

miR-221 在脑胶质瘤中的表达及调控关系

魏川江 刘 娴 王 策 董白晶 常英男 张 尧 赵天书

【摘要】目的 探讨 miR-221 在脑胶质瘤组织中的表达变化及其对胶质瘤细胞系细胞增殖的影响。**方法** 收集 2014 年 1 月至 2015 年 8 月手术切除的胶质瘤标本 123 例及颅脑损伤行内减压的正常脑组织 36 例,荧光定量 PCR 法检测 miR-221 表达水平。按照 miR-221 的表达水平将 123 例胶质瘤病人分为高表达组(miR-221/U6 的相对表达量 ≥ 0.6 , 72 例)和低表达组(miR-221/U6 的相对表达量 < 0.6 , 51 例),采用 Kplan-Meier 法分析 miR-221 表达水平与胶质瘤生存时间的关系。MTT 法检测 miR-221 对胶质瘤细胞系 U251、U87 细胞增殖的影响,双荧光试验和蛋白印迹法、PCR 方法筛选和验证 miR-221 的靶基因。**结果** 胶质瘤组织 miR-221 表达水平明显高于正常脑组织($P<0.01$);高级别胶质瘤 miR-221 表达水平明显低于低级别胶质瘤($P<0.01$)。miR-221 低表达胶质瘤病人生存时间较高表达病人明显延长($P<0.05$)。敲除 miR-221 基因显著抑制 U251、U87 细胞增殖($P<0.01$);而且,U251、U87 细胞敲除 miR-221 基因后,正性调节区锌指蛋白 2(PRDM2)mRNA 和蛋白表达水平明显增高($P<0.01$)。**结论** miR-221 在胶质瘤中异常高表达,可作为胶质瘤预后判断的生物标志物;PRDM2 可能是 miR-221 的靶基因。

【关键词】 胶质瘤;miR-221;正性调节区锌指蛋白 2;基因表达

【文章编号】 1009-153X(2017)07-0463-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Expression of miRNA - 221 in brain gliomas and its effects on glioma cell line poliferation

WEI Chuan-jiang¹, LIU Xian², WANG Ce², DONG Bai-jing², CHANG Ying-nan², ZHANG Yao³, ZHAO Tian-shu². 1. Department of Neurosurgery, People's Hospital of Guangming New District, Shenzheng 518107, China; 2. Department of Neurosurgery, The Fourth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 3. Department of Neurosurgery, Beijing Sanbo Brain Hospital, No.11 Clinical College of Medicine, Capital Medical University, Beijing 100093, China

【Abstract】 Objective To explore the expression of miRNA-221 in human gliomas and its effect on glioma cell line proliferation. **Methods** The expression levels of miRNA-221 were determined by qRT-PCR in 123 samples of glioma tissues and 36 samples of normal cerebral tissues. The effects of miRNA-221 on U87 and U251 cell proliferation were determined by MIT tests. Dual luciferase assay, qRT-PCR and western blot were used to validate the targets of miRNA-221. **Results** The expression level of miRNA-221 (0.62 ± 0.2) was significantly higher in the glioma tissues than that (0.37 ± 0.13) in the normal cerebral tissues ($P<0.01$). The survival time was significantly shorter in 72 glioma patients with higher expression of miRNA-221 than that in 51 glioma patients with lower expression of miRNA-221 after the operation ($P<0.01$). The over expression of miRNA-221 significantly promoted U251 and U87 cells proliferations ($P<0.05$). The depletion of miRNA-221 caused the increases in mRNA and protein of PRDM2 expressions ($P<0.05$) in the U251 and U87 cells. **Conclusions** The upregulation of miRNA-221 may be used as one of diagnostic indexes of human glioma. PRDM2 is one of target genes of miRNA-221.

【Key words】 Human glioma; MiRNA-221; Proliferation; Expression; PRDM2

脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,发病率高^[1,2]。胶质瘤对放、化疗敏感性低,易转移,高级别胶质瘤的诊治仍然是困扰临床医生的重大难题^[3,4]。微小 RNA(microRNA, miRNA)可通过与靶基因

mRNA 的 3'-UTR 结合的方式导致靶基因 mRNA 的降解或翻译的抑制,从而负调节靶基因的表达^[5],参与细胞多种生理、病理过程^[6-9]。目前已发现大量 miRNA,例如 miR-92b、miR-21、miR-221、miR-34a 以及 miR-218 等,与胶质瘤的发生发展具有紧密联系^[10,11],其中 miR-221 被认为在多种肿瘤的发生中起关键作用,被认为是肿瘤相关的关键 miRNA 之一^[12-16]。miR-221 在胶质瘤组织中异常高表达,并且 miR-221 可改变胶质瘤细胞的生物学特征,甚至影响肿瘤细胞对放、疗的敏感性^[17,18]。本研究通过检测 miR-221 在胶质瘤中的表达状态,探讨其在胶质瘤细胞中发挥作用的分子生物学机制,以便为胶质瘤

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2017.07.006
基金项目:黑龙江省卫生计生委科研课题(2016-129);哈尔滨市科技人才创新基金项目(2016RAQXJ173)
作者单位:518106 广东,深圳市光明新区人民医院神经外科(魏川江);150001 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第四医院神经外科(刘娴、王 策、董白晶、常英男、赵天书);100093 北京,北京三博脑科医院神经外科(张 尧)
通讯作者:赵天书,E-mail:zhaotianshufinmu@163.com

的诊治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本 收集2014年1月至2015年8月手术切除的胶质瘤标本123例,所有组织均经病理证实为脑胶质瘤,标本在取材后立即置于液氮中保存。123例中,男性72例,年龄33~70,平均 (48.78 ± 14.48) 岁;女性51例,年龄29~73岁,平均年龄 (46.3 ± 15.69) 岁。所有病人均为首次诊断的原发性神经胶质瘤,且为首次手术治疗。参照2007年WHO分级标准^[9],123例标本中,I级20例,II级26例,III级42例,IV级35例。对照组36例正常额叶组织标本,取自颅脑损伤内减压术的病人,确认伤前无神经系统肿瘤病史,病理检查证实为正常脑组织。该项研究经哈尔滨医科大学附属第四医院伦理委员会审核通过,均获得病人知情同意。

1.2 细胞系 人胶质母细胞瘤U87和U251为本实验室保存,使用含1%青霉素/链霉素和10%胎牛血清的RPMI1640培养基进行培养和传代。

1.3 核酸的提取 取约100 mg液氮保存的组织,在适量液氮的研钵中研磨成粉状;细胞系收集约 1×10^6 个细胞,PBS清洗。采用Trizol试剂提取总RNA,Nanodrop检测浓度和纯度后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 miR-221表达检测 采用Tapman方法。取总RNA 1 μg ,采用microRNA反转录试剂盒(TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, catalog#: 4366596.)按照说明合成microRNA cDNA。随后用miR-221检测试剂盒(Applied Bioscience, Cat.# 4426961)进行miR-221的扩增检测,内参基因采用U6(Applied Bioscience, Cat.# 4351372)。

1.5 U251和U87细胞增殖活性检测 将U251和U87细胞接种至6孔板,培养24 h后,同时转染miR-221抑制物(Applied Bioscience, Cat#: 4464084)以及对照,转染4~5 h后换液。用培养基配成单细胞悬液,接种至96孔板,24 h后进行MTT检测。检测时,每孔加MTT溶液(5 mg/ml)10 μl ,孵育4 h后终止培养,吸弃孔内培养上清液,每孔加100 μl 二甲基亚砜,振荡10 min后,酶标仪测量490 nm处吸光度值。

1.6 正性调节区锌指蛋白2(PR domain zinc finger protein 2, PRDM2)基因mRNA表达水平检测 采用实时荧光定量PCR方法。取2 μg 总RNA,用DNase I处理后,用Superscript II反转录试剂盒(美国Invitrogen公司)合成cDNA。cDNA产物作为实时荧光定量PCR的模板,进行相对定量检测。扩增引物

如下:PRDM2-F:5'-TTC CAC TTG AGA CTG AGG GT-3';PRDM2-R:5'-GAC ACC AAT CCG GGT CTT GT-3';GAPDH-F:5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3';GAPDH-R:5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'。利用扩增的 ΔCt 计算PRDM2/GAPDH的相对表达量。

1.7 PRDM2蛋白表达水平检测 收取U87和U251细胞样本,提取总蛋白并定量。使用10% SDS-PAGE凝胶电泳分析后转膜至PVDF膜。5%脱脂牛奶室温封闭2 h,加入对应一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,以TBST洗涤3次。加入二抗, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,最后加ECL显色试剂盒显影,胶片曝光。

1.8 荧光素酶实验 将MDM2基因的3'非编码区序列经PCR扩增后克隆至pGL3载体荧光素酶基因下游的XbaI位点,构建pGL3-WT-PRDM2(野生型)报告基因质粒。通过快速定点突变试剂盒(天根,CatKM101;PRDM2 3'非编码区序列内的结合位点序列突变),构建pGL3-PRDM2-MUT(突变型)报告基因质粒。取U87细胞分别进行转染,分组如下:①miR-221表达组,分别转染PRDM2荧光报告质粒野生型和突变型,以及空质粒对照组;②miR-221抑制组,分别转染PRDM2荧光报告质粒野生型和突变型,以及空质粒对照组。细胞转染24 h后,采用双荧光检测试剂盒,检测荧光素酶活性。

1.9 随访 所有胶质瘤病人术后每2个月进行一次随访,直至术后24个月。随访以复诊面谈及电话随访为主。包括:①治疗情况,包括药物治疗及物理治疗;②评价当前身体状况;③当前的临床症状;④理化检查;⑤影像学检查。

1.10 统计学分析 使用SAS 8.1软件分析,定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验;采用Kplan-Meier方法进行生存分析;以 $P<0.05$ 定义为有统计学差异。

2 结果

2.1 胶质瘤miR-221表达结果 胶质瘤miR-221表达水平 (0.62 ± 0.2) 明显高于正常脑组织 $(0.37\pm 0.13; P<0.001)$ 。高级别胶质瘤miR-221表达水平 (0.55 ± 0.19) 明显低于低级别胶质瘤 $(0.75\pm 0.14; P<0.01)$ 。男性胶质瘤病人miR-221表达水平 (0.64 ± 0.2) 与女性胶质瘤病人 (0.60 ± 0.2) 无明显差异 $(P>0.05)$;年龄 <50 岁胶质瘤病人miR-221表达水平 (0.62 ± 0.2) 与年龄 ≥ 50 岁胶质瘤病人 (0.63 ± 0.2) 无明显差异 $(P>0.05)$ 。

2.2 miR-221表达水平与胶质瘤生存时间的关系 按

照 miR-221 的表达水平将所有 123 例胶质瘤病人分为高表达组(miR-221/U6 的相对表达量 ≥ 0.6 , 72 例)和低表达组(miR-221/U6 的相对表达量 < 0.6 , 51 例)。生存曲线分析显示,低表达组生存时间较高表达组明显延长($P<0.05$),见图 1。

2.3 miR-221 对胶质瘤细胞系增殖的影响 转染 miR-221 抑制剂后, U251 和 U87 细胞内源性 miR-221 水平明显降低(图 2A),细胞增殖速度明显减慢(图 2B)。

2.4 胶质瘤 PRDM2 与 miR-221 关系 荧光素酶实验

结果表明, miR-221 明显增加 PRDM2 的荧光强度($P<0.05$, 图 3A)。抑制 miR-221 后, U87 和 U251 细胞 PRDM2 的 mRNA 和蛋白表达水平明显增高($P<0.05$, 图 3B、3C)。

3 讨论

胶质瘤的发生涉及基因的异常,因此了解胶质瘤发生、发展过程中基因的变异可为胶质瘤的靶向治疗提供理论基础。miRNA 与基因的调节关系紧密,参与多种基因异常性疾病,例如肿瘤。miR-221 在多种肿瘤组织中异常高表达^[12-16]。有报道显示 miR-221 在乳腺癌和胃癌中通过靶向抑癌基因 PTEN 导致肿瘤细胞的恶性增殖^[20,21]。也有报道显示 miR-221 可降低胰腺癌细胞对化疗的敏感性,可通过下调 RB 基因的表达增强胰腺癌细胞的肿瘤学特性。本文利用分子生物学手段研究 miR-221 在胶质瘤组织中的表达水平,结果显示与正常脑组织相比 miR-221 表达水平有异常的升高;细胞学实验证实 miR-221 可以促进 U251、U87 细胞增殖;进一步分析发现 miR-221 与胶质瘤病人生存期有紧密联系。

PRDM2 属于具有锌指结构家族中一个成员,通

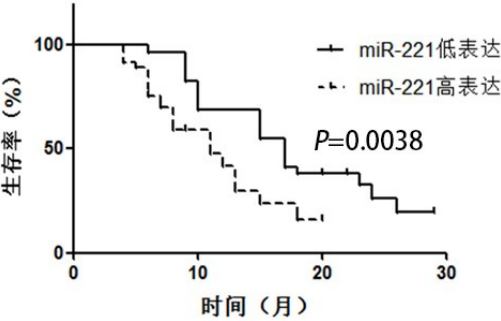


图 1 miR-221 基因高表达和低表达组胶质瘤病人生存曲线图
高表达组生存时间较低表达组明显缩短($P=0.0083$)

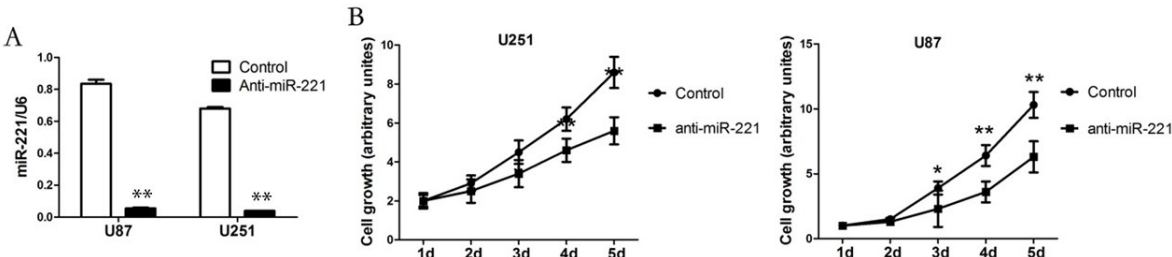


图 2 miR-221 对胶质瘤细胞系 U87 和 U251 细胞增殖的影响
A. U87 和 U251 细胞 mi-221 表达水平; B. U251 细胞增殖水平; C. U87 细胞增殖水平; Control: 对照组; anti-miR-221: miR-221 抑制剂组; 与对照组相应值比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

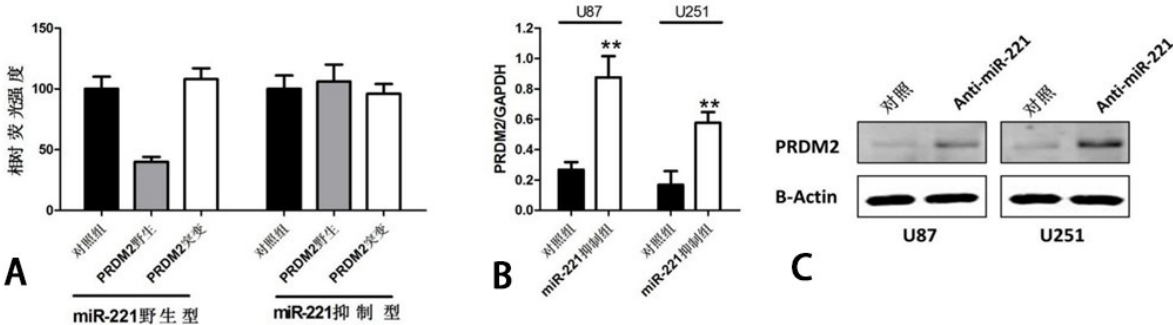


图 3 miR-221 对胶质瘤细胞系 U87 和 U251 细胞 PRDM2 表达的影响

A. mi-221 荧光强度变化; B. U87 和 U251 细胞 PRDM2 mRNA 表达水平; C. U87 和 U251 细胞 PRDM2 蛋白表达水平; PRDM2: 正性调节区锌指蛋白 2; 与对照组相应值比, ** $P<0.01$

过转录因子的方式调节靶基因,被认为是一个肿瘤抑制基因^[22, 23]。基因调控有多种形式,miRNA 介导的转录后调控是基因负调控的一种方式。通过生物信息学分析,本研究发现 PRDM2 基因的 3'-UTR 区域存在 miR-221 的 5 个靶位点,我们推测 miR-221 可能在转录后水平调控 PRDM2 的表达,通过双荧光、qPCR 和蛋白印迹实验,我们认为胶质瘤 PRDM2 是 miR-221 的靶基因。

【参考文献】

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, *et al.* Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(8): 1253-1265.
- [3] Mittal S, Pradhan S, Srivastava T. Recent advances in targeted therapy for glioblastoma [J]. Expert Rev Neurother, 2015, 15(8): 935-946.
- [4] Babu R, Kranz PG, Agarwal V, *et al.* Malignant brainstem gliomas in adults: clinicopathological characteristics and prognostic factors [J]. J Neurooncol, 2014, 119(1): 177-185.
- [5] Valinezhad OA, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation [J]. Int J Genomics, 2014, 2014: 970607.
- [6] Bushati N, Cohen SM. MicroRNA functions [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23: 175-205.
- [7] Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis [J]. Br J Cancer, 2006, 94(6): 776-780.
- [8] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857-866.
- [9] Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNA in cancer prognosis [J]. N Engl J Med, 2008, 359(25): 2720-2722.
- [10] Tivnan A, McDonald KL. Current progress for the use of miRNAs in glioblastoma treatment [J]. Mol Neurobiol, 2013, 48(3): 757-768.
- [11] Karsy M, Arslan E, Moy F. Current progress on understanding microRNAs in glioblastoma multiforme [J]. Genes Cancer, 2012, 3(1): 3-15.
- [12] Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, *et al.* miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(32): 23716-23724.
- [13] Kneitz B, Krebs M, Kalogirou C, *et al.* Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3 [J]. Cancer Res, 2014, 74(9): 2591-2603.
- [14] Falkenberg N, Anastasov N, Rappl K, *et al.* MiR-221/-222 differentiate prognostic groups in advanced breast cancers and influence cell invasion [J]. Br J Cancer, 2013, 109(10): 2714-2723.
- [15] Quintavalle C, Garofalo M, Zanca C, *et al.* miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphatase PTPmu [J]. Oncogene, 2012, 31(7): 858-868.
- [16] He H, Jazdzewski K, Li W, *et al.* The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(52): 19075-19080.
- [17] Qin B, Cao Y, Yang H, *et al.* MicroRNA-221/222 regulate ox-LDL-induced endothelial apoptosis via Ets-1/p21 inhibition [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 405(1-2): 115-124.
- [18] Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, *et al.* Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4): 1351-1358.
- [19] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. Acta Neuropathol, 2007, 114(2): 97-109.
- [20] Li B, Lu Y, Wang H, *et al.* miR-221/222 enhance the tumorigenicity of human breast cancer stem cells via modulation of PTEN/Akt pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 79: 93-101.
- [21] Shi J, Zhang Y, Jin N, *et al.* MicroRNA-221-3p plays an oncogenic role in gastric carcinoma by inhibiting PTEN expression [J]. Oncol Res, Epub, 2016.
- [22] Cheedipudi S, Puri D, Saleh A, *et al.* A fine balance: epigenetic control of cellular quiescence by the tumor suppressor PRDM2/RIZ at a bivalent domain in the cyclin gene [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(13): 6236-6256.
- [23] Tan SX, Hu RC, Liu JJ, *et al.* Methylation of PRDM2, PRDM5 and PRDM16 genes in lung cancer cells [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(5): 2305-2311.

(2017-01-07 收稿, 2017-06-03 修回)