

网络出版时间: 2019-9-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.014.html>

miR-141-3p 对脑胶质瘤细胞生长和 Wnt 信号通路的影响

江源铭¹, 盛宝英²

摘要 目的 探讨 miR-141-3p 对脑胶质瘤细胞生长的影响及机制。方法 用 Real-time PCR 方法分别测定正常星形胶质细胞 HA 和脑胶质瘤细胞 CHG-5、U-87MG、U251 中 miR-141-3p 表达水平。在脑胶质瘤细胞中转染 miR-141-3p mimics, Real-time PCR 检测过表达效果。MTT 方法测定细胞增殖, 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力, 流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot 检测细胞中 β -连环蛋白(β -catenin)、c-myc、生存蛋白(survivin)和活化型 Caspase-3(C-caspase-3)蛋白水平。结果 脑胶质瘤细胞 CHG-5、U-87MG、U251 中 miR-141-3p 表达水平低于正常星形胶质细胞 HA, U-87MG 细胞中 miR-141-3p 表达水平最低。miR-141-3p mimics 转染后的 U-87MG 细胞中 miR-141-3p 表达水平高于没有转染及转染 mimics control 的细胞。miR-141-3p 过表达后的 U-87MG 细胞增殖和克隆形成能力降低, 细胞凋亡率升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), miR-141-3p mimics 转染后的 U-87MG 细胞中 β -catenin、c-myc、survivin 蛋白水平降低, C-caspase-3 蛋白水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 miR-141-3p 在脑胶质瘤细胞中表达下调, 上调 miR-141-3p 表达抑制脑胶质瘤细胞生长并诱导细胞凋亡, 作用机制可能与下调 Wnt 信号通路有关。

关键词 脑胶质瘤; Wnt 通路; miR-141-3p; 生长

中图分类号 R 654.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)10-1562-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.013

miRNA 是一种单链 RNA, 其不能编码蛋白质, miR-141-3p 编码基因位于 14 号染色体上, 属于 miR-200 家族, 参与肿瘤的发生, 其不同肿瘤组织中的表达水平不同, 目前在胶质瘤、胰腺癌、食管癌等肿瘤组织中发现 miR-141-3p 低表达, 而在乳腺癌等肿瘤组织中发现 miR-141-3p 高表达^[1-3]。miR-141-3p 参与调控肿瘤细胞的生长, 其对于不同的肿瘤细胞作用不同, miR-141-3p 可以抑制食管癌等肿

瘤细胞的恶性表型^[4]。Wnt 通路在胶质瘤等肿瘤组织中过度激活, 抑制其激活可以逆转肿瘤细胞恶性增殖, 从而发挥抗肿瘤作用^[5]。该实验探讨 miR-141-3p 在脑胶质瘤细胞生长凋亡中的作用及机制, 为明确 miR-141-3p 在脑胶质瘤发生中的作用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 正常星形胶质细胞 HA 购自上海基免生物科技有限公司; 脑胶质瘤细胞 CHG-5、U-87MG、U251 购自中国医学科学院肿瘤细胞库; mimics control、miR-141-3p mimics 购自南通百奥迈科生物技术有限公司; Lipotectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司; β -连环蛋白(β -catenin)抗体、c-myc 抗体、生存蛋白(survivin)抗体和活化型 Caspase-3(C-caspase-3)抗体购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2 Real-time PCR 检测 miR-141-3p 在胶质瘤细胞中的表达 取正常星形胶质细胞 HA 和脑胶质瘤细胞 CHG-5、U-87MG、U251, 按照每个 25 mm 的培养瓶中加入 1 ml 的 TRIzol, 置于冰上裂解, 期间用移液枪反复吹打, 把裂解液转移到离心管内, 添加 200 μ l 的氯仿, 在室温下孵育 3 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min。RNA 存在上层水相溶液中, 收集 500 μ l 上层 RNA 溶液, 加入等体积异丙醇, 于 4 $^{\circ}$ C 环境中孵育 30 min。离心后, 将上清液吸除, 添加 75% 的乙醇洗涤沉淀, 干燥后, 以 DEPC 水溶解。取提取的 RNA 样品, 逆转录合成 cDNA, 进行 Real-time PCR, 程序为: 95 $^{\circ}$ C、15 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s; 54 $^{\circ}$ C、60s; 共 50 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 miR-141-3p 水平, 内参为 U6。实验重复 3 次, 取均值。

1.3 细胞转染和过表达效果检测 取 U-87MG 细胞, 接种到 24 孔细胞培养板中, 按照 Lipotectamine 2000 说明书将 mimics control、miR-141-3p mimics 转染至细胞中, 转染 24 h 后, 提取细胞中的总 RNA, 进行 Real-time PCR, 步骤同上。设置转染 mimics control、miR-141-3p mimics 后的 U-87MG 细胞为 mimics control 组、miR-141-3p mimics 组, 以只加入脂质体转染试剂 Lipotectamine2000 的 U-87MG 细胞为 Con-

2019-07-16 接收

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(编号: 12531698)

作者单位: ¹佳木斯大学, 佳木斯 154003

²佳木斯大学附属第一医院神经内科, 佳木斯 154003

作者简介: 江源铭, 男, 硕士研究生;

盛宝英, 女, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-

mail: shengbaoying123@163.com

trol 组。

1.4 MTT 检测细胞增殖 按照细胞量为 5×10^4 个/ml 将 Control 组、mimics control 组、miR-141-3p mimics 组细胞接种到 96 孔板内,继续培养 24 h 以后,将培养板取出,在每个孔内加入 0.5% 的 MTT 溶液,孵育 4 h 以后,吸弃孔内液体,添加 DMSO 溶液 150 μ l,结晶溶解以后,检测 490 nm 的吸光度(A)值,经过空白孔调零以后,分析细胞存活率变化,以 Control 组细胞存活率为 100%,分析 mimics control 组、miR-141-3p mimics 组细胞存活率变化。实验重复 3 次,取均值。

1.5 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 将 Control 组、mimics control 组、miR-141-3p mimics 组细胞分别接种到 6 孔板内,每个孔中添加 3 000 个细胞,同时加入 2 ml 的细胞培养液,继续孵育培养 14 d 以后,吸弃孔内的上清液,PBS 洗涤细胞后添加甲醇溶液固定 15 min,用苏木精染色,随机选取 5 个视野检测细胞克隆形成数目。实验重复 3 次,取均值。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将培养 24 h 后的 Control 组、mimics control 组、miR-141-3p mimics 组细胞用 PBS 洗涤 3 次以后,每组收集 10^6 个细胞,添加 500 μ l 的 Binding Buffer 混合后,分别加入 5 μ l 的碘化丙啶(propidium iodide, PI)和膜联蛋白 V-FITC(Annexin V-FITC)溶液,混合后,用流式细胞术测定细胞凋亡变化。实验重复 3 次,取均值。

1.7 Western blot 检测 β -catenin、c-myc、survivin 和 C-caspase-3 蛋白表达 将培养 24 h 后的 Control 组、mimics control 组、miR-141-3p mimics 组细胞用 PBS 洗涤 3 次以后,收集细胞,在细胞内加裂解液(按照每个 6 孔板中添加 100 μ l 裂解液),在冰上裂解约 30 min。收集裂解液,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清,分装后,保存于 -80 $^{\circ}$ C。吸取 2 μ l 的蛋白样品以二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法检测蛋白浓度。蛋白样品同上样缓冲液混匀,于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min 后,每个上样孔加 30 μ g 蛋白样品进行电泳。制胶:常规方法配制 10% 分离胶,观察其凝固以后,添加 5% 的浓缩胶。蛋白电泳

的起始电压为 60 V,观察溴酚蓝进入到分离胶后,将电压调整到 100 V 继续电泳。转膜:以 300 mA 电流把凝胶上的蛋白转印到硝酸纤维素膜(NC 膜)上,转膜置于冰上进行,时间为 1.5 h。封闭:用 5% 牛血清白蛋白于 37 $^{\circ}$ C 摇床封闭约 2 h。把 NC 膜放在含有 1:600 稀释的一抗的薄膜抗体孵育袋中,置于 4 $^{\circ}$ C 中过夜。把 NC 膜放在含有 1:3 000 稀释的二抗的抗体孵育袋中,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。将 NC 膜置于 ECL 试剂中发光,收集图像,以 β -actin 为参照,分析 β -catenin、c-myc、survivin 和 C-caspase-3 水平。实验重复 3 次,取均值。

1.8 统计学处理 实验数据用 SPSS 21.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组差异比较采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-141-3p 在胶质瘤细胞中低表达 脑胶质瘤细胞 CHG-5 (0.68 ± 0.06)、U-87MG (0.27 ± 0.03)、U251 (0.49 ± 0.09) 中的 miR-141-3p 表达水平低于正常星形胶质细胞 HA (1.00),差异有统计学意义($F = 91.111, P < 0.001$)。并且 U-87MG 细胞中 miR-141-3p 表达水平低于 CHG-5 和 U251 细胞。选用 U-87MG 细胞做后续实验。

2.2 miR-141-3p mimics 提高 U-87MG 细胞中 miR-141-3p 表达水平 miR-141-3p mimics 转染后的 U-87MG 细胞中 miR-141-3p 表达水平高于没有转染(1.00)及转染 mimics control (0.99 ± 0.09) 的细胞,差异有统计学意义($F = 26.604, P < 0.001$)。

2.3 miR-141-3p 抑制 U-87MG 细胞增殖、克隆并促进细胞凋亡 miR-141-3p 过表达后的 U-87MG 细胞增殖和克隆形成能力降低,细胞凋亡率升高,与没有转染及转染 mimics control 的细胞比较,差异有统计学意义。见表 1、图 1。

2.4 过表达 miR-141-3p 对 U-87MG 细胞中 β -catenin、c-myc、survivin 和 C-caspase-3 蛋白表达水平影响 miR-141-3p 过表达后的 U-87MG 细胞中 β -catenin、c-myc、survivin 蛋白表达水平降低,

表 1 各组 U-87MG 细胞存活率、克隆形成数目和凋亡率比较($n = 3, \bar{x} \pm s$)

项目	Control 组	mimics control 组	miR-141-3p mimics 组	F 值	P 值
存活率(%)	100.00	100.54 ± 9.47	$69.36 \pm 7.32^*$	20.012	0.002
克隆形成数目	58.64 ± 4.78	56.12 ± 7.49	$29.58 \pm 3.42^*$	0.002	0.001
凋亡率(%)	3.10 ± 0.51	3.02 ± 0.64	$21.87 \pm 3.61^*$	77.469	<0.001

与 mimics control 组比较: * $P < 0.05$

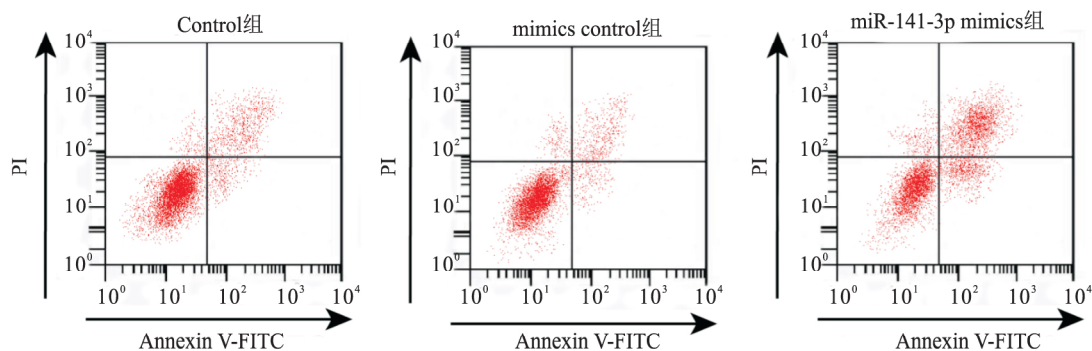


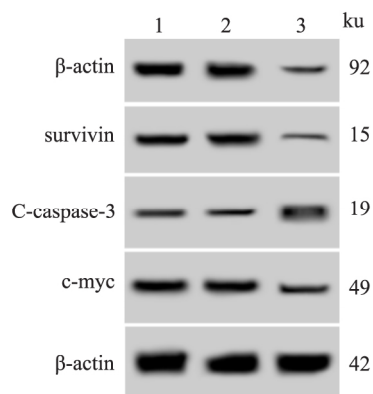
图1 流式细胞术测定 miR-141-3p 对 U-87MG 细胞凋亡影响

表2 各组 U-87MG 细胞中 β -catenin、c-myc、survivin 和 C-caspase-3 蛋白表达水平比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

项目	Control 组	mimics control 组	miR-141-3p mimics 组	F 值	P 值
β -catenin	0.89 ± 0.06	0.90 ± 0.07	$0.45 \pm 0.05^*$	54.027	<0.001
survivin	0.63 ± 0.06	0.60 ± 0.08	$0.58 \pm 0.07^*$	20.452	0.002
c-myc	0.60 ± 0.05	0.58 ± 0.07	$0.42 \pm 0.03^*$	10.554	0.011
C-caspase-3	0.43 ± 0.04	0.40 ± 0.06	$0.68 \pm 0.04^*$	31.279	0.001

与 mimics control 组比较: * $P < 0.05$

C-caspase-3 蛋白表达水平升高,与没有转染及转染 mimics control 组的细胞比较,差异有统计学意义。见图2、表2。

图2 Western blot 分析各组细胞中 β -catenin、c-myc、survivin 和 C-caspase-3 蛋白表达影响

1: Control 组; 2: mimics control 组; 3: miR-141-3p mimics 组

3 讨论

miRNA 长度约为 15 ~ 25 bp,其在人体组织中广泛表达,胚胎发育、组织功能维持等生理过程中几乎均有 miRNA 的参与,miRNA 还参与调控心血管系统疾病、肿瘤等病理过程^[1]。miR-141-3p 是一种与细胞生长凋亡等密切相关的调控因子,参与调控神经细胞等多种细胞的正常生理功能发挥^[2]。miR-141-3p 在肿瘤组织中异常表达,其可以作为肿瘤促进因子或肿瘤抑制因子发挥肿瘤细胞生长调控作用,目前在乳腺癌等肿瘤组织中发现 miR-141-3p

过表达,也有研究显示 miR-141-3p 在乳腺癌及食管癌组织中低表达,miR-141-3p 可能是一种肿瘤抑制因子^[3-12]。本实验结果显示,miR-141-3p 在胶质瘤细胞中的表达水平低于正常星形胶质细胞,提示 miR-141-3p 在胶质瘤中可能发挥抗肿瘤作用。

miRNA 参与肿瘤发生过程往往与肿瘤细胞的多种生物学特性有关,目前的研究表明,miR-141-3p 对于肿瘤细胞的生长、凋亡等具有重要作用,miR-141-3p 能够抑制胃癌等肿瘤细胞的生长,而 miR-141-3p 对于前列腺癌等肿瘤细胞的生长具有促进作用^[13]。本次实验研究显示,miR-141-3p 过表达后的胶质瘤细胞的增殖和克隆形成能力降低,细胞凋亡增多,细胞中凋亡标志蛋白 Caspase-3 活化水平升高,miR-141-3p 在胶质瘤生长中发挥抑制作用。

Wnt 信号通路能够把细胞表面的信号传递至细胞内,其是由 β -catenin、c-myc、survivin 等组成,其中 β -catenin 是 Wnt 信号通路激活的关键, β -catenin 也是 Wnt 信号通路的中心, β -catenin 表达水平的高低可以间接反映 Wnt 信号通路的激活水平;survivin 是一个凋亡抑制基因,其具有抑制细胞凋亡的作用,Wnt 信号通路激活可以促进 survivin 表达;c-myc 是 Wnt 信号通路的下游靶基因,也是一种癌基因^[14]。很多研究^[15]显示,Wnt 信号通路在肿瘤中过度激活,抑制其激活可以抑制肿瘤发生和进展。本研究显示,miR-141-3p 过表达可以下调胶质瘤细胞中 β -catenin、c-myc、survivin 的表达水平,miR-141-3p 能够负调控 Wnt 信号,miR-141-3p 抑制胶质瘤生长机

制可能与 Wnt 信号通路有关。

参考文献

- [1] 杜平, 张庆瑜. miR-200 家族在消化系统肿瘤中的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(29): 3053-7.
- [2] 宁艳, 姜桐, 蔡丽瑛. miR-141 的研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 7(14): 2533-5.
- [3] Li P, Xu T, Zhou X, et al. Downregulation of miRNA-141 in breast cancer cells is associated with cell migration and invasion: involvement of ANP32E targeting [J]. Cancer Med, 2017, 6(3): 662-72.
- [4] Xu L, Li Q, Xu D, et al. hsa-miR-141 downregulates TM4SF1 to inhibit pancreatic cancer cell invasion and migration [J]. Int J Oncol, 2014, 44(2): 459-66.
- [5] Yang P, Qiu Z, Jiang Y, et al. Silencing of cZNF292 circular RNA suppresses human glioma tube formation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7(39): 63449-55.
- [6] 谢琼, 胡桂明, 王洪涛. miRNA-223-3p 调控 JAK2/STAT3 信号通路对胃癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2018, 53(5): 94-9.
- [7] Delavar M R, Baghi M, Safaiejad Z, et al. Differential expression of miR-34a, miR-141, and miR-9 in MPP + -treated differentiated PC12 cells as a model of Parkinson's disease [J]. Gene, 2018, 662(1): 54-65.
- [8] Zheng L, Xu M, Xu J, et al. ELF3 promotes epithelial-mesenchymal transition by protecting ZEB1 from miR-141-3p-mediated silencing in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 387-400.
- [9] Zhang Y, Li J, Jia S, et al. Down-regulation of lncRNA-ATB inhibits epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells by increasing miR-141-3p expression [J]. Biochem Cell Biol, 2018, 97(2): 193-200.
- [10] Xue L, Yu X, Jiang X, et al. TM4SF1 promotes the self-renewal of esophageal cancer stem-like cells and is regulated by miR-141 [J]. Oncotarget, 2016, 8(12): 19274.
- [11] Xu S, Ge J, Zhang Z, et al. miR-141 inhibits prostatic cancer cell proliferation and migration, and induces cell apoptosis via targeting of RUNX1 [J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 1454-60.
- [12] Lu P, Xue Y, Yang Y, et al. Linc00472 suppresses breast cancer progression and enhances doxorubicin sensitivity through regulation of miR-141 and programmed cell death 4 [J]. Rsc Advances, 2018, 8(16): 8455-68.
- [13] Lei K, Liang X, Gao Y, et al. Lnc-ATB contributes to gastric cancer growth through a MiR-141-3p/TGF β 2 feedback loop [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(3): 514-21.
- [14] 朱睿明, 邢方岚, 张起顺, 等. miRNA-21 过表达对小鼠星形胶质细胞凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2018, 53(6): 73-6.
- [15] Chen G, Gao C, Gao X, et al. Wnt/ β -catenin pathway activation mediates adaptive resistance to BRAF inhibition in colorectal cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2018, 17(4): 806-13.

The effect of miR-141-3p on the growth of glioma cells and Wnt signaling pathway

Jiang Yuanming¹, Sheng Baoying²

(¹ Jiamusi University, Jiamusi 154003; ² Dept of Neurology,

The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003)

Abstract Objective To investigate the effect and its mechanism of miR-141-3p on the growth of glioma cells. **Methods** Real-time PCR was used to detect the expression of miR-141-3p in normal astrocyte HA and glioma cells CHG-5, U-87MG and U251, respectively. MiR-141-3p mimics was transfected into glioma cells, and Real-time PCR was used to detect the overexpression effect. MTT assay was used to measure cell proliferation. Colony formation assay was used to detect cell clone formation ability. Apoptosis was detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the levels of β -catenin, c-myc, survivin and C-caspase-3 in cells. **Results** The expression of miR-141-3p in glioma cells CHG-5, U-87MG and U251 was lower than that in normal astrocytes. The expression level of miR-141-3p in U-87MG cells transfected with miR-141-3p mimics was higher than that in non-transfected and transfected mimimics control. After over-expression of miR-141-3p, the proliferation and cloning ability of U-87MG cells decreased, the apoptotic rate increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The levels of β -catenin, c-myc and survivin protein in U-87MG cells transfected with miR-141-3p mimimics decreased, while the levels of C-caspase-3 protein increased ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-141-3p is downregulated in glioma cells, and up regulation of miR-141-3p expression inhibits glioma cell growth and induces apoptosis. The mechanism may be related to the downregulation of Wnt pathway.

Key words glioma; Wnt pathway; miR-141-3p; growth