-antimiR-21 转染结果

Fig.2 Transfection results of antimiR-21 and t-antimiR-21

(A) antimiR-21 groups; (B) t-antimiR-21 groups.

2.2 流式仪检测转染效率

在确定了荧光修饰的反义核酸于细胞内的大致定位后,使用流式仪进一步检测反义核酸的转染效率.结果显示:3'6-FAM(FITC)修饰的 anti-miR-21、t-anti-miR-21 转染 RPMI-8266 细胞 6 h 后, t-an-

ti-miR-21 与 anti-miR-21 转染效率都很高,两者差异性不大(图 2,3).转染 24 h 及 48 h 后,相对于 anti-miR-21 组, t-anti-miR-21 荧光信号衰减较快,说明 t-anti-miR-21 在细胞内降解较快(图 3).

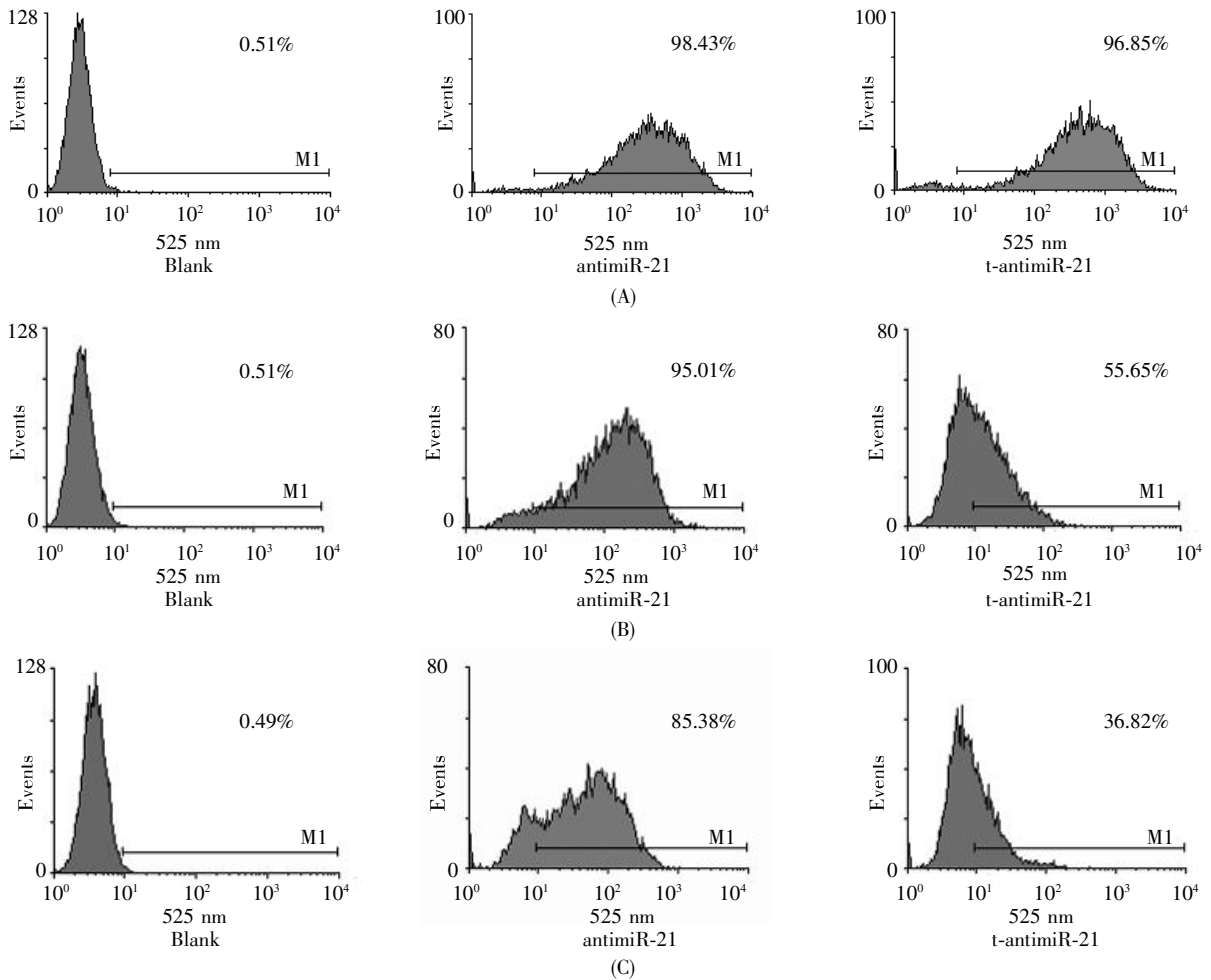


图 3 anti-miR-21 及 t-anti-miR-21 转染效率
Fig.3 Transfection efficiency of anti-miR-21 and t-anti-miR-21
(A) 6 h; (B) 24 h; (C) 48 h.

2.3 MTT 法筛选反义核酸最佳作用浓度

反义核酸的胞内定位及转染效率已先后确定,再通过 MTT 法测定反义核酸对细胞的抑制效应并确认最佳作用浓度.结果显示: t-anti-miR-21 在终浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 之间表现出有效抑制 RPMI-8266 增殖活力的效应,其最佳作用浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$,与随机对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$). t-anti-miR-21 在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 以上的终浓度显示出非特异性作用(图 4).

2.4 反义核酸对细胞的生长抑制作用最佳时间的确定

MTT 结果表明 t-anti-miR-21 的最佳作用浓度

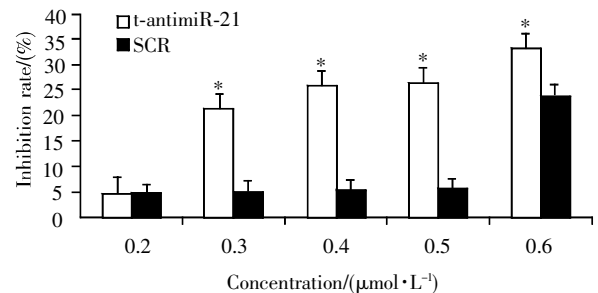


图 4 t-anti-miR-21 对 RPMI-8266 细胞增殖抑制作用
* $P < 0.05$, 与随机对照组相比.
Fig.4 Inhibition rates of RPMI-8266 after transfected with t-anti-miR-21
* $P < 0.05$ vs control groups.

为 $0.4 \mu\text{mol/L}$, 通过台盼蓝拒染法确定 t-antimiR-21 最佳作用时间. 结果显示: 终浓度 $0.4 \mu\text{mol/L}$ 的 t-antimiR-21 作用于 RPMI-8266 细胞后 24 h 开始表现出生长抑制效应, 持续至 72 h. 其最佳作用时间为 48 h. 随机对照组、空白对照组的生长基本不受影响(图 5).

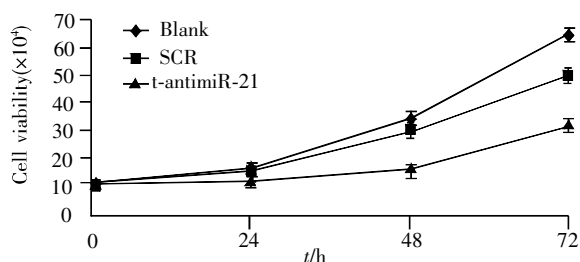


图 5 台盼蓝拒染法测活细胞数结果

* $P < 0.05$, 与随机对照组相比.

Fig.5 Cell viability with trypan blue dye assay

* $P < 0.05$ vs control groups.

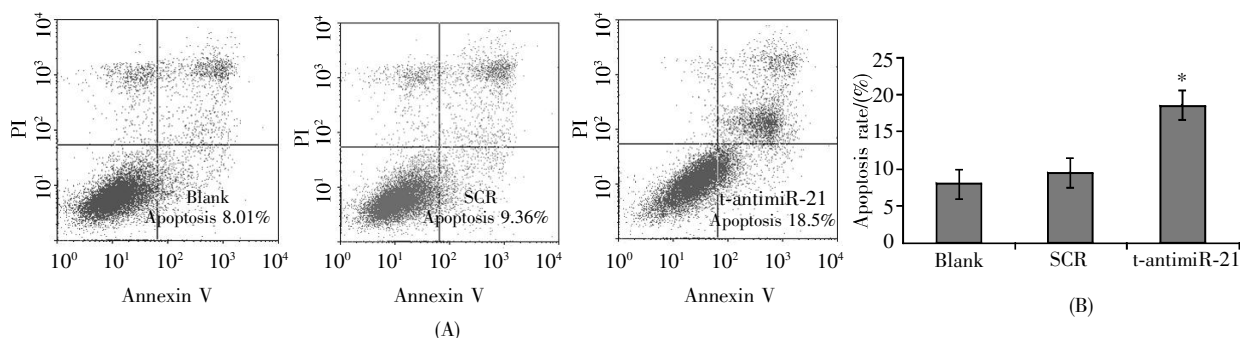


图 6 流式细胞仪检测 RPMI-8266 细胞凋亡

(A) Annexin V/PI 双染检测结果; (B) 各实验组细胞早期凋亡率比较. * $P < 0.05$, 与随机对照组相比.

Fig.6 Flow cytometry analysis of RPMI-8266 cell apoptosis

(A) Annexin V/PI assay result; (B) early apoptosis rates of groups. * $P < 0.05$ vs control groups.

为肿瘤的治疗带来新的曙光.

肿瘤相关的 microRNA 研究揭示出许多在肿瘤发生发展、诊断以及预后等方面起重要作用的 microRNA 分子, microRNA-21 就是最重要的癌基因 miRNA 之一. 当 miRNA 在肿瘤中高表达或作为癌基因时, 利用反义寡核苷酸技术特异性的抑制 miRNA 的活性. 针对 miRNA 的反义核酸是指针对根据碱基互补配对原理, 人工或生物合成与特定 miRNA 初级转录物、miRNA 前体或成熟 miRNA 互补的 DNA 序列, 通过有效手段将其导入到细胞内, 与靶 miRNA 形成 miRNA-DNA 杂交双链, RNA 酶 H 的活化, 引起 miRNA 的降解, 丧失原有的生物学活性, 从而达到基因控制和治疗的目的.

随着分子生物学技术的发展, 目前, 针对于

2.5 反义核酸对细胞凋亡的影响

MTT 法、台盼蓝拒染法依次确定了 t-antimiR-21 最佳终浓度为 $0.4 \mu\text{mol/L}$, 最佳作用时间为 48 h, 接着使用流式细胞仪进行功能学研究, 结果显示: $0.4 \mu\text{mol/L}$ 的 t-antimiR-21 作用于 RPMI-8266 细胞 48 h 后, 经 Annexin V/PI 二重染色, 采用流式细胞仪检测, 细胞早期凋亡率为 18.5%. 与对照组相比, 其凋亡率明显增加, $P < 0.05$ (图 6).

3 讨论

多发性骨髓瘤是多因素参与、多基因协同作用的多阶段过程的恶性增殖性疾病. 传统的治疗手术、化疗和放疗因其自身的局限性, 使其应用的范围无法扩大, 因此急需寻找新的治疗手段, 而 miRNA 对基因的表达调控说明了存在通过调节 miRNA 的表达来治疗疾病的可能性, 从而

成熟 miRNA 序列的反义核酸技术应用日臻完善. 它与其它研究手段和药物相比, 具有安全性高、易合成、剂量调节效应、直接作用到基因表达的不同水平抑制基因表达或治疗等优势, 而且反义核酸可使肿瘤细胞的表型逆转、形态变化、增殖速度减慢、生存期缩短、克隆形成能力下降、体内成瘤率降低, 而不影响细胞生存所必需的其它基因的表达^[2]. 由于 miRNA 仅约 19~24 个碱基, 用反义核酸技术抑制 miRNA 的活性被认为可能是最好而且最实际的方法^[2]. 但在实际应用中仍存在一些问题, 其中毒副作用大, 细胞穿透力弱, 与靶序列的亲和力低是急需解决的难点. 本研究根据 microRNA 的作用机制, 针对 miR-21 种子序列设计合成 t-antimiR-21, 并用 FITC 修饰其 3'端, 作用于 RPMI-8266 细胞后得到的结果与针对

miR-21 成熟序列合成的反义核酸 (antimiR-21) 相一致。图 2、3 显示, t-antimiR-21 转染 6 h 后, 与 antimiR-21 具有相同的转染效率, 但是 24、48 h 后降解较快。理论上, 相对于 antimiR-21, t-antimiR-21 具有较短的序列, 特异性强、转染效率高, 因此, 一定程度上可以克服长序列 antimiR-21 本身所产生的转染效率低及毒副作用大等不足, 但是, 降解较快这一现象的具体原因尚不清楚, 是否可以通过修饰来解决这一问题还需进一步的探索。

本课题组前期研究发现, 以 miRNA-21 为靶标的反义核酸 (antimiRNA-21) 可有效抑制 K562 细胞生长^[24], 使抑癌基因 Pdc4 表达上调, 促进 K562 细胞凋亡, 揭示了 antimiR-21 提高 K562 细胞对化疗药物 Ara-C 敏感性的分子生物学机制^[25]。在前期研究基础上, 本研究以多发性骨髓瘤为研究对象, 在确定了 t-antimiR-21 转染效率之后, 进一步实验判断 t-antimiR-21 是否影响细胞的生物学性质, 图 4~6 结果显示 t-antimiR-21 作用于 RPMI-8266 细胞后, 细胞生长受到抑制, 并显著促进细胞的凋亡, 推断出 t-antimiR-21 可通过促进多发性骨髓瘤凋亡来起作用。研究初步证实, t-antimiR-21 具有直接或间接抑制肿瘤的发生和肿瘤的生长作用, 可用于制备预防或治疗肿瘤的药物。随着 miRNA 反义核酸技术的发展和运用, 靶向抑制 miR-21 在临床治疗中具有广阔的前景。

参考文献(References):

- GE F, BI L, TAO S, *et al.* Proteomic analysis of multiple myeloma: current status and future perspectives[J]. *Proteomics Clinical Applications*, 2011, 5(1-2): 30-37.
- PICHIORRI F, SUH S S, LADETTO M, *et al.* MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2008, 105(35): 12885-12890.
- WU L, FAN J, BELASCO J G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2006, 103(11): 2034-2039.
- BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- GUO H, INGOLIA N T, WEISSMAN J S, *et al.* Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels[J]. *Nature*, 2010, 466(7308): 835-840.
- DJURANOVIC S, NAHVI A, GREEN R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay[J]. *Science*, 2012, 336(6078): 237-240.
- CALIN G A, SEVIGNANI C, DUMITRU C D, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2004, 101(9): 2999-3004.
- HE L, THOMSON J M, HEMANN M T, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 828-833.
- PICHIORRI F, SUH S S, ROCCI A, *et al.* Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/M DM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development[J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(4): 367-381.
- ZHOU Y, CHEN L, BARLOGIE B, *et al.* High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2010, 107(17): 7904-7909.
- GUTIERREZ N C, SARASQUETE M E, MISIEWICZ-KRZEMINSKA I, *et al.* Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling[J]. *Leukemia*, 2010, 24(3): 629-637.
- CHAN J A, KRICHEVSKY A M, KOSIK K S, *et al.* MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(14): 6029-6033.
- CAI X, HAGEDORN C H, CULLEN B R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs[J]. *RNA*, 2004, 10(12): 1957-1966.
- ASAGA S, KUO C, NGUYEN T, *et al.* Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer[J]. *Clinical Chemistry*, 2011, 57(5): 84-91.
- ASANGANI I A, RAHEED S A, NIKOLOVA D A, *et al.* MicroRNA-21 (miR-21) post-Transcriptionally downregulates Tumor suppressor Pdc4, and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2008, 27(15): 2128-2136.
- LI T, LI D, SHA J, *et al.* MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and Invasion in prostate cancer cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 383(3): 280-285.
- ZHU S, WU H, WU F, *et al.* MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis[J]. *Cell Research*, 2008, 18(3): 350-359.
- GABRIELY G, WURDINGER T, KESARI S, *et al.* MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators[J]. *Molecular Cell Biology*, 2000, 28(17): 5369-5380.
- ZHENG J, XUE H, WANG T, *et al.* miR-21 downregulates the tumor suppressor P12 (CDK2AP1) and stimulates cell proliferation and invasion[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2011, 112(3): 872-880.
- MEDINA P P, NOLDE M, SLANCK F J. OncomiR addiction in an vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma[J]. *Nature*, 2010, 467(7311): 86-90.
- ESAU C C. Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides[J]. *Methods*, 2008, 44(1): 55-60.
- SUSANNA O, CAMILA O, ANDREAS P, *et al.* Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs[J]. *Nature Genetics*, 2011, 43(4): 371-378.
- 许凤娣, 张惜阴. 肿瘤的反义核酸治疗[J]. *国外医学: 生理、病理科学与临床分册*(XU Feng-di, ZHANG Xi-yin. Antisense oligonucleotides therapy of tumors[J]. *Foreign Medical Sciences: Pathophysiology and Clinical Medicine*), 1995, 15(3): 149-150.
- 郭敏, 李育敏, 费嘉. 以 microRNA-21 为靶标反义寡核苷酸对人白血病 K562 细胞的抑制作用[J]. *中国病理生理杂志*(GUO Min, LI Yu-min, FEI Jia. Inhibition of microRNA-21 with antisense Oligonucleotide and their effects on human leukemic K562 cells[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*), 2009, 25(6): 1127-1131.
- 朱雪皎, 李育敏, 谷景义, 等. 靶向抑制 miRNA-21 提高白血病 K562 细胞对阿糖胞苷的敏感性[J]. *生命科学研究*(ZHU Xue-jiao, LI Yu-min, GU Jing-yi, *et al.* Enhanced chemosensitivity of leukemic cells to cytarabine by targeting suppression of miRNA-21[J]. *Life Science Research*), 2011, 15(4): 318-322.