

. 实验研究 .

miR-370-3p 对胶质母细胞瘤 U87-MG 细胞株增殖能力的影响

彭泽生 田道锋 张申起 陈谦学

【摘要】目的 探讨微小 RNA-370-3p(miR-370-3p)对人脑胶质瘤细胞系 U87-MG 增殖能力的影响及其机制。**方法** 将常规培养的 U87-MG 细胞分为空白组、无义序列转染组和模拟物转染组,后两组分别转染 miRNA 无义序列及 miR-370-3p 模拟物, qRT-PCR 法检测其转染效率,免疫印迹法检测转染细胞叉头框蛋白 M1(FoxM1)的表达;采用 EdU 法评估细胞的增殖能力,采用平板克隆形成实验检测细胞的增殖能力。**结果** 与空白组和无义序列转染组比较,模拟物转染组细胞 miR-370-3p 表达显著增加($P<0.05$),而 FoxM1 的蛋白表达显著减少($P<0.05$);而且模拟物转染组 U87-MG 细胞增殖能力及克隆形成率均明显减少($P<0.05$)。**结论** miR-370-3p 能够抑制 U87-MG 细胞的增殖能力,可能与减少 FoxM1 的表达有关。

【关键词】 胶质瘤;U87-MG 细胞;微小 RNA;miR-370-3p;叉头框蛋白 M1;细胞增殖

【文章编号】 1009-153X(2016)04-0223-04

【文献标志码】 A

【中国图书资料分类号】 R 739.41; R 73-34

Effects of MircoRNA-370-3p on proliferation of glioma cell line U87-MG and its potential mechanism

PENG Ze-sheng, TIAN Dao-feng, ZHANG Shen-qi, CHEN Qian-xue. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of MircoRNA (miRNA) -370-3p on the proliferation of U87-MG glioblastoma cells and its mechanism. **Methods** The cultured U87-MG cells were divided into blank group, mimics transfection group (transfected with Has-miRNA-370-3p mimics) and negative control group (transfected with miRNA-ctrl). Transfections of Has-miRNA-37-3p mimics were mediated by lipofectamine 2000 U87-MG cells. The transfection efficiency were detected by quantative real-time PCR. The expression of Forkhead M1 (FoxM1) protein were investigated by Western blotting 48 h after the transfection. The cell proliferation ability was evaluated by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation and colony formation assaies 72 h after the transfection. **Results** The expression of miRNA-370-3p increased and FoxM1 protein expression decreased significantly in U87-MG cells in the mimics transfection group compared with those in the blank group and negative control group. EdU assay showed that the short-term ability of the U87-MG cells proliferation was significantly lower in the mimics transfected group than those in the other two groups ($P<0.05$). The colony formation assay showed that the long-term ability of the U87-MG cells proliferation was significantly lower in the mimics transfection group than those in the other two groups ($P<0.05$). **Conclusion** It is suggested that upregulation of miRNA-370-3p expression can inhibit proliferation of U87-MG cells, probably by downregulating expression of FoxM1.

【Key words】 Glioma; U 87-MG cells; MircoRNA-370-3p; Proliferation; FoxM1

恶性多形性胶质母细胞瘤生长速度快、术后易复发、病死率极高,95%未经治疗的患者生存期不超过 3 个月^[1]。肿瘤细胞的恶性增殖是其治疗效果差、术后易复发的重要原因之一^[2]。研究发现一些特殊的微小 RNA(microRNA, miRNA)与胶质瘤细胞的恶性增殖有关^[3,4]。本研究探讨 miR-370-3p 对胶质母细胞瘤 U87-MG 细胞株增殖的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑恶性胶质母细胞瘤 U87-MG 细胞株购自中国科学院上海生科院细胞库。DMEM 高糖培养基及胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;青、链霉素混合液及结晶紫染色液购自武汉谷歌生物公司;BCA 试剂盒购于上海碧云天生物有限公司;转染试剂 Lipofectamine 2000 及 mRNA 抽提试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;MicroRNA 过表达模拟物 Has-miR-370-3p mimics、模拟物无义序列 miR-ctrl mimics 以及 Cell-Light™ EdU Apollo®567 In Vitro Imaging Kit 购自广州锐博生物科技有限公司;All-in-One™ miRNA qRT-PCR

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.04.010

基金项目:湖北省自然科学基金(2011CDB493);湖北省卫生厅科研项目(JX6B15)

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科(彭泽生、田道锋、张申起、陈谦学)

通讯作者:田道锋, E-mail: tiandaofeng@hotmail.com

Detection Kit、miR-370-3p 引物及内参 U6 引物购自美国 Gene Copoeia 公司；叉头框蛋白 M1 (forkhead box M1, FoxM1) 兔抗购自美国 Abcam 公司；GAPDH 鼠抗购自美国 Santa Cruz 公司；羊抗兔及猴抗鼠 Odyssey 专用荧光二抗购自美国 Li-cor 公司。

1.2 细胞培养及细胞转染 U87-MG 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青、链霉素的 DMEM 培养基培养，每 3~4 d 传代 1 次。将对数生长期贴壁的 U87-MG 细胞用胰蛋白酶消化，以 3×10^5 个/孔均匀接种到 6 孔板中。设空白组、无义序列转染组、模拟物转染组，每组 3 个复孔。次日细胞融合率达 70% 时，用 Lipofectamine 2000 介导 miR-370-3p mimics 以及 miR-ctrl 转染，转染步骤按 Lipofectamine 2000 说明书进行。所有寡聚核苷酸的终浓度均为 50 nmol/L。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-370-3p 的表达 将转染完成的细胞常规培养 48 h 后弃培养基，预冷的 PBS 洗 3 次后加入加入 1 ml TRIzol，平放静置 5 min 后，严格按照 RNA 抽提步骤抽提，分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度，吸光度 A260/A280 比值为 1.8~2.0 方可用于检测。依照 All-in-One™ miRNA 检测试剂盒说明书步骤操作，ABI7500 系统检测转染细胞中 miR-370-3p 表达，U6 作为内参。每组实验 3 重复，检测结果使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析。

1.4 免疫印迹法检测 FoxM1 蛋白表达 转染 72 h 后，用细胞裂解液 RIPA 冰上提取蛋白，BCA 法检测蛋白含量后加入缓冲液并煮沸 10 min。取 30 μg 蛋白用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离，将分离后的蛋白 200 mA 恒电流转 1.5 h 至聚偏氟乙烯膜上。5% 脱脂牛奶封闭 1 h，放入一抗 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 10 min，羊抗兔及猴抗鼠 Odyssey 专用荧光二抗孵育 1 h 后再用 TBST 洗膜 5 min×3 次。最后使用 Odyssey 系统扫膜并分析结果，GAPDH 作为内参。

1.5 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 检测细胞增殖 细胞转染 48 h 后，胰酶消化，以 5×10^5 个/孔爬片接种到六孔板中，待细胞贴壁后换用含 10 μmol/L EdU 的培养基继续培养 24 h。弃培养基，PBS 清洗细胞 2 次，将未渗入 DNA 的 EdU 洗脱。4% 多聚甲醛室温固定 10 min 后，按照 Cell-Light™ EdU Apollo® 567 试剂盒说明书步骤避光进行 EdU 及 DNA 染色，抗荧光淬灭剂封片。使用正置荧光显微镜观察结果，550 nm 处观察 Apollo® 567，350 nm 处观察 Hoechst33342。200 倍下随机选取 5 个视野，分别记录 Apollo® 567 及 Hoechst33342 显色细胞核个数，每组实验重复 3 次。使用 EdU 阳

性率评估细胞短期增殖能力。EdU 阳性率=同一视野下 Apollo® 567 染核个数/Hoechst33342 染核个数。
1.6 平板克隆形成实验 转染 24 h 后，使用胰酶消化细胞，以 100 个/孔接种到六孔板中，每 3 天换液一次，常规培养 2 周。待显微镜下观察到克隆形成后，弃培养基，PBS 小心清洗 1 次。使用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min，随后使用结晶紫染色 1 min。PBS 小心洗去结晶紫染色液，显微镜下记录细胞数大于 50 个的克隆。克隆形成率反应细胞长期增殖的能力。
1.7 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用方差分析和 LSD-t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模拟物对 U87-MG 细胞 miR-370-3p 表达水平及 FoxM1 蛋白表达的影响 与空白组、无义序列转染组比较，模拟物转染组 miR-370-3p 表达量显著增加 ($P < 0.05$; 图 1A)。该转染效率满足后续实验要求。与空白组和无义序列转染组比较，模拟物转染组 FoxM1 蛋白表达水平明显减少 ($P < 0.05$; 图 1B)。

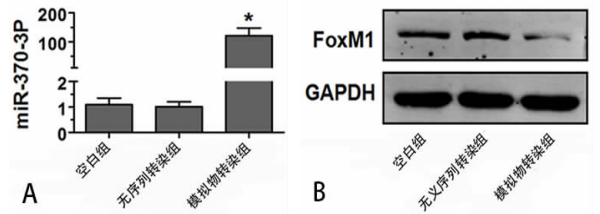


图 1 miR-370-3p 模拟物对 U87 细胞 miR-370-3p 水平及其调节靶点 FoxM1 表达的影响

A. 3 组 miR-370-3p 的相对表达水平比较，U6 作为内参，与空白组和无义序列转染组相比，* $P < 0.05$; B. 3 组 FoxM1 蛋白电泳图，GAPDH 作为内参

2.2 miR-370-3p 对 U87-MG 细胞增殖影响 与空白组和无义序列转染组比较，模拟物转染组细胞增殖能力明显下降 ($P < 0.05$; 图 2)。

2.3 miR-370-3p 对 U87-MG 细胞克隆形成能力的影响 与空白组和无义序列转染组比较，模拟物转染组所形成的克隆集落明显减少 ($P < 0.05$; 图 3)。说明 miR-370-3p 能够明显抑制 U87-MG 细胞的克隆形成能力，降低肿瘤细胞的远期增殖能力。

3 讨论

miRNA 是一类内生的、长度约 20 个核苷酸的非编码短链 RNA^[5]，通过靶向识别并部分互补结合到目的 mRNA 的 3' 端非编码区，降解该 mRNA 或抑制

其蛋白质翻译,从而发挥特定的生物学作用^[6]。每个 miRNA 都可以调控多个靶基因,而一个基因也可以受到多个不同的 miRNA 调控。据推测,这种复杂的调控网络约覆盖了人类三分之一的基因^[7],故 miRNA 与人类的生理病理进程存在着广泛的联系。miRNA 与肿瘤的发生发展密切相关,约 50% 的 miRNAs 位于或靠近基因组中肿瘤相关的脆性区域,即经常发生缺失、扩增、易位的染色体片段^[8];其中, miR-370-3p 位于人类 14 号染色体的 DLK1/DIO3 区域,该区域已被证实为癌症相关的基因组区域^[9]。研究发现,miR-370-3p 低表达能够抑制胆管癌^[10]、急性髓细胞性白血病^[11]、口腔鳞状细胞癌^[12]、肝细胞癌^[13]和卵巢癌^[14]等肿瘤细胞的部分恶性生物学特性。而在胶质瘤中,特别是恶性程度最高的胶质母细胞瘤中,miR-370-3p 的作用尚不清楚。

miRNA 模拟物能模拟细胞中成熟 miRNA 的高水平表达,从而增强内源性 miRNA 的调控作用。我们通过脂质体转染法将 miR-370-3p 模拟物常规转染入 U87-MG 细胞株中,获得了能够高表达

has-miR-370-3p 的 U87-MG 细胞。FoxM1 是 miR-370-3p 的已知靶点,例如在慢性粒细胞白血病^[15]、急性髓细胞性白血病^[11]、喉鳞状细胞癌^[16]、幽门螺杆菌诱导的胃癌^[17]中,均发现 miR-370-3p 可以调节 FoxM1 的表达。然而,不同肿瘤细胞之间存在着相当明显的生物学特异性,同一个基因在不同的肿瘤细胞中也可能存在的表达差异、生物学功能差异,甚至还会存在变异;所以,我们使用免疫印迹法来验证 miR-370-3p 能否在胶质瘤细胞系 U87-MG 中调节 FoxM1 的表达,结果发现 miR-370-3p 可明显降低 FoxM1 的表达。这说明 U87-MG 细胞 miR-370-3p 水平的升高能够有效抑制 FoxM1 蛋白的表达。

FoxM1 是叉头蛋白家族的一员,在恶性胶质瘤细胞中高表达,是一种原癌基因表达产物^[18]。研究发现,FoxM1 与胶质瘤细胞的增殖密切相关。FoxM1 不但能够通过 FoxM1-Skp2-p27 信号通路引起 p27 蛋白泛素化,促进细胞增殖,还能通过 Sonic hedgehog 信号通路促进细胞分裂,加速细胞增殖^[19-20]。此外,FoxM1 还能结合 β -catenin,促进其在神经

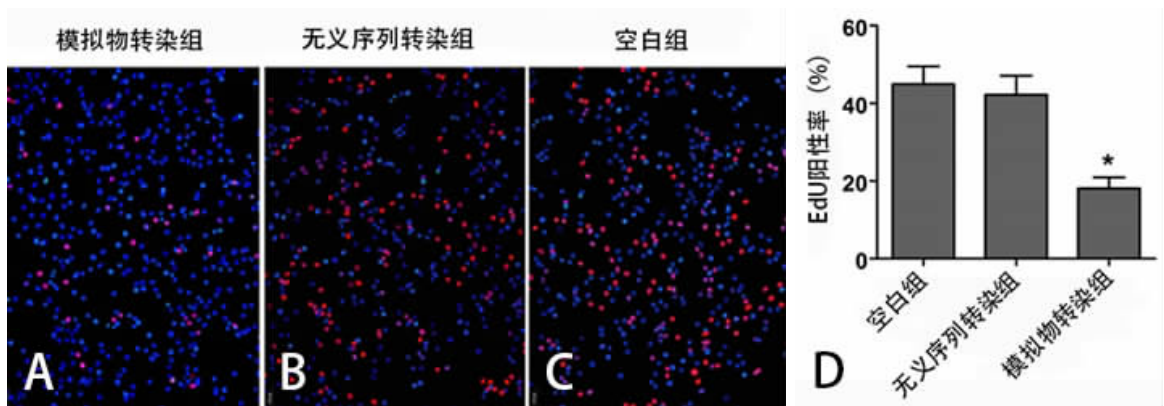


图2 3组细胞的增殖能力比较

A~C. 200 \times 荧光显微镜下观察细胞爬片的结果,红色代表Edu染色,蓝色代表Hoechst33342染色;D. 3组Edu阳性率比较,与空白组和无义序列转染组相比,* $P<0.05$

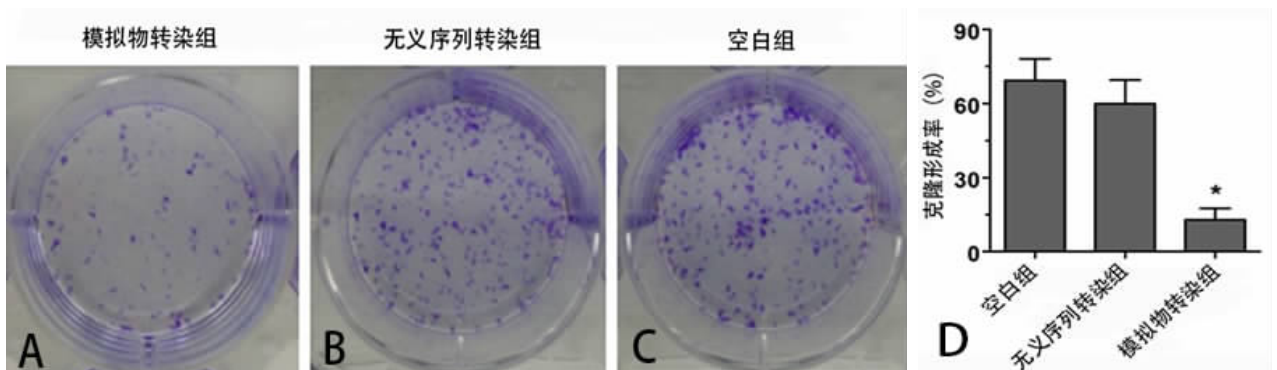


图3 平板克隆实验评估3组细胞间增殖能力

A~C. 3组细胞克隆形成情况肉眼观;D. 3组细胞克隆形成率比较,与空白组和无义序列转染组相比,* $P<0.05$

干细胞和胶质瘤干细胞中核转位,间接调节 Wnt/ β -catenin 信号通路下游靶基因,促进细胞增殖^[21]。我们发现 miR-370-3p 可反向调节 FoxM1 表达,所以我们猜想上调 miR-370-3p 表达可抑制 U87-MG 细胞增殖。为验证这一假设,我们使用 EdU 法比较各组间 U87-MG 细胞的增殖情况,结果发现上调 miR-370-3p 能够在短期内明显抑制 U87-MG 的增殖能力;最后,我们板克隆实验也发现 miR-370-3p 能够远期抑制 U87-MG 细胞的增殖能力。

总之,我们发现 miR-370-3p 能够影响胶质母细胞瘤 U87-MG 细胞株的增殖能力,可能是通过对原癌基因表达产物 FoxM1 蛋白的逆向调控实现的。

【参考文献】

[1] Surawicz TS, Davis F, Freels S, *et al.* Brain tumor survival: results from the National Cancer Data Base[J]. *J Neurooncol*, 1998, 40(2): 151-160.

[2] Taylor L. Diagnosis, treatment, and prognosis of glioma: five new things [J]. *Neurology*, 2010, 75(18 Suppl 1): S28-S32.

[3] Lu J, Getz G, Miska EA, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838.

[4] Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(34): 5848-5856.

[5] Bartel D. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.

[6] Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.

[7] Lewis BP, Burge CB, Bartel D. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.

[8] Calin G A, Sevignani C, Dumitru CD, *et al.* Human micro RNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2999-3004.

[9] Benetatos L, Hatzimichael E, Londin E, *et al.* The micro RNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(5): 795-814.

[10] Meng F, Wehbe-Janek H, Henson R, *et al.* Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant

human cholangiocytes [J]. *Oncogene*, 2008, 27(3): 378-386.

[11] Zhang X, Zeng J, Zhou M, *et al.* The tumor suppressive role of miRNA-370 by targeting FoxM1 in acute myeloid leukemia [J]. *Mol Cancer*, 2012, 11: 56.

[12] Chang KW, Chu TH, Gong NR, *et al.* miR-370 modulates insulin receptor substrate-1 expression and inhibits the tumor phenotypes of oral carcinoma [J]. *Oral Dis*, 2013, 19(6): 611-619.

[13] Xu WP, Yi M, Li QQ, *et al.* Perturbation of MicroRNA-370/Lin-28 homolog A/nuclear factor kappa B regulatory circuit contributes to the development of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2013, 58(6): 1977-1991.

[14] Chen XP, Chen YG, Lan JY, *et al.* MicroRNA-370 suppresses proliferation and promotes endometrioid ovarian cancer chemosensitivity to cDDP by negatively regulating ENG [J]. *Cancer Lett*, 2014, 353(2): 201-210.

[15] Zhou M, Zeng J, Wang X, *et al.* MiR-370 sensitizes chronic myeloid leukemia K562 cells to homoharringtonine by targeting Forkhead box M1 [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 265.

[16] Yungang W, Xiaoyu L, Pang T, *et al.* MiR-370 targeted Fox M1 functions as a tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(2): 149-154.

[17] Feng Y, Wang L, Zeng J, *et al.* FoxM1 is overexpressed in Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis and is negatively regulated by miR-370 [J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(8): 834-844.

[18] Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(11): 847-859.

[19] Liu M, Dai B, Kang SH, *et al.* FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3593-3602.

[20] Teh MT, Wong ST, Neil GW, *et al.* FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(16): 4773-4780.

[21] Zhang N, Wei P, Gong A, *et al.* FoxM1 promotes beta-catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(4): 427-442.

(2015-10-18 收稿, 2015-12-13 修回)