

. 实验研究 .

胶质瘤组织 miR-3653 的表达及 miR-3653 对胶质瘤 TG905 细胞侵袭、迁移的影响

范光亮 周云飞 张志龙

【摘要】目的 探讨胶质瘤组织 miR-3653 表达变化及 miR-3653 对人胶质瘤 TG905 细胞侵袭和迁移的影响及其分子机制。**方法** 收集 2017 年 1 月至 2019 年 3 月手术切除胶质瘤组织和瘤旁脑组织各 25 例。体外培养 TG905 细胞,过表达组转染 MiR-3653 mimic 质粒,过表达对照组转染 NC-MiR-3653 mimic 质粒,抑制对照组转染 NC-MiR-3653 inhibitor 质粒,抑制组转染 MiR-3653 inhibitor 质粒,miR-3653+ZEB2 过表达组同时转染 miR-3653 mimic 和 ZEB2 mimic 质粒。利用 qRT-PCR 及免疫印迹法检测 mRNA 和蛋白表达;应用 Transwell 实验和划痕实验检测细胞侵袭和迁移能力。**结果** 与瘤旁脑组织相比,胶质瘤组织 miR-3653 表达水平明显降低($P<0.05$)。低表达 miR-3653 显著促进胶质瘤 TG905 细胞的侵袭及迁移($P<0.05$)。过表达 miR-3653 显著抑制胶质瘤 TG905 细胞的侵袭及迁移($P<0.05$),明显抑制 TG905 细胞上皮-间质转化分子和 ZEB2 的表达($P<0.05$);过表达 ZEB2,可有效抑制 miR-3653 过表达的作用($P<0.05$)。**结论** 胶质瘤组织 miR-3653 呈低表达,通过靶向上调 ZEB2,促进细胞上皮-间质转化及细胞侵袭、迁移能力。

【关键词】 胶质瘤;TG8059 相比;微小核糖核酸(microRNA, miRNA);miR-3653;细胞侵袭;细胞迁移;上皮-间质转化;ZEB2

【文章编号】 1009-153X(2021)03-0180-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Expression of miR-3653 in human glioma tissues and effect of miR-3653 on invasion and migration of glioma TG905 cells

FAN Guang-liang¹, ZHOU Yun-fei², ZHANG Zhi-long². 1. Department of Neurosurgery, Longkou Nanshan Health Valley Cancer Hospital, Yantai 265700, China; 2. Binzhou Medical University, Yantai 264033, China

【Abstract】Objective To investigate the expression of miR-3653 in human glioma tissues and the effect of miR-3653 on the cell invasion and migration of human glioma TG905 cells. **Methods** The expression levels of miR-3653 were detected in glioma tissues and para-glioma tissues obtained from 25 patients with glioma who underwent microsurgery from January 2017 to March 2019. TG905 cells were cultured in vitro. The plasmids of MiR-3653 mimic, SEB2 mimic, and MiR-3653 inhibitor were transfected into the TG905 cells to up-regulate the expression of miR-3653 and ZEB2 and to down-regulate the expression of miR-3653, respectively. qRT-PCR and western blotting were used to detect the mRNA and protien expression. Transwell assay and wound-healing assay were used to detect the invasion and migration of TG905 cells. **Results** The expression lvl of miR-3653 in glioma tissues was significantly lower than that in para-glioma tissues ($P<0.05$). Down-regulation of miR-3653 significantly promoted the invasion and migration of TG905 cells ($P<0.05$). Overexpression of miR-3653 significantly inhibited the invasion and migration of TG905 cells, and significantly decreased the mRNA and protein expression levels of the ZEB2 and proteins related to epithelial-mesenchymal transition (EMT) ($P<0.05$). Overexpression of ZEB2 significantly inhibited the effect of overexprsion of miR-3653 on the TG905 cells ($P<0.05$). **Conclusions** The expression of miR-3653 in glioma tissues is low, which may be by targeting up-regulation of ZEB2 to promote EMT and cell invasion and migration.

【Key words】 Glioma; miR-3653; Cell invasion; Cell migration; Epithelial-mesenchymal transition; ZEB2

胶质瘤是最常见的颅内恶性肿瘤,具有高发病率和高病死率的特点^[1]。当前,临床上的治疗手段通常为手术切除、放疗和化疗,也有应用靶向治疗^[2]。然而,胶质瘤的预后非常差,中位生存期仅 10~15 个月^[3],高级别胶质瘤预后更差。导致胶质瘤整体生存时间短、生活质量低的潜在原因,一般认为是胶质瘤

的恶性侵袭和远处迁移^[4]。因此,寻找有效的预后标志物有助于胶质瘤预后判断,可以进一步指导胶质瘤的治疗。文献报道 miR-3653 对肝癌细胞的侵袭和迁移具有抑制作用^[5]。本文探讨 miR-3653 对胶质瘤细胞侵袭和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取 2017 年 1 月至 2019 年 3 月手术切除的胶质瘤组织 25 例,其中男 15 例,女 10 例;平均年龄(62.96±5.86)岁;WHO 分级Ⅱ级 3 例,Ⅲ级 13 例,Ⅳ级 9 例;所有病人术前均未行抗肿瘤治疗,切

除胶质瘤及瘤旁 2 cm 处脑组织,放入液氮保存。

1.2 细胞培养 将TG905细胞从液氮中取出,37 ℃快速融化,置于含 10%胎牛血清(美国 Gibco 公司)的 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)中培养,待细胞长至 80%的融合度时,进行传代处理,培养 3~4 代后,取对数生长期细胞进行后续实验。

1.3 瞬时转染 待细胞融合度达到 60%以上时,使用 Lipfectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司)进行转染,严格按照说明书进行操作。过表达组转染 MiR-3653 mimic 质粒,过表达对照组转染 NC-MiR-3653 mimic 质粒,抑制对照组转染 NC-MiR-3653 inhibitor 质粒,抑制组转染 MiR-3653 inhibitor 质粒,miR-3653+ZEB2 过表达组同时转染 miR-3653 mimic 和 ZEB2 mimic 质粒。

1.4 实时定量 PCR 检测 mRNA 表达 使用 TRIzol 法提取胶质瘤组织总 RNA,使用 cDNA 反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司)反转录为 cDNA,以 U6 和 GAPDH 为内参。U6 引物:正义链 5'-CTCGCTTCG-GCAGCACA-3',反义链 5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3';GAPDH 引物正义链 5'-TGTAAGTTCAGTCAATGA AGGG-3',反义链 5'-ACATCGCTCA GACACCATG-3';miR-3653 引物正义链 5'-TCTCCC-GAG AGACATATTT-3',反义链 5'-GATGAGAAGG-TATGAATCA-3'。反应体系为 20 μl:2×SYBR Pre-mix 10 μl,H₂O 8 μl,cDNA 1 μl,上下游引物个 0.5 μl。反应条件为:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 15 s、60 ℃退火 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环。根据 2^{-ΔΔCt} 算法计算 mRNA 表达量。

1.5 免疫印迹法检测蛋白表达 使用 RIPA 蛋白提取试剂盒(上海碧云天生物技术公司)进行细胞总蛋白提取。加入适当的 RIPA 裂解液,冰上收集细胞,每隔 3 min 震荡一次。12 000 转/min 离心 10 min,收集上清液。使用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离蛋白,湿转将蛋白转到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1.5 h,加入一抗 4 ℃过夜孵育,加二抗室温孵育 1.5~2 h 后,进行曝光处理。以 GAPDH 为内参,采用 Image J 软件分析每个蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值之比,以其比值作为目的蛋白表达水平。

1.6 胶质瘤细胞侵袭能力的检测 使用 Transwell 法检测胶质瘤细胞的侵袭能力。用无血清培养基制备含有胶质瘤细胞的细胞悬液,加入适当细胞悬浮液到上室中。然后,将含 10%胎牛血清的 DMEM 加入到下室中。细胞孵育 24 h 后,使用结晶紫染色,并在倒置显微镜(200 倍)下,对随机 5 个视野区域进行观

察,进行细胞计数,重复 3 次。

1.7 胶质瘤细胞迁移能力的检测 使用划痕实验检测胶质瘤细胞的迁移能力。将细胞接种到 12 孔中,待其全部长满,使用 100 μl 的枪头进行划痕,用 PBS 将划掉细胞洗净,同时加入无血清培养基进行培养。处理 0、48 h 后,在倒置显微镜下观察并拍照。细胞迁移率=(0 h 划痕宽度-48 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%。重复 3 次。

1.8 统计学处理 使用 SPSS 20.0 软件分析;定量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,行 *t* 检验和单因素方差分析;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤组织 miR-3653 的表达 与瘤旁脑组织相比,胶质瘤组织 miR-3653 表达量明显下调(*P*<0.05,图 1)。

2.2 过表达 miR-3653 抑制 TG905 细胞的上皮-间质

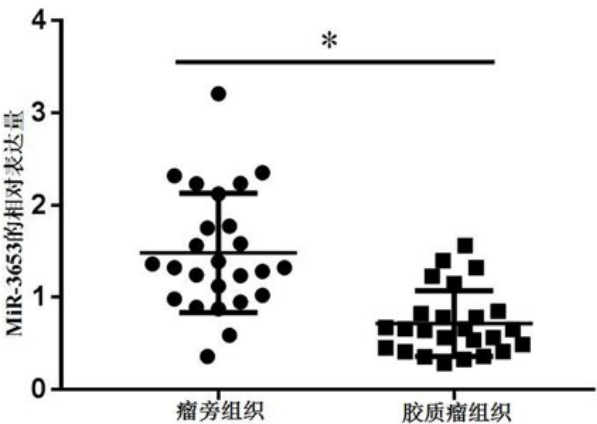


图 1 胶质瘤组织 miR-3653 的表达水平与瘤旁组织相比,**P*<0.05

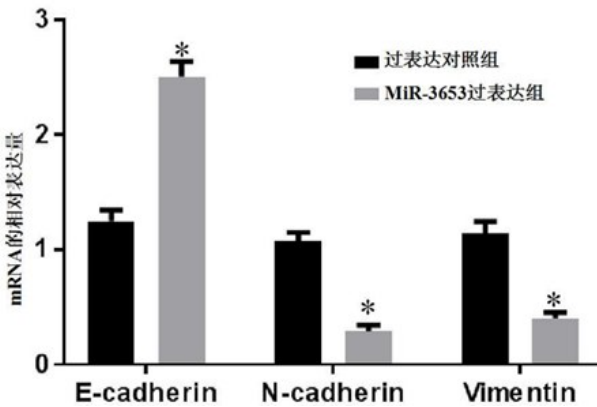


图 2 miR-3653 过表达对胶质瘤 TG905 细胞 EMT 标志分子 mRNA 表达的影响与过表达对照组相比,**P*<0.05;EMT. 上皮-间质转化;E-cadherin. 上皮型钙黏蛋白;N-cadherin. 神经型钙黏蛋白;Vimentin. 波形蛋白

转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 能力与过表达对照组相比,过表达组上皮型钙黏蛋白 mRNA 水平明显升高 ($P<0.05$),而神经型钙黏蛋白和波形蛋白 mRNA 水平明显降低 ($P<0.05$)。见图 2。

2.3 miR-3653 抑制胶质瘤 TG905 细胞的侵袭和迁移能力 与过表达对照组相比,miR-3653 过表达组 miR-3653 水平显著提高 ($P<0.05$,图 3A),明显抑制

TG905 细胞的迁移和侵袭 ($P<0.05$,图 3B、3C)。与抑制对照组相比,miR-3653 抑制组 miR-3653 水平显著降低 ($P<0.05$,图 3D),明显促进 TG905 细胞的迁移和侵袭 ($P<0.05$,图 3E、3F)。

2.4 过表达 miR-3653 抑制 TG905 细胞 ZEB2 表达 与过表达对照组相比,过表达组 ZEB2 表达水平明显降低 ($P<0.05$,图 4A、4B)。与抑制对照组相比,抑制

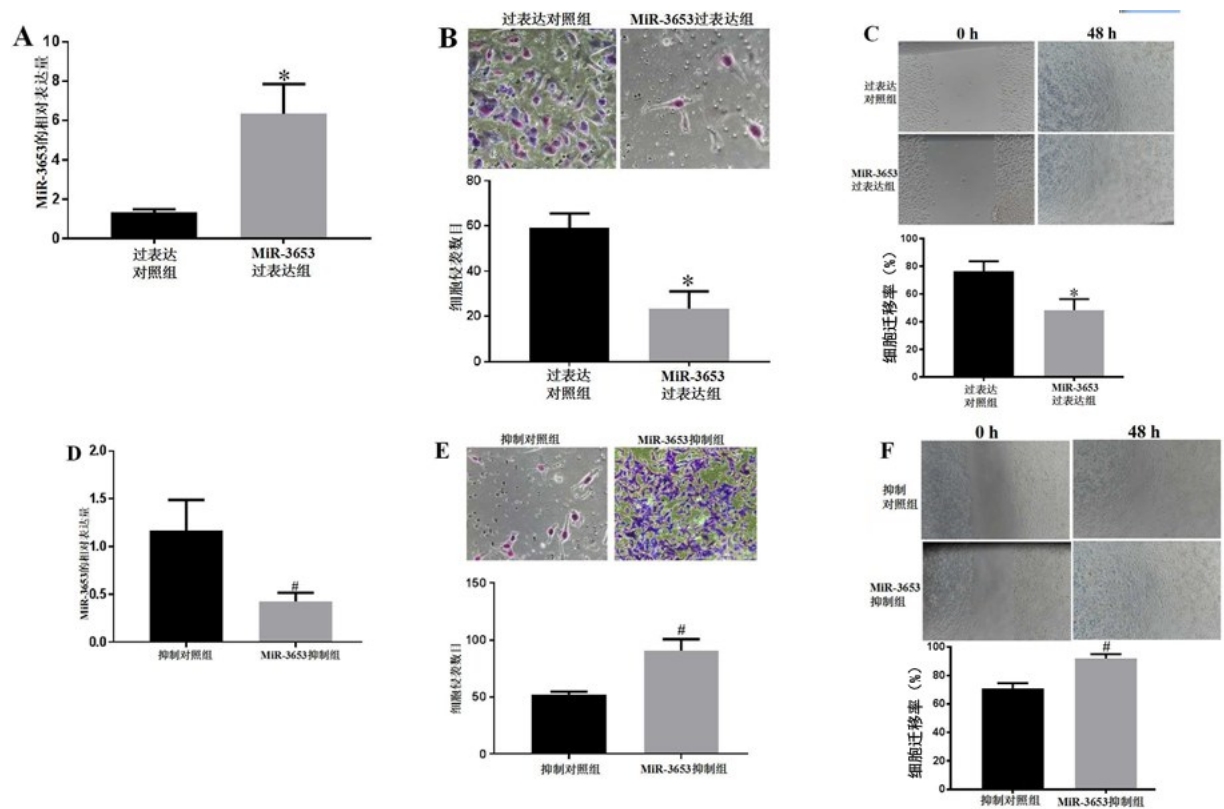


图 3 miR-3653 对胶质瘤 TG905 细胞侵袭和迁移的影响 与过表达对照组相比,* $P<0.05$;与抑制对照组相比,# $P<0.05$

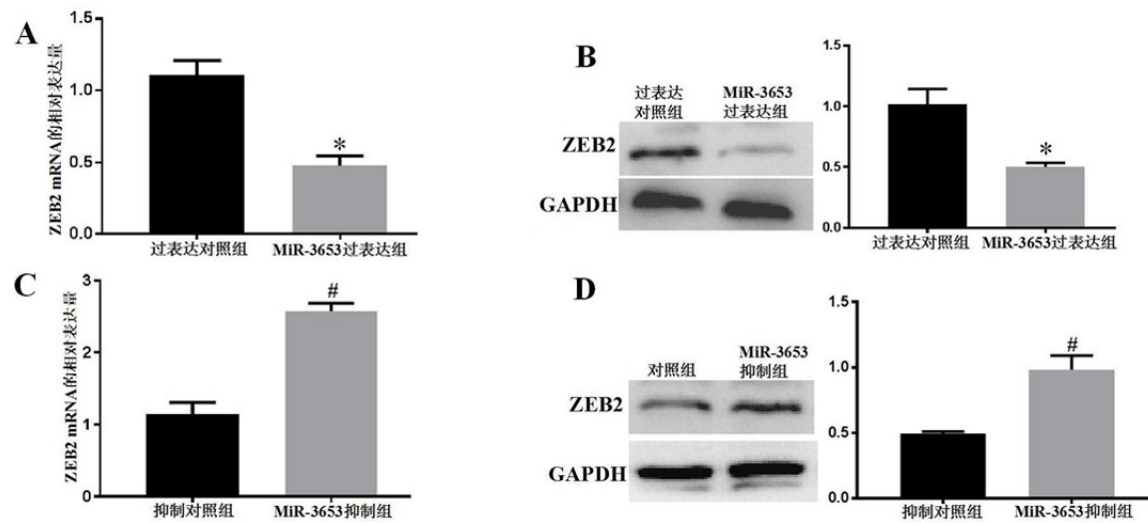


图 4 miR-3653 对胶质瘤 TG905 细胞 ZEB2 表达的影响 与过表达对照组相比,* $P<0.05$;与抑制对照组相比,# $P<0.05$

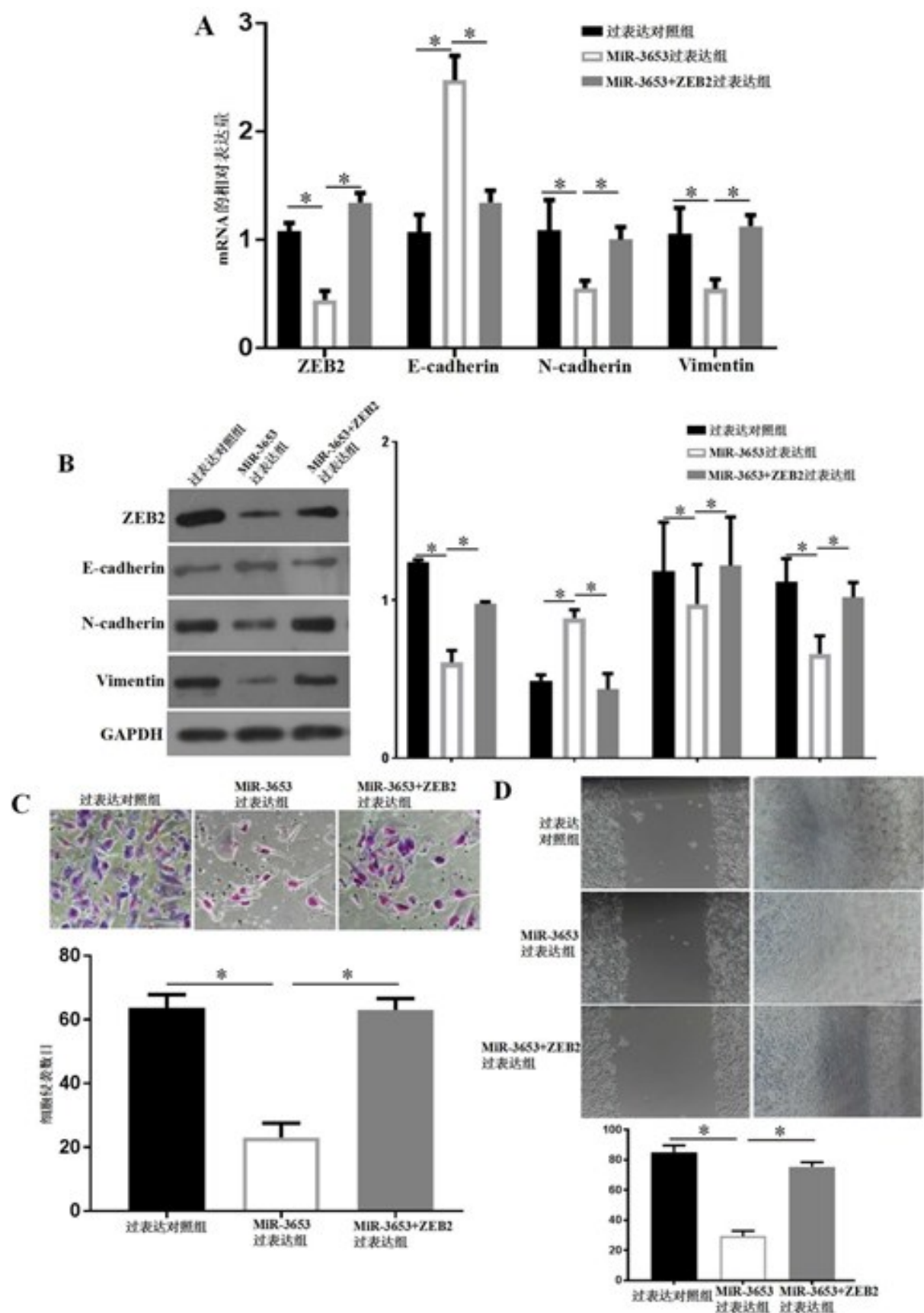


图5 过表达ZEB2抑制miR-3653对胶质瘤TG905细胞的作用
与miR-3653过表达组相比,* $P<0.05$;E-cadherin. 上皮型钙黏蛋白;N-cadherin. 神经型钙黏蛋白;Vimentin. 波形蛋白

组 ZEB2 表达水平明显升高($P<0.05$,图 4C、4D)。

2.5 过表达 ZEB2 抑制 miR-3653 对 TG905 细胞的作用 与过表达组相比,miR-3653+ZEB2 过表达组上皮型钙黏蛋白 mRNA 和蛋白水平明显降低($P<0.05$,图 5A、5B),而神经型钙黏蛋白和波形蛋白 mRNA 和蛋白水平明显增高($P<0.05$,图 5A、5B),TG905 细胞的侵袭和迁移能力显著增加($P<0.05$,图 5C)。

3 讨论

某些参与肿瘤进展的相关蛋白被报道为胶质瘤病人预后的潜在生物标志物,然而由于特异性和敏感性有限,只有少数在临床中具有实用价值。随着表观遗传学的发展,许多 miRNA 被认为是胶质瘤发生发展过程中的重要调控因子,可调节肿瘤细胞增殖和耐药性^[6]。某些 miRNA 可以作为肿瘤的诊断和预后预测的生物标志物以及治疗靶点^[7]。本研究发现胶质瘤组织 miR-3653 表达下调;过表达 miR-3653 明显抑制胶质瘤 TG905 细胞的迁移和侵袭,而其表达下调则增强胶质瘤 TG905 细胞的侵袭能力。这表明过表达 miR-3653,可通过抑制胶质瘤细胞的侵袭而发挥抗肿瘤作用。

EMT 是肿瘤转移的重要机制之一,上皮型钙黏蛋白、神经型钙黏蛋白和波形蛋白是 EMT 的标志分子。在 EMT 过程中,肿瘤细胞失去上皮特征,获得间质表型,从而增强转移能力^[8]。本文结果显示过表达 miR-3653 导致上皮型钙黏蛋白表达水平明显升高,神经型钙黏蛋白和波形蛋白表达水平明显降低,而抑制 miR-3653 则相反。这表明,过表达 miR-3653 明显抑制胶质瘤 TG905 细胞 EMT 能力。

研究显示,转录因子(比如 Twist 和 Zeb 蛋白)是肿瘤细胞 EMT 过程中的关键调控因子^[9,10]。有文献报道,ZEB2 含有 miR-3653 的互补序列,miR-3653 可以通过这些互补序列与 ZEB2 的 3'-UTR 相互作用^[11]。本研究结果显示过表达 miR-3653 明显抑制胶质瘤 TG905 细胞 ZEB2 的表达;反过来,过表达 ZEB2 则明显抑制 miR-3653 过表达对胶质瘤 TG905 细胞的作用。

总之,胶质瘤组织 miR-3653 呈低表达,通过靶向上调 ZEB2,促进细胞上皮-间质转化及细胞侵袭、迁移能力。这提示 miR-3653 可能会成为胶质瘤新的生物标志物和治疗靶点。

【参考文献】

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.

[2] Delgado -López PD, Corrales-García EM, MartinoJ, *et al.* Diffuse lowgrade glioma: a review on the new molecular - classification, natural history and current management strategies [J]. Clin Transl Oncol, 2017, 19(8): 931-944.

[3] Sturm D, Pfister SM, Jones DTW. Pediatric gliomas:current concepts on diagnosis, biology, and clinical management [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(21): 2370-2377.

[4] Davis ME. Epidemiology and overview of gliomas [J]. Semin Oncol Nurs, 2018, 34(5): 420-429.

[5] Zhang L, Zhang T , Deng Z, *et al.* MicroRNA3653 inhibits the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting ITGB1 [J]. Oncol Rep, 2019, 41(3):1669-1677.

[6] Chen Y, Li ZH, Liu X, *et al.* Reduced expression of miR-3653 in glioma and its correlations with clinical progression and patient survival [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(15): 6596-6601.

[7] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, *et al.* MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma [J]. JAMA, 2008, 299(4): 425-436.

[8] Vera J, Lai X, Schmitz U, *et al.* MicroRNA-regulated networks: the perfect storm for classical molecular biology, the ideal scenario for systems biology [J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 774: 55-76.

[9] Xie J, Tan ZH, Tang X, *et al.* MiR-374b-5p suppresses RECK expression and promotes gastric cancer cell invasion and metastasis [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(46): 17439-17447.

[10] Zaravinos A. The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer [J]. J Oncol, 2015, 2015: 1-13.

[11] Zhu W, Luo X, Fu H, *et al.* MiR-3653 inhibits the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of colon cancer by targeting Zeb2 [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(10): 1-17.

(2020-02-29 收稿, 2020-05-27 修回)