

microRNA-195 在脑膜瘤中的表达及其功能研究

阿库布千, 李祥龙, 罗鑫, 冯杰, 周江, 李昊, 刘亮, 陈礼刚, 夏祥国
西南医科大学附属医院神经外科, 四川 泸州 646000

摘要:目的 探究非编码 microRNA-195 在脑膜瘤中的表达及其功能。方法 采用原位杂交检测 miR-195 在脑膜瘤组织中的表达水平及其与临床分级的相关性;在脑膜瘤细胞株 IOMM-Lee 中过表达 miR-195, 通过 CCK8、流式细胞术等检测 miR-195 对脑膜瘤细胞生物学功能的影响。结果 miR-195 在脑膜瘤中表达, 其表达水平与肿瘤级别呈负相关。在脑膜瘤细胞中过表达 miR-195 可显著抑制肿瘤细胞的细胞活力, 将细胞周期阻滞于 G1 期;荧光素梅报告基因结果显示 miR-195 可以直接抑制 c-myb 的转录水平, 在脑膜瘤细胞中过表达 miR-195 能够显著抑制 c-myb mRNA 水平和蛋白水平的表达。结论 miR-195 在脑膜瘤中异常表达, 与肿瘤临床分级相关, 能够通过靶向调节 c-myb 的表达抑制脑膜瘤细胞的细胞周期, 抑制肿瘤细胞的生长。

关键词: miR-195; 脑膜瘤; 增殖; c-myb

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.06.016

Expression and function of microRNA-195 in meningioma

AKU BuQian, LI Xiang-Long, LUO Xin, FENG Jie, ZHOU Jiang, LI Hao, LIU Liang, CHEN Li-Gang, XIA Xiang-Guo *. Department of Neurosurgery, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Corresponding author: XIA Xiang-Guo, Email: xxgsin@sina.com

Abstract: Objective To investigate the expression and function of non-coding microRNA-195 (miR-195) in meningioma. **Methods** In situ hybridization was used to measure the expression of miR-195 in meningioma and its correlation with clinical classification was analyzed. After miR-195 was overexpressed in meningioma IOMM-Lee cell line, CCK8 and flow cytometry were used to investigate the influence of miR-195 on the biological function of meningioma cells. **Results** MiR-195 was expressed in meningioma, and its expression level was negatively correlated with tumor grade. Overexpression of miR-195 in meningioma cells significantly inhibited the viability of tumor cells and helped to achieve cell cycle arrest in G1 phase. The results of luciferase reporter gene assay showed that miR-195 directly inhibited the transcriptional level of c-myb expression, and overexpression of miR-195 in meningioma cells significantly inhibited the mRNA and protein expression of c-myb. **Conclusions** MiR-195 is abnormally expressed in meningioma, which is correlated with clinical tumor classification. MiR-195 inhibits the cell cycle of meningioma cells and the growth of tumor cells by targeted regulation of the expression of c-myb.

Key words: MicroRNA-195; Meningioma; Proliferation; C-myb

microRNAs 是一类非编码小分子 RNA, 通过调节靶基因的表达水平而发挥生物学功能, 参与细胞分化、增殖、凋亡等生理过程。越来越多的 microRNAs 被报道在多种肿瘤组织中表达异常, 且与肿瘤的级别、患者预后密切相关^[1-3], 其功能的研究对肿瘤的诊疗具有重要意义。近期研究表明, miR-195 在多种肿瘤组织中表达降低, 如结直肠癌、乳腺癌、肝癌、

胃癌等^[4-6]。MiR-195 在脑膜瘤中的表达和功能尚未报道, 因此, 我们检测了脑膜瘤患者组织中 miR-195 的表达情况, 并在脑膜瘤细胞株 IOMM-Lee 中研究了 miR-195 的生物学功能及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

本研究使用的胎牛血清购自杭州四季青公司,

基金项目: 泸州市科技计划项目[2016-S-67(6/23)]

收稿日期: 2017-08-29; 修回日期: 2017-11-06

作者简介: 阿库布千(1991-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 颅脑外伤、颅底肿瘤、脑血管病的基础与临床。

通信作者: 夏祥国, Email: xxgsin@sina.com

RPMI1640 培养基和胰蛋白酶购自 Gibco、转染试剂 LipofectaminTM RNAiMAX、RNA 提取 Trizol 试剂购自赛默飞世尔科技, CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学, miR-195、U6 引物、SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 检测试剂盒购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司, 原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 地高辛标记的 anti-miR-195 探针购自 EXIQON 公司, 双荧光素酶报告系统检测试剂盒购自 progeima 公司。

1.2 临床标本

收集 2010 年 11 月至 2014 年 5 月我院神经外科手术治疗脑膜瘤患者标本 54 例, 其中, 高于 54 岁的患者 28 例, 低于 54 岁的患者 26 例; 16 例男性和 38 例女性; 良性脑膜瘤 (I 期) 37 名, 非典型性脑膜瘤 (II 期) 12 名, 恶性脑膜瘤 (III 期) 7 名, 患者或家属均知情同意。

1.3 细胞培养和转染

人脑膜瘤细胞株 IOMM-Lee 购自 ATCC, 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 37℃、5% CO₂ 恒温箱中培养。MiR-195 mimic 转染 IOMM-Lee 细胞采用 LipofectaminTM, 对照为 mimic NC (negative control)。

1.3 细胞周期

收集细胞后采用预冷的 PBS 洗细胞两次, 加入预冷的 70% 乙醇重悬细胞, 于 4℃ 固定过夜, 第二天离心收集细胞, 以 1 mL 的 PBS 洗细胞一次, 再加入 500 μL 50 μg/mL 溴化乙锭 (含 100 μg/mL RNase A, 2% Triton X-100), 混匀后 4℃ 避光孵育 30 分钟。采用 BD 流式细胞仪检测, 计数 2~3 万个细胞, 结果用 ModFit 软件分析。

1.4 原位杂交

组织石蜡切片常规脱蜡后按博士德敏感性加强型原位杂交检测试剂盒 I (过氧化物酶) 试剂盒进行切片处理, 采用地高辛标记的 microRNA-195 探针进行原位杂交, 37℃ 杂交过夜, 采用 DAB 显色后由两人分别判读染色强度。

1.5 细胞活力检测

人脑膜瘤细胞株 IOMM-Lee 接种于 96 孔板, 每孔 1×10^4 个细胞, 分别转染阴性对照 mimic 和 miR-195 mimic 以后 24 h、48 h 和 72 h 检测细胞活力, 避光加入 CCK-8 工作液, 每孔 10 μL, 尽量避免产生气泡, 在 37℃ 孵育 1 h 后用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A450 值), 每组设 5 个重复孔, 另设对照孔调零。

1.6 双荧光素酶报告基因

将 c-myb 3' UTR 克隆至 PGL3 萤火虫荧光素酶载体, 酶切位点为 XbaI 和 FseI, 与海参荧光素酶质粒 pRL-SV40、miR-195 mimic 或 mimic control 转染至 IOMM-Lee 细胞后 48 小时, 采用 promega 试剂盒分别检测萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性, PGL3-c-myb 3' UTR 与 pRL-SV40 转染比例为 10 比 1, 以 pRL-SV40 荧光素酶活性为内参计算 c-myb 转录活性。

1.7 Realtime PCR

常规 Trizol 法提取 IOMM-Lee 细胞总 RNA, 每个样品 1×10^6 个细胞, 设三个复孔, 1 mL Trizol 裂解细胞后加入 200 μL 氯仿, 剧烈震荡 15 s, 静置 2 min 后 4℃ 低温 1200 g 离心 15 min, 吸取上清与等体积异丙醇混合, 静置 30 min 后 4℃ 低温 1200 g 离心 15 min, 弃上清, 70% 乙醇洗涤两次后烘干, 每个样品溶于 20 μL DEPC 水中。检测 c-myb 的 mRNA 水平时, 使用 Tarara 公司逆转录试剂盒去除基因组 DNA 并进行逆转录, c-myb realtime PCR 上游引物: GAAAGCGTCACCTTGGGAAA, 下游引物: TGTTCGATTCGGGAGATAATTGG β -actin 上游引物: GTCTGCCTTGCTAGTGGATAATG, 下游引物: TCGAGGACGCCCTATCATGG。c-myb 的 mRNA 水平采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 法进行计算, 以 β -actin 表达量作为内参。

1.8 统计学分析

本研究计量资料以均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS 软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-195 在脑膜瘤中的表达

miR-195 在脑膜瘤中表达 (见图 1), 54 例患者中有 20 例低表达或不表达, 与患者的性别和年龄不存在相关性, 与患者的肿瘤分级呈负相关 (见表 1), 肿瘤级别越高, miR-195 表达越低 ($P = 0.011$)。

2.2 micorRNA-195 对脑膜瘤细胞活力的影响

CCK8 结果显示, 在人脑膜瘤细胞 IOMM-Lee 中转染 miR-195 mimic 24 h、48 h 和 72 h 后细胞活力显著低于对照组 (见图 2), 该结果提示 micorRNA-195 能够抑制脑膜瘤细胞的生长。

2.3 过表达 micorRNA-195 引起脑膜瘤细胞细胞周期阻滞

进一步我们采用 PI 染色后分析 miR-195 对脑膜瘤细胞细胞周期的影响。结果显示, 与对照组相

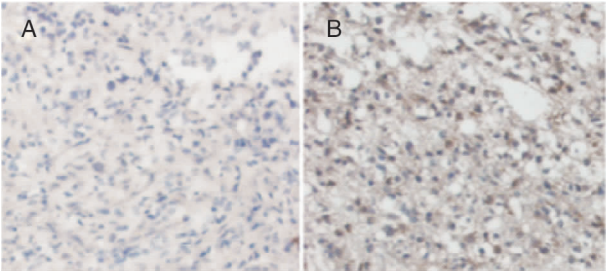


图 1 miR-195 在脑膜瘤中的表达 (×200)
(A) 低表达代表性图片;(B) 高表达代表性图片

表 1 miR-195 表达高低与临床资料的相关性分析

	Total	miR-195 expression		P
		High	Low	
Age				P=0.560
≥54	28	19	9	
<54	26	15	11	
Gender				P=0.517
Male	16	9	7	
Female	38	25	13	
WHO Grade				P=0.011
I	37	27	10	
II	12	6	6	
III	5	1	4	

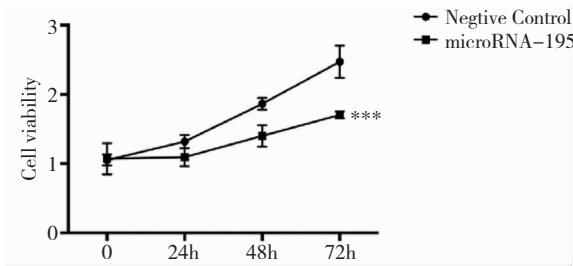


图 2 micorRNA-195 对脑膜瘤细胞活力的影响

比,miR-195 过表达的细胞 G1 期比例明显升高,S 期比例显著降低,而 G2 期细胞比例无显著差异(见图 3),表明 miR-195 可引起脑膜瘤细胞 G1 期阻滞。

2.4 过表达 microRNA-195 降低脑膜瘤细胞中 c-myb 的表达

microRNAs 主要通过调节靶基因的表达发挥生物学功能,因此,我们通过 microrna.org 靶基因预测发现 c-myb 可能是 miR-195 的靶基因(图 4A),我们通过荧光素梅报告基因实验验证,结果显示,miR-195 确实可以显著降低 c-myb 的转录活性(图 4B),并抑制 c-myb 的表达水平(图 4C)。

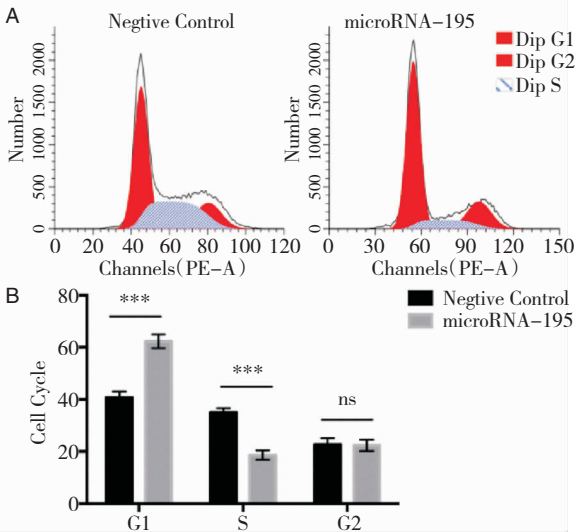


图 3 micorRNA-195 对脑膜瘤细胞细胞周期的影响
(A) PI 染色细胞周期分析;(B) 两组细胞 G1、S、G2 期比例统计

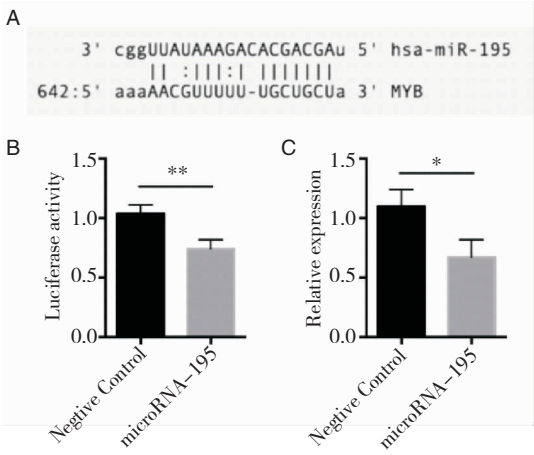


图 4 miR-195 直接靶向调节 c-myb 的表达
(A) miR-195 与 c-myb 3' UTR 序列比对;(B) 双荧光素酶报告系统显示 miR-195 降低 c-myb 转录活性;(C) 在脑膜瘤细胞中过表达 miR-195 降低 c-myb 的表达

3 讨论

随着近年来分子生物学的发展,研究发现^[7]多个 microRNA 在脑膜瘤中异常表达,并影响肿瘤细胞的生长和迁移。Kliese 等^[8]报道 miR-145 在脑膜瘤中的抗迁移和抗增殖功能,与良性脑膜瘤相比,miR-145 的表达在非典型和间变性肿瘤中降低,过表达 miR-145 的 IOMM-Lee 脑膜瘤细胞增值能力、侵袭能力均显著下降。

miR-195 位于染色体 17p13.1,是 miR15/16/195/497 家族中的重要成员,该家族 microRNAs 的

表达与肿瘤的发生发展关系密切。我们的研究结果显示 miR-195 在脑膜瘤中呈低表达状态,且其表达水平与 WHO 分级呈负相关,miR-195 在高级别脑膜瘤中的表达水平显著低于良性脑膜瘤。这种低表达可能与基因的杂合性缺失及表观遗传学修饰有关。有研究显示^[9],染色体的 17p13.1 位于在多种癌症中基因缺失和突变的高发区,而且 miR-195 启动子区域存在甲基化位点 CpG 岛,所以启动子区甲基化可能是 miR-195 表达下调的另一原因。因此认为基因突变和启动子甲基化一起参与 miR-195 在脑膜瘤中的下调,而基因突变和启动子甲基化与肿瘤的恶性程度有关^[9]。为了明确 miR-195 在脑膜瘤肿瘤细胞中的生物学功能,我们将 miR-195 转染至 IOMM-Lee 细胞中,结果显示,与对照组相比,高表达 miR-195 的脑膜瘤细胞活力显著降低 ($P < 0.05$),细胞周期 G1 期细胞比例显著增加 ($P < 0.05$),该结果提示,miR-195 可引起脑膜瘤细胞周期 G1/S 期阻滞。我们的研究结果与其他学者^[10,11]在肝癌细胞、宫颈癌细胞、脑胶质瘤细胞中的结果具有一致性。我们通过 microrna.org 靶基因预测 c-myc 可能是 miR-195 的靶基因,并采用荧光素酶报告系统进行了靶点验证。我们 realtime PCR 结果也显示,miR-195 能够在脑膜瘤细胞中靶向抑制 c-myc 的表达。c-myc 是一种在癌细胞中高表达的原癌基因,在细胞增殖、分化和恶性肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[12]。miR-195 对 c-myc 的调控作用在肺癌细胞中也曾被报道^[13],表明 miR-195 在不同肿瘤细胞中可能通过类似的作用机制发挥抑癌功能。

综上所述,本研究首次发现 miR-195 在脑膜瘤中异常表达,且其表达量与肿瘤 WHO 分级相关,能够通过靶向调节癌基因 c-myc 的表达,从而引起脑膜瘤细胞周期 G1/S 期阻滞,抑制肿瘤细胞的生长。

参 考 文 献

- [1] Bagnoli M, Canevari S, Califano D, et al. Development and validation of a microRNA-based signature (MiROvaR) to predict early relapse or progression of epithelial ovarian cancer: a cohort study [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17 (8): 1137-1146.
- [2] Liu R, Gu J, Jiang P, et al. DNMT1-microRNA126 epi-

- genetic circuit contributes to esophageal squamous cell carcinoma growth via ADAM9-EGFR-AKT signaling [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21 (4): 854-863.
- [3] Frampton AE, Castellano L, Colombo T, et al. Integrated molecular analysis to investigate the role of microRNAs in pancreatic tumour growth and progression [J]. *Lancet*, 2015, 385 Suppl 1: S37.
- [4] Zhang X, Xu J, Jiang T, et al. MicroRNA-195 suppresses colorectal cancer cells proliferation via targeting FGF2 and regulating Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6 (11): 2631-2640.
- [5] Yang B, Tan Z, Song Y. Study on the molecular regulatory mechanism of MicroRNA-195 in the invasion and metastasis of colorectal carcinoma [J]. *Int J Clinical Exp Med*, 2015, 8 (3): 3793-3800.
- [6] Luo Q, Wei C, Li X, et al. MicroRNA-195-5p is a potential diagnostic and therapeutic target for breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31 (3): 1096-1102.
- [7] Kishida Y, Natsume A, Kondo Y, et al. Epigenetic subclassification of meningiomas based on genome-wide DNA methylation analyses [J]. *Carcinogenesis* 2012, 33 (2): 436-441.
- [8] Kliese N, Gobrecht P, Pachow D, et al. miRNA-145 is downregulated in atypical and anaplastic meningiomas and negatively regulates motility and proliferation of meningioma cells [J]. *Oncogene*, 2013, 32 (39): 4712-4720.
- [9] Li D, Zhao Y, Liu C, et al. Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and role in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17 (7): 1722-1730.
- [10] Xu T, Zhu Y, Xiong Y, et al. MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2009, 50 (1): 113-121.
- [11] Wang N, Wei H, Yin D, et al. MicroRNA-195 inhibits proliferation of cervical cancer cells by targeting cyclin D1a [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37 (4): 4711-4720.
- [12] Frau M, Ladu S, Calvisi DF, et al. Pascale. Mybl2 expression is under genetic control and contributes to determine a hepatocellular carcinoma susceptible phenotype [J]. *J Hepatol*, 2011, 55 (1): 111-119.
- [13] Yongchun Z, Linwei T, Xicai W, et al. MicroRNA-195 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting MYB [J]. *Cancer lett*, 2014, 347 (1): 65-74.