

# 微小核糖核酸 592 对神经胶质瘤细胞株 U251 细胞凋亡影响的机制

吉文玉 蔡宁 杨思培

**【摘要】 目的** 探讨微小核糖核酸 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,检测 U251 细胞的凋亡率。**结果** 对 28 份神经胶质瘤组织和正常组织的定量 PCR 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;流式细胞分析显示,miR-592 显著促进 U251 细胞凋亡;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发现 miR-592 直接靶向 Runx2 的 3'-UTR 来抑制 Runx2 蛋白的表达水平。**结论** miR-592 通过直接靶向 Runx2 来诱导神经胶质瘤细胞凋亡,进而抑制细胞生长。

**【关键词】** 神经胶质瘤 U251 miR-592 凋亡 Runx2

**【中图分类号】** R739.41 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)04-0319-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.04.010

**The miR-592 suppresses U251 cell apoptosis by targeting Runx2** Ji Wenyu, Cai Ning, Yang Sipei.  
Department of First Pediatric Surgery, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,  
Wulumuqi 830054

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of miR-592 on U251 cell apoptosis in the Glioma. **Methods** The expression of miR-592 was analyzed by quantitative PCR in Glioma tissues from patients. Next, U251 cells were transfected with miR-592 mimics and then the growth of cells was detected by MTT assay. To extensively explore the direct target of miR-592 in glioma, dual-luciferase reporter assay and western blot assay were performed to confirm that Runx2 is the direct target of miR-592 in U251 cells. In order to test whether Runx2 was the functional target of miR-592, the cell growth curve was determined by down-regulating the level of Runx2. Moreover, the apoptosis of U251 was also detected after Runx2 knocking down. **Results** The expression of miR-592 was significantly reduced in glioma tissues. Over-expression miR-592 remarkably increased the apoptotic rate of U251 cells. Dual-luciferase reporter assay indicated that Runx2 was the direct target of miR-592 in U251 cells. Suppressed expression of Runx2 by siRNA prominently suppressed U251 cell growth and induced the cell apoptotic rate. **Conclusion** miR-592 suppressed the growth and promoted the apoptotic rate of U251 cells by targeting Runx2.

**【Key words】** Glioma MicroRNA miR-592 U251 Apoptotic rate

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,本研究应用 miR-592 mimics 上调 miR-592 在胶质瘤细胞中 U251 中的表达水平,探讨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 材料与方法

### 1.1 实验材料

胶质瘤细胞 U251 细胞为苏州医科大学附属第二医院中心实验室自有, 28 份神经胶质瘤和癌旁组织为苏州医科大学附属第二医院自 2012 年 4 月~2015 年 7 月所收集神经胶质瘤样本, 均经病理检查证实, 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、二甲基亚砷(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 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 °C、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 d 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 序列为 Runx2 siRNA: 5'-GCACGCUAUUAAAUCCAAATT-3'; 12 h 后进行第 1 次检测, 每孔加入 5 g/L 的噻唑蓝液 20  $\mu$ l, 继续培养到 4 h 后去掉培养基, 加入 DMSO 150  $\mu$ l, 用酶标仪在 490 nm 检测吸光值; 分别于转染后 12、24、36 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<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 为 1.8~2.0; 将 RNA 样本稀释成 2 ng/ $\mu$ l, 按照说明书配置成 15  $\mu$ l 的逆转录体系进行逆转; 取其中 2  $\mu$ l 作为模板配置成 20  $\mu$ l 体系进行定量 PCR 验证; 反应条件为 95 °C 10 min 预变性, 95 °C 15 s → 60 °C 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。计算公式为  $\Delta Ct = Ct - Ct_{GAPDH}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(T) - \Delta Ct(N)$ , 相对表达计算公式为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。定量引物均购自 QIAGEN 公司, 序列为 Runx2 上游引物: 5'-GACCAGTCT-TACCCCTCCTACC-3', Runx2 下游引物: 5'-CT-GCCTGGCTCTTCTTACTGAG-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GAGAGACCCCACTTGCTGCCA-3', GAPDH 下游引物: 5'-CTCACACTGCCCTC-CCTGGT-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。采用 FlowJo 软件进行分析。

1.2.5 蛋白免疫印迹实验 加入 200  $\mu$ l RIPA 缓冲液冰上 20 min 裂解细胞; 加入 50  $\mu$ l 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 °C 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  $\mu$ g, miR-592 过表达质粒 0.4  $\mu$ g, pRL-TK 质粒 0.05  $\mu$ g; 转染后 6 h 换完全培养基, 48 h 后去上清, 用 PBS 洗涤而得干净的上清, 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, 每组各 5 只; 分别皮下接种 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 细胞作为对照, 细胞接种量均为  $6.0 \times 10^6$  /只; 于接种后

每隔 5 d 游标卡尺测定肿瘤大小,以  $1/3 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$  计算肿瘤体积,并于接种后第 50 d 处死小鼠,绘制肿瘤生长曲线。

1.2.8 统计学处理

采用 SPSS 统计软件。正态分布的计量资料以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,2 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

定量 PCR 分析显示 miR-592 在神经胶质瘤组织中的相对表达水平明显下降(图 1)。过表达 miR-592 能明显抑制 U251 细胞生长。流式细胞实验对 U251 细胞的凋亡率检测显示 miR-592 能显著上调

细胞凋亡率(图 1,表 1)。

2.2 Runx2 是 miR-592 在 U251 细胞中的直接靶分子 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 显著抑制带有 Runx2 的 3'-UTR 的荧光素酶的活性(图 2)。定量 PCR 分析显示 Runx2 的相对表达在肿瘤组织中明显上调(图 2)。western blot 的方法显示 miR-592 抑制 Runx2 的蛋白水平(图 2)。

表 1 各组 U251 细胞凋亡率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率
对照组	13.71 $\pm$ 0.8	7.2 $\pm$ 0.68
miR-592 组	12.94 $\pm$ 1.66	17.47 $\pm$ 1.45 *

注:与对照组比较, \*  $P < 0.01$

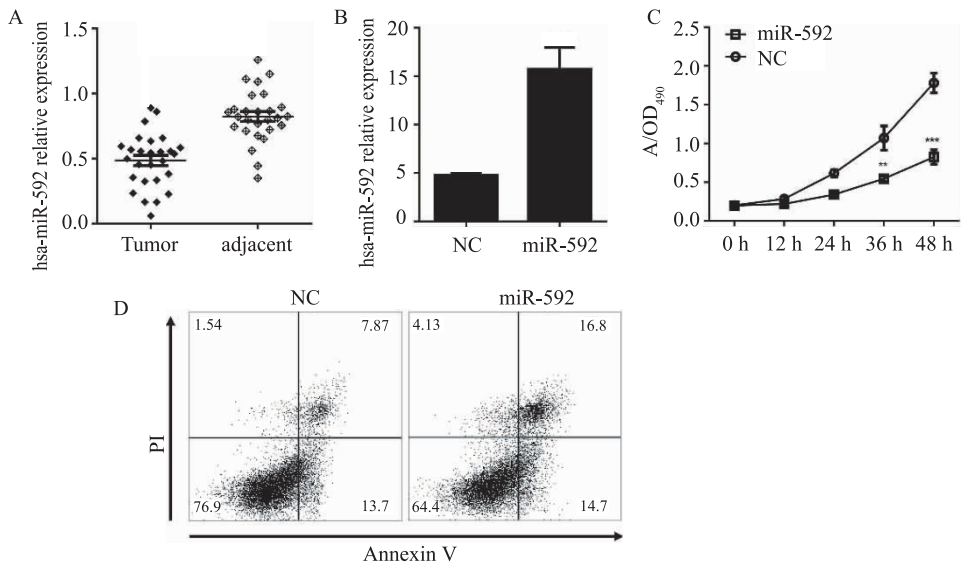


图 1 miR-592 促进 U251 细胞凋亡 A 为 miR-592 在肿瘤和癌旁组织中的表达水平;B 为转染 mimics 后 miR-592 的表达水平;C 为 MTT 检测 U251 细胞生长;D 为流式细胞仪检测 miR-592 过表达后 U251 细胞周期

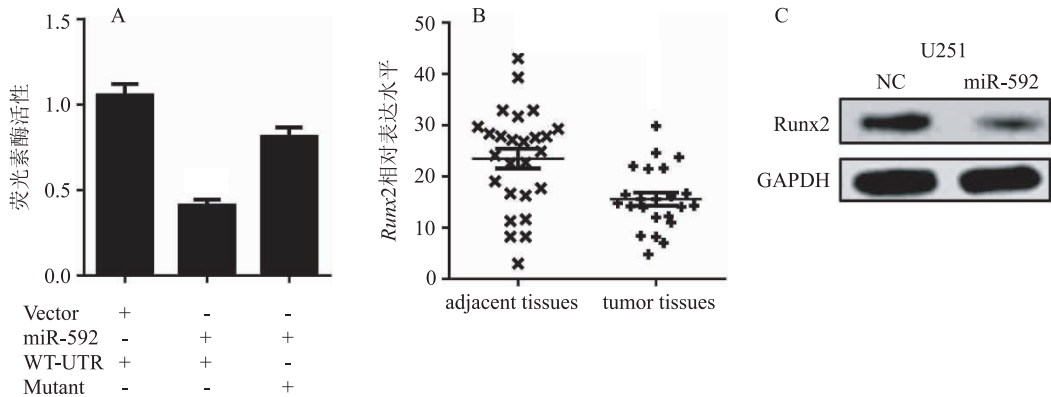


图 2 Runx2 是 miR-592 在 U251 细胞中的直接靶蛋白 A 为荧光素酶双报告实验;B 为定量检测 Runx2 在肿瘤组织和癌旁组织中的表达水平;C 为 Runx2 在转染 miR-592 和 NC 后 U251 细胞中的表达水平

2.3 下调 Runx2 表达水平抑制 U251 细胞生长并促进细胞凋亡 显示转染了 Runx2 siRNA 的细胞生长明显较对照组慢(图 3)。流式细胞技术检测显示,Runx2 下调表达上调 U251 细胞的凋亡率(图 3 和表 2)。

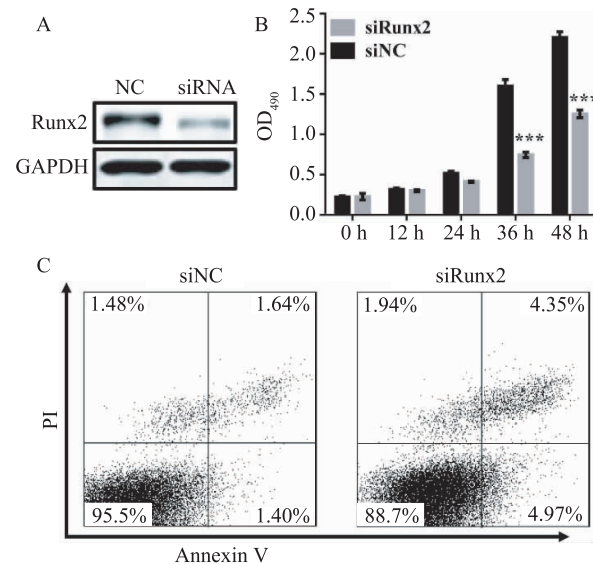


图 3 下调 Runx2 促进 U251 细胞凋亡 A 为 western blot 验证 siRNA 下调效率;B 为 MTT 实验检测 Runx2 下调后细胞生长情况;C 为流式细胞仪分析 Runx2 下调后细胞凋亡率

表 2 转染 siRunx2 的 U251 细胞的凋亡率( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	晚期凋亡率
对照组	1.58 ± 0.25
siRunx2 组	4.57 ± 0.36*

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$

2.4 miR-592 通过靶向 Runx2 调控 U251 的肿瘤的生长 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)。Runx2 的下调表达也明显抑制肿瘤的生长(图 4)。

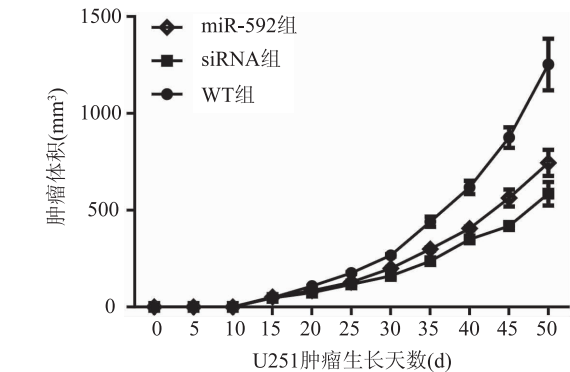


图 4 miR-592 靶向 Runx2 抑制 U251 肿瘤的生长

### 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。microRNA 通过靶向目的分子的 3'-UTR 来调节 mRNA 的水平,从而进一步调节蛋白的表达水平<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>。本研究发现,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 显著抑制细胞生长。流式细胞术检测表明,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]</sup>,而下调 Runx2 的表达又可以抑制肿瘤的生长和发生发展<sup>[17]</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。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 的表达水平明显下调。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,本研究通过 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,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]. Nature reviews Cancer, 2015, 16(1): 2. doi: 10. 1038/nrc.

(上接第 322 页)

- [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, 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): 1001-2346.
- [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 brain-stem 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]. *Biomedical reports*;doi: 10. 3892/br.2014.2(5): 611-619.
- [10] Dadiani M, Bossel BN, Paluch SS, 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, 14(5): 132-135.
- [11] Gong XE, Zhou WJ, Chai YQ, et al. MicroRNA-induced casca-

ded and catalytic self-assembly of DNA nanostructures for enzyme-free and sensitive fluorescence detection of microRNA from tumor cells[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(12): 2501-2504.

- [12] Kuninty PR, Schnittert J, Storm G, et al. MicroRNA targeting to modulate tumor microenvironment[J]. *Frontiers in oncology*, 2016, 6(3);doi:10. 3389/fonc.2016. 00003.
- [13] Zhang LY, 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(2): 32-34.
- [14] Vladimirova V, Waha A, Luckcrath 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]. *Laboratory Investigation*, 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] Wang W, Chen B, Zou RL, et al. Codonolactone, a sesquiterpene lactone isolated from *Chloranthus henryi* Hemsl, inhibits breast cancer cell invasion, migration and metastasis by down-regulating the transcriptional activity of Runx2[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(5): 1891-1900.

(2016-11-13 收稿)