

miR-182 靶向调控 FOXO3a 表达对胶质瘤 细胞增殖和侵袭能力的影响

余振兴¹, 邓磊¹, 张先斌¹, 胡祖力¹, 祝新根², 吴森经²

摘要 目的 探讨小分子核苷酸序列 182(miR-182) 靶向调控“叉头蛋白”的 O 亚家族(FOXO3a) 蛋白表达对胶质瘤细胞 U251 增殖与侵袭能力的影响。方法 将无义序列与 miR-182 mimics 脂质体转染入 U251 细胞内, MTT 法测定细胞的增殖数量, Transwell 小室测定细胞的转移。荧光素酶报告实验检测 miR-182 对 FOXO3a 的靶向作用, 应用 Western blot 与 qRT-PCR 测定 FOXO3a 蛋白与 mRNA 的表达。将 FOXO3a 野生型与突变型质粒导入 U251 细胞, 应用 MTT 与 Transwell 实验测定 U251 细胞的增殖与转移能力变化。结果

与对照组及无义序列组比较, 在第 1~3 天, 转染 miR-182 mimics 脂质体组的细胞数显著增加($P < 0.05$); 第 4~5 天, miR-182 mimics 脂质体组的细胞数呈减小趋势, 较其他两组细胞数仍显著增加($P < 0.05$)。荧光素酶报告实验检测显示, 共转染突变型 pcDNA3/EGFP(增强绿色荧光蛋白)-FOXO3a 3'-UTR(非翻译区)质粒和 miR-182 mimics 组细胞荧光素酶活性最低($P < 0.01$)。与对照组及无义序列组比较, miR-182 mimics 组 FOXO3a 的蛋白及 mRNA 含量显著减少($P < 0.01$)。转染突变型 FOXO3a 脂质体的 U251 细胞, 与野生型组比较, 其细胞增殖数量与转移数量均显著减少($P < 0.05$)。结论 miR-182 可促进胶质瘤 U251 细胞的增殖与转移, FOXO3a 蛋白表达量的增加会造成胶质瘤 U251 细胞的增殖与转移能力降低, miR-182 对 FOXO3a 起负性调控的作用。

关键词 胶质瘤细胞; miR-182; U251; 增殖; 侵袭

中图分类号 R 730.246

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)04-0559-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.012

神经胶质瘤亦被称为胶质细胞瘤, 是颅内最常见的恶性肿瘤之一, 约占颅脑肿瘤的 50%。按照肿瘤的起源可分为: 星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤及少突胶质细胞瘤^[1]。由于胶质

瘤细胞所处特殊位置, 药物治疗疗效差、手术难度大、易转移、复发^[2]。小分子 RNA-182(microRNA, miR-182) 为编码区序列, 通过调控下游基因的转录而影响相关蛋白的表达, 影响细胞的增殖、凋亡和分化^[3]。研究^[4]显示, miR-182 在癌细胞组织中高表达。“叉头蛋白”的 O 亚家族(forkhead, FOXO3a) 是由 FOXO3 基因编码的一类蛋白质, FOXO3a 蛋白在肝癌、肺癌、胃癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌、淋巴瘤、白血病等多种恶性肿瘤细胞中均有表达^[5]。该研究通过对胶质瘤 U251 细胞系中 miR-182 与 FOXO3a 的相互作用关系, 探讨 miR-182 通过对 FOXO3a 蛋白的调控对胶质瘤细胞的增殖与侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 胶质瘤细胞 U251 购自上海中科院细胞所; DMEM 高糖培养基、胰酶及脂质体 Lipofectamine2000 均购自美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清及双抗(100 U/ml 青霉素与 100 g/L 链霉素组成) 购自美国 Gibco 公司; FOXO3a 一抗(兔抗) 购自美国 Cell Signaling 公司; FOXO3a 二抗(羊抗兔) 购自北京康为世纪公司; β -action 内参购自德国 Tiangen 公司; BCA 蛋白浓度试剂盒、PCR 扩增仪购自美国 Thermo 公司; miR-182 与抑制剂及逆转录试剂盒购自美国 ABI 公司; 荧光素酶基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司; 低温离心机购自德国 Eppendorf 公司; 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 细胞培养与转染 向 U251 细胞与正常人星型细胞分别加入含 10% 胎牛血清与 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基溶液, 制成悬液, 放入培养箱(37 °C、5% CO₂) 中培养。待细胞生长至对数期, 加入胰酶进行消化, 获得 U251 细胞悬液, 按照分组分别加入对照组、无义序列 miR-182、miR-182 mimics 已整合成功的脂质体, 完成细胞转染, 继续培养约 48 h 直至转染成功后的细胞进入对数期。

1.3 构建 FOXO3a 质粒 使用 pcDNA3 作为空载

2018-12-28 接收

基金项目: 江西省科技计划项目(编号: 2010BSA12300)

作者单位: ¹ 中国人民解放军联勤保障部队第 908 医院神经外科, 南昌 330000

² 南昌大学第二附属医院神经外科, 南昌 330000

作者简介: 余振兴, 男, 住院医师, 硕士;

邓磊, 男, 主任医师, 博士, 责任作者, E-mail: cf2018zx@163.com

体质粒 报告强化绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP) 质粒载体, 分别将野生型(亦称无干扰型) FOXO3a 3'-非翻译区(untranslated region, UTR) 与突变型(亦称过表达型) FOXO3a 3'-UTR 序列复制后导入 pc DNA3 载体, 得到无干扰型与过表达型 pc DNA3/EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒。

1.4 进行荧光素酶报告实验 将长满瓶底约 80% 的 U251 细胞消化后接种于 96 孔板, 正常培养过夜, 显微镜下观察, 细胞密度超过 75% 时分别加入: A 组突变型 pc DNA3/EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒; B 组共转染突变型 pc DNA3/EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒和无义序列; C 组共转染突变型 pc DNA3/EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒和 miR-182 mimics; D 组野生型 pc DNA3/EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒; E 组共转染野生型 pc DNA3/EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒和无义序列; F 组共转染野生型 pc DNA3/EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒和 miR-182 mimics。待质粒与脂质体转染成功后, 按照荧光素酶试剂盒操作, 测定对应荧光素酶活性。

1.5 Western blot 检测 FOXO3a 蛋白表达 收集转染成功后不同处理的 U251 细胞, 得细胞悬液, PBS 清洗 3 次, 取下层细胞, 加入蛋白裂解液(PMSF 与 RIPA 按照 1:100) 提取蛋白; 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集蛋白沉淀; BCA 试剂盒测定标准蛋白曲线; 按照实验流程配制好分离胶与浓缩胶, 依次加入样品, 设定电压 80 V/120 V; 待溴酚蓝出现在胶底附近时, 电泳结束; 按照胶块、PVDF 膜处于正中间, 两边依次为三层滤纸、海绵的顺序放置好, 进行转膜, 持续时间为 90 min; 使用 TBST 溶液洗脱 3 次, 边洗边振摇, 每次 10 min; 5% 脱脂牛奶封闭结束后, 孵育对应 1 抗过夜, 继续 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入对应辣根过氧化物标记的二抗, 孵育 1 h; 选用 ECL 显影液显影结束后, 应用 Image J 软件进行灰度分析。

1.6 qRT-PCR 测定 FOXO3a mRNA 表达 采用 TRIzol 裂解液快速提取不同处理细胞中 mRNA, 加入 TRIzol 溶液与氯仿(5:1) 混合液, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 得到 3 个相层; 轻轻吸取上层无色含 RNA 水层, 加入等体积异丙醇混匀, 离心, 保留下层沉淀; 加入 TRIzol 溶液与 75% 乙醇混合液(1:1), 对 RNA 继续清洗以去除杂质, 离心, 得到纯度更高的 RNA 提取物; 将 EP 管倒扣于吸水纸上进行干燥, 加入无 RNase 的水, 混合均匀后备用。依次加入 2 μl 10 × RT 工作液、4 μl 25 mmol/L

MgCl₂、2 μl 0.1 mol/L DTT、1 μl RNaseOUT(40 U/μl)、1 μl SuperScript RT(200 U/μl) 合成引物序列, 按照预变性 95 °C、10 min; 变性 95 °C、15 s; 退火 56 °C、60 s; 延伸 72 °C、32 s 程序设置 PCR 扩增。选用 GAPDH 作为内参。引物序列见表 1。

表 1 基因 GAPDH、FOXO3a 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
GADPH	F: AATGGGCAGCCGTTAGGAAA
	R: GCGCCCAATACGACCAAATC
FOXO3a	F: CGGGATCCATGGCAGAGGCACCGGCTTCCC
	R: CCAAGCTTTTCAGCCTGGCACCAGCTCTGAG

1.7 MTT 法测定细胞增殖 将正常 U251 细胞与转染 siRNA-miR-182、miR-182 mimics 及过表达 FOXO3a 成功的细胞进行培养, 48 h 后收集细胞, 制备细胞悬液, 按照 3 000 ~ 8 000 个/孔进行 96 孔板点板, 每种设 6 个复孔; 培养箱继续培养 1 ~ 5 d 后, 每孔加入 20 μl MTT 溶液, 继续培养 4 h, 加入 100 ml DMSO, 摇床低速振荡 10 min, 酶标仪 490 nm 处测定吸光度值。

1.8 Transwell 法测定细胞侵袭能力 将转染不同处理的细胞分别接种于 Transwell 上室(有/无 Matrigel 胶), 下室为含 10% 胎牛血清的完全培养液, 培养 36 h 后, 苏木精染色封片, 测定穿过孔的细胞数目。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两独立组间比较进行 *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验; 作图选用 Graph Prism5.0 软件, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法测定转染 miR-182 对 U251 增殖能力的影响 培养第 1 天, 各组转染后的 U251 细胞增殖数量差异无统计学意义(*P* > 0.05); 培养第 2 ~ 3 天, 与对照组及无义序列组比较, 转染 miR-182 mimics 组细胞数显著增加(*P* < 0.01); 第 3 ~ 5 天, miR-182 mimics 组细胞数虽有减小, 但与对照组及无义序列组比较, 其细胞数量仍呈显著性增加(*P* < 0.05)。第 1 ~ 5 天, 无义序列组 U251 细胞, 细胞数量开始呈增加趋势后逐渐减少; 与对照组细胞数比较, 无义序列组细胞数无显著变化(*P* > 0.05)。见图 1。

2.2 Transwell 法测定转染 miR-182 对 U251 侵袭能力的影响 3 组间穿过小室的细胞数差异有统计

学意义 ($P < 0.05$) ; 与对照组比较 ,miR-182 mimics 组穿过小室细胞数显著增多 ($t = 5.577$, $P = 0.005$) 。见表 2、图 2。

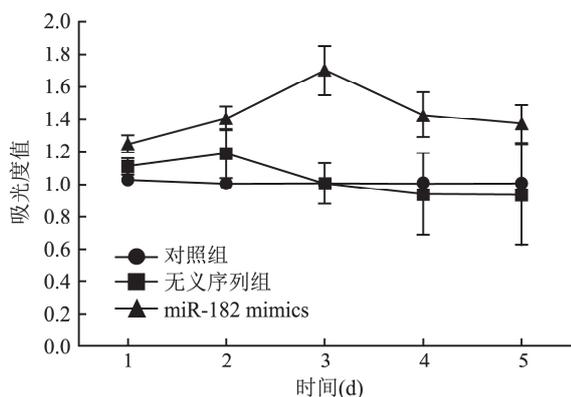


图 1 MTT 法测定转染 miR-182 U251 细胞的增殖能力

表 2 Transwell 法测定穿过小室的细胞数(个 $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞数
对照	36.9 ± 3.4
无义序列	34.6 ± 2.7
miR-182 mimics	54.3 ± 4.2
F 值	6.551
P 值	<0.05

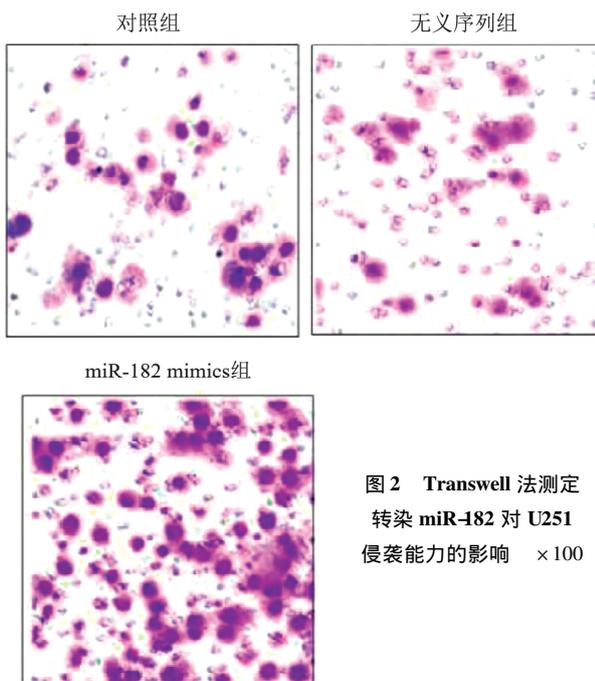


图 2 Transwell 法测定转染 miR-182 对 U251 侵袭能力的影响 ×100

2.3 荧光素酶活性验证结果 经 Microma/miR-Base/TargetScan 靶基因数据库筛选 ,将 FOXO3a 暂定为 miR-182 调控的下游靶基因。经荧光素酶报告实验验证 A ~ E 组荧光素酶对应活性 ,见图 3; 两

两比较 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,miR-182 mimics 与 pc DNA3/ EGFP-FOXO3a 3'-UTR 共转染组 (C 组) 荧光素酶活性明显较其他组低 ($P < 0.01$) ,证实 miR-182 可抑制突变型质粒的荧光素酶活性 ,FOXO3a 是 miR-182 调控的直接作用靶点。

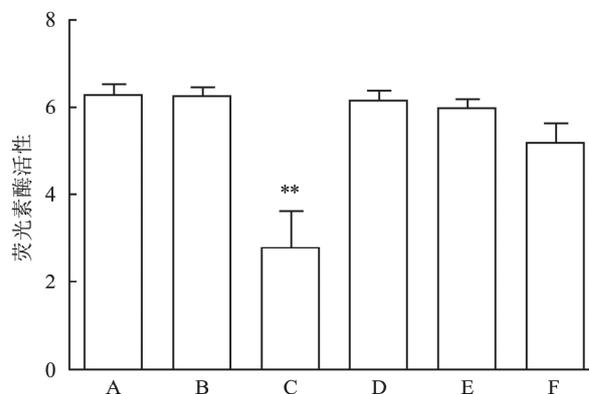


图 3 荧光素酶活性验证结果

A 组: 突变型 pc DNA3/ EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒; B 组: 共转染突变型 pc DNA3/ EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒和无义序列; C 组: 共转染突变型 pc DNA3/ EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒和 miR-182 mimics; D 组: 野生型 pc DNA3/ EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒; E 组: 共转染野生型 pc DNA3/ EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒和无义序列; F 组: 共转染野生型 pc DNA3/ EGFP-FOXO3a 3'-UTR 质粒和 miR-182 mimics; 与 A 组比较: ** $P < 0.01$

2.4 转染 miR-182 后 U251 细胞内 FOXO3a 的蛋白表达情况 Western blot 检测 FOXO3a 蛋白的表达 3 组之间差异有统计学意义 ($F = 13.128$, $P < 0.05$) ; 与对照组比较 ,miR-182 mimics 组 FOXO3a 蛋白含量显著降低 ($P < 0.05$) 。在 qRT-PCR 实验中 3 组之间差异有统计学意义 ($F = 17.227$, $P < 0.05$) ; 与对照组比较 ,miR-182 mimics 组 FOXO3a mRNA 含量显著降低 ($P < 0.05$) 。见图 4。

2.5 突变型 FOXO3a 干扰 U251 细胞增殖与迁移变化 与野生型 FOXO3a 干扰 U251 细胞组比较 ,MTT 实验测定第 1 ~ 3 天 ,突变型组细胞数显著增加 ($P < 0.05$) ; 第 4 ~ 5 天 ,突变型组细胞数有减小趋势 ,与野生型组比较 ,其细胞数仍显著偏多 ($P < 0.05$) 。在 Transwell 小室实验中 ,培养 36 h 后 ,与野生型组穿过细胞数 (37.8 ± 2.8 个) 比较 ,突变型组穿过小室的细胞数 (25.2 ± 2.64 个) 显著减少 ($P < 0.05$) 。见图 5。

3 讨论

胶质瘤是中枢神经系统细胞异常增殖与转移引

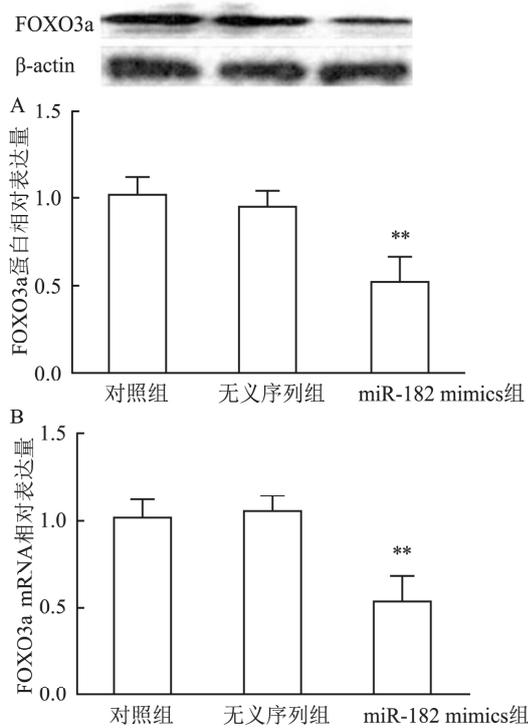


图4 转染 miR-182 后 U251 细胞内 FOXO3a 的 mRNA 与蛋白表达情况

A: 蛋白表达; B: mRNA 表达; 与对照组比较: ** P < 0.01

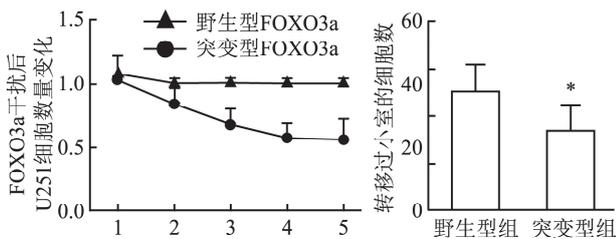


图5 突变型 FOXO3a 干扰 U251 细胞增殖与迁移变化与野生型组比较: * P < 0.05

起的恶性肿瘤之一,约占中枢神经系统肿瘤的 3/5^[6]。胶质瘤细胞极易向周围浸润,导致胶质瘤手术切除难度大,术后易出现复发;尽管随着现代科学技术的进步,胶质瘤患者的 5 年生存率仍然低至 5%^[7]。生命体的正常生长发育得益于基因精准的、多方位的整体调控。无论是基因本身的碱基序列发生微小改变,还是非编码区的调控序列发生异常,都会使机体的生理活动发生异常,这种异常超出机体的自我调节承受范围,即出现病理状态。miRNAs 是一类自身无法直接表达蛋白质、可对下游基因蛋白质表达进行调控的小分子密码子^[8]。有研究^[9]者提出,下游靶 mRNA 的 3'UTR 为调控 miRNA 的主要结合位点。如 miRNA-663 可通过调控下游

靶基因转移生长因子-β 抑制胶质瘤细胞的增殖、转移与侵袭; miRNA-506 可调控下游靶基因胰岛素样生长因子 2 mRNA 的结合蛋白 1 抑制胶质瘤细胞的增殖^[10-11]。miR-182 为 miR-183-96-182 家族一员,位于人类第 7 号染色体,被证实为具有癌基因功能。在多种胶质瘤细胞信号通路中均显示 miR-182 扮演着重要角色,Feng et al^[12]证实 miR-182 过表达可调控神经突起生长素(neritin,NRN1)基因与 NRN1 蛋白表达从而控制胶质瘤细胞的增殖与转移;Xue et al^[13]等证实 miR-182-5p 的促进与抑制均可激活信号转导转录激活因子 3 信号通路,从而调控胶质母细胞瘤的增殖与迁移。本研究中,对对照组、无义序列组、miR-182 mimics 组的 U251 细胞进行培养后显示,与其他两组比较,转染 miR-182 mimics 组的 U251 细胞增殖速度明显加快,提示 miR-182 可促进胶质瘤 U251 细胞的生长;在进行 Transwell 小室实验显示,转染 miR-182 mimics 组的 U251 细胞穿过小室的细胞数明显较其他两组多,提示 miR-182 可促进胶质瘤 U251 细胞的转移;经荧光素酶活性实验验证,miR-182 mimics 与 pc DNA3/EGFP-FOXO3a 3'-UTR 共转染组(C 组)荧光素酶活性明显较其他组低,证实 FOXO3a 是 miR-182 调控的直接作用靶点。

FOXO3a 是分子量为 75 ku 的蛋白质,含有高度保守的翼螺旋结构域,可被磷酸化或乙酰化激活。FOXO3a 蛋白已被证实受到蛋白激酶 B 与核因子 κB 激酶 β 的抑制剂等修饰激活后,其活性发生改变,可参与肿瘤细胞的生长与增殖。p53 是一种重要的抑癌基因,当受到外界刺激时,FOXO3a 与 p53 可相互促进以抑制肿瘤细胞的生长,且被证实二者为协同作用^[14]。为进一步探讨 miR-182 对 FOXO3a 调控趋势,本研究选用脂质体进行转染,使 FOXO3a 进入突变状态,在体内过表达,结果显示:与对照组比较,进入 FOXO3a 蛋白突变状态的 U251 细胞增殖速度与侵袭速度均显著减小,突变状态 U251 细胞中 miR-182 的 mRNA 含量显著减小。

参考文献

[1] Davis F G, Freels S, Grutsch J, et al. Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: an analysis based on Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) data, 1973 - 1991 [J]. J Neurosurg, 1998 88(1): 1 - 10.

[2] Gilder A S, Wang L, Natali L, et al. Pertussis toxin is a robust and selective inhibitor of high grade glioma cell migration and inva-

- sion [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168418.
- [3] Deng M, Tang H, Zhou Y, et al. miR-216b suppresses tumor growth and invasion by targeting KRAS in nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(17): 2997–3005.
- [4] Chiang C H, Hou M F, Hung W C. Up-regulation of miR-182 by β -catenin in breast cancer increases tumorigenicity and invasiveness by targeting the matrix metalloproteinase inhibitor RECK [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(4): 3067–76.
- [5] Lehtinen M K, Yuan Z, Boaq P R, et al. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span [J]. *Cell*, 2006, 125(5): 987–1001.
- [6] Chu S H, Ma Y B, Feng D F, et al. Correlation of low SLC22A18 expression with poor prognosis in patients with glioma [J]. *J Clin Neurosci*, 2012, 19(1): 95–8.
- [7] Nikaki A, Piperi C, Papavassiliou A G. Role of microRNAs in gliomagenesis: targeting miRNAs in glioblastoma multiforme therapy [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21(10): 1475–88.
- [8] Nicolas F E, Lopez-Martinez A F. MicroRNAs in human diseases [J]. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 2010, 4(3): 142–54.
- [9] Zhou F, Nie L, Feng D, et al. MicroRNA-379 acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by targeting the IGF1R-mediated AKT and ERK pathways [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1857–66.
- [10] Cheng Y C, Tsai W C, Sung Y C, et al. Interference with psm4 expression exerts an anti-tumor effect by decreasing the invasion and proliferation of human glioblastoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(2): 819–31.
- [11] Luo Y, Sun R, Zhang J, et al. miR-506 inhibits the proliferation and invasion by targeting IGF2BP1 in glioblastoma [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(10): 2007–14.
- [12] Feng Y A, Liu T E, Wu Y. microRNA-482 inhibits the proliferation and migration of glioma cells through the induction of neuritin expression [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2): 1197–203.
- [13] Xue J, Zhou A, Wu Y, et al. miR-182-5p induced by STAT3 activation promotes glioma tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14): 4293–304.
- [14] Brunet A, Sweeney L B, Sturqill J F, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase [J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2011–5.

Effects of FOXO3a expression by miR-182 targeted regulation on proliferation and invasion of glioma cells

Yu Zhenxing, Deng Lei, Zhang Xianbin, et al

(Dept of Neurosurgery, PLA Joint Support Force 908 Hospital, Nanchang 330000)

Abstract Objective To explore the effects of FOXO3a protein expression by miR-182 targeted regulation on the proliferation and invasion of glioma cell U251. **Methods** The nonsense sequence and miR-182 mimics liposome were transfected into U251 cells. The proliferation of cells was determined by MTT assay and the cell metastasis was measured by transwell chamber. The Luciferase Reporter Assay was used to detect the targeting effect of miR-182 on FOXO3a, and the expression levels of FOXO3a protein and mRNA were determined by Western blot and qRT-PCR. The FOXO3a wild-type and mutant-type plasmids were introduced into U251 cells, and the proliferation and metastasis ability of U251 cells were measured by MTT and transwell. **Results** Compared with control group and nonsense sequence group, the number of cells in miR-182 mimics liposome group was significantly increased on the 1st to 3rd d ($P < 0.05$). On the 4th to 5th d, the number of cells in miR-182 mimics liposome group showed a decreasing trend, but the number of cells was significantly increased in other two groups ($P < 0.05$). In the Luciferase Reporter Assay, the mutant pcDNA3/EGFP-FOXO3a 3'-UTR plasmid and miR-182 mimics were transfected, and the luciferase activity in miR-182 mimics group was the lowest ($P < 0.01$). Compared with control group and nonsense sequence group, the levels of FOXO3a protein and mRNA in miR-182 mimics group were significantly decreased ($P < 0.01$). The quantities of cell proliferation and metastasis in U251 cells which were transfected with mutant FOXO3a liposome were significantly decreased compared with those in wild-type group ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-182 can promote the proliferation and metastasis of glioma cell U251. The increase of FOXO3a protein expression will decrease the proliferation and metastasis ability of glioma cell U251, and miR-182 may negatively regulate FOXO3a.

Key words glioma cells; miR-182; U251; proliferation; invasion