

miR-92b对神经胶质瘤细胞U251增殖及迁移侵袭的影响

王宇 康鹏

【摘要】 目的 探究miR-92b对神经胶质瘤细胞U251增殖及迁移侵袭的影响以及其可能机制。方法 利用miRNA芯片筛选出在神经胶质瘤细胞U251和入脑正常胶质细胞HEB中差异表达的miRNA;化学合成法制备miR-92b抑制剂,转染后用real-time PCR技术验证表达变化;CCK-8实验检测转染后细胞的增殖能力;划痕实验和Transwell实验检测转染后细胞的迁移和侵袭能力;Western blot检测细胞中胰岛素样生长因子结合蛋白3(IGFBP-3)、 β -catenin和E-cadherin的表达;荧光酶素实验验证IGFBP-3是否为miR-92b的靶基因。结果 基因芯片结果显示miR-92b在神经胶质瘤细胞中表达水平高于入脑正常胶质细胞($P < 0.05$);CCK-8实验结果显示转染miR-92b抑制剂后,U251细胞增殖能力降低($P < 0.05$);划痕实验和Transwell实验结果显示转染miR-92b抑制剂后,U251细胞迁移和侵袭能力降低($P < 0.05$);Western blot结果显示抑制miR-92b后,IGFBP-3和E-cadherin蛋白表达增加($P < 0.05$), β -catenin表达减少($P < 0.05$);荧光酶素实验结果显示,miR-92b能直接靶向调控IGFBP-3。结论 miR-92b在神经胶质瘤中表达显著增加,其可能通过抑制IGFBP-3蛋白表达,从而促进肿瘤细胞的增殖及迁移侵袭。

【关键词】 神经胶质瘤; miR-92b; IGFBP-3; 增殖; 迁移; 侵袭

doi: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.09.003

Effects of miR-92b on proliferation, migration and invasion of glioma cell line U251 WANG Yu, KANG Peng. Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of miR-92b on proliferation, migration and invasion of U251 cells and its possible mechanism. **Methods** The differential expression of miRNA in glioma cell line U251 and human normal glial cell line HEB was screened by miRNA chip. miR-92b inhibitor was synthesized by chemical synthesis, the expression changes were verified by real-time PCR after transfection. Cell proliferation ability was detected by CCK-8 assay after transfection. Wound healing assay and Transwell assay were used to detect cell migration and invasion ability after transfection. Western blot was performed to detect U251 cell proliferation and migration related protein β -catenin, E-cadherin and IGFBP 3. Luciferase assay was detected to confirm whether IGFBP-3 was the target gene of miR-92b. **Results** miRNA chip results showed that the level of miR-92b in U251 cell was significantly higher than that of HEB. Inhibited miR-92b significantly decreased U251 cell proliferation ability, migration and invasion ($P < 0.05$). Western blot results showed the expression of β -catenin was decreased ($P < 0.05$), and the expression of E-cadherin was increased ($P < 0.05$) after transfection miR-92b inhibitor. Luciferase assay showed that miR-92b could directly regulate IGFBP-3. **Conclusions** The expression of miR-92b in U251 cell was increased significantly. It may inhibit the U251 cell proliferation and migration through up-regulation the expression of IGFBP-3 protein.

【Key words】 Glioma; miR-92b; IGFBP-3; Proliferation; Migration; Invasion

神经胶质瘤(Glioma)是颅内肿瘤中常见的一种。尽管近十年来在手术、化疗和放疗方面取得进展,但是由于神经胶质瘤具有局部侵袭能力强、生长速度快、边界不清晰等特点,手术难以彻底切除,导致术后复发率高,患者的预后仍然较差,平均生存时间

很短^[1]。microRNA(miRNA)是一类非编码RNA,长度20~22个碱基,通过降解mRNA或者抑制mRNA翻译,在转录后水平对基因表达进行调控。最近有研究表明,miR-92b可能是神经胶质瘤中潜在的致癌基因^[2]。我们在前期实验中发现miR-92在神经胶质瘤细胞U251中表达升高,并通过生物信息学检索发现miR-92b能够跟胰岛素样生长因子结合蛋白3(Insulin-like Growth Factor-binding Protein, IGFBP-3) mRNA

基金项目:北京市科技局项目(201408231)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科

通讯作者:康鹏 Email: kangpengbjtt@163.com

3' UTR 区域稳定结合。由于目前 miR-92b 在神经胶质瘤进展的致癌过程中的作用仍尚未阐明,因此,本研究拟用人 U251 胶质瘤细胞作为研究对象,探究 miR-92b 对 U251 细胞增殖及迁移侵袭的影响,分析 IGFBP3 在其中起到的作用和相关机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 本实验中采用神经胶质瘤细胞株 U251 和人脑正常胶质细胞株 HEB,由中国科学院上海细胞库提供。

1.1.2 主要试剂 Trizol 试剂、Lipofectamine 2000 转染试剂、实时荧光定量 PCR 检测试剂盒购自 Invitrogen 公司;胎牛血清及 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购自日本同仁公司;Transwell 小室和 Matrigel 胶购于美国 BD 公司;miR-92b 引物由苏州吉玛生物科技公司合成,miR-92b 抑制剂和 miR-92b mimic 及其相应对照物购自广州锐博生物科技有限公司;SYBR Green PCR Master Mix 试剂购自 TaKaRa 公司;IGFBP3、 β -catenin 及 E-cadherin 抗体以及二抗均购自 Sant Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 神经胶质瘤细胞株 U251 和人脑正常胶质细胞株 HEB 培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素溶液混合组成的 DMEM 培养基中。所有细胞均置于 37°C、5%CO₂ 的细胞培养箱中,每隔 48 小时观察细胞状态,待细胞融合度达到 90% 时传代。

1.2.2 转染 U251 细胞 取对数生长期的 U251 细胞进行转染 miR-92b 抑制剂和 miR-92b 空白对照,将细胞分为 U251-miR-92b 抑制剂组和 U251-空白对照组,转染后采用 real-time PCR 检测 miR-92b 过表达效果,在细胞转染后 6 h 更换新的培养基。

1.2.3 Real-time PCR 检测 miR-92b 表达 Trizol 法提取细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA,再以 cDNA 为模板进行目的基因的扩增。miR-92b 引物上游:5'-GGGGCAGTTATTGCACTTGTC-3',下游:5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-3';以 U6 作为 miR-92b 的测定内参,引物上游:5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATAC-3',下游:5'-AAAAATATGGAACGCTCAGCAATTTG-3'。反应条件:预变性 95°C 10 min,变性 95°C 15 s,退火 60°C 60 s,40 个循环,各设置 3 个重复孔,结果以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法分析细胞基因表达差异。

1.2.4 细胞增殖实验 将转染 48 h 后的细胞调整浓度为 1×10⁴/ml,取 100 μ l 接种于 96 孔板,每组重复 4 个孔,置于 37°C、5%CO₂ 的细胞培养箱中过夜,加入 10 μ l/孔 CCK-8 溶液,孵育 2 h,测定 450 nm 处各孔的光密度值。

1.2.5 细胞划痕实验 将 1×10⁶ 细胞接种在六孔板中,当细胞融合度达到 90% 后,用已经灭菌的 200 μ l 枪头在六孔板中划一条直痕。用 PBS 洗去漂浮的细胞,用 DMEM 继续培养,划痕 0 h 和 48 h 后进行拍照。用划痕愈合情况来显示细胞迁移能力。

1.2.6 Transwell 实验 预先在 Transwell 小室中铺上 50 μ l 的 ECM 基质胶 (Invitrogen),将转染 48 h 后的细胞调整浓度为 1×10⁵/ml,在上室加入 200 μ l 细胞悬液,下室加入 500 μ l 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在细胞培养箱中培养 24 h。取出小室, PBS 清洗 3 次,用甲醛固定 10 min,加入 0.1% 的结晶紫溶液进行染色 15 min, PBS 洗 3 次,用棉签轻轻拭去小室内侧细胞,取下室膜平铺于载玻片上,显微镜下随机观察 5 个视野的细胞数量。

1.2.7 Western blot 细胞转染 48 h 后收集细胞,用 BCA 法测定蛋白浓度。经 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳,转 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 1 h,用一抗孵育于 4°C 孵育过夜, PBST 洗膜 3 遍,二抗于常温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 遍,用 ECL 化学发光检测。

1.2.8 荧光素酶实验 为了检测 miR-92b 是否直接作用于 IGFBP-3 的 3' UTR 区,我们在 U251 细胞中进行荧光素酶实验。我们在 U251-miR-92b 抑制剂组和 U251-空白对照组细胞均分别转染野生型 IGFBP-3 荧光素酶报告质粒 (WT) 和突变型 IGFBP-3 荧光素酶报告质粒 (MUT)。方法为构建野生型和突变型的 IGFBP-3 荧光素酶报告质粒载体,将 U251 细胞按每孔 1×10⁵ 接种于 24 孔板,24 h 后用 Lipofectamine 2000 分别与 miR-92b 抑制剂和 miR-92b NC 共转染进入 U251 细胞,24 h 后由双荧光素酶报告系统检测海肾和萤火虫荧光强度,以海肾荧光强度为内参,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较用单因素方差分析,各组均数间两两比较采用 SNK-q 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-92b 在 U251 中的表达水平 见图 1 (见本期封三)。miRNA 芯片分析结果显示,和人脑正常胶质细胞 HEB 对比发现,有 10 个 miRNA 在神经胶质瘤细胞 U251 中表达出现上调:miR-92b, miR-21, miR-221, miR-9, miR-148a, miR-23a, miR-10b, miR-372, miR-381; 10 个 miRNA 在神经胶质瘤细胞 U251 细胞表达出现下调:miR-34a, miR-146a, miR-124, miR-128, miR-218, miR-326, miR-885, miR-491, miR-32, miR-195; 差异均有统计学意义 (P < 0.05)。RT-PCR 实验结果显示与人脑正常胶质细胞 HEB 相比,神经胶质瘤细胞 U251 中 miR-92b 表达水平显著增高 [(1.03±0.05) 比 (1.73±0.07),

$P < 0.05$]

2.2 下调miR-92b基因表达对神经胶质瘤细胞增殖能力的影响 见图2。U251-miR-92b抑制剂组细胞增殖能力要明显弱于U251-空白对照组细胞($P < 0.05$)。

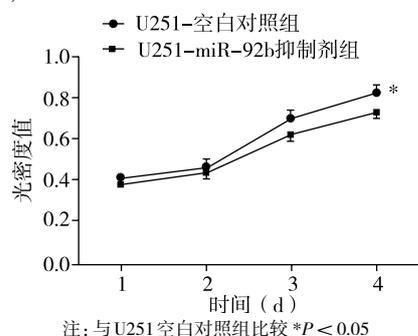


图2 miR-92b抑制剂对U251细胞增殖的影响

2.3 下调miR-92b基因表达对神经胶质瘤细胞侵袭和迁移能力的影响 见图3, 4。划痕实验结果表明U251-miR-92b抑制剂组细胞划痕愈合率显著低于U251-空白对照组细胞。Transwell实验结果表明U251-miR-92b抑制剂组细胞侵袭数显著少于U251-空白对照组细胞($P < 0.05$)。

2.4 下调miR-92b基因表达对 β -catenin和E-cadherin表达水平的影响 见图5。Western blot实验结果显示,与U251-空白对照组相比,U251-miR-92b抑制剂组细胞中的 β -catenin蛋白表达水平降低($P < 0.05$),E-cadherin蛋白表达水平升高($P < 0.05$),

2.5 miR-92b靶向调控IGFBP-3蛋白表达 见图6。结果发现,在野生型荧光素酶中抑制miR-92b后,荧光素酶活性显著高于U251-空白对照组的荧光素酶活性($P < 0.05$)。而对于突变型荧光素酶,两组细胞的荧光素酶活性无变化。Western blot实验结果发现,抑制miR-92b表达后,U251细胞的IGFBP-3蛋白表达水平上调($P < 0.05$)。

3 讨论

越来越多的研究证据表明,神经胶质瘤细胞的高增殖能力,高迁移和侵袭能力成为胶质瘤难以有效治疗的主要障碍^[3]。随着分子生物学技术的迅速发展,找到有效的治疗神经胶质瘤的药物或者分子靶向治疗方法成为研究的难点和热点。许多研究证据表明多种miRNAs都参与了肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移侵袭以及分化等过程^[4]。miR-92b主要在脑原发性肿瘤中表达,可被用于区分原发性和转移性脑肿瘤^[5]。在本研究中,我们发现多种miRNA在神经胶质瘤细胞U251中表达异常,其中,miR-92b在神经胶质瘤细胞U251中的表达显著高于人脑正常胶质细胞株HEB。此结果与Wang等^[6]的研究结果相符。同时,我们还通过CCK-8实验以及Transwell实验发现抑制miR-92b的表达能抑制神经胶质瘤细胞U251的增殖和迁移侵袭能力。 β -catenin和E-cadherin在肿瘤细胞的增殖和迁移侵袭中具有重要的作用, β -catenin的表达可以促进肿瘤的增殖和侵袭^[7],而E-cadherin则具有相反的作用^[8]。我们的实验结果显示miR-92b抑制剂可以减少 β -catenin的表达,同时增加E-cadherin的表达,从另一方面显示抑制miR-92b的表达能抑制神经胶质瘤细胞U251的增殖和迁移侵袭能力。上述这些结果都提示miR-92b的异常表达参与U251细胞的增殖侵袭过程,miR-29b在胶质瘤中可能是一种癌基因。

为了进一步探索miR-92b促进胶质瘤进展的具体机制,我们通过生物信息学检索发现miR-92b能够跟IGFBP3 mRNA 3' UTR区域稳定结合。IGFBP-3是IGF信号通路的重要调节因子。已有研究报道IGFBP-3作为抑癌基因,能抑制多种恶性肿瘤细胞增殖^[9],包括神经胶质瘤^[10]。另外有研究报道IGFBP-3在多种恶性肿瘤中均有异常表达,与恶性肿瘤的发展或浸润转移密切相关^[11]。Yang等^[12]报道在神经胶质瘤中过表达IGFBP3能抑制细胞增殖和肿瘤形成。Abdolhoseinpour等^[13]研究结果表明血浆和组织中的IGFBP-3的表达水平可用于预测神

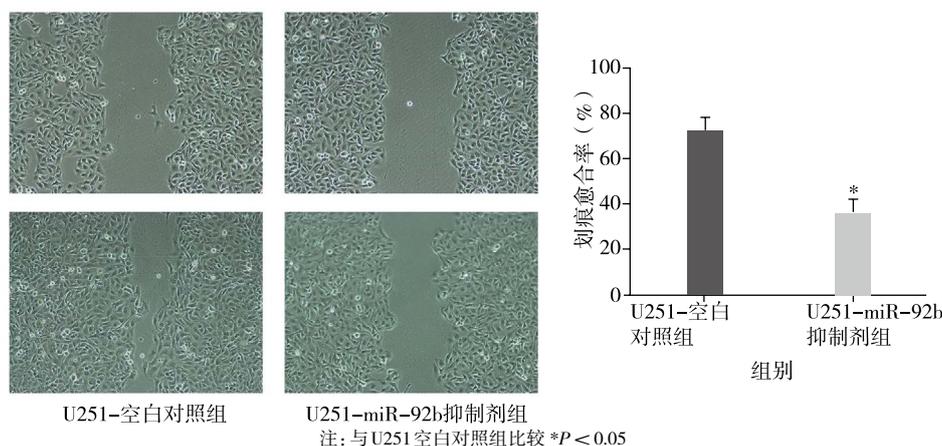
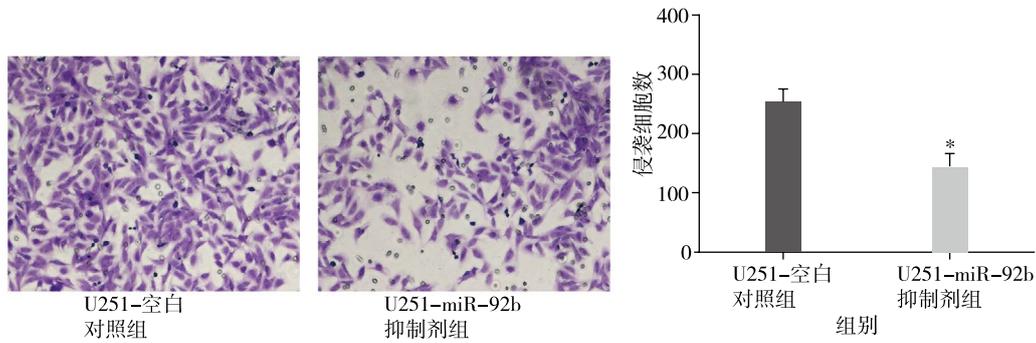


图3 miR-92b抑制剂对U251细胞迁移的影响

胶质瘤患者预后。Santosh 等^[14]报道 IGFBP-3 可作为神经胶质瘤患者的生存预测指标。本研究通过荧光素酶实验和 Western blot 实验发现, miR-92b 能直接调控 IGFBP-3 蛋白的表达水平。miR-92b 能够与 IGFBP-3 mRNA 的 3' UTR 区以不完全互补的形式相结合,从而发挥抑制 IGFBP-3 表达以及促进神经

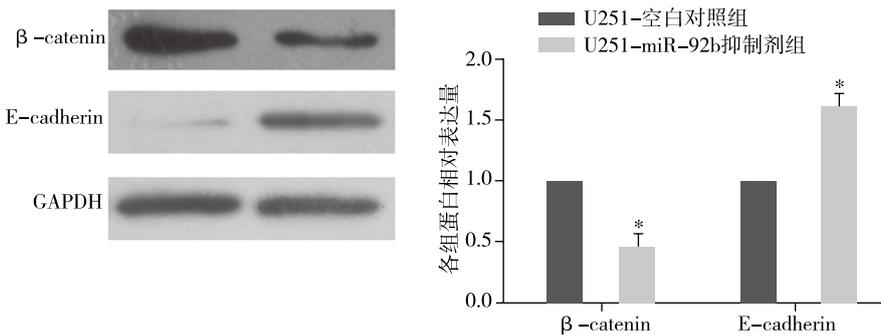
胶质瘤恶性进展的作用。

综上所述,本研究发现 miR-92b 在神经胶质瘤中表达显著增加,抑制 miR-92b 表达可以抑制肿瘤细胞的增殖及迁移侵袭,这为神经胶质瘤的治疗提供了新的方向。我们下一步将在动物实验继续验证 miR-92b 在神经胶质瘤发展中的作用,为 miR-92b



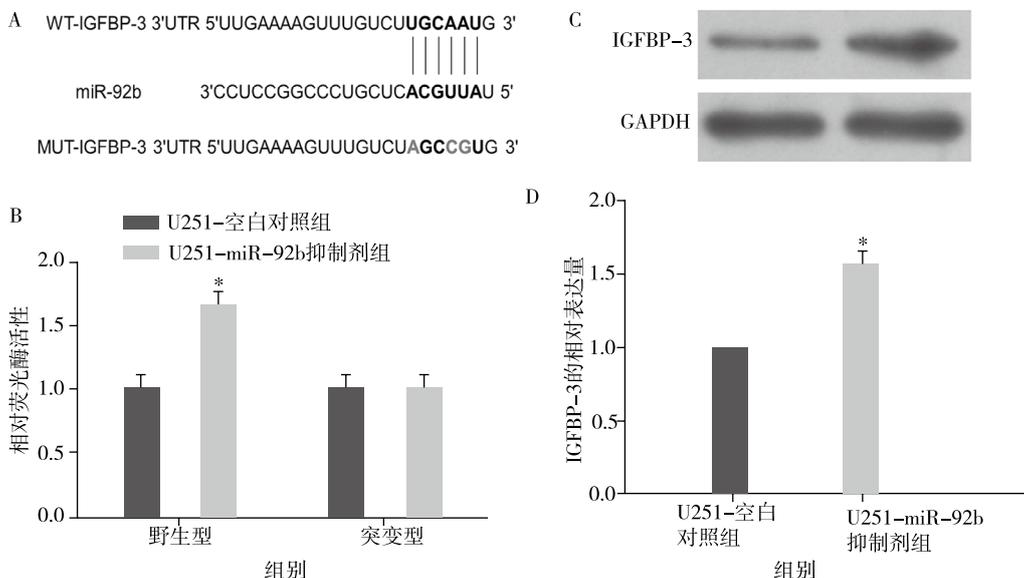
注:与 U251 空白对照组比较 * $P < 0.05$

图 4 miR-92b 抑制剂对 U251 细胞侵袭的影响



注:与 U251 空白对照组比较 * $P < 0.05$

图 5 miR-92b 抑制剂对 U251 细胞中 β -catenin 和 E-cadherin 的表达水平影响



注: A miR-92b 和 IGFBP-3 mRNA 3' UTR 区域稳定结合; B 荧光素酶活性检测; C, D Western blot 检测 IGFBP-3 蛋白表达水;与 U251 空白对照组比较 * $P < 0.05$

图 6 miR-92b 与 IGFBP3 mRNA 3' UTR 区域稳定结合并调控 IGFBP-3 蛋白在 U251 细胞中的表达水平

基因作为神经胶质瘤早期诊治的靶向分子证据提供新的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Sathornsumetee S, Rich JN, Reardon DA. Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma [J]. *Neurol Clin*, 2007, 25 (4): 1 111-1 139.
- [2] Wu ZB, Cai L, Lin SJ, et al. The miR-92b functions as a potential oncogene by targeting on Smad3 in glioblastomas [J]. *Brain Res*, 2013, 1 529: 16-25.
- [3] Hadjipanayis CG, Van Meir EG. Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2009, 87(4): 363-374.
- [4] Kusenda B, Mraz M, Mayer J, et al. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2006, 150(2): 205-215.
- [5] Nass D, Rosenwald S, Meiri E, et al. MiR-92b and miR-9/9* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors [J]. *Brain Pathol*, 2009, 19(3): 375-383.
- [6] Wang K, Wang X, Zou J, et al. miR-92b controls glioma proliferation and invasion through regulating Wnt/beta-catenin signaling via Nemo-like kinase [J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(5): 578-588.
- [7] Xing Y, Liu Z, Yang G, et al. MicroRNA expression profiles in rats with selenium deficiency and the possible role of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in cardiac dysfunction [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(1): 143-152.
- [8] Liu W, Lv C, Zhang B, et al. MicroRNA-27b functions as a new inhibitor of ovarian cancer-mediated vasculogenic mimicry through suppression of VE-cadherin expression [J]. *Rna*, 2017.
- [9] Yan J, Yang X, Li L, et al. Low expression levels of insulin-like growth factor binding protein-3 are correlated with poor prognosis for patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3 395-3 402.
- [10] Yamada PM, Lee KW. Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: local vs. systemic action [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(5): C954-C976.
- [11] Perks CM, Holly JM. Epigenetic regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) in cancer [J]. *J Cell Commun Signal*, 2015, 9(2): 159-166.
- [12] Yang CH, Yue J, Pfeffer SR, et al. MicroRNA-21 promotes glioblastoma tumorigenesis by down-regulating insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP3) [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(36): 25 079-25 087.
- [13] Abdolhoseinpour H, Mehrabi F, Shahraki K, et al. Investigation of serum levels and tissue expression of two genes IGFBP-2 and IGFBP-3 act as potential biomarker for predicting the progression and survival in patients with glioblastoma multiforme [J]. *J Neuro Sci*, 2016, 366: 202-206.
- [14] Santosh V, Arivazhagan A, Sreekanthreddy P, et al. Grade-specific expression of insulin-like growth factor-binding proteins-2, -3, and -5 in astrocytomas: IGFBP-3 emerges as a strong predictor of survival in patients with newly diagnosed glioblastoma [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(6): 1 399-1 408.

(收稿日期: 2017-08-05)

· 消息 ·

《神经疾病与精神卫生》杂志2017~2018年征稿通知

《神经疾病与精神卫生》杂志是神经、精神科学及精神卫生领域的学术性期刊(CN23-1479/R, ISSN1009-6574, 月刊)。为更好地服务神经科学、精神科学以及精神卫生领域的专家、作者和读者,构建理想的学术交流平台,配合本刊2017~2018年的重点号刊发,特发出征稿通知,希望有关学科方向的医护工作者和学者能多给予支持。

解读本刊

中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)

征稿内容

1. 帕金森及运动障碍疾病; 2. 精神疾病的流行病学调查; 3. 社区精神病学; 4. 中枢神经系统肿瘤; 5. 联络会诊精神病学; 6. 心身医学; 7. 女性心理健康; 8. 癫痫与电生理; 9. 神经康复; 10. 中西医结合治疗精神疾病; 11. 老年精神病学; 12. 神经介入及内镜治疗; 13. 认知功能障碍; 14. 睡眠障碍; 15. 神经退行性疾病的基础研究; 16. 神经免疫疾病; 17. 颅脑创伤研究; 18. 脑小血管病。此外,以上所列方向相关的护理研究同为本刊重点征稿范围。

来稿要求

详见稿约。

相关事宜

(1) 来稿请注明为征稿稿件,并备注相对应的征稿方向及编号(如: 1. 帕金森及运动障碍疾病); (2) 所有符合征稿方向的稿件均享受优先审稿、优先发表的权利。

联系方式

地址: 北京市宣武门外大街香炉营东巷2号院1-7-302 神经疾病与精神卫生杂志社 邮编: 100052

电话: 010-83191160 传真: 010-83191161 电子邮箱: ndmh@ndmh.com