

БЛОКИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ микроРНК miR-221, -30d И -15a СПОСОБСТВУЕТ РАЗВИТИЮ РАКА ПРОСТАТЫ ПРИ ПОСРЕДСТВЕ БЕЛКА VM1*

© 2015 Хенкванг Ксуан, Вей Ксуе**, Джяхуа Пен,
Джяджун Ше, Бейджун Донг, Юран Хуанг

Department of Urology, Renji Hospital, Affiliated
to Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine,
Shanghai, China; fax: +86(21)683-83716,
E-mail: weixuerh@sohu.com

Поступила в редакцию 20.05.14
После доработки 03.08.14

Злокачественная опухоль простаты (РСa) – это тип рака, находящегося на втором месте по смертности среди мужчин. В патогенез рака простаты вовлечен белок VM1, член протеинового семейства PcG. Было обнаружено, что злокачественное перерождение тканей простаты сопровождается нарушением экспрессии некоторых микроРНК (miРНК). Пока неясно, как miРНК регулируют экспрессию VM1. Используя двойную люциферазную тест-систему, мы провели селекцию 18 miРНК, обладающих потенциальной способностью подавлять экспрессию белка VM1, и обнаружили, что 12 из них были способны связываться с 3'-концевым нетранслируемым районом (3'-НТР) в мРНК VM1. Методом ПЦР в режиме реального времени было установлено, что в злокачественных тканях простаты сильно снижены уровни экспрессии эндогенных miR-221, -15a и -30d. Последующие функциональные исследования показали, что miR-221 и miR-30d могут ингибировать пролиферацию злокачественных клеток простаты, а дополнительная экспрессия в них белка VM1 может частично снимать супрессорное воздействие этих микроРНК на клеточную пролиферацию. В своем исследовании мы выявили взаимосвязь между снижением уровней экспрессии miR-221, -30d и развитием патологического процесса при раке простаты. Полученные нами результаты показали, что микроРНК miR-221 и miR-30d являются потенциальными супрессорами злокачественной опухоли простаты и могут служить в качестве маркеров для оценки степени тяжести этого вида рака, а также могут являться мишенями для терапевтического воздействия при лечении этого онкологического заболевания у человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: miРНК, рак простаты, VM1, клеточная пролиферация.

Рак простаты (РСa) – второй по смертности среди мужчин тип рака, является комплексным многофакторным заболеванием, определяющимся как генетическими предпосылками, так и воздействием различных факторов окружающей среды. Несмотря на тяжесть клинических и социальных последствий этого заболевания, механизмы, лежащие в его основе, остаются недостаточно понятными.

Принятые сокращения: РСa – рак простаты; miРНК – микроРНК; siРНК – малые интерферирующие РНК; VM1 – B-cell specific Molony leukemia virus insertion region homolog 1, онкобелок из семейства PcG (polycomb group); 3'-НТР – 3'-концевой нетранслируемый район мРНК; AGO2 – главный белковый компонент комплекса RISC; GAPDH – глициральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, VM14-144, 25.01.2015.

** Адресат для корреспонденции.

К настоящему времени стало известно, что белки семейства PcG (polycomb group), которые были впервые идентифицированы у *Drosophila* как эпигенетические регуляторы генов гематопоэза, играют ключевую роль в прогрессии и рецидивировании рака [1]. Известно также, что повышенная экспрессия белка VM1 (B-cell specific Molony leukemia virus insertion region homolog 1) – члена семейства PcG, используемого в качестве маркера в биологии стволовых клеток, коррелирует с устойчивостью клеток к химическому стрессу [2]. Проведенные недавно исследования показали, что между уровнем экспрессии VM1 и прогрессией рака простаты наблюдается прямая положительная корреляция [3, 4]. Сообщалось также о том, что VM1 является важнейшим регулятором самообновления стволовых клеток простаты и их перерождения в злокачественные [5].

МикроРНК (miРНК) – это один из видов коротких некодирующих РНК, подавляющих

экспрессию белков путем частично комплементарного связывания с 3'-концевым нетранслируемым районом (3'-НТР) в мРНК. Согласно биоинформационным предсказаниям, экспрессия более 60% белок-кодирующих генов регулируется при участии miРНК. Изменения уровней экспрессии miРНК влияют на процессы возникновения, развития и метастазирования раковых опухолей человека и, как предполагается, на функционирование онкогенов и опухолевых супрессоров в злокачественной ткани [6, 7]. Сообщалось также, что нарушения экспрессии некоторых miРНК сопровождают развитие патологического процесса при раке простаты [8–10].

Для проведения своей работы мы сконструировали на основе люциферазы 3'-НТР ВМ11-репортерную систему и провели скрининг 18 miРНК, которые потенциально были способны подавлять экспрессию ВМ11. Мы изучили эндогенную экспрессию в злокачественных тканях простаты 12 miРНК, отобранных в результате скрининга, и обнаружили, что уровни экспрессии некоторых из них (miR-221, -30d и -15a) были существенно снижены по сравнению с нормой. Полученные нами результаты способствуют прояснению взаимоотношений между miРНК и развитием рака простаты. Кроме того, мы предложили к использованию потенциальные биомаркеры для клинической диагностики рака простаты и возможные мишени для терапевтического воздействия при лечении РСa.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы тканей. Забор образцов тканей проводили у пациентов возраста 65–75 лет, подвергнутых биопсии в Госпитале Ренджи с мая 2011 г. по ноябрь 2013 г. Была сделана случайная выборка 30 биоптатов раковой ткани и соответствующих им образцов соседних нормальных тканей простаты больных пациентов для изучения экспрессии ВМ11 и miРНК.

Культура клеток. Клетки РС-3 были выращены в среде RPMI 1640 с добавкой фетальной сыворотки и 2 мМ глутамин («Nutclone», США) в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°. Клетки НЕК293Т культивировали в тех же условиях в среде Дульбекко, содержащей 10%-ную фетальную сыворотку («Nutclone», США), 100 мкг/мл пенициллина и 10 мкг/мл стрептомицина. Синтетические микроРНК miR-221 и miR-30d, а также малые интерферирующие АГО2-специфичные siРНК (АГО2 siРНК) были получены от фирмы «Shanghai GenePharma» (Китай).

Вестерн-блоттинг. Белковые экстракты тканей нагревали в буфере для образцов, содержащем

Ds-Na и β-меркаптоэтанол, и наносили на 12%-ный ПААГ по 20 мкл в лунку. После проведения электрофореза белки переносили на PVDF-мембраны («Amersham Pharmacia Biotech», Англия). Мембраны блокировали, а затем инкубировали с поликлональными кроличьими анти-ВМ11 антителами («Abcam», США) и моноклональными анти-GAPDH антителами («Santa Cruz Biotechnology Inc.», США) в течение ночи при 4°. Комплексы антиген–антитело выявляли с помощью конъюгатов пероксидазы с вторичными антикроличьими или с антимышиными IgG методом электрохемилюминесценции с использованием набора для ECL («Pierce», США). GAPDH была использована в качестве внутреннего контроля.

ПЦР в режиме реального времени был использован для полуколичественной оценки уровней экспрессии 12 выбранных miРНК. Фракцию общей РНК экстрагировали из тканей с использованием реагента Trizol Reagent («Invitrogen», США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Обратную транскрипцию и получение кДНК проводили с использованием набора TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit и miRNA-specific TaqMan MGB Probes («Applied Biosystems», США). В качестве внутреннего контроля для нормирования данных была использована U6 snРНК (некодирующая малая ядерная РНК). Каждое определение проводили в трех повторях и представляли результаты как средние значения ± s.d.

Двойной люциферазный тест. Полноразмерный 3'-НТР гена *ВМ11* (1948 п.н.) клонировали в вектор pmirGLO («Promega», США), содержащий кодирующий район гена люциферазы светлячков, с целью получить люциферазный репортерный вектор, в котором 3'-НТР расположен вслед за геном люциферазы. Для проведения люциферазного репортерного теста клетки НЕК293Т высевали в 48-луночные планшеты и трансфицировали их синтетическими miR-221 или miR-30d одновременно с люциферазным репортерным вектором с использованием липофектамина 2000 («Invitrogen», США). Спустя двое суток клетки собирали и анализировали в двойном люциферазном тесте Dual-Luciferase Assay («Promega», США). Каждый эксперимент выполняли в трех независимых повторях и представляли результаты как относительную люциферазную активность (отношение активности люциферазы светлячков к активности люциферазы коралла *Renilla*).

Тест на клеточную пролиферацию. Клетки РС-3 высевали в 96-луночные планшеты (2 × 10³ клеток на лунку) и оставляли на ночь для прикрепления. Затем клетки трансфицировали miR-221 или miR-30d. Через 48 ч после начала трансфекции в каждую лунку добавляли по 20 мкл раст-

вора 3-(4,5-диметилтриазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид с концентрацией 5 мг/мл (МТТ, «Sigma», США) и инкубировали в течение 4 ч. Затем в лунки добавляли ДМСО и определяли поглощение при 490 нм.

Статистический анализ. Сравнение данных между двумя несвязанными группами проводили с использованием *t*-теста Стьюдента с помощью программы SPSS Statistical Package version 16. Уровни микроРНК в разных тканях сравнивали с использованием *U*-теста Манна–Уитни. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сверхэкспрессия белка VM11 в тканях раковой опухоли простаты. VM11, член белкового семейства PcG, является маркером, используемым в биологии стволовых клеток. Есть данные, свидетельствующие о прямой положительной корреляции между уровнем VM11 и развитием патологического процесса при некоторых типах рака. Мы определили методом вестерн-блоттинга уровни экспрессии VM11 в пяти образцах нормальной ткани (рис. 1, *a*) и 30 образцах раковой опухоли (рис. 1, *б*) простаты и показали, что в злокачественной ткани он был значительно более высоким по сравнению с нормой ($p < 0,01$).

МикроРНК регулируют экспрессию белка VM11 в клетках РС-3. Для изучения взаимосвязи между эндогенными микроРНК и экспрессией VM11 в злокачественных клетках простаты мы блокировали экспрессию AGO2 (главный белковый компонент комплекса RISC) в клетках РС-3 и изучали в них продукцию белка VM11. Как показано на рис. 1, *в*, подавление экспрессии белка AGO2 путем трансдукции в клетки AGO2 siРНК приводило к значительному увеличению продукции белка VM11. Это означало, что микроРНК могут играть ключевую роль в регуляции экспрессии VM11.

Выявлено 12 микроРНК, способных ингибировать экспрессию VM11; эндогенные уровни экспрессии трех из них снижены в тканях рака простаты. Мы предположили, что микроРНК могут ингибировать продукцию белка VM11. Используя инструменты биоинформатики, а именно онлайн-программу TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), мы выяснили, что 18 микроРНК могли бы являться потенциальными репрессорами VM11. Для экспериментальной проверки влияния этих микроРНК на экспрессию VM11 мы клонировали полноразмерный 3'-НТР гена *VM11* в вектор pmirGLO, несущий ген люциферазы светлячков, и провели двойной люциферазный тест (см. раздел «Методы исследования»). Как показано на рис. 2, *a*, трансфекция клеток HEK293T двенадцатью из восемнад-

цати исследованных синтетических микроРНК совместно с репортерным люциферазным вектором (pmirGLO-VM11) значительно снижала уровни люциферазной активности, а, следовательно, подавляла экспрессию этого фермента.

Далее мы определили уровни эндогенной экспрессии этих 12 микроРНК в тканях РСa. Для этого из 30 образцов опухоли были получены фракции тотальной РНК и объединены по пять образцов в каждую из шести сформированных для исследования экспериментальных групп (соответствующие контрольные группы были сформированы из мРНК, экстрагированных из нормальных тканей). Как показано на рис. 2, *б*, экспрессия трех микроРНК (miR-15a, miR-221 и miR-30d) из 12 была значительно снижена в злокачественной ткани по сравнению с нормой.

Мишенью для miR-221 и miR-30d является мРНК VM11. Поскольку уже было известно, что miR-15a была способна подавлять экспрессию VM11 в тканях карциномы яичников и аденокарциномы протоков поджелудочной железы [11, 12], мы сосредоточили свое внимание на функционировании miR-221 и miR-30d.

В дальнейшем мы устанавливали участки связывания для miR-221 и miR-30d с использованием двойной люциферазной системы. Как следует из рис. 3, *б* и *г*, активность люциферазы светлячков уменьшалась на 49,2 или 28,8% при трансфекции HEK293T клеток miR-221 или miR-30d соответственно по сравнению с контролем (клетки, трансфицированные контрольной микроРНК). В присутствии ингибитора экспрессии miR-221 или miR-30d относительная активность люциферазы возрастала на 17,3 или 40,1% соответственно по сравнению с контролем (клетки, трансфицированные контрольной антисмысловой-микроРНК). Это означает, что miR-221 и miR-30d связывались с районом 3'-НТР в мРНК VM11 и ингибировали трансляцию люциферазы.

Еще одно подтверждение связывания miR-221 и miR-30d со своими участками в 3'-НТР VM11 было получено путем точечного мутагенеза в этом районе (рис. 3, *a* и *в*). Предполагаемые участки связывания miR-221 и miR-30d были модифицированы путем замены четырех нуклеотидов; репортерные векторы, несущие эти замены, были названы pmirGLO-VM11-Mu1 и pmirGLO-VM11-Mu2 соответственно. Вектор «дикого» типа (pmirGLO-VM11-WT) был использован в качестве контроля. Приведенные на рис. 3, *б* и *г* (правые панели) гистограммы показывают, что активность люциферазы, кодируемой мутантными репортерными векторами pmirGLO-VM11-Mu1 и pmirGLO-VM11-Mu2, практически не менялась при трансфекции клеток HEK293T miR-221 и miR-30d соответственно по сравнению

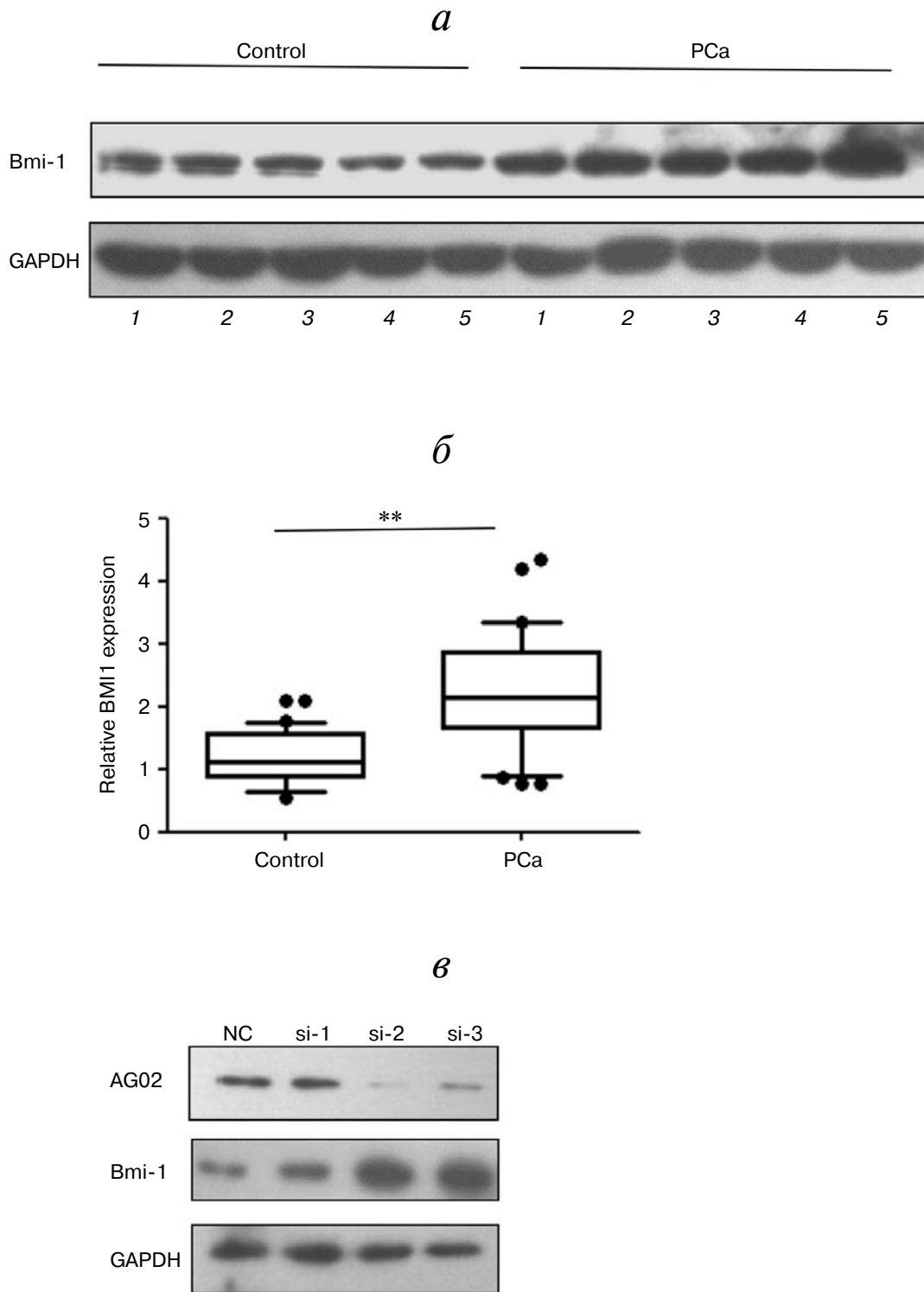


Рис. 1. Продукция белка BMI1 увеличена в тканях рака простаты. *a* – Уровни экспрессии BMI1 в объединенных образцах из опухолевых (PCa) или прилежащих к опухолям нормальных тканей (Control) простаты, определенные методом вестерн-блоттинга. Уровень экспрессии GAPDH был использован в качестве внутреннего контроля для сравнения. Из 30 образцов раковой ткани было сформировано по пять образцов для исследования; *b* – количественная обработка результатов вестерн-блоттинга с использованием программы Quantity One («Bio-Rad», США). Данные анализировали с помощью парного *t*-теста Стьюдента. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *в* – AGO2-специфичные siРНК вводили по отдельности в клетки РС-3 путем трансфекции и через 48 ч определяли уровни экспрессии белков AGO2 и BMI1 методом вестерн-блоттинга

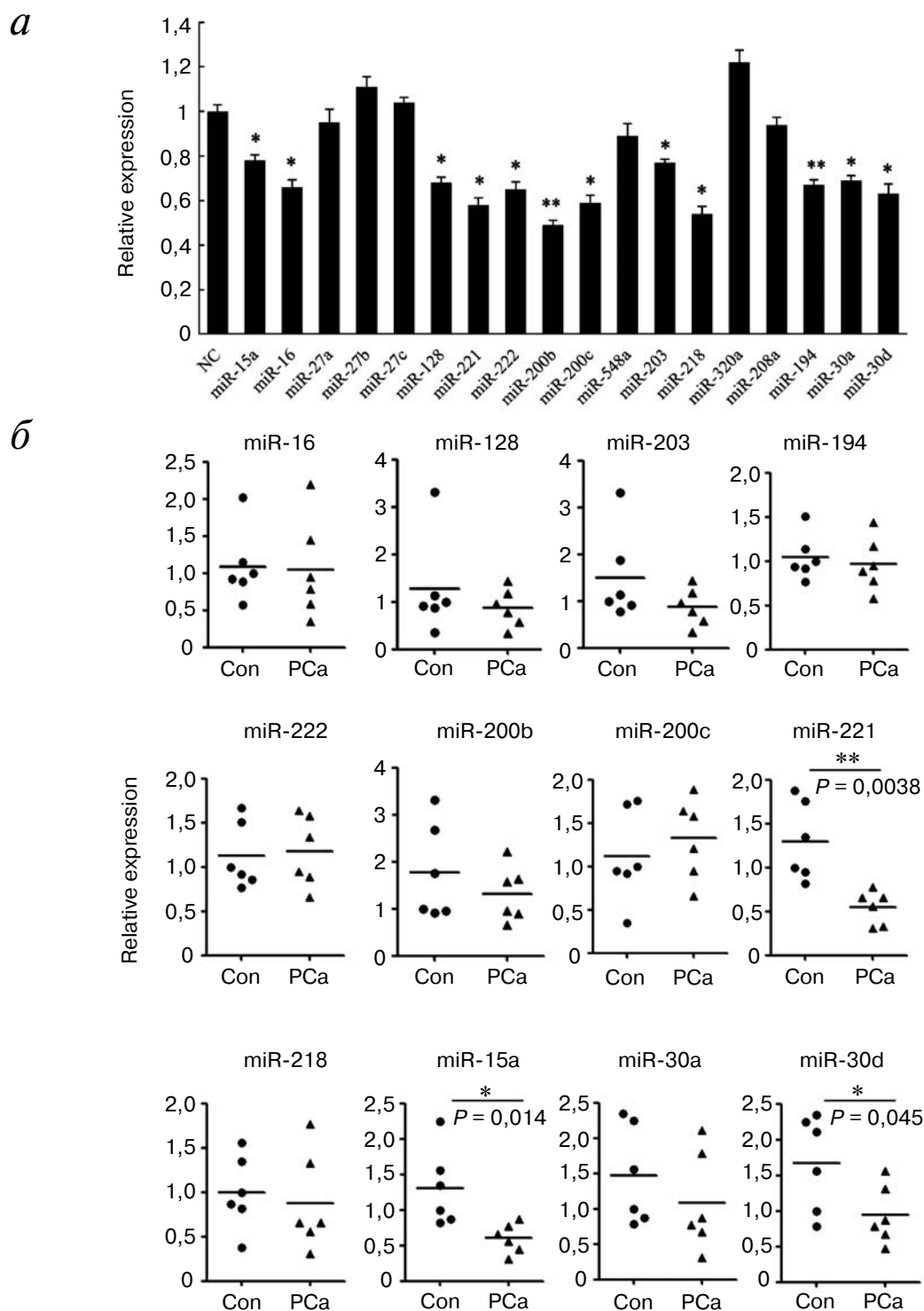


Рис. 2. МикроРНК miR-221, -15a и -30d взаимодействуют с участками в 3'-НТР в мРНК *BM11*, уровень их экспрессии снижен в тканях раковой опухоли простаты. *a* – miРНК, способные связываться с 3'-НТР в мРНК *BM11*. Полноразмерный 3'-НТР гена *BM11* был клонирован в плазмиду pmirGLO вслед за кодирующим районом гена люциферазы светлячков. Было проанализировано 18 miРНК, потенциально способных напрямую взаимодействовать с 3'-НТР. Для анализа была использована двойная люциферазная тест-система. Полученные данные оценивали с использованием парного *t*-теста Стьюдента, значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми; *b* – определение методом ПЦР в режиме реального времени уровней экспрессии 12 отобранных miРНК в тканях PCa и прилегающих к опухоли нормальных тканях (Con). Общая фракция РНК была экстрагирована из 30 образцов злокачественных и нормальных тканей. По пять образцов РНК объединили в шесть проб, использованных для дальнейшего анализа. Полученные данные оценивали с использованием парного *t*-теста Стьюдента, значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

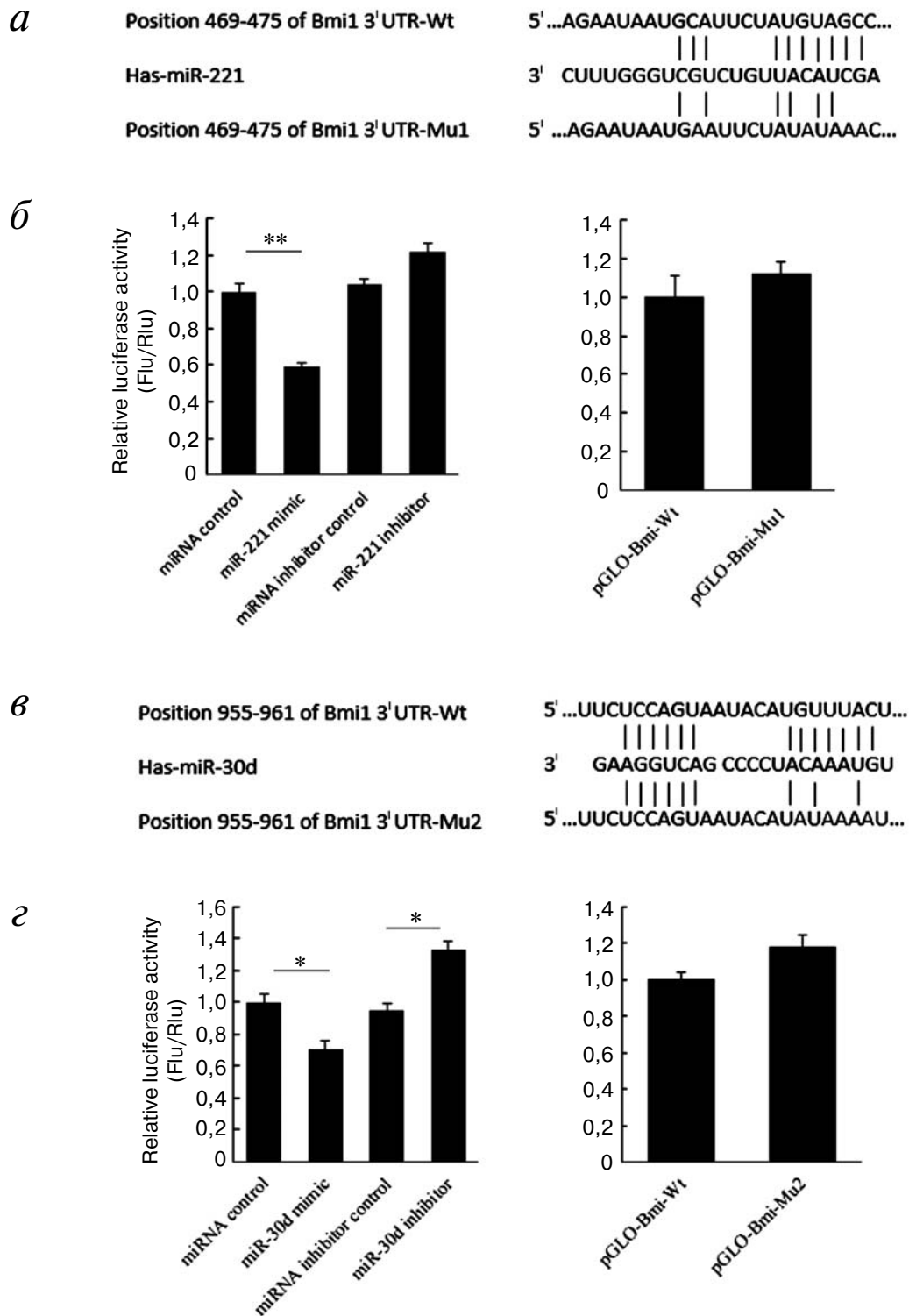


Рис. 3. Идентификация участка связывания для miR-221 и miR-30d. Клетки HEK293Т трансфицировали люциферазным репортерным вектором pmirGLO-BMI1 одновременно с контрольной miPHK, синтетическими miR-221 или miR-30d, контрольной бессмысловой miPHK или miR-221/-30d вместе с их ингибитором и анализировали в клеточных лизатах люциферазную активность в двойном люциферазном тесте. Результаты выражали в отн. ед (активность люциферазы светлячков/активность люциферазы из *Renilla*; б, г – левые панели). При мутационной замене четырех нуклеотидов в участках связывания для miR-221 (а) или miR-30d (в) в 3'-НТР (репортерные векторы pmirGLO-BMI1-Mu1 или pmirGLO-BMI1-Mu2 соответственно) люциферазная активность под действием трансфицирования miR-221 или miR-30d менялась незначительно (б, г – правые панели). Полученные данные оценивали с использованием *t*-теста Стьюдента, значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

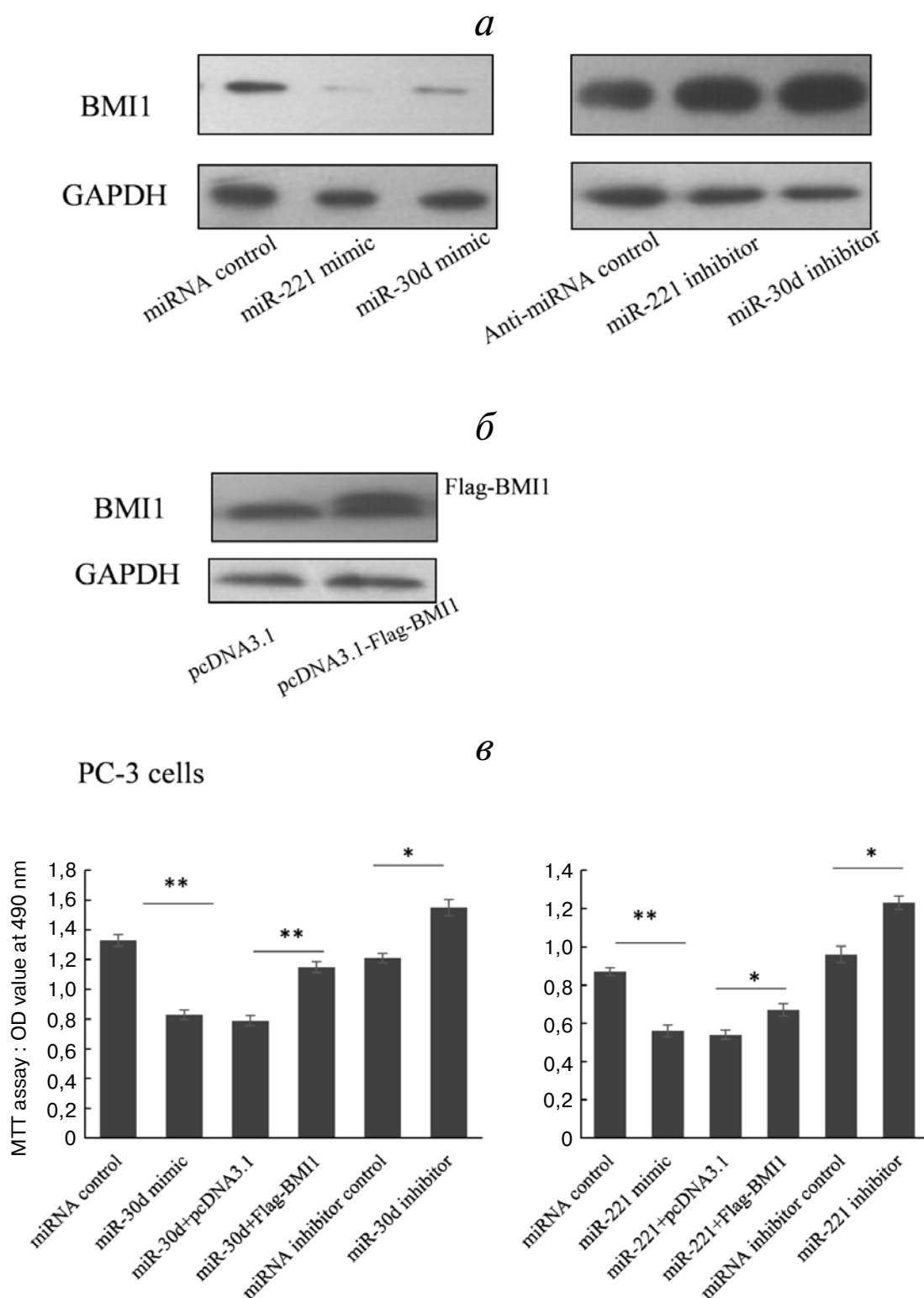


Рис. 4. МикроРНК miR-221 и miR-30d ингибируют пролиферацию злокачественных клеток простаты путем подавления экспрессии белка BMI1. В клетки PC-3 вводили путем трансфекции синтетические miR-221/-30d (а) или синтетические miR-221/-30d вместе с плазмидой pcDNA 3.1-Flag BMI1, экспрессирующей дополнительное количество BMI1 (б). (Для сравнения использовали контрольную miРНК и «пустую» плазмиду pcDNA 3.1 соответственно.) Уровни экспрессии BMI1 определяли методом вестерн-блоттинга. Интенсивность пролиферации определяли с помощью витального красителя МТТ; полученные данные оценивали с использованием *t*-теста Стьюдента, значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми (в). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

с контролем (pmirGLO-ВМ11-WT). Это явилось еще одним подтверждением того, что miR-221 и miR-30d связываются с 3'-НТР в мРНК ВМ11 и могут ингибировать трансляцию белка ВМ11.

Для доказательства того, что miR-221 и miR-30d могут подавлять экспрессию эндогенного ВМ11, мы трансфицировали клетки РС-3 синтетической miR-221 или miR-30d, либо miR-221/miR-30d вместе с их ингибитором и через 48 ч после трансфекции определяли уровни экспрессии эндогенного ВМ11 методом вестерн-блоттинга. Как показано на рис. 4, а, продукция белка ВМ11 значительно снижалась после введения в клетки указанных микроРНК. Между тем, в присутствии ингибитора этих miРНК уровень экспрессии ВМ11 был существенно выше.

Разбалансировка экспрессии miR-221 или miR-30d связана с нарушением пролиферации злокачественных клеток простаты. Есть данные, свидетельствующие о том, что при повышенном уровне экспрессии ВМ11 наблюдается стимуляция пролиферации различных типов раковых клеток. Для дальнейшего выяснения биологической функции miR-221 и miR-30d в развитии рака простаты мы изучали пролиферацию злокачественных клеток простаты при изменении в них уровней экспрессии этих микроРНК.

Клетки РС-3 после введения в них синтетических miR-221 или miR-30d демонстрировали более низкую способность к пролиферации, чем клетки, трансфицированные контрольной miRNA. При сверхэкспрессии белка ВМ11, вызванной введением в клетки плазмиды pcDNA 3.1-Flag ВМ11, их пролиферативная способность частично восстанавливалась. Это означало, что указанные микроРНК ингибировали пролиферацию раковых клеток простаты, в частности путем воздействия на продукцию белка ВМ11. При трансфекции клеток ингибитором экспрессии miR-221 или miR-30d их пролиферативная способность значительно возрастала. Это могло свидетельствовать о том, что снижение уровня экспрессии miR-221 и miR-30d связано с прогрессией РСa и приводит к стимуляции пролиферации злокачественных клеток простаты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белок ВМ11, известный также под названием PCGF4 (polycomb group RING finger protein 4) или RNF51 (RING finger protein 51), является онкобелком из семейства PcG (polycomb group). Ранее было показано, что между уровнем экспрессии белка ВМ11 и развитием патологического процесса при раке простаты наблюдается прямая положительная корреляция [3, 4]. Есть сообщения,

свидетельствующие о том, что ВМ11 играет решающую роль в регуляции самообновления стволовых клеток простаты и их злокачественного перерождения [5]. В своей работе мы обнаружили, что с раком простаты связана сверхэкспрессия белка ВМ11. Однако есть сообщения о том, что уровень мРНК ВМ11 незначительно возрастает в тканях рака простаты. Эти данные позволяют предположить, что экспрессия белка ВМ11 при патогенезе РСa регулируется в основном на посттранскрипционном уровне [13]. Известно, что miРНК, один из видов коротких некодирующих РНК, подавляют экспрессию белков путем частично комплементарного связывания с 3'-НТР мРНК, и большинство из них не индуцирует деградацию мРНК. Мы предположили, что может существовать взаимосвязь между экспрессией miРНК и сверхэкспрессией ВМ11. Проведенный нами эксперимент по «нокдауну» белка AGO2 подтверждал эту гипотезу, и впоследствии с использованием двойной люциферазной тест-системы мы выявили 12 miРНК, которые были способны подавлять экспрессию ВМ11. При изучении экспрессии этих miРНК в тканях РСa мы обнаружили, что уровни трех из них (miR-15a, miR-221 и miR-30d) были значительно снижены в тканях раковой опухоли по сравнению с соседними нормальными тканями. Поскольку уже было известно, что miR-15a подавляла экспрессию ВМ11, связываясь с районом 3'-НТР в мРНК ВМ11, то мы сосредоточили свое внимание на изучении биологических функций miR-221 и miR-30d. Исследование пролиферативной способности клеток РС-3 с использованием витального красителя МТТ показало, что miR-221 и miR-30d функционируют как супрессоры роста злокачественных клеток простаты, а подавление экспрессии этих miРНК может способствовать пролиферации злокачественных клеток линии РС-3.

Итак, наше исследование было призвано прояснить роль miРНК в регуляции экспрессии белка ВМ11. Мы впервые показали, что miR-221, miR-222, miR-30a и miR-30d могут связываться с районом 3'-НТР в мРНК ВМ11. Уровни экспрессии miR-221 и miR-30d были значительно снижены в тканях раковой опухоли простаты, а экспрессия белка ВМ11 – повышена. МикроРНК miR-221 и miR-30d являются потенциальными ингибиторами прогрессии РСa и поэтому могут быть использованы в качестве клинических маркеров и мишеней при терапии этого заболевания у человека.

Работа выполнена при поддержке Национального фонда по естественным наукам Китая (91129725).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siddique, H.R., and Saleem, M. (2012) Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences, *Stem Cells*, **30**, 372–378.
2. Kang, M.K., Kim, R.H., Kim, S.J., Yip, F.K., Shin, K.H., Dimri, G.P., Christensen, R., Han, T., and Park, N.H. (2007) Elevated Bmi-1 expression is associated with dysplastic cell transformation during oral carcinogenesis and is required for cancer cell replication and survival, *Br. J. Cancer*, **96**, 126–133.
3. Atala, A. (2013) Re: akt-mediated phosphorylation of Bmi1 modulates its oncogenic potential, e3 ligase activity, and DNA damage repair activity in mouse prostate cancer, *J. Urol.*, **189**, 771.
4. Ammirante, M., Kuraishy, A.I., Shalapour, S., Strasner, A., Ramirez-Sanchez, C., Zhang, W., Shabaik, A., and Karin, M. (2013) An IKK α -E2F1-BMI1 cascade activated by infiltrating B cells controls prostate regeneration and tumor recurrence, *Genes Dev.*, **27**, 1435–1440.
5. Lukacs, R.U., Memarzadeh, S., Wu, H., and Witte, O.N. (2010) Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation, *Cell Stem Cell*, **7**, 682–693.
6. Wu, W.K., Lee, C.W., Cho, C.H., Fan, D., Wu, K., Yu, J., and Sung, J.J. (2010) MicroRNA dysregulation in gastric cancer: a new player enters the game, *Oncogene*, **29**, 5761–5771.
7. Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., and Calin, G.A. (2009) MicroRNAs – the micro steering wheel of tumour metastases, *Nature Rev. Cancer*, **9**, 293–302.
8. Srivastava, A., Goldberger, H., Dimtchev, A., Marian, C., Soldin, O., Li, X., Collins, S.P., Suy, S., and Kumar, D. (2014) Circulatory miR-628-5p is downregulated in prostate cancer patients, *Tumour Biol.*, **35**, 4867–4873.
9. Qiang, X.F., Zhang, Z.W., Liu, Q., Sun, N., Pan, L.L., Shen, J., Li, T., Yun, C., Li, H., and Shi, L.H. (2014) miR-20a promotes prostate cancer invasion and migration through targeting ABL2, *J. Cell Biochem.*, **115**, 1269–1276.
10. Ottman, R., Nguyen, C., Lorch, R., and Chakrabarti, R. (2014) MicroRNA expressions associated with progression of prostate cancer cells to antiandrogen therapy resistance, *Mol. Cancer*, **13**, 1.
11. Bhattacharya, R., Nicoloso, M., Arvizo, R., Wang, E., Cortez, A., Rossi, S., Calin, G.A., and Mukherjee, P. (2009) MiR-15a and MiR-16 control Bmi-1 expression in ovarian cancer, *Cancer Res.*, **69**, 9090–9095.
12. Guo, S., Xu, X., Tang, Y., Zhang, C., Li, J., Ouyang, Y., Ju, J., Bie, P., and Wang, H. (2014) miR-15a inhibits cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma by down-regulating Bmi-1 expression, *Cancer Lett.*, **344**, 40–46.
13. Hoffmann, M.J., Engers, R., Florl, A.R., Otte, A.P., Muller, M., and Schulz, W.A. (2007) Expression changes in EZH2, but not in BMI-1, SIRT1, DNMT1 or DNMT3B are associated with DNA methylation changes in prostate cancer, *Cancer Biol. Ther.*, **6**, 1403–1412.

**DOWNREGULATION OF miR-221, -30d,
AND -15a CONTRIBUTES TO PATHOGENESIS
OF PROSTATE CANCER BY TARGETING BMI1**

**Hanqing Xuan, Wei Xue*, Jiahua Pan, Jianjun Sha,
Baijun Dong, Yiran Huang**

*Department of Urology, Renji Hospital, Affiliated
to Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine,
Shanghai, China; fax: +86(21)683-83716,
E-mail: weixuerh@sohu.com*

Received May 20, 2014

Revision received August 3, 2014

Prostate cancer (PCa) is the second leading cause of cancer-related deaths of men. BMI1, a member of PcG family of proteins, has been implicated in the pathogenesis of prostate cancer, and disturbed profile of microRNAs (miRNAs) has been found in prostate cancer tissues. How BMI1 is regulated by miRNAs is unclear. In this study, we screened 18 miRNAs that potentially repress the expression of BMI1 using a dual luciferase system and found that 12 miRNAs could bind with the 3'UTR of *BMI1* mRNA. Detected using qRT-PCR, we found the expression of miR-221, -15a, and -30d was significantly reduced in prostate cancer tissues. Subsequent functional study indicated that miR-221 and miR-30d can repress prostate cancer cell proliferation, and this effect can be partially rescued by BMI1 overexpression. Our study constructs the relation between downregulated miR-221, -30d, and prostate cancer pathogenesis. These results indicate that MiR-221 and miR-30d are candidate tumor suppressor miRNAs in prostate cancer and therefore serve as potential clinical classification markers and therapeutic targets for human prostate cancer.

Key words: miRNA, prostate cancer, BMI1, cell proliferation