

· 实验研究 ·

# miR-497 对恶性脑膜瘤细胞增殖的影响

周德才 王少雄 黄程 王文波

**【摘要】目的** 探讨 miR-497 对恶性脑膜瘤细胞增殖的影响及作用机制。**方法** 收集 2019 年 1~9 月手术切除的女性脑膜瘤组织标本 10 例,其中恶性脑膜瘤 5 例(WHO 分级Ⅲ级),良性脑膜瘤 5 例(WHO 分级Ⅰ级),采用 RNA-seq 法和 qRT-PCR 检测脂肪酸合成酶(FASN)mRNA 和 miR-497 表达水平。体外培养恶性脑膜瘤细胞株 IOMM-Lee 细胞,设置空白组(不做任何处理)、miR-NC 组(转染 negative control 质粒)、miR-497-m 组(转染 miR-497 mimics)和 miR-497-i 组(转染 miR-497 inhibitor),MTT 法检测细胞增殖能力,检测细胞上清液乳酸水平和细胞 ATP 含量,免疫印迹法检测细胞 FASN 蛋白表达水平。**结果** 恶性脑膜瘤组织 FASN mRNA 水平明显高于良性脑膜瘤组织( $P<0.05$ ),而 miR-497 水平则明显低于良性脑膜瘤组织( $P<0.05$ )。与空白组和 miR-NC 组相比,miR-497-m 组细胞增殖能力、细胞上清液乳酸水平、细胞 ATP 含量以及 FASN 蛋白表达水平均明显降低( $P<0.05$ );而 miR-497-i 组细胞增殖能力、细胞上清液乳酸水平、细胞 ATP 含量以及 FASN 蛋白表达水平均明显升高( $P<0.05$ )。**结论** 恶性脑膜瘤组织 miR-497 呈低表达,通过靶向促进 FASN 表达,提高肿瘤细胞内脂肪酸代谢水平,促进肿瘤细胞增殖。

**【关键词】** 恶性脑膜瘤;细胞增殖;miR-497;脂肪酸合成酶;FASN

**【文章编号】** 1009-153X(2021)02-0106-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

## Effect of miR-497 on proliferation of malignant meningioma cells

ZHOU De-cai<sup>1</sup>, WANG Shao-xiong<sup>1</sup>, HUANG Cheng<sup>1</sup>, WANG Wen-bo<sup>2</sup>. 1. Department of Neurosurgery, Haikou Third People's Hospital, Haikou 571100, China; 2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of miR-497 on the proliferation of malignant meningioma cells and its mechanism. **Methods** The levels of fatty acid synthase (FASN) mRNA and miR-497 were detected by RNA-seq and qRT-PCR in meningioma tissues obtained from 10 female patients with meningioma including 5 malignant and 5 benign meningiomas. IOMM-Lee cells were cultured in vitro and divided into blank group, miR-NC group (transfected with negative control), miR-497-m group (transfected with miR-497 mimics) and miR-497-i group (transfected with miR-497 inhibitor). The cell proliferation ability was detected by MTT method; lactic acid in cell supernatant and cell ATP contents were detected; FASN protein expression were measured using western blotting. **Results** The mRNA level of FASN was significantly higher and the miR-497 level was significantly lower in malignant meningioma tissues than benign meningioma tissues ( $P<0.05$ ). Compared with blank and miR-NC groups, the cell proliferation activity, lactate acid level in the cell supernatant, cell ATP content and FASN protein expression level significantly decreased in miR-497-m group ( $P<0.05$ ), while significantly increased in miR-497-i group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The expression level of miR-497 in malignant meningioma tissue is low, which may be by promoting FASN expression and increasing the fatty acid metabolism level in tumor cells to promote tumor cell proliferation.

**【Key words】** Malignant meningioma; miR-497; Fatty acid synthase (FASN); Cell proliferation

恶性脑膜瘤约占脑膜瘤的 20%,具有非典型特征和局部侵袭性,术后复发率高<sup>[1]</sup>,因此研究恶性脑膜瘤的生物特性和发病机制具有重要临床意义。最近有研究显示脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FASN)抑制剂可用于激素受体阳性颅内肿瘤的治疗<sup>[2]</sup>,但机制尚不清楚。miR-497 在很多恶性肿瘤中发挥着类似抑癌基因的作用<sup>[3]</sup>,通过搜索 FASN 3'-UTR 序列,我们发现其存在与 miR-497 结合的互补序

列。本研究探讨 miR-497 对恶性脑膜瘤细胞增殖的影响,为临床提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 收集 2019 年 1~9 月手术切除的女性脑膜瘤组织标本 10 例;年龄 27~63 岁;恶性脑膜瘤 5 例(WHO 分级Ⅲ级),良性脑膜瘤 5 例(WHO 分级Ⅰ级)。本研究得到我院伦理道德委员会的批准(2018-927-01),所有病人均知情同意。所有病人术前均未接受其它抗肿瘤治疗。

**1.2 细胞培养及转染** 将 IOMM-Lee 细胞株(上海拜力生物科技有限公司)置于含 10%胎牛血清的 RP-

表 1 各组细胞增殖活性比较

组别	光密度值		
	24 h	48 h	72 h
空白组	0.684±0.043	0.820±0.079	1.194±0.102
miR-NC 组	0.672±0.045	0.812±0.086	1.180±0.093
miR-497-m 组	0.513±0.038 <sup>*</sup>	0.657±0.071 <sup>*</sup>	0.895±0.057 <sup>*</sup>
miR-497-i 组	0.726±0.059 <sup>*</sup>	0.918±0.083 <sup>*</sup>	1.337±0.134 <sup>*</sup>

注:与空白组相应值比,\**P*<0.05;与 miR-NC 组相应值比,#*P*<0.05

MI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司)培养。随机分为空白组(不做任何处理)、miR-NC 组(转染 negative control)、miR-497-m 组(转染 miR-497 mimics)、miR-497-i 组(转染 miR-497 inhibitor)。按 Lipofectamine TM 2000 转染试剂盒说明书操作步骤转染细胞。

1.3 二代 RNA 测序 采用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,用 2100 型生物分析仪和 RNA6000 纳米芯片试剂盒(美国 Invitrogen 公司)测定 RNA 的含量和纯度,RIN 值>7.0。取 10 μg RNA,根据 mRNA-seq 样品制备试剂盒(美国 Illumina 公司)说明,将 poly(a)-或 poly(a)+RNA 片段随机分割成小片段,反转录成 cDNA。委托我国杭州 LC 生物技术公司利用 Illumina X10 测序仪对这些 cDNA 文库进行测序。

1.4 实时荧光定量 PCR 收集脑膜瘤组织和转染后的 IOMM-Lee 细胞,Trizol 法提取总 RNA,用逆转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司)反转录为 cDNA。按照 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书检测 miR-497 和 FASN mRNA 水平。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法量化。

1.5 MTT 法检测细胞增殖情况 将各组 IOMM-Lee 细胞按 2×10<sup>3</sup>/ml 接种至 96 孔板,培养 24、48、72 h,加入 MTT 溶液(10 μl/孔)4 h 后去除培养基,二甲基亚砷溶解结晶,用酶标仪检测 450 nm 处光密度值(optical density,OD)。

1.6 乳酸试剂盒检测细胞上清乳酸水平 取各组 IOMM-Lee 细胞(2×10<sup>5</sup>/ml)培养 48 h 后,收集上清,将标准品进行梯度稀释后,用乳酸试剂盒(美国 Bio-Vision 公司)和酶标仪检测 OD 值,绘制标准曲线。检测细胞上清中 OD 值,并根据标准曲线公式计算乳酸含量(mmol/L)。

1.7 荧光素酶法检测细胞内 ATP 水平 收集各组 IOMM-Lee 细胞(2×10<sup>5</sup>个),加入细胞裂解液,用化学发光试剂盒(美国 Invitrogen 公司)检测 ATP 含量。同样根据标准曲线公式计算 ATP 含量(nmol/mg)。

1.8 双荧光素酶报告基因实验 用生物信息学软件 Targetscan 预测 miR-633 靶基因。将 FASN mRNA 野生型或突变型 3'-UTR 分别构建成 pmiR-RB 报告载体。将 IOMM-Lee 细胞接种到 96 孔板中,与 50 nmol/L miR-497mimics 或 miR-NC 以及 50 ng 野生型或突变型 3'-UTR 载体共转染。用双荧光素酶报告分析系统检测转染后 48 h 的荧光素酶活性。

1.9 免疫印迹法检测蛋白表达 收集细胞,加入 RIPA 缓冲液裂解,测定蛋白浓度。12% SDS-PAGE 电泳及蛋白电转,10%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 FASN 一抗(1:100;赛信通(上海)生物试剂有限公司)4 ℃ 孵育过夜。HRP 标记的二抗(赛信通(上海)生物试剂有限公司)室温孵育 1 h。ECL 发光、显影后,用 Image J 分析条带的灰度值,并以目的蛋白与内参的比值计算为蛋白表达量。

1.10 统计学分析 应用 GraphPad Prism 6 软件处理;定量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,采用单因素方差分析;检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 脑膜瘤组织 FASN 和 miR-497 表达差异 mRNA-seq 分析显示,恶性脑膜瘤组织 FASN mRNA 水平(21.73±6.69)明显高于良性脑膜瘤组织(8.66±1.73;*P*<0.05);恶性脑膜瘤组织 miR-497 水平(62.08±21.59)明显低于良性脑膜瘤组织(258.83±31.20;*P*<0.05)。PCR 检测结果显示,恶性脑膜瘤组织 FASN

表 2 各组细胞上清液乳酸水平和细胞 ATP 含量比较

组别	乳酸水平(mmol/L)	ATP 含量(nmol/mg)
空白组	5.007±0.198	3.891±0.304
miR-NC 组	4.998±0.176	3.942±0.355
miR-497-m 组	3.482±0.126 <sup>*</sup>	2.457±0.171 <sup>*</sup>
miR-497-i 组	5.453±0.204 <sup>*</sup>	4.258±0.372 <sup>*</sup>

注:与空白组相应值比,\**P*<0.05;与 miR-NC 组相应值比,#*P*<0.05

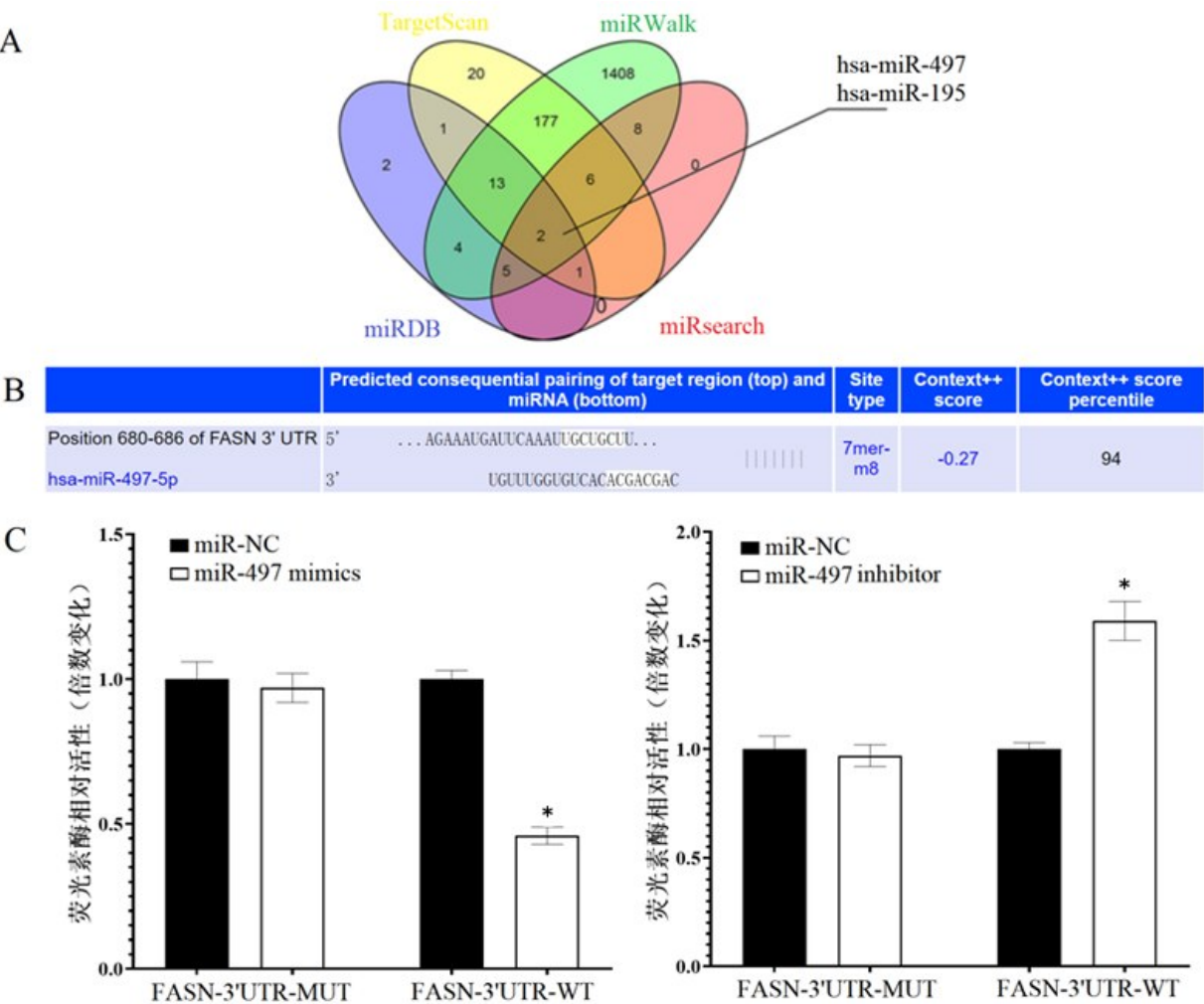


图1 生物信息学方法和荧光素酶报告基因实验分析miR-497和FASN mRNA靶向调控关系

A. 数据库筛选目标miRNA,在交叉点显示hsa-miR-497和hsa-miR-19;B. 靶向miR-497和FASN mRNA的结合位点;C. 荧光素酶报告基因检测结果,与miR-NC组相比,\*  $P < 0.05$

mRNA 水平( $3.47 \pm 0.36$ )较良性脑膜瘤组织( $1.03 \pm 0.22$ )明显增加( $P < 0.05$ ),恶性脑膜瘤组织 miR-497 水平( $0.45 \pm 0.27$ )较良性脑膜瘤组织( $1.05 \pm 0.33$ )明显降低( $P < 0.05$ )。

2.2 miR-497对IOMM-Lee细胞增殖的影响 PCR检测发现,与空白组和miR-NC组相比,miR-497-m组细胞miR-497水平明显上调( $P < 0.05$ ),miR-497-i组细胞miR-497水平明显下调( $P < 0.05$ )。这说明转染成功。MTT法检测结果显示,与空白组和miR-NC组相比,miR-497-m组细胞增殖能力明显降低( $P < 0.05$ ),而miR-497-i组细胞增殖能力明显增加( $P < 0.05$ )。见表1。

2.3 miR-497对IOMM-Lee细胞乳酸分泌和ATP含量的影响 与空白组和miR-NC组相比,miR-497-m组细胞培养上清乳酸水平和细胞ATP含量均明显降低( $P < 0.05$ ),miR-497-i组细胞培养上清乳酸水平和

细胞ATP含量均明显升高( $P < 0.05$ )。见表2。

2.4 miR-633靶基因的筛选和验证 使用生物信息学软件TargetScan、miRDB、miRsearch和miRWalk预测,miR-497存在与FASN mRNA靶向结合的序列(图1a、1b)。双荧光报告基因法验证结果显示,与miR-NC组相比,miR-497 mimics和WT-FASN 3'-UTR共转染可显著降低荧光素酶强度( $P < 0.05$ ;图1c)。

2.5 miR-497对FASN蛋白表达的影响 与空白组和miR-NC组相比,miR-497-m组细胞FASN蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ ),miR-497-i组细胞FASN蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ),见图2。

3 讨论

增殖失控是肿瘤细胞的重要特征之一。研究表明,FASN是唯一一个参与脂肪酸从头合成的关键限



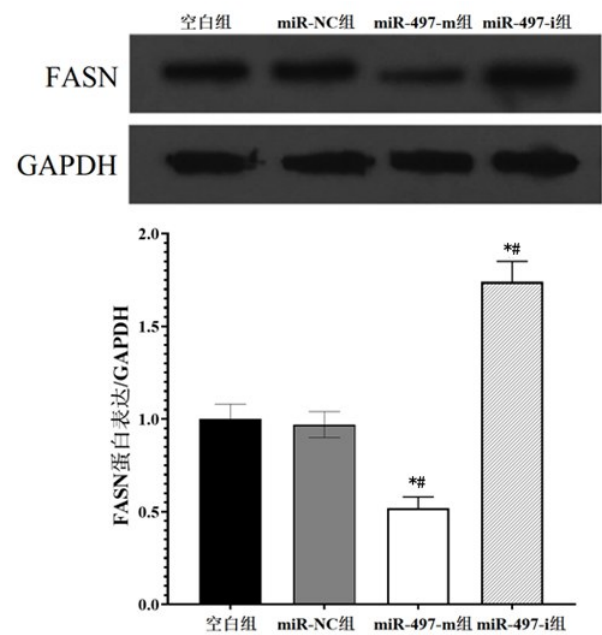


图2 免疫印迹法检测各组细胞FASN蛋白表达水平  
注:与空白组相应值比,\* $P<0.05$ ;与miR-NC组相应值比,# $P<0.05$

速酶,对于维持肿瘤细胞的增殖至关重要<sup>[4]</sup>。陈阿静等<sup>[5]</sup>发现FASN在恶性脑膜瘤组织中高度表达。Song等<sup>[6]</sup>也证实FASN基因敲除可抑制IOMM-Lee细胞的增殖、迁移和侵袭活性。本研究发现脑膜瘤组织FASN mRNA水平明显上调,而且肿瘤分级越高,FASN mRNA表达水平越高。

最近,有研究提出小分子FASN抑制剂对多种肿瘤生长有显著的抑制作用,尤其是高表达雌性激素受体的肿瘤<sup>[7]</sup>。本研究利用生物学软件筛选和双荧光素酶报告基因验证发现miR-497存在与FASN mRNA靶向结合的互补序列,提示FASN在脑膜瘤细胞中表达上调可能受miR-497的调控。miR-497是具有抑癌基因活性的miR-15家族成员之一。Chae等<sup>[8]</sup>报道miR-497在非小细胞肺癌中表达水平低于癌旁正常组织,上调miR-497表达则可以调节SMURF2依赖的转化生长因子 $\beta$ 泛素化,进而降低肺癌细胞A549的增殖活性和集落形成。本研究通过RNA-seq法和PCR法证实miR-497在恶性脑膜瘤中表达下调,尤其是恶性脑膜瘤组织降低更明显。这与Negroni等<sup>[9]</sup>研究结果一致。我们还进一步通过细胞实验证实,上调miR-497表达可以抑制IOMM-Lee细胞增殖,相反,下调miR-497表达后IOMM-Lee细胞增殖则进一步失控。这表明miR-497在恶性脑膜瘤中起抑癌基因的作用。此外,本文结果显示上调或下调miR-497表达对于IOMM-Lee细胞

FASN蛋白表达、ATP含量以及乳酸分泌也有一定的影响,说明miR-497能够通过靶向FASN降低细胞内脂肪酸代谢水平,进而抑制恶性脑膜瘤细胞的生长能力。

综上所述,恶性脑膜瘤组织miR-497呈低表达,通过靶向调控FASN表达,降低肿瘤细胞内脂肪酸代谢水平,抑制肿瘤细胞增殖能力。

【参考文献】

[1] Buerki RA, Horbinski CM, Kruser T, *et al.* An overview of meningiomas [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(21): 2161-2177.

[2] Stepanova DS, Semenova G, Kuo YM, *et al.* An essential role for the tumor-suppressor merlin in regulating fatty acid synthesis [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(18): 5026-5038.

[3] Wang JX, Zhang X, Shi JM, *et al.* Fatty acid synthase is a primary target of MiR-15a and MiR-16-1 in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 78566-78576.

[4] 孙东雷,赵田禾,赵曼羽,等. 脂肪酸合成酶作为癌症治疗靶点的生物信息学分析[J]. *现代预防医学*, 2020, 47(3): 508-513,521.

[5] 陈阿静,隋玉明,勾荣彬,等. 磷酸化蛋白激酶B、脂肪酸合成酶、血管内皮生长因子在脑膜瘤组织中的表达及意义[J]. *中国医刊*, 2019, 54(8): 917-919.

[6] Song LR, Li D, Weng JC, *et al.* MicroRNA-195 functions as a tumor suppressor by directly targeting fatty acid synthase in malignant meningioma [J]. *World Neurosurg*, 2020, 136(4): e355-e364.

[7] Angeles TS, Hudkins RL. Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2016, 11(12): 1187-1199.

[8] Chae DK, Park JY, Cho M, *et al.* MiR-195 and miR-497 suppress tumorigenesis in lung cancer by inhibiting SMURF2-induced TGF- $\beta$  receptor I ubiquitination [J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(12): 2663-2678.

[9] Negroni C, Hilton DA, Ercolano E, *et al.* GATA-4, a potential novel therapeutic target for high-grade meningioma, regulates miR-497, a potential novel circulating biomarker for high-grade meningioma [J]. *EBio Medicine*, 2020, 59(9): 102941.

(2021-01-04收稿,2021-01-20修回)