

. 实验研究 .

miR-153 下调 FOXR2、CDK8 和 CDK13 的表达
抑制胶质母细胞瘤细胞增殖

胡克琦 周达全 陈 锋 周 毅 敖祥生

【摘要】目的 探讨 miR-153 对胶质母细胞瘤细胞增殖的影响。方法 体外培养胶质母细胞瘤细胞系 U87、U251、SHG-44 和 T98G 细胞,分别转染 miR-153 质粒(miR-153 组)、空载质粒(载体组)和 miR-153 突变质粒(miR-153 突变组),另设置空白对照组(不转染任何质粒)。RT-PCR 检测 miR-153、FOXR2、CDK8 和 CDK13 的表达,MTT 法检测细胞增殖能力。结果 miR-153 组 U87、U251、SHG-44 和 T98G 细胞 miR-153 表达水平较载体组和空白对照组显著上升($P<0.05$),细胞增殖水平较载体组和空白对照组均显著降低($P<0.05$)。miR-153 组 U87、U251、SHG-44 和 T98G 细胞 FOXR2、CDK8 和 CDK13 的 mRNA 水平较 miR-153 突变组、载体组和空白对照组均显著下降($P<0.05$),而后三组之间均无统计学差异($P>0.05$)。结论 miR-153 抑制胶质母细胞瘤细胞增殖,其机制可能与抑制 FOXR2、CDK8 和 CDK13 表达有关。

【关键词】胶质母细胞瘤;微小核糖核酸;miR-153;细胞增殖

【文章编号】1009-153X(2020)11-0767-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

miR-153 inhibits proliferation of glioblastoma multiforme cell lines by down-regulation of FOXR2, CDK8 and CDK13

HU Ke-qi, ZHOU Da-quan, CHEN Feng, ZHOU Yi, AO Xiang-sheng. Department of Neurosurgery, Xiangyang Center Hospital, Xiangyang 441021, China

【Abstract】Objective To study the effect of miR-153 on the cell proliferation of glioblastoma multiforme (GBM) cell lines and its mechanism. Methods GBM cell lines U87, U251, SHG-44 and T98G were cultured in vitro and transfected with miR-153 over-expression plasmid, vector and miR-153 mutant plasmid, respectively. RT-PCR was used to determine the mRNA level of FOXR2, CDK8 and CDK13. MTT assay was used to determine the proliferation of U87, U251, SHG-44 and T98G cells. Results The level of miR-153 and the mRNA level of FOXR2, CDK8 and CDK13 were significantly up-regulated in U87, U251, SHG-44 and T98G cells ($P<0.05$), and the proliferation of U87, U251, SHG-44 and T98G cells were inhibited after transfected with miR-153 over-expression ($P<0.05$). Conclusion miR-153 inhibits proliferation of glioblastoma multiforme cell lines, which may be related to the down-regulation of FOXR2, CDK8 and CDK13.

【Key words】Glioblastoma multiforme; miR-153; Cell proliferation

多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)是恶性程度最高的脑肿瘤,具有高度侵袭性^[1],即使采用手术辅以放疗、化疗等综合治疗^[2],但疗效不理想^[3,4]。深入研究GBM的发病机制,寻找新的治疗靶点,是目前研究的热点。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类非编码 RNA,由 20~24 个核苷酸构成,为单链形式,可通过序列互补配对参与靶基因的调控^[5]。miRNA 在多种炎症疾病和肿瘤中发挥重要作用^[6-10]。本文探讨 miR-153 对 GBM 细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与转染 将 U87、U251、SHG-44 和 T98G 细胞(中科院细胞库)接种到 6 孔板,加入适量含 10%胎牛血清(美国 Gibco 公司)的 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)培养,密度约 60%时转染 miR-153 质粒(miR-153 组)、载体质粒(载体组)和 miR-153 突变质粒(miR-153 突变组),转染操作按照转染试剂盒(美国 Sigma Aldrich 公司)说明书完成,转染 6 h 后更换培养基继续培养 18 h,收获细胞进行后续实验。另设置空白对照组,不转染任何质粒。山东维真生物公司合成 miR-153 突变质粒序列:5'-AGC GGT GG CCA GTG ACT TTT TTG TGA TGT AGC TGC TAG TAA TAT GAG CCC AGT AGC TTA GTC

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.11.011
作者单位:441021 湖北,襄阳市中心医院神经外科(胡克琦、周达全、陈 锋、周 毅、敖祥生)
通讯作者:敖祥生, E-mail: aoxiangsheng@sohu.com

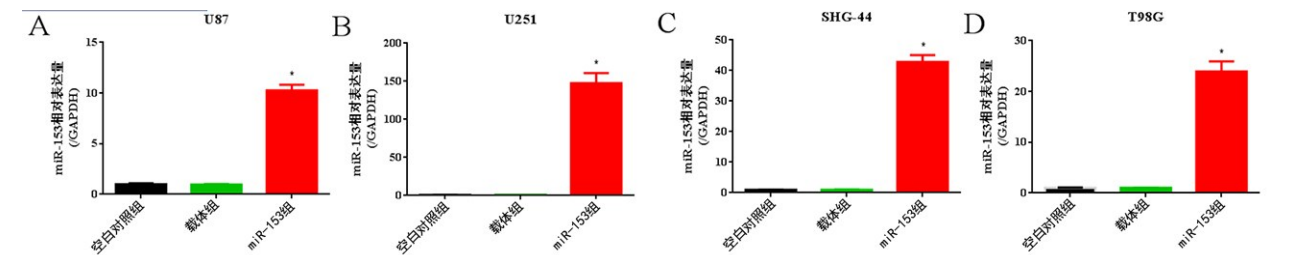


图1 RT-PCR检测胶质母细胞瘤细胞系miR-153的表达
与空白对照组或载体组相比,* $P<0.05$

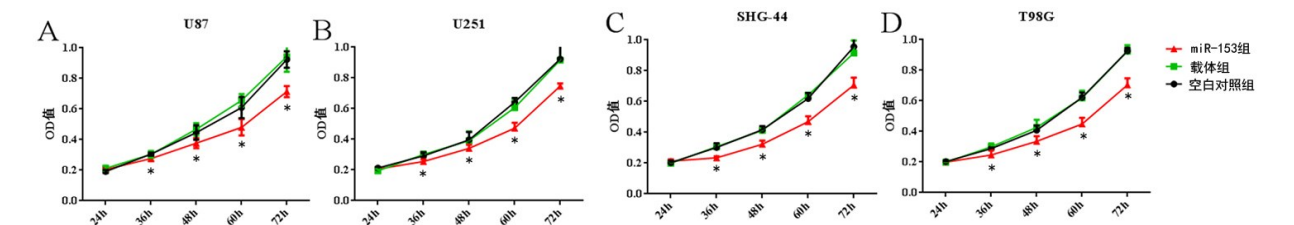


图2 miR-153抑制胶质母细胞瘤细胞系细胞增殖
与与空白对照组或载体组相比,* $P<0.05$

ACA AAA GAG TTC ATT GGA AAC TGT G-3'.

1.2 RT-PCR 检测细胞相关基因 mRNA 水平 收获细胞,用预冷 PBS 洗涤 3 次,弃上清液,用 TRIzol 试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)抽提细胞总 RNA,分光光度法定量,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。用反转录试剂盒(日本 TOYOBO 公司)获得 cDNA,根据 SYBR GREEN 试剂盒(日本 TOYOBO 公司)进行 RT-PCR 实验。miR-153 的抽提、反转录和 RT-PCR 用专门的试剂盒完成(北京康为世纪生物科技有限公司)。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法量化分析数据。引物设计山东维真生物公司合成,引物序列见表 1。

1.3 MTT 法检测 miR-153 对细胞系增殖的影响 将 U87、U251、SHG-44 和 T98G 细胞接种到 6 孔板,每孔加入 5 mg/L 的 MTT 溶液(美国 Sigma 公司)20 μ l 继续培养 4 h 后吸尽培养液,加入 PBS 洗 3 次,加入 150 μ l

二甲基亚砷 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床温和震荡 10 min。酶联免疫检测仪检测 570 nm 波长处光密度值。

1.4 统计学分析 用 Graphpad prism 6 软件进行分析;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 t 检验和方差分析;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 质粒转染效果 miR-153 组 U87、U251、SHG-44 和 T98G 细胞 miR-153 表达水平较载体组和空白对照组显著上升($P<0.05$,图 1)。

2.2 miR-153 抑制 GBM 细胞系增殖 miR-153 组 U87、U251、SHG-44 和 T98G 细胞增殖水平较载体组和空白对照组均显著降低($P<0.05$,图 2)。

2.3 miR-153 抑制 GBM 细胞 FOXR2、CDK8 和 CDK13 的表达 Target Scan 软件分析 miR-153 可能的靶基因结果发现,miR-153 可能的靶基因有 CDK8

表 1 引物信息

基因	序列	Tm($^{\circ}$ C)
miR-153	Pf: 5'-TATCCAGTGCGAATACCT-3'	55.5
	Pr: 5'-AGTGCAGGCTCCGAGGTA-3'	
FOXR2	Pf: 5'-GAATGAGTTATTTCTGCCTTGT-3'	54.1
	Pr: 5'-GGGAATGGATACCCTGCT-3'	
CDK8	Pf: 5'-CAGGGAATCAAGACAGCA-3'	57.6
	Pr: 5'-TCCAGGTTGGGATAGGC-3'	
CDK13	Pf: 5'-CACCAAGCATAGGAGCCA-3'	54.6
	Pr: 5'-GCTTTGTAACTTGTCCTGTA-3'	
GAPDH	Pf: 5'-AACGGATTTGGTCGTATTG-3'	53.9
	Pr: 5'-GGAAGATGGTATGGGATT-3'	

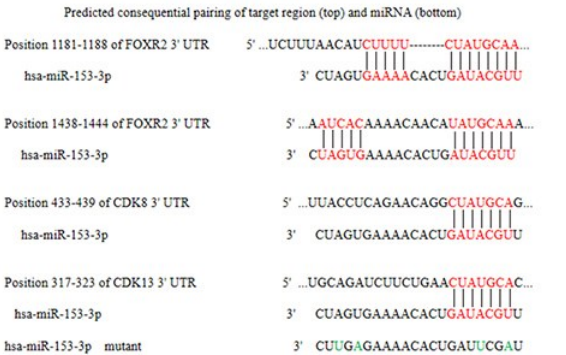


图3 Target Scan 分析 miR-153 相关靶基因

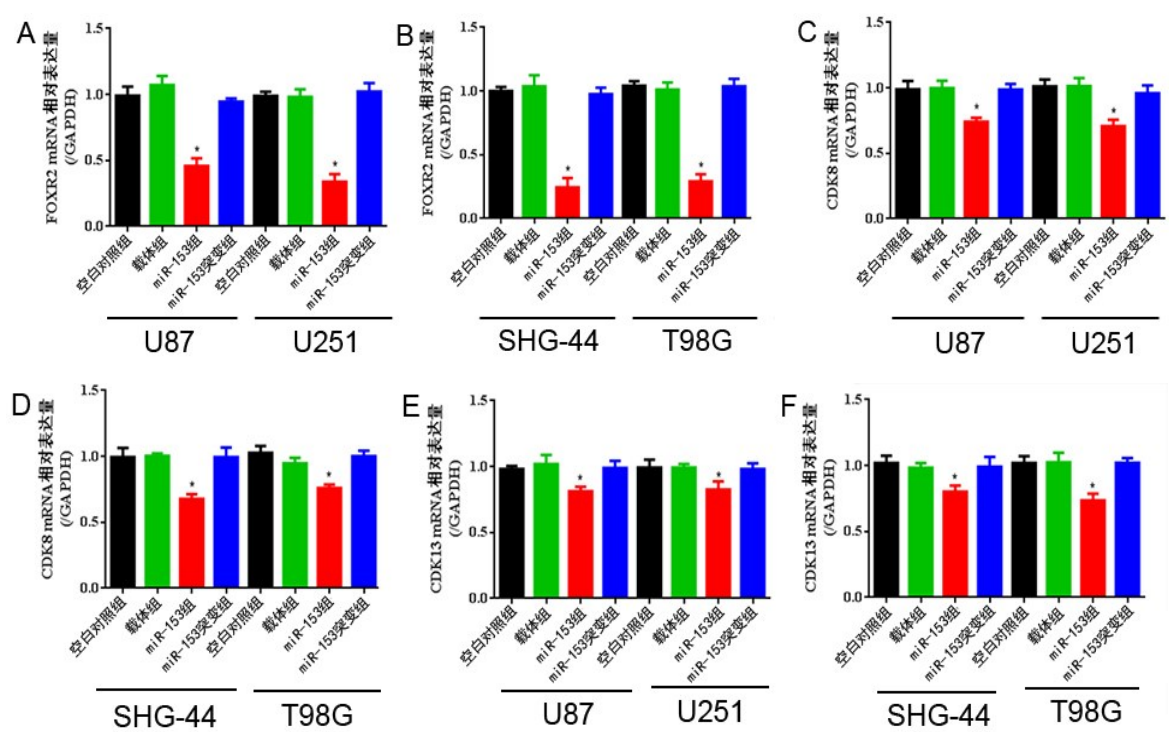


图4 miR-153抑制胶质母细胞瘤细胞系FOXOR2、CDK8和CDK13基因表达与空白对照组、载体组或miR-153突变组相比,* $P<0.05$

和CDK13(图3)。RT-PCR检测结果显示,miR-153组U87、U251、SHG-44和T98G细胞FOXOR2、CDK8和CDK13的mRNA水平较miR-153突变组、载体组和空白对照组均显著下降($P<0.05$,图4),而后三组之间均无统计学差异($P>0.05$,图4)。

3 讨论

GBM是中枢神经系统常见的恶性肿瘤,因其在脑组织内浸润性生长,手术完全切除病灶极其困难;另外,GBM细胞增殖快、侵袭能力强^[11,12],部分GBM呈放化疗抵抗状态,因此GBM的治疗效果不佳。近年来,miRNA在GBM中的作用的研究越来越多。有研究报道,miR-21在GBM中表达上调并可促进瘤细胞增殖^[13],而miR-7在GBM中表达下调并可抑制肿瘤^[14]。可见,miRNA很可能参与GBM的发病和进展。

我们通过培养U87、U251、SHG-44和T98G等GBM细胞系,转染miR-153质粒,发现miR-153抑制GBM细胞系FOXOR2、CDK8和CDK13的表达,而且GBM细胞系增殖水平显著下降。FOXOR2是一种原癌基因。有研究报道,FOXOR2可促进结肠癌细胞增殖和侵袭^[15],还可通过抑制p27信号通路促进GBM的增殖^[16],而FOXOR2被抑制后,子宫内膜癌细胞增殖

也被抑制^[17]。我们的研究发现miR-153可抑制FOXOR2的表达,而且miR-153可抑制GBM的增殖,这表明,miR-153抑制GBM的增殖很可能与抑制FOXOR2有关。

CDK8和CDK13均属于细胞周期蛋白依赖性激酶家族,CDK8与cyclin C、MED12、MED13等组成一个调节复合体,在转录因子、染色质修饰子、启动子和增强子与RNA聚合酶Ⅱ之间搭桥,并调节转录^[18]。CDK13与CDK12共同在RNA加工和mRNA前体的剪接中发挥作用^[19]。CDK8是一种原癌基因,有研究报道,CDK8被抑制后,结肠癌的生长也被抑制^[20];CDK13和CDK12被抑制后,乳腺癌的增殖被抑制^[21]。我们的研究发现miR-153可抑制CDK8和CDK13的表达,而且miR-153可抑制GBM的增殖,这表明,miR-153抑制GBM的增殖也可能与抑制CDK8和CDK13有关。

【参考文献】

[1] Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review [J]. JAMA, 2013, 310(17): 1842–1850.

[2] Wick W, Osswald M, Wick A, *et al.* Treatment of glioblasto-

- ma in adults [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2018, 11: 1277012020.
- [3] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987–996.
- [4] Zwierner K, Paulsen F, Schittenhelm J, *et al.* Prognostic parameters and outcome after re-irradiation for progressive glioblastoma [J]. *Acta Neurol Scand*, 2017, 136(3): 239–245.
- [5] Hammond SM. An overview of microRNAs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 87: 3–14.
- [6] Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1509: 1–10.
- [7] Saliminejad K, Khorram KH, Soleymani FS, *et al.* An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451–5465.
- [8] Zhu X, Zhao Y, Hou W, *et al.* MiR-153 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Nrf2/HO-1 signaling [J]. *Chromosome Res*, 2019, 27(3): 167–178.
- [9] Huang Q, Xia J, Wang L, *et al.* miR-153 suppresses IDO1 expression and enhances CAR T cell immunotherapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 58.
- [10] Bi CW, Zhang GY, Bai Y, *et al.* Increased expression of miR-153 predicts poor prognosis for patients with prostate cancer [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(36): e16705.
- [11] Olmez I, Love S, Xiao A, *et al.* Targeting the mesenchymal subtype in glioblastoma and other cancers via inhibition of diacylglycerol kinase alpha [J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(2): 192–202.
- [12] Bhat K, Balasubramanian V, Vaillant B, *et al.* Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma [J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(3): 331–346.
- [13] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6029–6033.
- [14] Kefas B, Godlewski J, Comeau L, *et al.* microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(10): 3566–3572.
- [15] Lu SQ, Qiu Y, Dai WJ, *et al.* FOXR2 promotes the proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(5): 681–689.
- [16] Liu X, Liu N, Yue C, *et al.* FoxR2 promotes glioma proliferation by suppression of the p27 pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34): 56255–56266.
- [17] Deng X, Hou C, Liang Z, *et al.* MiR-202 suppresses cell proliferation by targeting foxr2 in endometrial adenocarcinoma [J]. *Dis Markers*, 2017, 2017: 2827435.
- [18] Menzl I, Witalisz-Siepracka A, Sexl V. CDK8—novel therapeutic opportunities [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2019, 12(2): .
- [19] Greifenberg AK, Honig D, Pilarova K, *et al.* Structural and functional analysis of the Cdk13/Cyclin K complex [J]. *Cell Rep*, 2016, 14(2): 320–331.
- [20] Liang J, Chen M, Hughes D, *et al.* CDK8 selectively promotes the growth of colon cancer metastases in the liver by regulating gene expression of TIMP3 and matrix metalloproteinases [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(23): 6594–6606.
- [21] Quereda V, Bayle S, Vena F, *et al.* Therapeutic targeting of CDK12/CDK13 in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2019, 36(5): 545–558.
- (2020-06-29 收稿, 2020-08-25 修回)
- ~~~~~
- (上接第 766 页)
- [12] 杜彦艳, 刘鑫, 单保恩. Wnt/ β -catenin 信号转导通路 with 肿瘤关系的研究进展[J]. *肿瘤*, 2009, 29(8): 803–806.
- [13] 任星光, 段虎斌, 肖友朝, 等. Wnt- β -catenin 信号通路相关长链非编码 RNA 在胶质瘤中的研究进展[J]. *肿瘤研究与临床*, 2020, 32(1): 58–61.
- [14] He L, Zhou H, Zeng Z, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling cascade: a promising target for glioma therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2217–2228.
- [15] Jiang J, Yang X, He X, *et al.* MicroRNA-449b-5p suppresses the growth and invasion of breast cancer cells via inhibiting CREPT-mediated Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 302: 74–82.
- [16] Bai J, Gao Y, Du Y, *et al.* MicroRNA-300 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma cells by downregulating CREPT/Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(4): 3743–3753.
- (2020-05-12 收稿, 2020-06-22 修回)