

## 微小核糖核酸 592 对神经胶质瘤细胞株 U251 细胞凋亡的影响

陈照亮<sup>1</sup>, 刘红<sup>1</sup>, 杨会利<sup>1</sup>, 高玉凯<sup>1</sup>, 张娟<sup>1</sup>, 吉文玉<sup>2</sup>

1. 滨州市中心医院肿瘤科, 山东 滨州 251700

2. 新疆医科大学第一附属医院儿外一科, 乌鲁木齐 830054

**摘要:**目的 研究微小核糖核酸 592 (miR-592) 对神经胶质瘤细胞株 U251 凋亡的影响。方法 首先通过定量聚合酶链反应 (PCR) 分析 miR-592 在 28 份神经胶质瘤与其临近癌旁组织中的表达水平; 随后向 U251 细胞转染 miR-592 的拟合物, 并通过流式细胞技术分析 miR-592 过表达对 U251 细胞凋亡的影响; 通过生物信息学分析, 找到 miR-592 的潜在靶分子, 并通过荧光素酶双报告实验以及蛋白免疫印迹法等进行验证; 进一步, 转染 U251 细胞 Runx2 的下调 siRNA, 绘制细胞的生长曲线, 并对 U251 细胞的凋亡进行分析。结果 对 28 份神经胶质瘤组织和正常组织的定量 PCR 结果分析发现, miR-592 在肿瘤组织中明显低表达; miR-592 过表达能明显抑制 U251 细胞的生长; 流式细胞分析结果显示, miR-592 显著促进 U251 细胞凋亡; 实验对照组晚期凋亡率为  $7.2\% \pm 0.68\%$ , 而转染 miR-592 组晚期凋亡率为  $17.47\% \pm 1.45\%$ ; 荧光素酶双报告实验以及蛋白免疫印迹法实验结果发现 miR-592 直接靶向 Runx2 的 3'-UTR 来抑制 Runx2 蛋白的水平; 接下来, 向 U251 细胞转染 Runx2 的 siRNA, 绘制细胞的生长曲线, 并通过流式细胞技术分析 U251 细胞的凋亡率。结论 miR-592 通过直接靶向 Runx2 来诱导神经胶质瘤细胞凋亡, 进而抑制肿瘤细胞的生长。

**关键词:** 神经胶质瘤; U251; miR-592; 凋亡; Runx2

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.02.011

## Effect of microRNA-592 on the apoptosis of glioma cell line U251

CHEN Zhaoliang<sup>1</sup>, LIU Hong<sup>1</sup>, YANG Huili<sup>1</sup>, GAO Yukai<sup>1</sup>, ZHANG Juan<sup>1</sup>, JI Wenyu<sup>2</sup> 1. Department of Oncology, Binzhou City Center Hospital, Binzhou, 2517002. Department of First pediatric surgery, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Wulumuqi 830054

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of microRNA-592 (miR-592) on the apoptosis of glioma cell line U251. **Methods** PCR was used to measure the expression of miR-592 in glioma tissue and adjacent tissue. U251 cells were transfected with miR-592 mimics and then flow cytometry was used to analyze the effect of miR-592 overexpression on the apoptosis of U251 cells. A bioinformatics analysis was used to identify the potential target molecules of miR-592, and then dual-luciferase reporter assay and Western blot were used for validation. U251 cells were transfected with the small interfering RNA (siRNA) which downregulated the expression of Runx2, and then the cell growth curve was plotted and the apoptosis of U251 cells was analyzed. **Results** The results of quantitative PCR for 28 glioma tissues and normal tissues showed that the expression of miR-592 was significantly reduced in glioma tissues and miR-592 overexpression significantly inhibited the growth of U251 cells. Flow cytometry showed that miR-592 significantly promoted the apoptosis of U251 cells; the late apoptosis rate was  $7.2\% \pm 0.68\%$  in the control group and  $17.47\% \pm 1.45\%$  in the miR-592 transfection group. Dual-luciferase reporter assay and Western blot showed that miR-592 directly targeted 3'-UTR of Runx2 to inhibit the level of Runx2 protein. U251 cells were transfected with the siRNA of Runx2; the cell growth curve was plotted, and flow cytometry was used to analyze the apoptosis rate of U251 cells. **Conclusions** miR-592 directly targets Runx2 to induce the apoptosis of U251 cells and thus inhibit cell growth.

**Key words:** Glioma; U251; MicroRNA-592; Apoptosis; Runx2

神经胶质瘤是最为常见的原发性中枢神经系统肿瘤。50% ~ 60% 的脑部恶性肿瘤都是胶质瘤<sup>[1]</sup>。对神经胶质瘤现有的治疗策略主要是手术治疗、放射治疗、化学治疗或其他方式的辅助性治疗<sup>[2-4]</sup>。然而,高转移率和对放化疗的耐受性使得胶质瘤的预后效果都很差<sup>[5-7]</sup>。我们的研究发现,微小核糖核酸 592 (miR-592) 在胶质瘤组织中相对于癌旁组织明显表达降低。为了进一步探究 miR-592 在胶质瘤细胞中作用机制,我们应用 miR-592 mimics 上调 miR-592 在胶质瘤细胞(U251 细胞)中表达水平,研究其对胶质瘤细胞生长和凋亡的影响,并进一步通过实验寻找 miR-592 的靶分子。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

胶质瘤细胞 U251 细胞为新疆医科大学第一附属医院中心实验室自有,28 份胶质瘤和癌旁组织为我院自 2012 年 4 月至 2015 年 7 月所收集神经胶质瘤样本,其中 28 例胶质瘤样本中 I 级胶质瘤 4 例(均为毛细胞型星形细胞瘤)、II 级 4 例(少突胶质细胞瘤及弥漫性星形细胞瘤)、III 级 14 例(少突胶质细胞瘤,星形细胞瘤,间变性星形细胞瘤)、IV 级 6 例(胶质母细胞瘤),均由术中切除获得,均经病理验证,且已经过患者或家属知情同意。RPMI-1640 培养基和 FBS 为美国 Gibco 公司产品,噻唑蓝、二甲基亚砜(DMSO)为美国 Sigma 公司产品,Runx2 单克隆抗体购自于 Abcam 公司,荧光素酶检测试剂盒购自于 Promega 公司,酶标检测仪为德国 MD 公司产品,Lipofectamine 2000、Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品,miR-592 mimics 和 siRNA 购自于上海吉凯基因公司,miR-592 和 Runx2 定量检测试剂盒为德国 QIAGEN 公司产品。实时定量聚合酶链反应试剂盒为美国 ABI 产品,流式细胞仪为美国 BD 公司产品,PI 和 Annexin V 凋亡染色试剂盒也为美国 BD 公司产品,其他相关质粒为实验室自有。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人胶质瘤细胞 U251 以 10% 的胎牛血清 RPMI-1640 或 DMEM 培养基,在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、相对湿度为 90% 的培养箱中培养。用 0.25% 的胰酶消化,每 2 天换液传代。

1.2.2 细胞增殖实验(噻唑蓝) 以每孔 10 000 个细胞接种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔。细胞贴壁后,向细胞转染 100 nmol/L 的 miR-592 mimics 或者 Runx2 的 siRNA,以随机序列的 mimic 作为实

验对照,Runx2 的 siRNA 序列如下:Runx2 siRNA: 5'-GCACGCUAAUAAAUCCAAATT-3'。12 h 后进行第一次检测:每孔加入 5 g/L 的噻唑蓝液 20 μl,继续培养到 4 h 后,去掉培养基,加入 DMSO 150 μl,用酶标仪在 490 nm 检测吸光值。分别于转染后 12、24、36 h 和 48 h 测定吸光度(A)值。根据测得的 A 值绘制生长曲线。

1.2.3 RNA 提取及实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR): 所有样本用液氮在研钵中研磨,用 TRzol 提取总 RNA,并通过酶标仪测 RNA 浓度, $A_{260}/A_{280}$  为 1.8 ~ 2.0。将 RNA 样本稀释成 2 ng/μl,按照说明书配置成 15 μl 的逆转录体系进行逆转。取其中 2 μl 作为模板配置成 20 μl 体系进行定量 PCR 验证。反应条件为 95℃ 10 min 预变性,95℃ 15 s → 60℃ 30 s 进行 40 个循环,反应结束后得到各个标本和内参 GAPDH 的 Ct 值。计算公式:  $\Delta Ct = Ct - Ct_{GAPDH}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(T) - \Delta Ct(N)$ , 相对表达计算公式为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。定量引物均购自 QIAGEN 公司,序列如下:Runx2 上游引物: 5'-GACCAGTCTTAC-CCCTCCTACC-3', Runx2 下游引物: 5'-CTGCCTG-GCTCTTCTTACTGAG-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GAGAGACCCCACTTGCTGCCA-3', GAPDH 下游引物: 5'-CTCACACTGCCCCTCCCTGGT-3'。

1.2.4 流式细胞技术 以每孔 10 000 个细胞接种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔。向细胞转染 100 nmol/L 的 miR-592 mimics 或 100 nmol/L 的 Runx2 siRNA,以随机的 mimic 作为实验对照,序列如前所述。48 h 后,用胰酶消化制成单细胞悬液,PBS 洗涤 3 次。按说明书操作进行 PI/Annexin V 染色细胞,避光染色 20 min,流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率,实验重复 3 次,每次 3 个复孔。结果用 FlowJo 软件进行分析。

1.2.5 蛋白免疫印迹实验 加入 200 μl RIPA 缓冲液冰上 20 min 裂解细胞。加入 50 μl 5X SDS-PAGE 上样缓冲液,煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE。转膜,10% BSA 溶液封闭,加入稀释好的抗体工作液,4℃ 过夜孵育,TBST 洗膜 3 次。再加入 HRP 标记的抗人 IgG 二抗,TBST 洗膜 3 次后,加上化学发光底物,于暗室内压片、曝光、显影和定影。

1.2.6 荧光素酶双报告实验 以每孔  $2.0 \times 10^5$  个 293T 细胞接种于 24 孔板。培养 24 h 后,用 lipofectamine2000 将报告质粒和 miR-592 过表达质粒共转染于 293T 细胞,并同步共转入 pRL-TK 作

为对照质粒,用量分别为:报告质粒 0.4 μg; miR-592 过表达质粒 0.4 μg; pRL-TK 质粒 0.05 μg。转染后 6 h 换完全培养基。48 h 后去上清,用 PBS 洗去未去干净的上清,随后用 lysis buffer 冰上裂解细胞,收集上清用于荧光素酶活性检测(试剂盒购自于 Promega)。计算方法为:荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶读值/海肾荧光读值。

1.2.7 裸鼠肿瘤模型 建立购买 8 周龄的 BALB/c (nu/nu) 裸鼠(上海斯莱克),随机分成 3 组,每组 5 只。分别于左、右侧肋部皮下接种 miR-592 稳定表达的 U251 细胞、Runx2 siRNA 稳定表达的 U251 细胞(细胞系均由上海吉凯基因公司制备),以正常 U251 细胞作为实验对照,细胞接种量均为  $6.0 \times 10^6$ /只,左右侧各  $3.0 \times 10^6$  个。于接种后每隔 5 d 游标卡尺测定肿瘤大小,以  $1/3 \times \text{长径} \times \text{短径} \times 2$  计算肿瘤体积,并于接种后第 50 天处死小鼠,绘制肿瘤生长曲线。

1.3 统计学方法

各组数据均采用 SPSS 统计软件进行统计学处

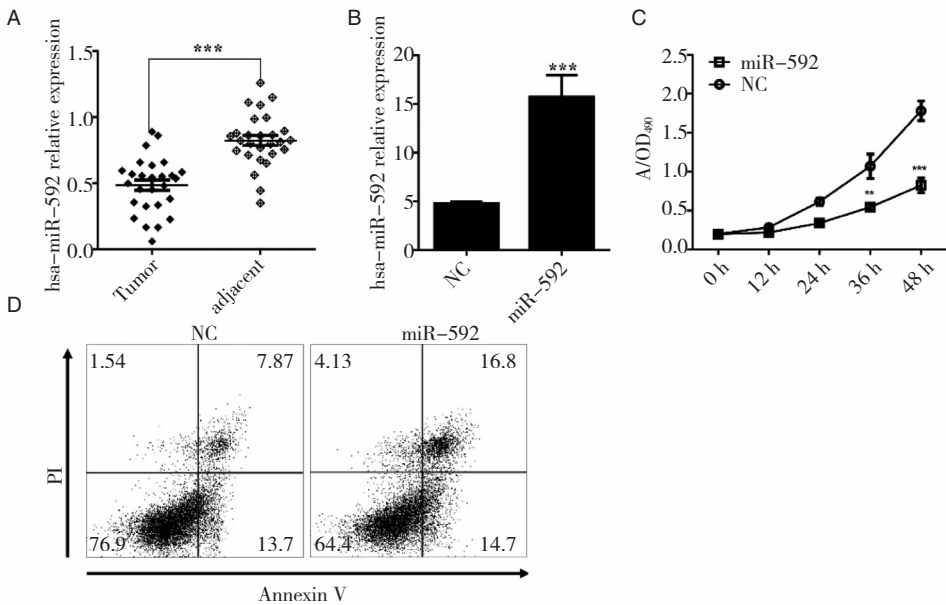
理。正态分布的计量资料采用均值 ± 标准差,两组间数据比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-592 促进 U251 细胞凋亡

首先,我们通过定量 PCR 的方法分析了 miR-592 在神经胶质瘤组织和癌旁组织中的表达变化。结果表明 miR-592 在神经胶质瘤组织中的相对表达明显下降(图 1A)。

为了进一步研究 miR-592 是否在胶质瘤的发生发展中发挥着功能性的作用,我们合成了 miR-592 的 mimics,并合成随机序列的对照。脂质体转染 U251 细胞后,我们首先检测了 miR-592 的表达(图 1B),并通过 MTT 实验绘制生长曲线(图 1C)。结果显示,过表达 miR-592 能明显抑制 U251 细胞生长。流式细胞实验对 U251 细胞的凋亡检测结果显示 miR-592 能显著性上调细胞凋亡率(图 1D,表 1)。



A: miR-592 在肿瘤和癌旁组织中的表达; B: 转染 mimics 后 miR-592 的表达水平; C: MTT 检测 U251 细胞生长; D: 流式细胞仪检测 miR-592 过表达后 U251 细胞周期

图 1 miR-592 促进 U251 细胞凋亡。

Table 1 Apoptotic rate of U251 cells in various groups

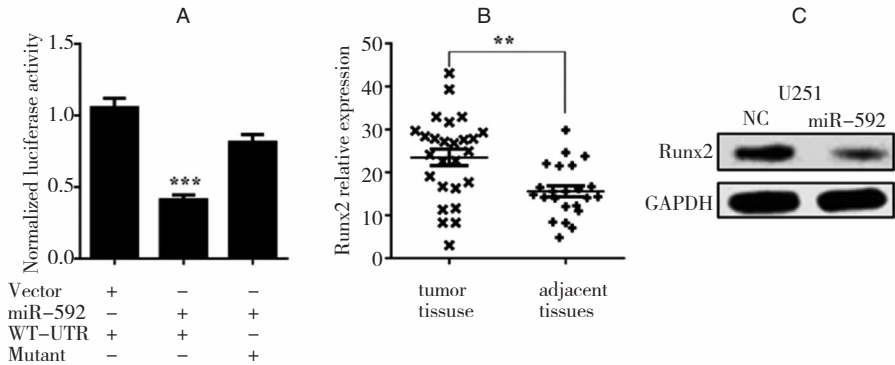
Group	Early apoptotic rate(%)				Late apoptotic rate(%)			
	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3	$\bar{x} \pm s$	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3	$\bar{x} \pm s$
NC	13.7	12.92	14.52	$13.71 \pm 0.8$	7.87	6.51	7.21	$7.2 \pm 0.68$
MiR-592	12.8	11.35	14.66	$12.94 \pm 1.66$	16	18.9	17.5	$17.47 \pm 1.45^{**}$

\*\*  $P < 0.01$ , vs NC group

## 2.2 Runx2

Runx2 是 miR-592 在 U251 细胞中的直接靶分子:为了进一步探究 miR-592 在神经胶质瘤细胞中的作用机制。通过查阅文献我们发现 Runx2 在神经胶质瘤细胞中发挥着重要作用,我们通过生物信息学分析发现 miR-592 能直接靶向 Runx2 的 3'-UTR。荧光素酶双报告实验也显示 miR-592 显著性的抑制带有 Runx2 的 3'-UTR 的荧光素酶的活性(图 2A)。为了进一步验证 Runx2 是否是 miR-

592 的直接靶分子,我们通过定量 PCR 的方法分析了 Runx2 在神经胶质瘤组织和癌旁组织中的表达,结果显示 Runx2 的相对表达在肿瘤组织中明显上调(图 2B)。随后我们还通过 western blot 的方法分析了转染 miR-592 后 U251 细胞 Runx2 蛋白的表达,结果显示 miR-592 抑制 Runx2 的蛋白水平(图 2C)。以上结果表明,Runx2 是 miR-592 在 U251 细胞中的直接靶分子。



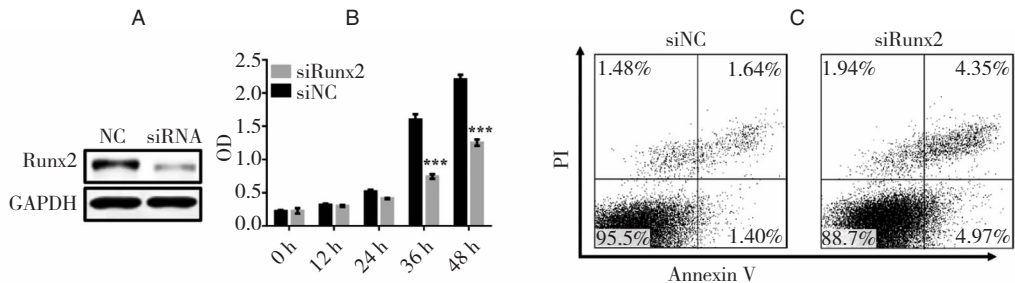
A: 荧光素酶双报告实验; B: 定量检测 Runx2 在肿瘤组织和癌旁组织中的表达; C: Runx2 在转染 miR-592 和 NC 后 U251 细胞中的表达

图 2 Runx2 是 miR-592 在 U251 细胞中的直接靶蛋白

## 2.3 下调 Runx2 表达水平抑制 U251 细胞生长并促进细胞凋亡

为了研究 Runx2 是否是 miR-592 在 U251 细胞中的功能性靶分子,我们设计了 Runx2 下调的 siRNA。转染 U251 细胞后,western blot 实验验证 Runx2 的表达(图 3.A)。同时,我们也检测了下调 Runx2 对 U251 细胞生长的影响,结果显示转染了

Runx2 siRNA 的细胞生长明显比对照组低(图 3.B)。流式细胞技术对周期的检测显示,Runx2 下调表达上调 U251 细胞的凋亡率(图 3.C 和 Table 2)。综上所述,下调 Runx2 表达能重现 miR-592 过表达的表型,说明 Runx2 是 miR-592 的功能性靶分子。



A: western blot 验证 siRNA 下调效率; B: MTT 实验检测 Runx2 下调后细胞生长情况; C: 流式细胞仪分析 Runx2 下调后细胞凋亡率

图 3 下调 Runx2 促进 U251 细胞凋亡

Table 2 Apoptotic rate of siRunx2 on U251 cells

Group	Late apoptotic rate( % ) ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )
NC	1.58 ± 0.25
siRunx2	4.57 ± 0.36 *

\*  $P < 0.05$ , vs NC group

总结以上结果我们得出如下结论: miR-592 通过直接靶向 Runx2 来促进 U251 细胞凋亡率来抑制细胞生长。

2.4 miR-592 通过靶向 Runx2 调控 U251 的肿瘤的生长

为了进一步验证 Runx2 是否为 miR-592 的功能性的靶分子,进一步通过体内的成瘤实验验证以上疑问。通过在裸鼠皮下接种 miR-592 稳定表达的 U251 细胞;Runx2 siRNA 稳定表达的 U251 细胞和对照组 U251 细胞。于接种后每隔 5 天测定一次肿瘤大小。并于接种后 50 天处死小鼠。通过绘制肿瘤的生长曲线,发现 miR-592 过表达明显抑制肿瘤的生长(图 4)。同时,我们发现,Runx2 的下调表达也明显抑制肿瘤的生长(图 4)。该实验结果表明,miR-592 通过下调 Runx2 抑制胶质瘤肿瘤生长。

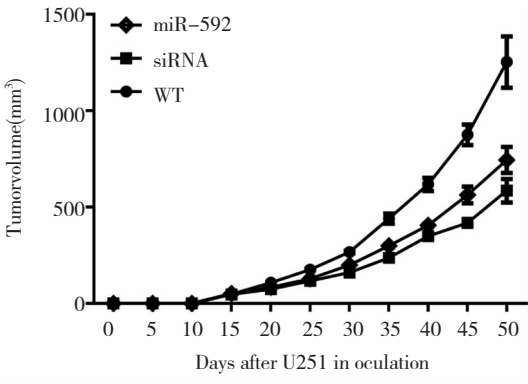


图 4 miR-592 靶向 Runx2 抑制 U251 肿瘤的生长

总结以上所有结果,可得出如下结论: miR-592 通过靶向 Runx2 来调控 U251 细胞的凋亡和肿瘤的生长。

3 讨论

microRNA 是一类长度约为 22 个碱基的非编码 RNA。虽然 microRNA 在哺乳动物细胞中的总体数量很少,但是它们却调节了大约 30% 的基因。mi-croRNA 通过靶向目的分子的 3'-UTR 来调节 mR-NA 的水平从而进一步调节蛋白的水平<sup>[8,9]</sup>。诸多文献报道指出 microRNA 在肿瘤的发生发展过程中

起着各种各样非常重要的作用<sup>[10-13]</sup>。我们发现, miR-592 在神经胶质瘤组织中的表达显著下调。合成 miR-592 的 mimics 并转染 U251 细胞来过表达 miR-592,MTT 实验结果显示过表达 miR-592 显著性的抑制细胞生长。流式细胞检测表明,过表达 miR-592 上调 U251 细胞的凋亡率。这些结果表明,miR-592 在神经胶质瘤细胞中发挥着肿瘤抑制基因的功能。

Runx2 是 Runt 相关转录因子家族的重要成员<sup>[14]</sup>。它可以形成核心结合因子(CBF)复合物结合到 DNA 序列上,从而达到对基因表达的调控作用<sup>[15]</sup>。越来越多的研究表明 Runx2 在包括胶质瘤在内的多种肿瘤中都有表达。Runx2 的高表达能促进肿瘤的生长、转移和浸润<sup>[16-17]</sup>。而下调 Runx2 的表达又可以抑制肿瘤的生长和发生发展<sup>[18]</sup>。这些结果表明 Runx2 发挥着肿瘤抑制因子的功能。应用荧光素酶双报告实验,发现 miR-592 能直接和 Runx2 的 UTR 结合。而在肿瘤组织中 Runx2 的表达也明显上调,western blot 实验结果也显示过表达 miR-592 的 U251 细胞的 Runx2 的表达明显下调。以上结果表明,Runx2 是 miR-592 在 U251 细胞中的直接靶分子。

为了进一步研究 Runx2 是否是 miR-592 在 U251 细胞中的功能性靶分子,我们通过 siRNA 特异性的沉默 Runx2 的表达。MTT 实验结果表明,下调 Runx2 显著性的抑制 U251 细胞的生长,其凋亡水平也明显上调。这个结果表明,Runx2 是 miR-592 在 U251 细胞中的功能性靶蛋白。

综上所述,我们得出以下结论: miR-592 通过直接靶向 Runx2 促进凋亡来抑制 U251 细胞生长。

参 考 文 献

[1] Shipman L. Glioma: Tumour cell teamwork [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(1): 2.

[2] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment [J]. Genes Dev. 2007,21(21):2683-2710.

[3] 郝俊海,常杨军. 神经胶质瘤相关长链非编码 RNA 的研究进展 [J]. 中华神经外科杂志, 2016, 32(1): 94-96.

- [4] 王伟民. 重视神经胶质瘤手术治疗的方法研究 [J]. 中华神经外科杂志, 2008, 24(4): 312-313.
- [5] Castro MG, Lowenstein PR. Neuro-oncology: The long and winding road--gene therapy for glioma [J]. Nat Rev Neurol, 2013, 9(11): 609-610.
- [6] Hashizume R, Andor N, Ihara Y, et al. Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma [J]. Nat Med, 2014, 20(12): 1394-1396.
- [7] Reardon DA, Wen PY. Glioma in 2014: unravelling tumour heterogeneity-implications for therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2015, 12(2): 69-70.
- [8] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review [J]. EMBO Mol Med. 2012, 4(3): 143-159.
- [9] Wang C, Ji B, Cheng B, et al. Neuroprotection of microRNA in neurological disorders (Review) [J]. Biomed Rep. 2014, 2(5): 611-619.
- [10] Dadiani M, Bossel Ben-Moshe N, Paluch-Shimon S, et al. Tumor Evolution Inferred by Patterns of microRNA Expression through the Course of Disease, Therapy, and Recurrence in Breast Cancer [J]. Clin cancer Res, 2016, 22(14): 3651-3662.
- [11] Gong X, Zhou W, Chai Y, et al. MicroRNA-induced cascaded and catalytic self-assembly of DNA nanostructures for enzyme-free and sensitive fluorescence detection of microRNA from tumor cells [J]. Chem Commun (Camb). 2016, 11;52(12): 2501-2504.
- [12] Kuninty PR, Schnittert J, Storm G, et al. MicroRNA Targeting to Modulate Tumor Microenvironment [J]. Front Oncol. 2016, 6: 3.
- [13] Zhang L, Yang CS, Varelas X, et al. Altered RNA editing in 3' UTR perturbs microRNA-mediated regulation of oncogenes and tumor-suppressors [J]. Sci Rep, 2016, 6: 23226.
- [14] Vladimirova V, Waha A, Lückérath K, et al. Runx2 is expressed in human glioma cells and mediates the expression of galectin-3 [J]. J Neurosci Res, 2008, 86(11): 2450-2461.
- [15] Niu DF, Kondo T, Nakazawa T, et al. Transcription factor Runx2 is a regulator of epithelial-mesenchymal transition and invasion in thyroid carcinomas [J]. Lab invest, 2012, 92(8): 1181-1190.
- [16] Takahashi T. Overexpression of Runx2 and MKP-1 stimulates transdifferentiation of 3T3-L1 preadipocytes into bone-forming osteoblasts in vitro [J]. Calcif Tissue Int. 2011, 88(4): 336-347.
- [17] 付胜伟, 岳树源. 微小分子 RNA 在胶质瘤中的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39(4): 373-376.
- [18] Wang W, Chen B, Zou R, et al. Codonolactone, a sesquiterpene lactone isolated from *Chloranthus henryi* Hemsl, inhibits breast cancer cell invasion, migration and metastasis by downregulating the transcriptional activity of Runx2 [J]. Int J Oncol. 2014, 45(5): 1891-1900.