

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.010.html

miR-638 通过靶向调控 Notch 4 促进神经胶质瘤细胞的侵袭能力

李勋华^{1,2}, 王 婷³, 卢齐伟³, 钱立庭¹

摘要 目的 研究微小 RNA-638 (miR-638) 在恶性胶质瘤中的表达, 探讨 miR-638 在胶质瘤细胞侵袭过程中的作用及可能机制。方法 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分别检测正常神经组织、胶质瘤组织、正常胶质细胞株、胶质瘤细胞株中 miR-638 的表达水平; Transwell 实验检测分别转染 miR-638 模拟物和 miR-638 抑制物后 U251 细胞侵袭水平的改变; 生物信息学预测和验证 miR-638 对 Notch 4 的靶向调控关系; 构建 Notch 4 真核表达重组质粒 (pCMV-Notch 4 cDNA) 过表达 U251 细胞中的 Notch 4 表达水平, 并检测 U251 细胞侵袭水平的改变。结果 miR-638 在胶质瘤组织和细胞株中表达上调, 而 Notch 4 在胶质瘤细胞中表达下调, 两者表达呈负相关性; 过表达 miR-638 使 U251 细胞的侵袭细胞数上升 ($P < 0.01$), 而抑制 miR-638 表达后 U251 细胞的侵袭细胞数减少 ($P < 0.01$); miR-638 在 U251 细胞中能直接靶向抑制 Notch 4 的表达, 提升 Notch 4 在 U251 细胞中的表达能使侵袭细胞数减少 ($P < 0.01$)。结论 miR-638 在胶质瘤中高表达, 其可能通过靶向抑制 Notch 4 的表达促进胶质瘤细胞的侵袭能力。

关键词 神经胶质瘤; 微小 RNA-638; 侵袭; Notch 4

中图分类号 R 363.14

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)01-0047-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.010

胶质瘤在临床神经外科工作中是最常见的颅内原发性恶性肿瘤, 发病率高, 在颅内肿瘤中可达到 40%~50%。在我国胶质瘤占据颅内肿瘤发病率的首位^[1]。越来越多的研究^[2]表明微小 RNA (miRNA) 是人体生理和病理过程的重要调控分子, 其通过与靶基因 mRNA 的 3' 非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 序列完全或部分互补配对结合, 促进靶基因 mRNA 的降解或者抑制其翻译成蛋白质, 从而参与细胞的生长、增殖、分化、代谢、凋亡、

新生血管生成、细胞侵袭、转移等多种生理和病理过程。microRNA 在肿瘤中存在异常表达, 通过调控不同功能的靶基因, 影响着肿瘤的发生发展和恶性转化进程。已有研究^[3-6]证实微小 RNA-638 (miR-638) 在乳腺癌、结直肠癌、急性白血病和黑色素瘤中起着重要的促侵袭作用, 但在胶质瘤中的功能性研究却少有报道。因此, 该研究将从组织和细胞水平探讨 miR-638 在胶质瘤中的生物学功能及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 U251、U87、T98G、A172 胶质瘤细胞株和人正常星形细胞株 NHA 均购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。10 例胶质瘤组织及正常脑组织均取于安徽医科大学附属省立医院, 所有实验操作均经医院伦理委员会批准。DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) 和 G418 购于美国 Gibco 公司; TRIzol、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 检测试剂盒和 LipofectamineTM 2000 转染试剂购于美国 Invitrogen 公司; Transwell 小室和 Matrigel 胶购于美国 Corning 公司; Notch4 及 β -actin 抗体购于英国 Abcam 抗体公司; miR-638 模拟物和 miR-638 抑制物及其相应对照物购于广州锐博生物科技有限公司; 各种内切酶及连接酶购于上海天跟公司, 胶回收试剂盒购于日本 TaKaRa 生物公司。

1.2 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱及酶标仪 (美国 Thermo 公司); 超纯水仪 (美国 millipore 公司); 电子天平及 pH 计 (德国梅特勒托利多仪器有限公司); 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 仪器公司); 金属浴 (北京中科奥博科技有限公司); 普通梯度 PCR 仪、荧光定量 PCR 仪、垂直电泳系统、蛋白转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司); 显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); 恒温摇床 (常州华普达仪器制造厂); 超净工作台 (苏州苏泰净化设备有限公司); 凝胶成像系统 (上海勤翔 GenoSens1810) 等。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及转染 U251、U87、T98G、A172 人胶质瘤细胞株以及人正常星形胶质细胞系 NHA

2016-09-18 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085SMH233)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院肿瘤放疗科, 合肥 230001
² 滁州城市职业学院, ³ 外科教研室, ³ 内科教研室, 滁州 239000

作者简介: 李勋华, 男, 硕士研究生, 讲师;

钱立庭, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: money2004@sina.com

在 7 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下于含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基中常规培养。转染前 1 d 将 U251 细胞接种于 6 孔板(接种密度:1 × 10⁶ 个/ml)待细胞贴壁后,按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书转染 miR-638 模拟物和 miR-638 抑制物(转染浓度:100 nmol/孔)转染 6 h 后,去除原先培养基,更换为含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基,继续培养 24 h 或 48 h 后收集细胞总 RNA 或总蛋白进行相关后续实验检测。

1.3.2 实时荧光定量 PCR TRIzol 一步法抽提细胞总 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-638 定量引物,上游:5'-AAGGGATCGCGGGCG-3',下游:5'-TGCCTGTCGTGGAGTC-3';以 U6 作为 miR-638 定量测定内参,引物上游:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3',下游:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'。以 GAPDH 作为 Notch 4 定量测定内参,引物上游:5'-CAAGGTCATCATGACAACCTTTG-3',下游:5'-GTCCACCACCCTGTGCTGTAG-3'。Notch 4 引物上游:5'-CGGCCTCGGACTCAGTCA-3';下游:5'-CAACTACATCCTCATCAACTTCTG-3'。反应条件:预变性 95 ℃ 10 min,变性 95 ℃ 15 s,退火 60 ℃ 60 s,40 个循环,每组设置 3 个重复孔,结果以 2^{-ΔΔCt} 方法分析各组基因表达差异。

1.3.3 Transwell 实验 将转染后的 U251 细胞或高表达 Notch 4 的 U251 细胞制成细胞悬液(细胞密度:1 × 10⁵ 个/ml)。取 100 μl 细胞悬液加入 Transwell 小室,并移至加有 500 μl 含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基的 24 孔板中,每组设置 3 个重复孔。将 24 孔板放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 后取出小室,用无菌棉球擦去小室中 Matrigel 胶和细胞,PBS 溶液漂洗 2 次后,用 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min 后,PBS 溶液漂洗 2 次,用 1% 结晶紫染色液染色 10 min,自来水漂洗直至多余的结晶紫被洗净,晾干后于倒置显微镜下随机选取 3 个视野并拍照,统计穿膜细胞数。

1.3.4 Western blot 实验 收集预处理细胞,加入 100 μl 蛋白裂解液,置于冰上裂解 10 min 后,4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液即为细胞总蛋白。运用 BCA 法测定总蛋白浓度后预处理蛋白,以 30 μg/孔上样量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,将凝胶上的蛋白经 100 V 2 h 电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。将稀释比例 1:

1 000 的 Notch 4 和 β-actin 一抗 4 ℃ 孵育过夜,TBST 溶液漂洗 3 次,10 min/次,HRP 标记的二抗室温孵育 2 h,TBST 溶液漂洗 3 次,10 min/次,ECL 化学发光显影并采集图像。

1.3.5 pCMV-Notch4 cDNA 重组质粒构建及鉴定

Notch 4 人基因全序列引物(Pubmed,NM_004557)上下游引物分别加入 NHEI 及 KPN1 酶切序列,提取 U251 细胞系,根据试剂盒说明逆转成 cDNA 第一条链。PCR 扩增 Notch 4 蛋白编码序列,引物序列同 2.2,上游增加酶切位点:GCT AGC,下游增加酶切位点 GGT ACC,PCR 条件为 94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min,35 个循环,PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统采集数据后进行试剂盒切胶回收 Notch 4 PCR 产物。双酶切 Notch 4 PCR 产物以及 pcDNA3.1 质粒,产物切胶回收并用 Ligation HighDNA 连接酶连接(16 ℃,16 h),转化感受态 DH5α 菌株筛选后摇菌过夜,小提质粒双酶切、测序鉴定。Lipofectamine™ 2000 进行重组质粒(pCMV-Notch 4 cDNA)及空质粒对 U251 的转染,G418 筛选得到稳定转染质粒的细胞株。

1.4 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理,计数资料比较采用 χ^2 检验,两组独立样本比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-638 在胶质瘤组织以及胶质瘤细胞系中高表达 RT-PCR 检测 U87、U251、T98G、A172 人胶质瘤细胞系以及人脑胶质瘤组织的 miR-638 表达水平。结果显示,相对于正常人脑星形胶质细胞系 NHA,miR-638 在各个胶质瘤细胞系中均表达上调,其中 U251 细胞系中的表达上调最为显著(*P* < 0.01)。同样,人正常脑组织标本中显示与胶质瘤细胞系相同的结果,胶质瘤人脑组织中的 miR-638 表达量显著高于正常脑组织(*P* < 0.01),提示 miR-638 对胶质瘤的发生发展可能有促进作用。见图 1。

2.2 miR-638 促进胶质瘤细胞的侵袭能力 运用 Transwell 实验检测分别转染 miR-638 抑制物和 miR-638 模拟物后 U251 细胞侵袭水平的改变。结果显示,相比于 miR-638 抑制物对照组,转染 miR-638 抑制物即 miR-638 低表达使 U251 细胞的侵袭细胞数减少。反之,转染 miR-638 模拟物,即 miR-638 过表达使 U251 细胞的侵袭细胞数增多,见图 2。

2.3 miR-638 直接靶向调控 Notch 4 的表达 为

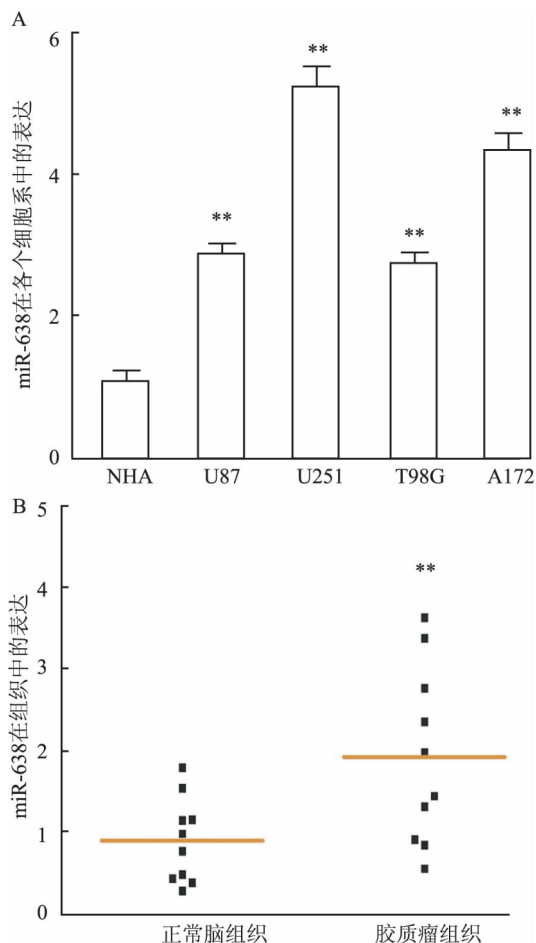


图1 miR-638在胶质瘤组织和胶质瘤细胞系中高表达

A: miR-638在正常人星形胶质细胞(NHA)与胶质瘤细胞系(U87、U251、T98G、A172)中的相对表达量,与NHA细胞系比较: ** $P < 0.01$; B: miR-638在正常脑组织及胶质瘤组织中的表达,与正常脑组织比较: ** $P < 0.01$

了探讨 miR-638 促进胶质瘤细胞侵袭能力的分子机制,首先在 MICRORNA (<http://www.microrna.org>) 权威生物信息系统预测 miR-638 的靶基因,结果显示 miR-638 与 Notch 4 的 3'-UTR 序列有 6 个互补配对位点,Notch 4 可能是 miR-638 的直接靶基因。进而在 U251 细胞中转染 miR-638 抑制物以及抑制物对照物后,分别用 RT-PCR 方法检测 Notch 4 mRNA 和 Western blot 方法检测 Notch 4 蛋白的表达水平,结果显示 U251 细胞中转染抑制 miR-638 的表达后,Notch 4 mRNA (与抑制物对照组比较: $t = 18.070$, $P < 0.05$) 和蛋白水平均显著升高,提示 Notch 4 是 miR-638 的直接靶基因,见图 3。

2.4 上调 Notch 4 表达抑制胶质瘤细胞的侵袭能力 为了探讨 Notch 4 是否直接参与胶质瘤细胞的侵袭过程,本研究构建人 Notch 4 基因的真核表达载体(pCMV-Notch 4 cDNA)及空质粒(pcDNA)转染

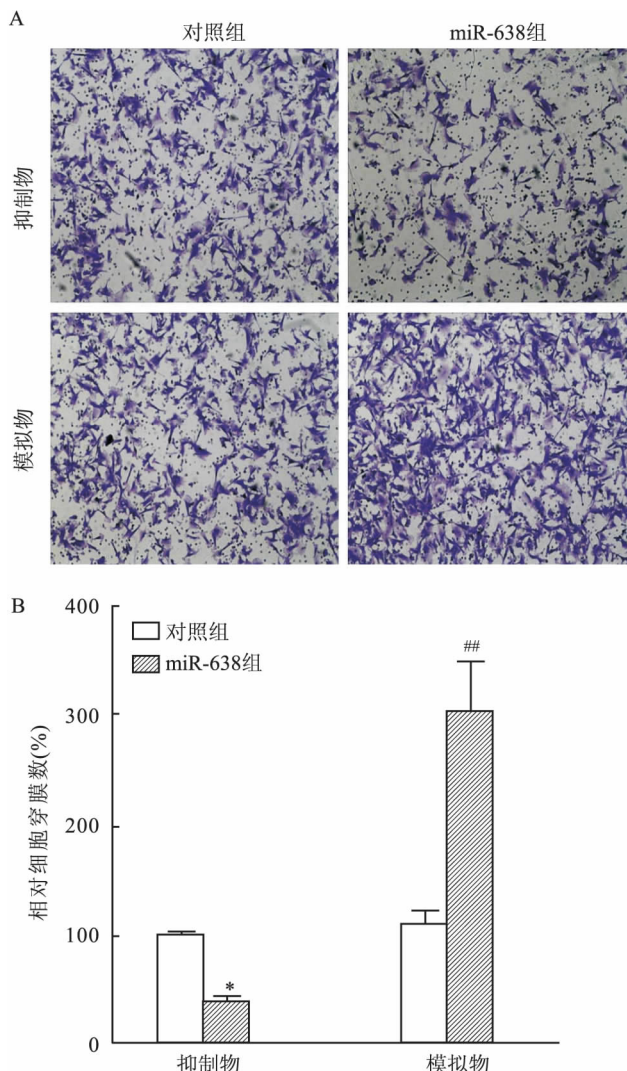


图2 miR-638促进胶质瘤细胞的侵袭能力 焦油紫染色×40

A、B: 焦油紫染色检测细胞穿膜数量及其统计图,与抑制物对照组比较: * $P < 0.05$; 与模拟物对照组比较: ## $P < 0.01$

U251 细胞株。Transwell 实验检测过表达 Notch 4 的 U251 细胞侵袭水平的改变。结果显示相比原始细胞过表达 Notch 4 的 U251 细胞侵袭能力明显降低,侵袭细胞数也发生下降 ($t = 5.878$, $n = 3$, $P < 0.01$) 见图 4。

3 讨论

胶质瘤呈广泛浸润生长、易复发且细胞异型性高,是临床上恶性程度最高的颅内肿瘤。因为其所处解剖位置的特殊性,目前还没有有效的治疗措施,手术切除结合术后放疗和化疗等综合性治疗手段仍是目前主要的抗癌治疗方式,但治疗效果不容乐观。因此,开发新的胶质瘤治疗手段已是迫在眉睫。

microRNA 通过转录后抑制翻译或裂解靶

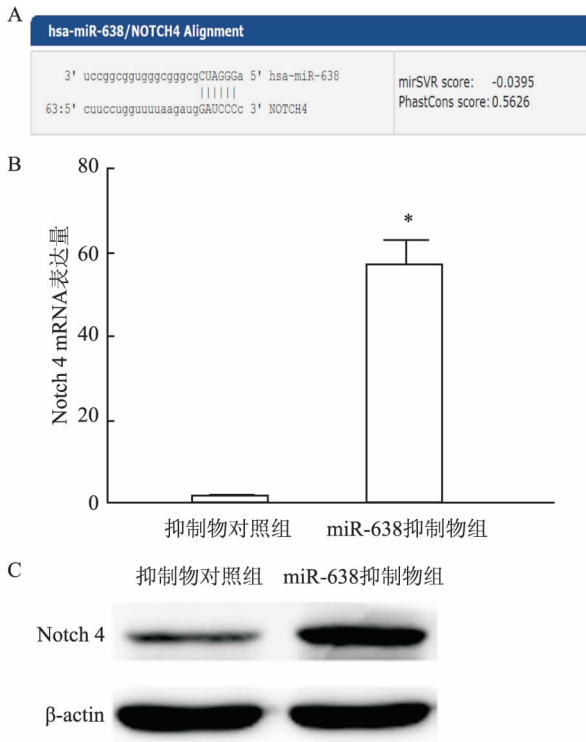


图3 miR-638 在 U251 细胞中直接靶向调控 Notch 4

A:生物信息学方法预测 Notch 4 可能是 miR-638 的直接靶基因;B:转染 miR-638 后 Notch 4 mRNA 表达水平上升;C:转染 miR-638 后 Notch 4 蛋白表达水平上升

mRNA 的方式参与细胞增殖、分化、凋亡等生物学过程的调控,是表观遗传调控的方式之一。大量的研究表明,miRNA 在胶质瘤的发生发展和恶性转化过程中起着重要作用,其中 miR-7 能够靶向抑制 EGFR 的表达,降低 Akt 通路的过度激活,从而阻遏肿瘤的转移进程^[7]。在胶质瘤细胞中抑制 miR-21 的表达可以恢复半胱天冬酶的表达,促进肿瘤细胞的凋亡^[8]。miR-34a 在胶质瘤组织中表达下调,恢复 miR-34a 的表达可以有效抑制靶基因 c-Met、Notch-1、Notch-2 和 CDK6 的促癌作用,从而逆转肿瘤细胞的恶性表型^[9]。因此,miRNA 有可能成为胶质瘤分子靶向治疗的新靶点。

本研究显示 miR-638 在胶质瘤组织中的表达水平明显高于正常神经组织,同样在胶质瘤细胞株中也有相似的结果。抑制 miR-638 的表达能够显著降低胶质瘤细胞的侵袭能力,反之,提高 miR-638 表达则能够增强胶质瘤细胞的侵袭能力。提示 miR-638 在胶质瘤发生发展过程中可以起着重要的促癌作用。在人类胃癌、结肠癌以及急性白血病中 miR-638 表达存在异常,通过调节肿瘤细胞生长和转移进程影响着多种肿瘤的发生发展和恶性转化过

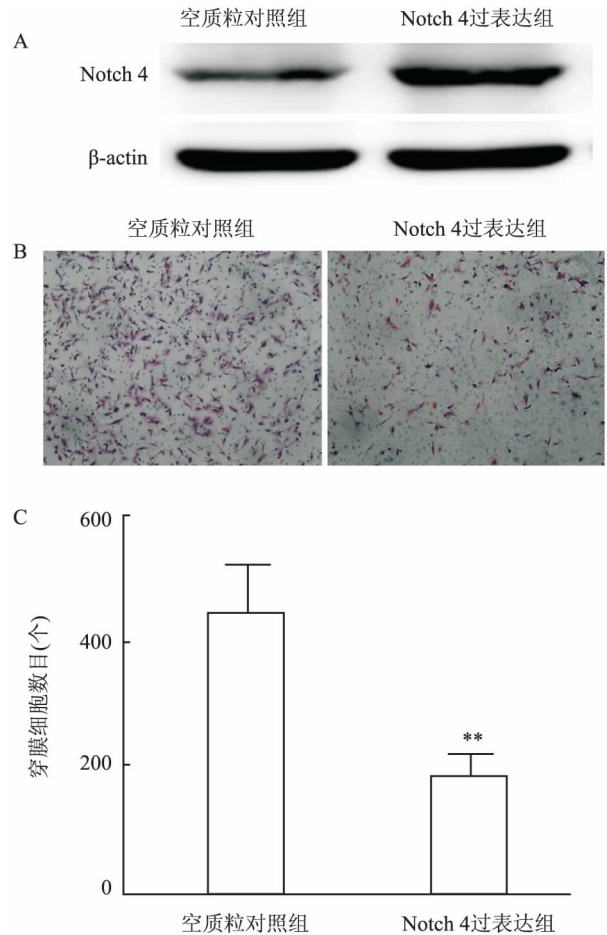


图4 Notch 4 在胶质瘤组织中低表达且上调

其表达将抑制 U251 细胞的侵袭转移能力 焦油紫染色 ×40

A:Western blot 检测转染 Notch 4 过表达载体后 Notch 4 蛋白表达水平上升;B:焦油紫染色检测过表达 Notch 4 对 U251 细胞侵袭能力的下降;C:B 图的统计图;与空质粒对照组比较:** P < 0. 01

程^[4]。在非小细胞肺癌中,miR-638 可能作为肿瘤化疗效果评估的新生物学标志物^[4]。另外,miR-638 被显示参与系统性红斑狼疮肾炎的病理发生机制,并且可以作为慢性肝炎 B 病毒感染者的早期临床诊断指标^[10-11]。Notch 家族参与细胞生长、分化和发育的多种生理过程,同时也参与肿瘤的增殖、凋亡和转移等多种病理过程。其在乳腺癌中多次被报道参与肿瘤的恶性转化进程的调节,其可作为乳腺癌预后评估的重要生物学指标^[12-13]。同样,Notch 家族分子也在胰腺癌、肝癌^[14]、非小细胞肺癌^[15]中具有重要的肿瘤生物学调节功能。而目前对于 Notch 4 在胶质瘤中的生物学功能研究却少之又少。本研究首次显示了 miR-638 在胶质瘤侵袭中的重要作用,并且证实 miR-638 能直接靶向调控 Notch 4 的蛋白表达,在 U251 细胞中恢复 miR-638 的表达亦能明显抑制胶质瘤细胞的侵袭能力,显示出与抑制 miR-

638 表达相似的效果。

综上所述,在胶质瘤发生发展过程中,miR-638 能够通过与 Notch 4 的 3'-UTR 序列互补配对结合,靶向抑制其表达,促进胶质瘤细胞的侵袭能力,加速肿瘤的恶性转化进程。本研究完善了胶质瘤恶性侵袭的分子机制,并且为 miR-638 作为胶质瘤分子治疗靶点、开发抗癌治疗的新策略提供理论依据。

参考文献

- [1] Li J, Qu Q, Qu J, et al. Association between XRCC1 polymorphisms and glioma risk among Chinese population [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(10):186.
- [2] Mohr A M, Mott J L. Overview of microRNA biology [J]. *Semin Liver Dis* 2015, 35(1):3-11.
- [3] Zavala V, Perez-Moreno E, Tapia T, et al. miR-146a and miR-638 in BRCA1-deficient triple negative breast cancer tumors, as potential biomarkers for improved overall survival [J]. *Cancer Biomarkers*, 2016, 16(1):99-107.
- [4] Wang F, Lou J F, Cao Y, et al. miR-638 is a new biomarker for outcome prediction of non-small cell lung cancer patients receiving chemotherapy [J]. *Exp Mol*, 2015, 47(5):e162.
- [5] Zhang J, Fei B, Wang Q, et al. MicroRNA-638 inhibits cell proliferation, invasion and regulates cell cycle by targeting tetraspanin 1 in human colorectal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(23):12083-96.
- [6] Lin Y, Li D, Liang Q, et al. miR-638 regulates differentiation and proliferation in leukemic cells by targeting cyclin-dependent kinase 2 [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(3):1818-28.
- [7] Kefas B, Godlewski J, Comeau L, et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(10):3566-72.
- [8] Chan J A, Krichevsky A M, Kosik K S. MicroRNA-21 is an anti-apoptotic factor in human glioblastoma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14):6029-33.
- [9] Li Y, Guessous F, Zhang Y, et al. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19):7569-76.
- [10] Lu J, Kwan B C, Lai F M, et al. Glomerular and tubulointerstitial miR-638, miR-198 and miR-146a expression in lupus nephritis [J]. *Nephrology*, 2012, 17(4):346-51.
- [11] Kumar M, Sharma Y, Bandi S, et al. Endogenous antiviral microRNAs determine permissiveness for hepatitis B virus replication in cultured human fetal and adult hepatocytes [J]. *J Med Virol*, 2015, 87(7):1168-83.
- [12] Nagamatsu I, Onishi H, Matsushita S, et al. NOTCH4 is a potential therapeutic target for triple-negative breast cancer [J]. *Anti-cancer Res*, 2014, 34(1):69-80.
- [13] Costa M J, Wu X, Cuervo H, et al. Notch4 is required for tumor onset and perfusion [J]. *Vasc Cell*, 2013, 5:7.
- [14] Ahn S, Hyeon J, Park C K. Notch1 and Notch4 are markers for poor prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2013, 12(3):286-94.
- [15] Theys J, Yahyanejad S, Habets R, et al. High NOTCH activity induces radiation resistance in non small cell lung cancer [J]. *Radiother Oncol*, 2013, 108(3):440-5.

MiR-638 promotes invasion of glioma cells via modulating Notch 4 expression

Li Xunhua^{1,2}, Wang Ting³, Lu Qiwei³, et al

(¹Dept of Radiotherapy and Oncology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Surgery, ³Dept of Internal Medicine, Chuzhou City Vocation College, Chuzhou 239000)

Abstract Objective To investigate the expression of microRNA-638 (miR-638) in gliomas tissues/cells and its role in the invasion of human glioma cells and the potential mechanism. **Methods** RT-PCR was used to detected expression of miR-638 in normal nerve tissues/cells and glioma tissue/cells. Transwell assay was used to detect the changes of the invasion level of U251 cells transfected with miR-638 mimic and miR-638 inhibitor. Relationship between miR-638 and Notch 4 was predicted and validated by bioinformatics analysis. Overexpressing Notch 4 by constructing eukaryotic expression plasmid and transfected into U251 (pCMV-Notch 4 cDNA), invasion level of U251 cells was detected by Transwell assay. **Results** Expression of miR-638 in glioma tissues and cells was up-regulated, whereas Notch 4 was down-regulated, the correlation was negative; In U251 cells, the overexpression of miR-638 increased the number of invasive cells ($P < 0.01$), and that inhibited the expression of miR-638 can decrease the number of invasive cells ($P < 0.01$); in U251 cells, miR-638 target to inhibit the expression of Notch 4 directly, and enhanced the expression of Notch 4 can decrease the number of invasive cells ($P < 0.01$). **Conclusion** MiR-638 is highly expressed in gliomas, which may promote the invasion of glioma cells by inhibiting the expression of Notch 4.

Key words glioma; microRNA-638; invasion; Notch 4