

. 实验研究 .

上调 miR-124-3p 表达增加 U-87 MG 人胶质母细胞瘤细胞的放疗敏感性

麦麦提依明·托合提 张 诚 黄啸元 高 峰 帕热哈提江·依孜木
阿卜杜喀迪尔·牙森 董 军 杨小鹏 吴永刚

【摘要】目的 探讨 miR-124-3p 表达水平对 U-87 MG 人胶质母细胞瘤细胞(U87 细胞)放疗敏感性的影响。**方法** 体外培养 U87 细胞,利用脂质体载体转染技术转染 hsa-miR-124-3p mimics 或 hsa-miR-124-3p inhibitor 质粒调控 miR-124-3p 表达;转染 24 h 后,取生长状态良好的 U87 细胞,在室温下用西门子 Primus-M 型直线加速器进行照射(16 Gy)模拟放疗;实时荧光定量 PCR 检测细胞 miR-124-3p 表达水平,CCK-8 法检测细胞增殖能力。**结果** 转染 hsa-miR-124-3p mimics 质粒后,细胞 miR-124-3p 表达水平明显上调($P<0.05$);转染 hsa-miR-124-3p inhibitor 质粒后,细胞 miR-124-3p 表达水平明显下调($P<0.05$)。上调 miR-124-3p 表达,U87 细胞增殖活性明显降低($P<0.05$);下调 miR-124-3p 表达,U-87 细胞增殖活性明显增高($P<0.05$)。上调 miR-124-3p 表达联合放疗,U87 细胞增殖活性进一步明显降低($P<0.05$);下调 miR-124-3p 表达联合放疗,U87 细胞增殖活性明显降低,但仍明显高于未给予任何处理的 U87 细胞的增殖活性($P<0.05$)。**结论** 上调 miR-124-3p 表达明显抑制 U87 细胞的增殖活性,并且显著增加 U87 细胞的放疗敏感性。

【关键词】 胶质母细胞瘤;U87 MG 细胞;miR-124-3p;细胞增殖;放疗敏感性

【文章编号】 1009-153X(2024)07-0422-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41

Upregulation of miR-124-3p expression increases the radiosensitivity of U-87 MG human glioblastoma cells

MAIMAITIYIMING Tuoheti, ZHANG Cheng, HUANG Xiao-yuan, GAO Feng, PAERHATIJIAN Yizimu, ABUDUKADIER Yasen, DONG Jun, YANG Xiao-peng, WU Yong-gang. Department of Neurosurgery, The People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of miR-124-3p expression on the radiosensitivity of U-87 MG human glioblastoma cells (U87 cells). **Methods** U87 cells were cultured in vitro. The expression of miR-124-3p was regulated by transfecting hsa-miR-124-3p mimics or hsa-miR-124-3p inhibitor plasmids using liposome vector transfection technology. After 24 hours of transfection, U87 cells in good growth condition were irradiated at room temperature using a Siemens Primus-M linear accelerator (16 Gy) to simulate radiotherapy. The expression level of miR-124-3p in U87 cells was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the proliferation ability of U87 cells was detected by the CCK-8 method. **Results** After transfection with hsa-miR-124-3p mimics plasmids, the expression level of miR-124-3p in U87 cells was significantly upregulated ($P<0.05$); after transfection with hsa-miR-124-3p inhibitor plasmids, the expression level of miR-124-3p in U87 cells was significantly downregulated ($P<0.05$). Upregulating the expression of miR-124-3p significantly reduced the proliferation activity of U87 cells ($P<0.05$); downregulating the expression of miR-124-3p significantly increased the proliferation activity of U87 cells ($P<0.05$). The combination of upregulating miR-124-3p expression and radiotherapy further significantly reduced the proliferation activity of U87 cells ($P<0.05$); the combination of downregulating miR-124-3p expression and radiotherapy significantly reduced the proliferation activity of U87 cells, but was still significantly higher than the proliferation activity of U87 cells without any treatment ($P<0.05$). **Conclusions** Upregulating the expression of miR-124-3p significantly inhibits the proliferation activity of U87 cells and significantly increases their radiosensitivity.

【Key words】 Glioblastoma; U87 MG cells; miR-124-3p; Cell proliferation; Radiosensitivity

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2024.07.008

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2022D01C625, 2019D01C107, 2017D01C146)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院神经外科(麦麦提依明·托合提、张 诚、黄啸元、高 峰、帕热哈提江·依孜木、阿卜杜喀迪尔·牙森、董 军、杨小鹏、吴永刚)

通信作者:吴永刚,Email: wyg931543@163.com

胶质瘤是起源于神经上皮组织的恶性肿瘤,其中胶质母细胞瘤恶性程度最高(WHO 分级Ⅳ级)^[1]。胶质母细胞瘤通常呈侵袭性,手术难以完全切除,易复发,术后放化疗效果欠佳。微小核糖核酸(microRNAs, miRNA)是一类高度保守的非编码小 RNA 分子,通过抑制翻译、控制 mRNA 剪切,促进 mRNA 降解,在细胞增殖、分化以及凋亡中具有重要

作用^[2]。我们前期通过基因芯片技术对胶质母细胞瘤放疗敏感性有关基因进行筛选,并通过实时荧光定量 PCR 技术对其中四种 miRNA 进行验证^[3]。本研究从 miR-124-3p 入手,探讨其表达水平对胶质母细胞瘤细胞放疗敏感性的影响。

1 资料与方法

1.1 细胞培养 U-87 MG 人胶质母细胞瘤细胞(U87 细胞)购自中科院上海细胞库,培养于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中,在含 10%胎牛血清及 100 μg/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中培养,待贴壁生长至 90%时,使用胰蛋白酶消化传代。

1.2 细胞分组 将细胞分为 5 个组,包括空白对照组(control)、miR-124-3p 高表达对照组(hsa-miR-124-3p mimics NC)、miR-124-3p 高表达组(hsa-miR-124-3p mimics)、miR-124-3p 低表达对照组(hsa-miR-124-3p inhibitor NC)、miR-124-3p 低表达组(hsa-miR-124-3p inhibitor)。

1.3 细胞转染技术 细胞转染所用的 RNA 片段信息(hsa-miR-124-3p mimics: UAA GGC ACG CGG UGA AUG CCA AAG CAU UCA CCG CGU GCC UUA UU; mimics NC: UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT; hsa-miR-124-3p inhibitor: UUG GCA UUC ACC GCG UGCC UUA; Inhibitor NC: CAG UAC UUU UGU GUA GUA CAA)由新疆康智睿生物技术有限公司提供。取处于对数生长期、生长状态良好的 U87 细胞,接种于 6 孔板,用 100 μl 无血清 opti-MEM 分别稀释 10 μl miRNA (20 μmol/L),室温下静置 5 min,然后取 3 μl 的 LipofectamineTM 2000 稀释在 100 μl opti-MEM 中,然后混合 LipofectamineTM 2000 和 DNA 的稀释液,轻轻混匀并在室温下静置 20 min,每个培养孔加混合液 200 μl;培养 6 h 后,吸出混合液换入正常培养基,同时置于荧光显微镜下拍照。

1.4 实时荧光定量 PCR 技术 用实时荧光定量 PCR 技术检测细胞 miR-124-3p 表达量。首先,采用经典的 TRIzol(美国 Ambion 公司)提取总 RNA,紫外分光光度计测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 以及总 RNA 浓度。Primer ScriptTM RT reagent Kit 将 1 μg 总 RNA 反转录反应获得 cDNA。采用实时荧光定量 PCR 检测 miRNA 的表达。反应条件:95 ℃进行 2 min 初始变性,随后在 95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 30 s,最后 60 ℃延伸 30 s,扩增 40 个循环。以 U6 作为内参。根据 2^{-ΔΔC_t} 法计算相对表达量。引物序列:hsa-miR-124-3p 正义链

5'-TGCGCTAAGGCACGCGGTGAAT-3',反义链 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCAC - TGGATACGACTTGGCATT-3';内参 U6 正义链 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC- 3',反义链 5'-AAATATGGAACGCTTCACGA-3'。

1.5 CCK8 增殖实验 取生长状态良好的 U87 细胞,用 DMEM 培养基调整细胞密度到 5×10³ 个/100 μl,接种 96 孔板,同时设空白组,每组 3 个复孔,培养 24 h、48 h、72 h,每孔加入 10 μl CCK8 培养 4 h;酶标仪测定 450 nm 处吸光度。

1.6 放疗方法 转染 24 h 后取生长状态良好的 U87 细胞,给予 16 Gy 射线照射,均在室温下用西门子 Primus-M 型直线加速器进行照射。照射 24 h 后用 DMEM 培养基调整细胞密度到 5×10³ 个/100 μl,接种 96 孔板,同时设空白组,每组 3 个复孔,培养 24、48、72 h,CCK8 实验检测 450 nm 处吸光度。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件分析;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 *t* 检验;以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染效果 荧光显微镜下观察发现,空白对照组,几乎没有绿色荧光(图 1A、1B);转染 miR-124-3p mimics 质粒后,出现绿色强荧光(图 1C、1D);转染 miR-124-3p inhibitor 质粒后,绿色荧光明显减弱(图 1E、1F)。实时定量 PCR 检测显示,与空白对照组相比,转染 miR-124-3p mimics 质粒后,miR-124-3p 表达量明显增加(*P* < 0.01;图 2);转染 miR-124-3p inhibitor 质粒后,miR-124-3p 表达量明显下降(*P* < 0.01;图 2)。

2.2 miR-124-3p 表达水平对 U87 细胞增殖活性的影响 与空白对照组相比,转染 miR-124-3p mimics 质粒后,U87 细胞增殖活性明显降低(*P* < 0.05;表 2);转染 miR-124-3p inhibitor 质粒后,U87 细胞增殖活性明显增高(*P* < 0.05;表 1)。

2.3 放疗对 U87 细胞增殖活性的影响 与放疗前相比,所有 U87 细胞放疗后增殖活性均明显降低(*P* < 0.05;表 1)。与放疗后空白对照组相比,转染 miR-124-3p mimics 质粒后,U87 细胞增殖活性明显降低(*P* < 0.05;表 1);转染 miR-124-3p inhibitor 质粒后,U87 细胞增殖活性明显增高(*P* < 0.05;表 1)。

3 讨论

近年来,随着分子生物学的进展,对肿瘤的认识

有了很大的进步,但胶质母细胞瘤恶性程度高,呈侵袭性生长,手术难以完全切除,放化疗效果欠佳,仍是临床难题^[4]。深入研究胶质瘤细胞高侵袭性以及放疗耐受性的发生机制,有助于改进治疗方法,最终为提高病人生活质量及改善预后提供更有效的方案。很多因素在胶质母细胞瘤侵袭性生长中起重要作用,包括癌基因、抑癌基因,侵袭性相关细胞因子、miRNA、外泌体等,其中 miRNA 作为近几年来研究的热点,其在胶质瘤细胞高侵袭性以及放疗耐受性的发生机制有待进一步研究^[5]。

miRNA 广泛存在于真核生物的细胞内,通过与 3'端或 5'端的非翻译区结合方式对 DNA 进行直接或间接的调控,从而影响细胞的增殖、分化和凋亡等,调节生物体生长与发育^[6]。miRNA 对肿瘤的生长和侵袭起到抑制或促进的作用,例如 miR-21、miR-17、miR-155 和 miR-2 等作为致癌因子发挥作用,而 let-7 家族、miR-34 家族和 miR-15a 等是作为抑癌因子发挥作用的^[6,7]。还有一些 miRNA 可能在损伤后急

性炎症反应后有重要作用^[8]。研究发现,miRNA 在脑胶质瘤中具有重要作用,可通过调控靶 mRNA 的表达,影响脑胶质瘤增殖、迁移和侵袭等生物学行为^[9]。

我们前期通过对胶质母细胞瘤放疗前标本进行收集并根据其对放疗敏感性分组,通过基因芯片技术对放疗敏感有关 miRNA 进行筛选,通过实时定量 RNA 技术对其中差异较大的 miRNA 进行分析后得到四种胶质母细胞瘤放射敏感性有关 miRNA,其中 miR-124-3p 在放疗敏感性高胶质母细胞瘤中表达明显升高^[3]。miR-124 存在大量的靶基因,在许多肿瘤中表达下调,比如宫颈癌、乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌、及食管癌,是一个抑癌基因^[10-12]。有研究表明,miR-124 影响肿瘤细胞增殖、侵袭和转移、促进细胞凋亡和自噬发生^[11-13]。miR-124-3p 是 miR-124 家族成员之一,是一种中枢神经系统特异性高表达的 miRNA,与中枢神经系统的神经发育、胶质细胞再生、修复和炎症反应密切相关^[14]。Zhao 等^[15]通过基因干扰技术对 U251 和 U373 胶质瘤细胞系进行 miR-

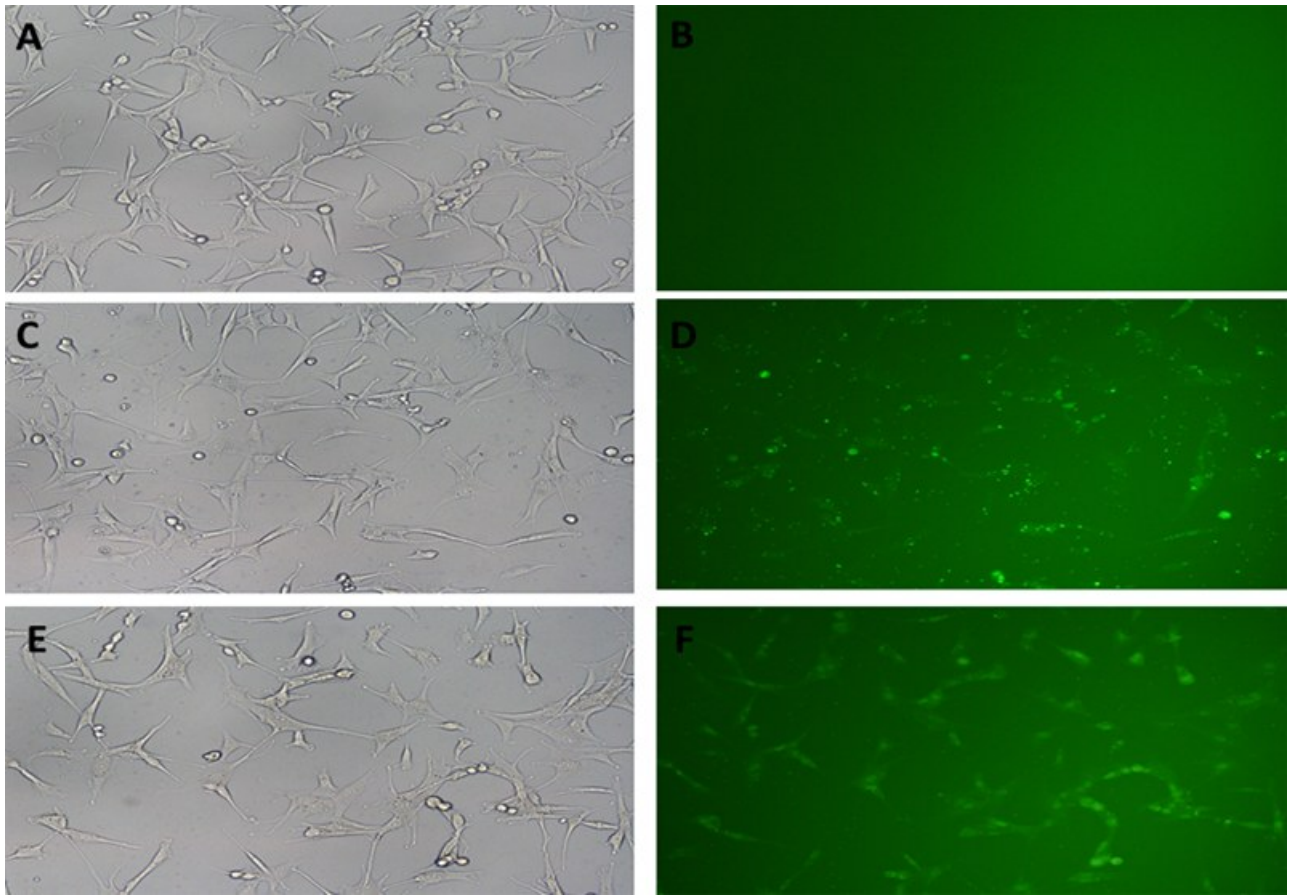


图1 荧光显微镜观察 hsa-miR-124-3p 质粒转染胶质母细胞瘤U87细胞(×100)

A、B. 空白对照组;C、D. 转染 hsa-miR-124-3p mimics 质粒;E、F. 转染 hsa-miR-124-3p inhibitor 质粒

Figure 1 Fluorescence microscopic observation of hsa-miR-124-3p plasmid transfection in glioblastoma U87 cells (×100)

A-B: Blank control group. C-D: Transfection with hsa-miR-124-3p mimics plasmid. E-F: Transfection with hsa-miR-124-3p inhibitor plasmid.

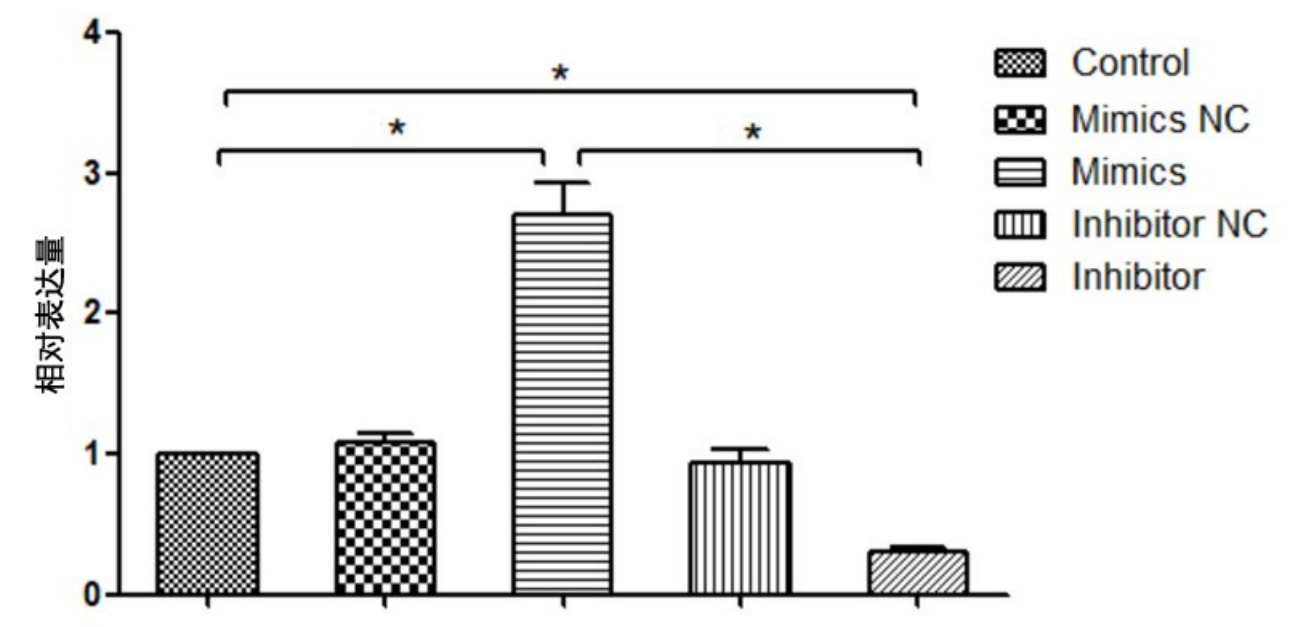


图2 转染 miR-124-3p 质粒对胶质母细胞瘤 U87 细胞 miR-124-3p 表达的影响

* $P<0.01$; Control. 空白对照组; Mimics NC. miR-124-3p 高表达对照组; Mimics. miR-124-3p 高表达组; Inhibitor NC. miR-124-3p 低表达对照组; inhibitor. miR-124-3p 低表达组

Figure 2 Effects of transfecting miR-124-3p plasmids on miR-124-3p expression in glioblastoma U87 cells

* $P<0.01$. Control: Blank control group. Mimics NC: miR-124-3p high expression control group. Mimics: miR-124-3p high expression group. Inhibitor NC: miR-124-3p low expression control group. Inhibitor: miR-124-3p low expression group.

表1 上调 miR-124-3p 表达联合放疗对 U-87 MG 人胶质母细胞瘤细胞的增殖活性的影响

Table 1 Effects of upregulating miR-124-3p expression combined with radiotherapy on the proliferative activity of U-87 MG human glioblastoma cells

组别	24 h		48 h		72 h	
	放疗前	放疗后	放疗前	放疗后	放疗前	放疗后
空白对照组	0.444±0.002	0.208±0.008 [#]	0.858±0.049	0.312±0.019 [#]	1.068±0.139	0.521±0.017 [#]
Mimics NC 转染组	0.448±0.031	0.198±0.010 [#]	0.853±0.058	0.320±0.028 [#]	1.046±0.129	0.522±0.022 [#]
hsa-miR-124-3p mimics 转染组	0.343±0.013 [*]	0.076±0.034 ^{##}	0.488±0.127 [*]	0.159±0.011 ^{##}	0.662±0.106 [*]	0.334±0.005 ^{##}
inhibitor NC 转染组	0.446±0.022	0.182±0.019 [#]	0.860±0.070	0.323±0.019 [#]	1.058±0.135	0.518±0.024 [#]
hsa-miR-124-3p inhibitor 转染组	0.553±0.007 [*]	0.284±0.007 ^{##}	1.177±0.072 [*]	0.475±0.020 ^{##}	1.417±0.114 [*]	0.675±0.0454 ^{##}

注:与空白对照组相应值比,* $P<0.05$;与放疗前相应值比,# $P<0.05$

124-3p 基因干扰,结果显示 miR-124-3p 可通过 PPP1R13L 抑制胶质母细胞瘤增殖及侵袭性生长。Silber 等^[16]通过对 U87 细胞系进行干预后也发现类似现象。沈凯等^[17]发现 miR-124-3p 表达下调,小鼠少突胶质细胞系小胶质细胞系 BV2 细胞自噬水平显著上升;过表达 miR-124-3p 能有效抑制由脂多糖引起的 BV2 细胞活力降低,并有效抑制脂多糖引起的细胞自噬。本研究采用应用更为广泛并增殖率更高的 U87 细胞作为研究对象,结果显示 miR-124-3p 具有抑制 U87 细胞增殖活性的作用。

胶质母细胞瘤另外一个特征是放疗耐受性。Deng 等^[18]通过收集放疗敏感/耐受病人肿瘤标本进一步研究,发现 miR-124 通过 CDK4 轴增强胶质母细胞瘤细胞对放疗敏感性。Bahreyni 等^[19]指出 miR-7、miR-10b、miR-124、miR-128、miR-320、miR-21、miR-203、miR-15 等,可通过调控增殖、凋亡、DNA 修复、细胞周期等影响胶质瘤放射敏感性。本研究结果显示增加 miR-124-3p 表达量可显著增加放疗对 U87 细胞的抑制能力。

总之,上调 miR-124-3p 表达明显抑制 U87 细胞

的增殖活性,并且显著增加 U87 细胞的放疗敏感性。但其具体机制有待进一步探讨。

【利益冲突声明】:本文不存在任何利益冲突。

【作者贡献声明】:麦麦提依明·托合提负责项目设计、完成部分实验、整理数据、统计学分析及论文撰写;张诚负责协助完善部分实验及统计学分析;黄啸元负责部分实验的完成;高峰、阿卜杜喀迪尔·牙森、董军、杨小鹏负责协助统计学分析及协助论文撰写;帕热哈提江·依孜木负责协助统计学分析及相关图片制作;吴永刚负责把握整个研究质量、协助论文撰写及修改。

【参考文献】

[1] YIN Y, QIU S, PENG Y. Functional roles of enhancer of zeste homolog 2 in gliomas [J]. *Gene*, 2016, 576(1 Pt 2): 189–194.

[2] MERCATELLI N, GALARDI S, CIAFRE SA. MicroRNAs as multifaceted players in glioblastoma multiforme [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2017, 333: 269–323.

[3] WU HM, WANG HD, TANG Y, *et al*. Differential expression of microRNAs in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients with glioblastoma multiforme [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6): 4723–4730.

[4] NIEDER C, ANDRATSCHKE NH, GROSU AL. Re-irradiation for recurrent primary brain tumors [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(10): 4985–4895.

[5] PAW I, CARPENTER RC, WATABE K, *et al*. Mechanisms regulating glioma invasion [J]. *Cancer Lett*, 2015, 362(1): 1–7.

[6] NIYAZI M, ZEHENTMAYR F, NIEMOLLER OM, *et al*. MiRNA expression patterns predict survival in glioblastoma [J]. *Radiat Oncol*, 2011, 6: 153.

[7] BESSW A, SANTA J, FADRUS P, *et al*. MicroRNAs involved in chemo- and radioresistance of high-grade gliomas [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(4): 1969–1978.

[8] GU H, FENG DF. Bioinformatics analysis of peripheral blood miRNA in patients with severe traumatic brain injury [J]. *Chin J Clin Neurosurg*, 2019, 24(12): 749–751.

顾浩,冯东福. 重型颅脑损伤病人外周血 miRNA 生物信息学分析[J]. 中国临床神经外科杂志, 2019, 24(12): 749–751.

[9] PENG ZS, TIAN DF, ZHANG SQ, *et al*. The effect of miR-370-3p on the proliferation ability of glioblastoma U87-MG cell line [J].

Chin J Clin Neurosurg, 2016, 21(4): 223–226.

彭泽生,田道锋,张申起,等. miR-370-3p 对胶质母细胞瘤 U87-MG 细胞增殖能力的影响[J]. 中国临床神经外科杂志, 2016, 21(4): 223–226.

[10] XU S, ZHAO N, HHUI L, *et al*. MicroRNA-124-3p inhibits the growth and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting STAT3 [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3): 1385–1394.

[11] DENG D, WANG L, CHEN Y, *et al*. MicroRNA-124-3p regulates cell proliferation, invasion, apoptosis, and bioenergetics by targeting PIM1 in astrocytoma [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(7): 899–907.

[12] EGUIA-AGUILAR P, PEREZPENA-DIAZCONTI M, BENADON-DARSZON E, *et al*. Reductions in the expression of miR-124-3p, miR-128-1, and miR-221-3p in pediatric astrocytomas are related to high-grade supratentorial, and recurrent tumors in Mexican children [J]. *Childs Nerv Syst*, 2014, 30(7): 1173–1181.

[13] YUAN Q, SUN T, YE F, *et al*. MicroRNA-124-3p affects proliferation, migration and apoptosis of bladder cancer cells through targeting AURKA [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 19(1): 93–101.

[14] LEUNG LY, CHAN CP, LEUNG YK, *et al*. Comparison of miR-124-3p and miR-16 for early diagnosis of hemorrhagic and ischemic stroke [J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 433: 139–144.

[15] ZHAO WH, WU SQ, ZHANG YD. Downregulation of miR-124 promotes the growth and invasiveness of glioblastoma cells involving upregulation of PPP1R13L [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(1): 101–107.

[16] SILBER J, HASHIZUME R, FELIX T, *et al*. Expression of miR-124 inhibits growth of medulloblastoma cells [J]. *Neuro-Oncol*, 2013, 15(1): 83–90.

[17] SHEN K, ZHANG CY, YIN XQ, *et al*. Study on the mechanism of miR-124-3p and autophagy in LPS induced microglial cell death [J]. *J Nantong Univ*, 2019, 39(2): 89–92.

沈凯,张春燕,殷晓芹,等. miR-124-3p 和自噬在 LPS 致小胶质细胞死亡中的作用机制研究[J]. 南通大学学报(医学版), 2019, 39(2): 89–92.

[18] DENG X, MA L, WU M, *et al*. miR-124 radiosensitizes human glioma cells by targeting CDK4 [J]. *J Neuro-Oncol*, 2013, 114(3): 263–274.

[19] BAHREYNI-TOOSI MT, DOLAT E, KHANBABAEI H, *et al*. microRNAs: potential glioblastoma radiosensitizer by targeting radiation-related molecular pathways [J]. *Mutat Res*, 2019, 816–818: 111679.

(2022-04-04 收稿, 2024-05-09 修回)