

. 实验研究 .

# lncRNA MLK7-AS1 通过抑制 miR-375 的表达 促进胶质瘤 U251 细胞的增殖和侵袭

张兴业 田 博 满明昊 郭少春

**【摘要】目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)MLK7-AS1 在人脑胶质瘤组织中表达及其对胶质瘤 U251 细胞增殖、侵袭的影响。**方法** 选择 2016~2017 年手术切除的脑胶质瘤组织标本 45 例,2007 版 WHO 分级 I 级 8 例,II 级 15 例,III 级 10 例,IV 级 12 例。另选择其中 10 例瘤旁正常脑组织作对照。体外培养 U251 细胞和人正常星形胶质细胞(NHA)。U251 细胞根据转染质粒分成四组:转染 miR-375 mimic 组、转染 si-MLK7-AS1 组、同时转染 miR-375 inhibitor 和 si-MLK7-AS1 组以及只转染 miR-375 inhibitor 组。RT-qPCR 检测 MLK7-AS1 和 miR-375 的表达水平;荧光素酶报告基因实验验证 MLK7-AS1 与 miR-375 之间的关系;CCK-8 法检测 U251 细胞增殖活性,Transwell 实验检测 U251 细胞侵袭能力。**结果** 高级别胶质瘤组织 MLK7-AS1 表达水平明显高于低级别胶质瘤组织( $P<0.05$ ),而后者明显高于瘤旁正常脑组织( $P<0.05$ );高级别胶质瘤组织 miR-375 表达水平明显低于低级别胶质瘤组织( $P<0.05$ ),而后者明显低于瘤旁正常脑组织( $P<0.05$ )。U251 细胞 MLK7-AS1 表达水平明显高于 NHA( $P<0.05$ ),miR-375 表达水平明显低于 NHA( $P<0.05$ )。序列分析显示 MLK7-AS1 和 miR-375 存在特异性结合序列,荧光素酶报告基因实验表明 U251 细胞 MLK7-AS1 负调控 miR-375 表达。沉默 MLK7-AS1 表达通过上调 miR-375 表达明显抑制 U251 细胞增殖和侵袭( $P<0.05$ )。**结论** lncRNA MLK7-AS1 可能通过调节 miR-375 的表达水平在人脑胶质瘤中发挥着促癌的作用。

**【关键词】** 胶质瘤;长链非编码 RNA MLK7-AS1;miR-375;细胞增殖;细胞侵袭;U251 细胞

**【文章编号】** 1009-153X(2020)07-0454-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

## LncRNA MLK7-AS1 promotes proliferation and invasion of glioma cells by inhibiting miR-375

ZHANG Xing-ye, TIAN Bo, MAN Ming-hao, GUO Shao-chun. Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, PLA, Xi'an 710038, China

**【Abstract】 Objective** To explore the expression of lncRNA MLK7-AS1 in the glioma tissues and its effect on glioma U251 cells proliferation and invasion. **Methods** The expression levels of lncRNA MLK7-AS1 and miR-375 were detected in 45 glioma tissues which were obtained from 45 patients with glioma underwent surgery from 2016 to 2017, including 23 low grade gliomas and 22 high grade gliomas, and were also detected in 10 normal brain tissues adjacent to the glioma (control group). U251 cells and human normal astrocytes (NHA) were cultured in vitro. U251 cells were divided into four groups based on transfected plasmids: miR-375 mimic group, si-MLK7-AS1 group, miR-375 inhibitor and si-MLK7-AS1 group, and miR-375 inhibitor group. RT-qPCR was used to detect the expression levels of MLK7-AS1 and miR-375. The luciferase reporter gene experiment was used to verify the relationship between MLK7-AS1 and miR-375. CCK-8 method was used to detect the proliferation activity of U251 cells, and Transwell test was used to detect the invasion ability of U251 cells. **Results** The expression level of MLK7-AS1 in high-grade glioma tissues was significantly higher than that in low-grade glioma tissues ( $P<0.05$ ), which was significantly higher than that in normal brain tissues adjacent to the glioma ( $P<0.05$ ). The miR-375 expression level in high-grade glioma tissues was significantly lower than that of low-grade glioma tissues ( $P<0.05$ ), which was significantly lower than that of normal brain tissue adjacent to the glioma ( $P<0.05$ ). The expression level of MLK7-AS1 in U251 cells was significantly higher than that in NHA ( $P<0.05$ ), while the expression level of miR-375 in U251 cells was significantly lower than that in NHA ( $P<0.05$ ). Sequence analysis showed that MLK7-AS1 and miR-375 had specific binding sequences. Luciferase reporter gene experiments showed that MLK7-AS1 in U251 cells can negatively regulate the expression of miR-375. Silence MLK7-AS1 expression significantly inhibited the proliferation and invasion of U251 cells by up-regulating the expression level of miR-375 ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The results suggest that lncRNA MLK7-AS1 play a important role in promoting growth of human gliomas by regulating the expression level of miR-375.

**【Key words】** Glioma; LncRNA MLK7-AS1; miR-375; Cell proliferation; Cell invasion

胶质瘤是颅内最常见的原发性恶性肿瘤,占颅内肿瘤的 50%左右<sup>[1,2]</sup>。由于胶质瘤细胞增殖、侵袭能力强,难以完全切除,术后容易复发,预后差<sup>[3]</sup>。因此,寻找新的治疗方法是亟待解决的问题。长链非

编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)定义为真核基因组里长度大于 200 个核苷酸、不具有编码蛋白质功能的转录产物<sup>[4,5]</sup>,可通过与其他分子相互作用,广泛参与调控细胞活动以及肿瘤发生发展<sup>[5,6]</sup>。研究发现 lncRNA MLK7-AS1 在胃癌组织表达上调<sup>[7]</sup>,在卵巢癌组织及其细胞系中表达也上调<sup>[8]</sup>。本研究探讨 lncRNA MLK7-AS1 在胶质瘤组织以及细胞系中表达及其对胶质瘤细胞增殖与侵袭影响。

1 材料与方法

1.1 组织标本来源 选择 2016~2017 年手术切除的脑胶质瘤组织标本 45 例,2007 版 WHO 分级 I 级 8 例,II 级 15 例,III 级 10 例,IV 级 12 例。另选择其中 10 例瘤旁正常脑组织作对照。

1.2 细胞培养、转染及分组 U251 胶质瘤细胞及人正常星形胶质细胞(normal human astrocyte, NHA),均由我院神经外科研究所捐赠,含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基进行培养。待细胞密度达 70%,将培养基更换为 Opti 培养基,根据脂质体试剂盒说明书进行转染。将 miR-375 mimic、miR-375 inhibitor、荧光素酶报告载体以及 si- MLK7- AS1 分别与 lipofectamine2000 混匀 20 min 后,加到培养基中进行转染。si- MLK7- AS1 序列:正义链 5'-CACGGAGAAGGTCTGCAGGTTTCATTTCTGAGCCAGCGAGACCACCAGCCCCGCCAG- 3',反义链 5'-TGGACCAAATCTTTAATCCTGTAGATCTCGGTCTGAATTTTAAATACTTTGGTTACCC-3'。根据转染质粒分成四组:转染 miR-375 mimic 组、转染 si-MLK7-AS1 组、同时转染 miR-375 inhibitor 和 si-MLK7-AS1 组以及只转染 miR-375 inhibitor 组。

1.3 PCR 检测 MLK7- AS1 和 miR-375 表达 按照 Trizol 说明书提取胶质瘤、瘤旁正常脑组织、U251 细胞及 NHA 细胞总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 浓度与纯度。逆转录后进入 PCR 循环反应。MLK7-AS1 上游引物 5'-TTACCAGACACAACCAACCCC-3',下游引物 5'-ATCAGTCAGGCCCATTTGGTTT-3';miR-375 上游引物 5'-CAGGGTCCGAGGTATT-3',下游引物 3'-CTGCTTTGTTCTGTTTCG-5'。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖水平 将对数生长期 U251 细胞制为单细胞悬液,取 100  $\mu$ l 细胞接种于 96 孔板中,浓度约为每孔 2 000 个细胞。接种 24、48、72 h,每孔添加 10  $\mu$ l 的 CCK8 溶液(中国碧云天生物技术有限公司)37  $^{\circ}$ C 条件下再培养 2 h。测定 450 nm

波长处吸光度,计算细胞增殖率。

1.5 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 用 24 孔板将 Transwell 小室(美国康宁公司)分为上、下两室。将已被稀释的基质胶铺满 Transwell 上室置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中。用无血清培养液将细胞浓度调整为  $1\times 10^5$ /ml,每个上室加入 100  $\mu$ l 细胞悬液、下室加入 500  $\mu$ l 含有 10% 胎牛血清的培养液,37  $^{\circ}$ C 培养 24~48 h。用棉签拭去靠上室侧膜的细胞。采用 4% 甲醛固定 5 min,用结晶紫进行染色,显微镜进行观察,随机计数 5 个高倍视野的细胞并计算细胞的平均值。实验重复三次。

1.6 荧光素酶报告基因实验验证 MLK7-AS1 与 miR-375 相互作用 将 U251 细胞接种于 24 孔板,并在每孔中将荧光素酶报告载体与野生型以及突变型 MLK7-AS1 共转染至细胞中,24 h 后共转染 miR-375 相似物。在转染 48 h 后收集细胞。按照 promega 公司双荧光素酶活性检测试剂盒(美国普洛麦格公司)说明书对细胞进行处理,使用单光子检测仪检测荧光素酶活性。荧光素酶活性以萤火虫荧光素酶强度与海肾荧光素酶强度之比来计算。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行分析;计量资料以  $\bar{x}\pm s$  标书,采用 *t* 检验和单因素方差分析;*P*< 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MLK7-AS1 在脑胶质瘤组织以及 U251 细胞中表达水平升高 高级别胶质瘤组织(WHO 分级 III~IV 级)MLK7-AS1 表达水平明显高于低级别胶质瘤组织(WHO 分级 I~II 级;*P*<0.05),而低级别胶质瘤组织 MLK7-AS1 表达水平又明显高于瘤旁正常脑组织(*P*<0.05)。U251 细胞 MLK7-AS1 表达水平明显高于 NHA(*P*<0.05)。见图 1。

2.2 miR-375 在脑胶质瘤组织以及 U251 细胞中表达降低 高级别胶质瘤组织(WHO 分级 III~IV 级)miR-375 表达水平明显低于低级别胶质瘤组织(WHO 分级 I~II 级;*P*<0.01),而低级别胶质瘤组织 miR-375 表达水平又明显低于瘤旁正常脑组织(*P*<0.05)。U251 细胞 miR-375 表达水平明显低于 NHA(*P*<0.05)。见图 2。

2.3 U251 细胞 MLK7-AS1 抑制 miR-375 的表达 序列分析发现 MLK7-AS1 与 miR-375 之间存在潜在的特异性结合序列(图 3A),表明 MLK7-AS1 与 miR-375 可能存在相互作用。荧光素酶报告基因实验结果显示,野生型 MLK7-AS1 组细胞转染 miR-375 后,

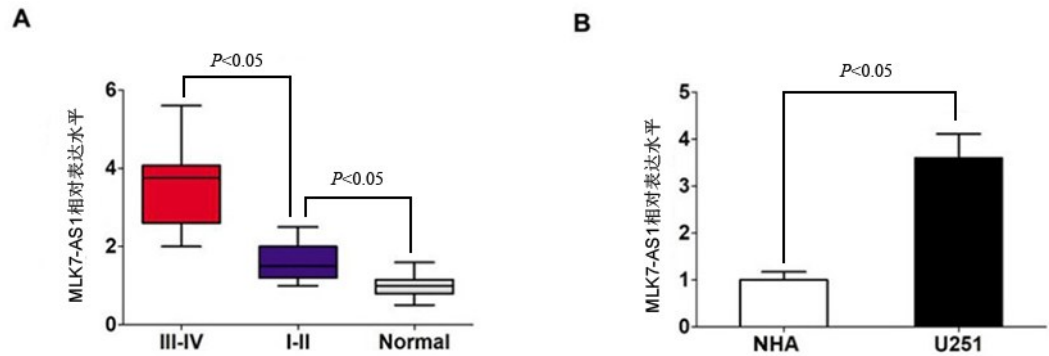


图1 长链非编码RNA MLK7-AS1在人脑胶质瘤组织以及U251细胞中表达

A. Ⅲ~Ⅳ. WHO 分级Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤组织; I~Ⅱ. WHO 分级 I~Ⅱ级胶质瘤组织; Normal. 瘤旁正常脑组织; NHA. 人正常星形胶质细胞

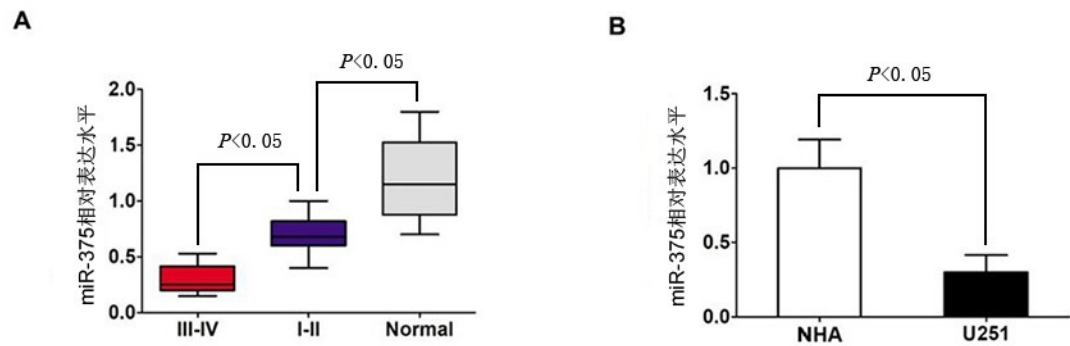


图2 miR-375在人脑胶质瘤组织以及U251细胞中表达

A. Ⅲ~Ⅳ. WHO 分级Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤组织; I~Ⅱ. WHO 分级 I~Ⅱ级胶质瘤组织; Normal. 瘤旁正常脑组织; NHA. 人正常星形胶质细胞

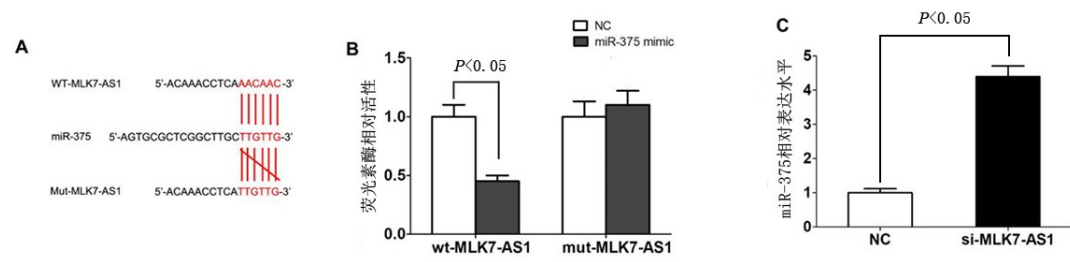


图3 U251细胞lncRNA MLK7-AS1与miR-375之间关系的荧光素酶报告基因实验验证

A. 序列分析显示,miR-375被预测为是lncRNA MLK7-AS1的靶基因;B. U251细胞荧光素酶相对活性,wt-MLK7-AS1指野生型 MLK7-AS1,mu-MLK7-AS1指突变型 MLK7-AS1,NC组转染 miR-375 无效质粒,miR-375 mimic 组转染 miR-375 mimic 质粒;C. U251 细胞中 miR-375 相对表达水平,NC 组不沉默 MLK7-AS1 表达,si-MLK7-AS1 组沉默 MLK7-AS1 表达;lncRNA. 非长链编码RNA

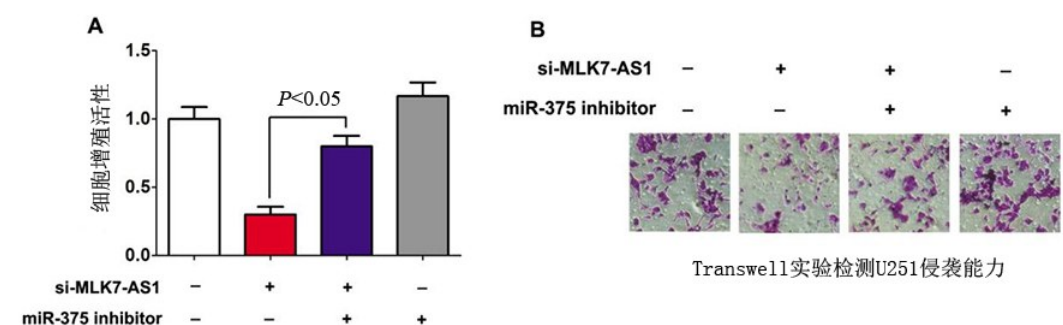


图4 非长链编码RNA MLK7-AS1对胶质瘤U251细胞增殖、侵袭能力的影响

荧光素酶活性较对照组明显降低( $P<0.05$ ;图 3B),而突变型 MLK7-AS1 组细胞转染 miR-375 后,荧光素酶活性较对照组无明显变化( $P>0.05$ ;图 3B)。这些结果提示 MLK7-AS1 可以直接结合并调控 miR-375 表达。另外,沉默 MLK7-AS1 组细胞 miR-375 表达水平明显高于对照组( $P<0.05$ ;图 3C)。这表明 MLK7-AS1 可以负调控 miR-375 的表达。

2.4 MLK7-AS1 通过抑制 miR-375 的表达促进 U251 细胞的增殖和侵袭 转染 miR-375 mimic 组和转染 miR-375 inhibitor 组细胞增殖活性和侵袭能力均无统计学差异( $P>0.05$ );转染 si-MLK7-AS1 组细胞增殖活性和侵袭能力较转染 miR-375 mimic 组均明显降低( $P<0.05$ )。同时转染 miR-375 inhibitor 和 si-MLK7-AS1 组细胞增殖活性和侵袭能力较转染 si-MLK7-AS1 组均明显增高( $P<0.05$ )。见图 4。

3 讨论

胶质瘤呈浸润性生长,肿瘤恶性程度越高,向周围浸润的范围越广<sup>[3]</sup>。随着医疗技术的进步,化疗、手术、放疗等有了一定的突破,但大多数胶质瘤总生存期仍然很低<sup>[2]</sup>。近年来,越来越多的研究证实 lncRNA 在胶质瘤中发挥着重要作用<sup>[4,9,10]</sup>。在真核基因组里,lncRNA 是为长度大于 200 个核苷酸且不具有编码蛋白质功能的转录产物<sup>[7]</sup>,在转录以及翻译过程中发挥着重要的调控作用<sup>[8,11]</sup>,参与表观遗传调控、染色质重塑、胚胎的生长发育等过程。本研究发现,人脑胶质瘤组织 lncRNA MLK7-AS1 呈高表达,提示 MLK7-AS1 可能与胶质瘤发病有关。miR-375 又名 hsa-miR-375,位于人 2 号染色体 q35 的 cryba2 和 Ccdc108 两个编码基因之间<sup>[12]</sup>。miR-375 异常表达对多种恶性肿瘤的增殖、侵袭、迁移等产生影响<sup>[12,13]</sup>。本研究表明,脑胶质瘤组织 miR-375 表达明显下降;MLK7-AS1 负性调节 miR-375 表达,促进细胞增殖及侵袭。

综上所述,本研究发现 MLK7-AS1 在胶质瘤组织中高表达的现象,并发现 MLK7-AS1 能够抑制 miR-375 的表达水平,促进细胞增殖和侵袭。这提示 MLK7-AS1 可能具有胶质瘤诊断标志物作用,且干预 MLK7-AS1/miR-375 信号通路可能是胶质瘤治疗的潜在靶点。

【参考文献】

[1] Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, *et al.* Cost of migration:

invasion of malignant gliomas and implications for treatment [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(8): 1624-1636.

[2] Kenneth A, Romina N, Louis DN, *et al.* The 2016 world health organization classification of tumor soft hecentral nervous system: a summary [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131: 803-820.

[3] Westpnhal M, Lamszus K. The neuro biology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12: 495-508.

[4] 慕茂林,牛万祥,张晓明,等.长链非编码 RNASNORD3A 在脑胶质瘤中的表达变化及功能研究[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2019, 1-9.

[5] Kanduri C. Long noncoding RNAs: lessons from genomic imprinting [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(1): 102-111.

[6] 韩 聪,胡建宏,胡 珊,等.长链非编码 RNA 研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2018, 29: 123-130.

[7] Quan Y, Zhang Y, Lin W, *et al.* Knock down of longnon-coding RNAMAP3K20 antisense RNA 1 inhibits gastric cancer growth through epigenetically regulating miR- 375 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(2): 527-534.

[8] Yan H, Li H, LiP Y, *et al.* Long noncoding RNAMLK7-AS1 promote sovarian cancer cells progression by modulating miR-375/YAP1 axis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37: 237-253.

[9] 杨建龙,葛哈明,闫忠军,等.lncRNA-ADAMTS9-AS2 与胶质瘤预后的相关性[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2019, 24(5): 276-278.

[10] 周建华,胡 涛,陈 宇,等.lncRNA NEAT1 在人脑胶质瘤的表达变化及其与病人预后的关系[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2019, 24(3): 148-150.

[11] Zhang R, LiJ B, Yan XF, *et al.* Long noncoding rnap lasma-cytoma variant translocation1 (PVT1) promotes colon cancer progression via endogenous sponging miR-26b [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 8685-8692.

[12] Kang W, Huang TT, Zhou YH, *et al.* miR-375 is involved in Hippo pathway by targeting YAP1/TEAD4- CTGF axis in gastric carcinogenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 92-103.

[13] Li LN, Jia LP, Ding Y. Up regulation of miR-375 inhibits human liver cancer cell growth by modulating cell proliferation and apoptosis via targeting ErbB2 [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3319-3326.