

miR-578 表达上调对胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响及其与 PREX2a 的相关性分析*

张 祥,王垒垒,姚俊朝,赵永辉,李贺扬,刘旭光,龙银波,刘 晨,王 鹏
(河北省沧州市中心医院神经外科 061000)

[摘要] **目的** 探讨上调 miR-578 对胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响及其与 PREX2a 的相关性。**方法** 采取 Western blot 和 qPCR 两种方法检测不同级别的人脑胶质细胞瘤组织及正常脑组织标本中 miR-578 相对表达量。选取人恶性胶质瘤 U87、U251 细胞系进行 miR-578 对人脑恶性胶质瘤细胞增殖和凋亡影响的体外实验研究,分为 miR-578 类似物组及阴性序列组。qPCR 及 Western Blot 分别检测转染后 48 h 的胶质瘤细胞中 miR-578 和 PREX2a 的表达,平板克隆形成实验检测转染后胶质瘤细胞克隆形成数目,流式细胞术检测胶质瘤细胞凋亡情况。噻唑蓝(MTT)法检测胶质瘤细胞 24、48、72 h 时的相对生存活力。**结果** qPCR 结果显示胶质瘤组织标本中 miR-578 的相对表达量较正常脑组织标本明显降低($P < 0.01$)。与阴性序列组比较,miR-578 类似物组 U87、U251 胶质瘤细胞的 miR-578 表达明显升高($P < 0.05$),miR-578 的直接作用底物(PREX2a)表达则明显下降($P < 0.05$)。MTT 实验检测转染后 48 h 的 miR-578 类似物组 U87、U251 胶质瘤细胞在 24、48、72 h 的生存能力较阴性序列组明显降低($P < 0.05$)。平板克隆形成实验显示 miR-578 类似物组 U87、U251 胶质瘤细胞克隆数较阴性序列组明显减少($P < 0.05$)。流式细胞术检测 miR-578 类似物组 U87、U251 胶质瘤细胞的凋亡能力较阴性序列组明显增强($P < 0.05$)。**结论** miR-578 在胶质瘤细胞增殖和凋亡中发挥了明显的负性生物学作用,该过程可能与 PREX2a 相关。

[关键词] 胶质瘤;miR-578;PREX2a;增殖;凋亡

[中图法分类号] R651

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)05-0752-04

Effect of up-regulating miR-578 expression in glioma cell on its proliferation and apoptosis*

ZHANG Xiang, WANG Leilei, YAO Junzhao, ZHAO Yonghui, LI Heyang, LIU Xuguang,
LONG Yinbo, LIU Chen, WANG Peng

(Department of Neurosurgery, Cangzhou Municipal Central Hospital, Cangzhou, Heibei 061000 China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of up-regulating microRNA-578(miR-578) on the proliferation and apoptosis of glioma cells and its relationship with PREX2a. **Methods** The relative expression levels of miR-578 in different grades of human brain glioma cell tissue and normal brain tissue samples were detected by adopting Western blot and qRT-PCR. The human malignant glioma U87 and U251 cell lines were selected to conduct the in vitro experiment for the effect of miR-578 on the proliferation and apoptosis of human malignant glioma cells. The experiments were divided into two groups, the miR-578 analogue group and negative control group. The expression of miR-578 in glioma cells after transfection for 48 h was detected by qRT-PCR and the expression of PREX2a in glioma cells was detected by Western blot. The plate colony formation assay was used to detect the number of glioma cells clone formation in the two groups of glioma cells at 48 h after transfection. The apoptosis situation of glioma cells was detected by flow cytometry. The relative survival vitality of glioma cells at 24, 48, 72 h after transfection were detected by MTT assay. **Results** The qPCR results showed that the relative expression level of miR-578 in glioma tissue sample was significantly decreased compared with the normal brain tissue sample ($P < 0.01$). Compared the negative sequence group, the miR-578 expression of U87 and U251 glioma cells in the miR-578 mimics group was significantly increased, but the miR-578 direct action substrate PREX2a expression was significantly declined ($P < 0.05$). In the MTT experiment detection, the U87 and U251 glioma cells survival ability at 24, 48, 72 h in the miR-578 mimics group at 48 h after transfection was significantly decreased compared with the negative sequence group. The plate clone experiment showed that the cloned number of miR-578 mimics group U87 and U251 was significantly decreased compared with the negative sequence group ($P < 0.05$). In the cytometry detection, U87 and U251 glioma

cells apoptosis ability in the miR-578 mimics group was significantly increased compared with the genitive sequence group ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-578 plays a significant negative biological effect in the proliferation and apoptosis of glioma cells and this process may be associated with PREX2a.

[Key words] glioma; miR-578; PREX2a; proliferation; apoptosis

微 RNA (microRNA, miRNA) 是一种长 17~25 个核苷酸的单链内源性的非编码 RNA, 其可通过与靶基因的 3'UTR 区互补配对, 指导 miRNP 复合体对靶基因 mRNA 进行切割或者翻译抑制; 也可以通过类似 siRNA 的 RNA 干扰途径, 对基因表达进行抑制性调控^[1-2]。它们在许多正常生物学行为如细胞生长、增殖及凋亡等过程中发挥重要作用^[3]。研究发现, miR-578 在 BRCA1/2 相关乳腺癌中表达下调且可影响血管内皮生长因子、黏着斑激酶及缺氧诱导因子等信号通路^[4]。PREX2a 作为一种肿瘤相关蛋白, 通过抑制同源性磷酸酶-张力蛋白活性在包括脑胶质瘤等多种恶性肿瘤的发生、发展中发挥生物学活性^[5]。胶质瘤作为颅内最常见恶性肿瘤以无限增殖及向周围正常脑组织浸润而著称, 而 miR-578 在其发生、发展中所发挥的作用仍未有报道, 本研究旨在探讨 miR-578 对脑胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑胶质瘤组织及正常脑组织分别取自沧州市中心医院神经外科脑胶质瘤及癫痫手术治疗患者, 其中正常脑组织 8 例, 不同级别的脑胶质瘤组织 56 例, 其中 II 级 18 例、III 级 15 例、IV 级 23 例。人胶质瘤 U87、U251 细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库, 由沧州市中心医院神经病学研究所冻存。miR-578 类似物序列 (5'-AAT GCT ATT ATA AAC CCA TT-3') 及阴性对照序列 (5'-ACT ACC GTT GTT ATA GGT G-3') 由广州瑞博生物公司合成。Trizol 试剂购自美国英杰公司, 用于实施 qPCR 的 miR-578 定量试剂盒购自上海吉玛公司, GAPDH 单抗及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 小牛血清和 DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司, 脂质体 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司, 膜联蛋白 v-fitc 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司, PREX2a (miR-578 的直接作用底物) 抗体购自美国 Abzoom 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 胶质瘤细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液置于 37 °C 5% CO₂ 相对湿度条件下的培养箱中培养, 转染时将 2×10^5 个 U87、U251 接种在 6 孔板内, 待 50%~80% 细胞融合后, 经 Lipofectamine2000 介导将 miR-578 类似物和阴性序列分别转染到上述胶质瘤细胞中。转染后 6 h 更换完全培养液继续培养 48 h, 收集细胞用于实验研究。

1.2.2 qPCR 采用 Trizol 法提取脑胶质瘤组织与

正常对照脑组织标本中总 RNA, 转染后 48 h 的 miR-578 类似物和阴性序列组 U87、U251 细胞总 RNA。分别用 miR-578 和 U6 引物于荧光定量 PCR 仪 (美国, 7500 型 ABI) 进行 Real-time PCR 扩增, 以 U6 作内参。选用 20 μ L 扩增体系, 反应条件: 95 °C 3 min 循环 1 次; 95 °C 12 s, 62 °C 60 s, 循环 40 次, 每 2 秒升高 0.2 °C, 循环 1 次。按相对表达倍数 = $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ 计算各组织及细胞中 miR-578 和内参 U6 的相对表达量。

1.2.3 Western blot U87、U251 细胞转染后继续培养 48 h, 提取总蛋白。取 150 μ g 上样量, 100 μ g/L 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离蛋白质, 电转移至聚偏氟乙烯膜 (PVDF)。0.05 g/mL 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入兔抗人 PREX2a 一抗 (1:1 000) 4 °C 过夜, 加入小鼠抗兔 IgG 二抗 (1:1 000) 孵育 1 h。结果采用凝胶成像分析系统扫描。

1.2.4 噻唑蓝 (MTT) 法 每组细胞按 2×10^3 个细胞 (每孔 200 μ L) 接种到 96 孔板, 分别于接种后 24、48、72 h 每孔加入 MTT 溶液 20 μ L (5 mg/mL), 37 °C 条件下继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加二甲亚砜 (DMSO) 200 μ L, 振荡 15 min, 紫外分光光度计 570 nm 波长测各孔吸光度值, 每组设 6 个复孔。

1.2.5 细胞平板克隆形成实验 转染后 48 h, 制备单细胞悬液, 计数, 取 2×10^3 个细胞接种于 60 mm 的培养皿中。培养 2 周后, 弃去培养液, PBS 轻洗 2 次, 甲醇固定 15 min, 0.5% 的结晶紫染色, 显微镜下观察, 计数细胞克隆。克隆形成率 = (克隆形成数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.6 流式细胞术 转染后 48 h 用胰酶消化成单细胞悬液, 收集至 1.5 mL EP 管中, PBS (0.01 mol/L, pH7.2) 洗涤细胞 2 次, 4 °C 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 75% 乙醇 1 mL、4 °C 固定 18 h 以上。200 μ L RNAase (1 mg/mL)、37 °C 孵育 30 min, 800 μ L 碘化丙啶 (PI) 染色液混匀后 4 °C 避光染色 30 min, 应用 FACS Calibur (美国 BD 公司) 流式细胞仪在 488 nm 检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.00 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 *t* 检验, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织中 miR-578 表达情况 qPCR 结果显示, WHO IV 级胶质瘤组织中 miR-578 表达水平为 (18.20 \pm 2.53)%, WHO III 级胶质瘤组织中 miR-578

表达水平为(36.20±3.34)%,WHO II 级胶质瘤组织中 miR-578 表达水平为(51.40±4.30)%;正常脑组织中 miR-578 表达水平为(59.60±4.31)%。miR-578 表达与胶质瘤级别呈负相关($r=0.912, P=0.00$);胶质瘤组织中 miR-578 水平较正常脑组织明显降低($P<0.01$),见图 1。

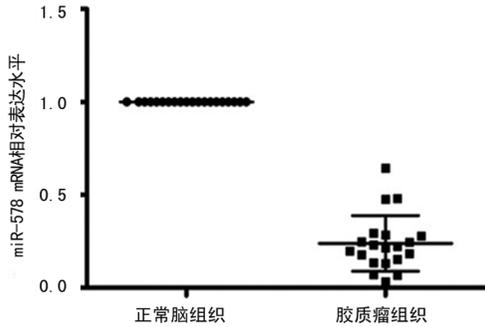


图 1 qPCR 胶质瘤和正常脑组织中 miR-578 表达情况

2.2 胶质瘤细胞中 miR-578、PREX2a 表达情况 各细胞组的 qPCR 检测到 miR-578 类似物组 miR-578 水平较转入阴性序列组明显升高($P<0.05$),见图 2; Western Blot 检测到各细胞组的 miR-578 类似物组 miR-578 的直接作用底物 PREX2a 表达较阴性序列组明显下降($P<0.05$),见图 2、3。

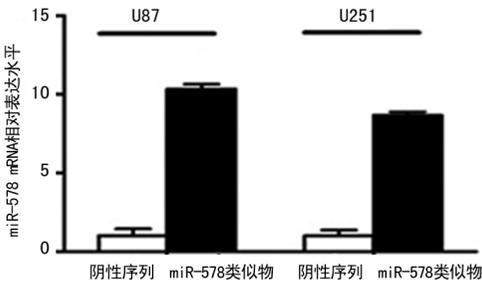


图 2 胶质瘤细胞 miR-578 相对表达情况

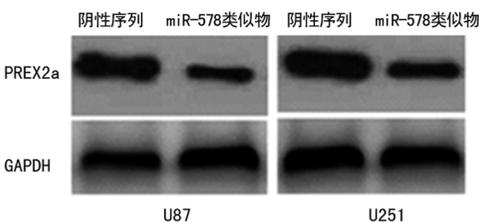


图 3 胶质瘤细胞 PREX2a 表达情况

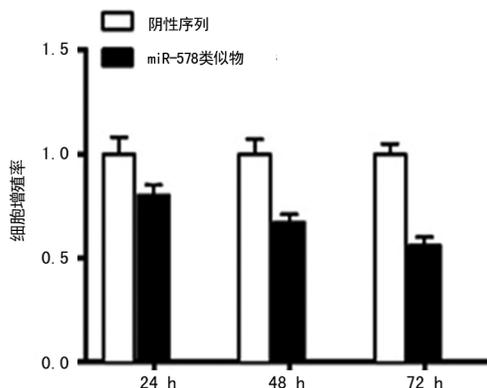


图 4 U87 胶质瘤细胞生存能力情况

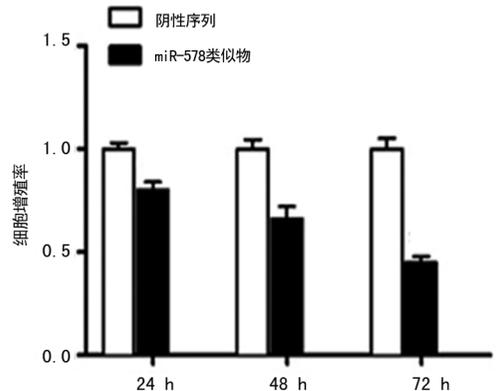
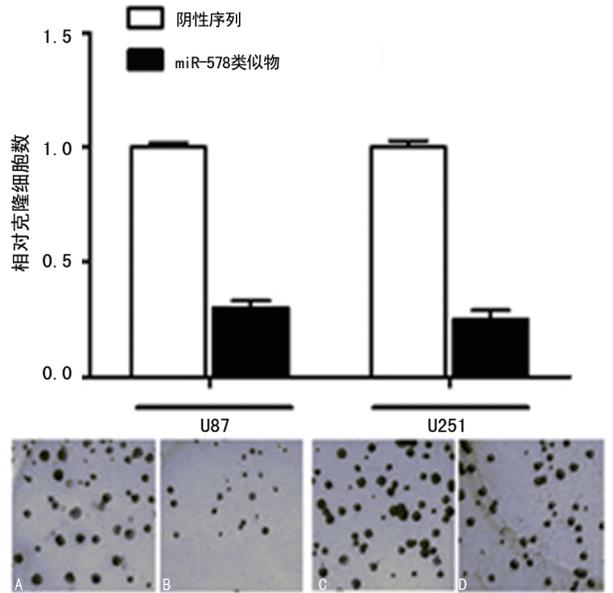


图 5 U251 胶质瘤细胞生存能力情况



A:U87 细胞阴性序列组;B:U87 细胞 miR-578 类似物组;C:U251 细胞阴性序列组;D:U251 细胞 miR-578 类似物组

图 6 胶质瘤细胞细胞克隆形成率情况

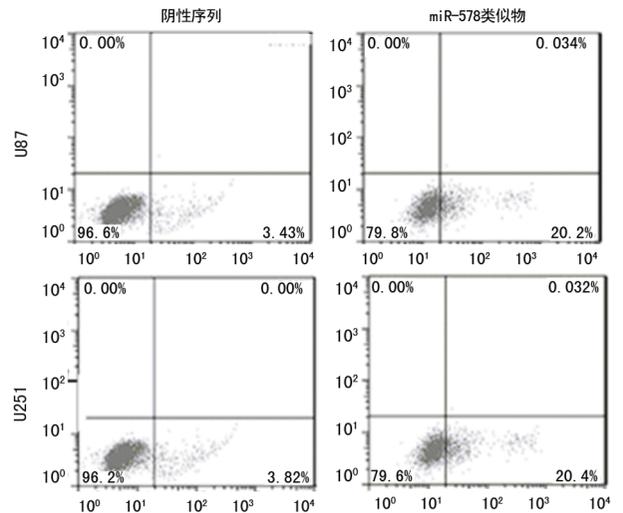


图 7 胶质瘤细胞凋亡情况

2.2 转入 miR-578 类似物后对胶质瘤细胞增殖能力的影响 与转入阴性序列组比,U87 细胞系的 miR-578 类似物组胶质瘤细胞在 24、48、72 h 的增殖率分别为(81.65±4.03)%、(68.38±3.67)%、(53.67±

3.28)%, U251 胶质瘤细胞在 3 个时间点的增殖率则分别为 (79.67 ± 3.06)%、(61.87 ± 4.66)%、(45.39 ± 2.84)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4、5。

2.3 细胞平板克隆形成实验 与阴性序列组比较, 转入 miR-578 类似物组 U87 细胞克隆形成率为 (37.67 ± 2.89)%、U251 细胞为 (34.67 ± 3.26)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 6。

2.4 流式细胞技术检测情况 与阴性序列组比较, U87、U251 胶质瘤细胞的 miR-578 类似物组凋亡率明显增加 ($P < 0.05$), 见图 7。

3 讨论

恶性胶质瘤是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤, 属人类预后极差的肿瘤之一^[6-7]。随着多模态三维影像融合与神经导航、神经电生理监测与唤醒手术、术中实时成像等技术在临床中逐步应用; 替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 联合常规分割适形外照射的同步放化疗及 TMZ 序贯化疗成为恶性脑胶质瘤的标准治疗方案; 恶性脑胶质瘤局部治疗的手段逐渐丰富, 包括卡莫司汀缓释膜片及对流增强的局部化疗, 推高了恶性脑胶质瘤的局部化疗药物浓度, 使得脑胶质瘤治疗方法逐步增多, 但其中位生存期仍不足 18 个月^[8-10]。因此如何控制脑胶质瘤细胞增殖及迁移成为其治疗的重要研究方向。

miRNA 作为与正常及病理情况下细胞增殖、运动等生物学特性密切相关的内源性非编码 RNA 成为近年研究的重点^[11]。研究发现, 众多 miRNA 在胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭及肿瘤细胞表型转化中发挥重要作用, 如 miR-451 在胶质瘤细胞增殖-迁移表型转换中发挥重要作用; miR29C、miR134 等与胶质瘤细胞增殖密切相关。研究表明, PREX2a 作为一种鸟氨酸交换因子 (GEF), 其通过促进肿瘤血管生成促进多种恶性肿瘤的转移且在胶质瘤表型转换中发挥重要作用, 提示可能参与恶性肿瘤的发生和发展^[12-13]。

本研究 Western Blot 结果显示, miR-578 在正常脑组织中较脑胶质瘤组织中表达明显升高, 且与胶质瘤级别呈负相关。qPCR 检测结果显示: 胶质瘤细胞中 miR-578 水平明显较正常脑组织降低, 表明其在胶质瘤细胞中表达降低。转入 miR-578 类似物后胶质瘤细胞中 miR-578 水平明显升高, PREX2a 明显下降。miR-578 过表达的胶质瘤细胞增殖活性明显下降, 表明 miR-578 在胶质瘤细胞增殖中起到负性调控作用。流式细胞技术检测胶质瘤细胞凋亡结果显示转入外源性 miR-578 类似物后, 胶质瘤细胞更容易凋亡, 表明 miRNA-578 表达低的胶质瘤细胞生存能力更强。

内含子中编码的 miRNA 作为一种细胞内生因子, 对细胞生物学过程的调节比转录调节效果更快并且是可逆的^[14]。以上研究结果表明, 胶质瘤细胞中下

调的 miR-578 可促进细胞增殖及增强胶质瘤细胞的生存能力, 其机制可能与调节 PREX2a 相关。提示 miR-578 可作为对胶质瘤复发、转移及预后的预测指标, 同时也为人脑胶质瘤治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] BACHMAYR-HEYDA A, AUER K, SUKHBAATAR N, et al. Small RNAs and the competing endogenous RNA network in high grade serous ovarian cancer tumor spread[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 39640-39653.
- [2] BAO L D, WANG L L, GUO M W, et al. Role of microRNA-4458 in patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology letters*[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3958-3966.
- [3] BARTELS C L, TSONGALIS G J. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 623-631.
- [4] DANZA K, DE SUMMA S, PINTO R, et al. MiR-578 and miR-573 as potential players in BRCA-related breast cancer angiogenesis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(1): 471-483.
- [5] LIU L, LIU Z X, WANG H, et al. Knockdown of PREX2a inhibits the malignant phenotype of glioma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 2301-2307.
- [6] GOODENBERGER M L, JENKINS R B. Genetics of adult glioma[J]. *Cancer Genet*, 2012, 205(12): 613-621.
- [7] AGRAWAL S. Diabetes mellitus type 1 with mixed connective tissue diseases[J]. *J Assoc Physicians India*, 2016, 64(1): 102.
- [8] NABORS L B, MIKKELSEN T, HEGI M E, et al. A safety run-in and randomized phase 2 study of cilengitide combined with chemoradiation for newly diagnosed glioblastoma (NABTT 0306) [J]. *Cancer*, 2012, 118(22): 5601-5607.
- [9] EISELE G, WICK A, EISELE A C, et al. Cilengitide treatment of newly diagnosed glioblastoma patients does not alter patterns of progression[J]. *J Neurooncol*, 2014, 117(1): 141-145.
- [10] 黄玉宝, 童鹿青, 张辰, 等. NSC23766, Y-27632 对 3D 水凝胶中胶质瘤细胞侵袭迁移及整合素表达的影响[J]. *中华神经医学杂志*, 2017, 16(7): 665-670.
- [11] DIETRICH P, BOSSERHOFF A K. Melanoma sponge on pigmentation gene to reduce tumour-suppressive microRNAs[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2018, 31(3): 350-351.
- [12] 杨学军, 海龙, 于圣平. 恶性胶质瘤侵袭迁移的生物学行为研究[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2018, 18(1): 36-40.
- [13] 丁超. RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRP) 与非编码 RNA (ncRNA) 调控的研究进展[J]. *复旦学报(医学版)*, 2015, 42(2): 256-261.
- [14] 王轩, 韩磊, 张安玲, 等. 腺病毒载体介导 shRNAs 共调控胶质母细胞瘤细胞 miR-221/222 的表达及功能的体外研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2016, 15(3): 224-230.