

上调及下调MicroRNA-195对人脑胶质瘤影响的初步研究

李晋虎 苗旺 刘晓东 王宏勤 慕伟 王新星 范益民

【摘要】 目的 观察上调及下调microRNA-195 (miR-195)对裸鼠皮下荷SHG-44人脑胶质瘤生长的影响并探讨其机制。方法 使用脂质体瞬时转染法将miR-195 mimics和inhibitor分别转入人脑胶质瘤细胞系SHG-44,同时设立空白对照组和阴性对照组;实时荧光定量PCR (qRT-PCR)检测转染前后miR-195的含量变化;流式细胞法检测各组细胞周期分布;裸鼠成瘤实验观察miR-195对体内胶质瘤增殖的影响;肿瘤组织HE染色观察病理学改变;Western blot、免疫组织化学染色检测肿瘤组织周期相关蛋白P21、Cyclin D1的表达变化。结果 qRT-PCR测得转染mimics后miR-195的表达水平提高19倍左右,而转染inhibitor后miR-195的表达水平降低为空白对照组的42%;与空白对照和阴性对照组相比,miR-195mimics组细胞阻滞于G0/G1期 ($P<0.05$);而miR-195 inhibitor组则相反 ($P<0.05$);裸鼠成瘤实验显示,miR-195 mimics组与空白对照组和阴性对照组相比,肿瘤生长速度减慢,体积减小 ($P<0.05$),而miR-195 inhibitor组则结果相反 ($P<0.05$);HE染色结果显示miR-195 mimics组肿瘤组织异型性下降,新生血管数减少,而miR-195 inhibitor组则相反;Western blot检测示与空白对照组和阴性对照组比较,miR-195 mimics组P21表达上调,而Cyclin D1表达下调,miR-195 inhibitor组结果相反 (P 均 <0.05);免疫组化染色检测显示,与空白对照组和阴性对照组比较,miR-195 mimics组中P21表达阳性率较高,而Cyclin D1的表达阳性率较低 (P 均 <0.05),miR-195 inhibitor组情况则相反 (P 均 <0.05)。结论 MiR-195可使P21表达升高,下调Cyclin D1的表达,阻滞G0/G1期向S期转换,从而抑制人脑胶质瘤细胞SHG-44的增殖能力。

【关键词】 神经胶质瘤; 细胞周期; MiR-195; P21; Cyclin D1

Effect of microRNA-195 on proliferation of human glioma SHG-44 cells *in vivo* Li Jinhu, Miao Wang, Liu Xiaodong, Wang Hongqin, Mu Wei, Wang Xinxing, Fan Yimin. Department of Neurosurgery, The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Fan Yimin, Email: fanyimin5678@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of up-regulated expression and down-regulated expression of miR-195 on the SHG-44 human glioma xenograft growth, and explore the possible mechanism. **Methods** MiR-195 mimics(Group A) and inhibitor(Group B) were transfected into SHG-44 cell by Lipofectamine RNAiMAX. At the same time, the blank control group(Group C) and negative control group(Group D) were established. MiR-195 expression level was observed by Real-time PCR. Flow cytometry was used to monitor changes in cell cycle. Study the effects of miR-195 on glioma proliferation *in vivo* by xenograft experiment. Pathological changes of the glioma tissues were observed by HE staining. Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression changes of P21 and Cyclin D1 in removed tumor specimens. **Results** After transfection of miR-195 mimics, Real-time PCR showed that miR-195 expression level increased about 19 times. However, miR-195 expression level of inhibitor group were decreased to 42.3% of blank control group. Compared with Group C and Group D, cells of Group A were blocked in the G0/G1 phase ($P<0.05$). Group B, however, the result was opposite

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.09.017

基金项目:山西省基础研究计划(青年科技研究基金)项目(2012021035-4);山西省科技攻关项目(20080311059-1)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第一医院神经外科

通讯作者:范益民, Email: fanyimin5678@126.com

($P < 0.05$). Xenograft experiment showed that the volume in Group A was significantly smaller than of those in Group C and Group D ($P < 0.05$) and the result of Group B was to the contrary ($P < 0.05$). HE staining indicated that decreased heteromorphism and reduced number of new vessels in Group A were noted as compared with those in Group C and Group D and the result of Group B was opposite. Western blot showed that the expression levels of P21 in Group A was significantly up-regulated as compared with that in Group C and Group D, while the expression of Cyclin D1 was down-regulated. Group B, however, the situation was opposite. Immunohistochemistry revealed that expression of P21 in Group A was overexpression, while the expression levels of Cyclin D1 was down-regulated ($P < 0.05$). However, the result of Group B was opposite ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-195 can efficiently block in G0/G1 phase to S phase transition and inhibit the growth of human glioma cell SHG-44 *in vivo*, probably through up-regulate P21 expression of and down-regulate Cyclin D1 expression.

【Key words】 Glioma; Cell cycle; MiR-195; P21; Cyclin D1

人脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,其生长迅速,致死、致残率极高^[1-2]。近年来,越来越多的研究证实 microRNA (miRNA, miR) 与细胞增殖、分化凋亡、新生血管生成密切相关^[3],其在恶性肿瘤的发生发展过程中发挥着类似原癌基因或抑癌基因的作用。我们前期的实验已经证实,过表达 miR-195 可以在体外实验中抑制胶质瘤细胞的增殖,促进其凋亡和坏死^[4-5],但是其在体内的实验情况仍不明确。本实验选择 miR-195 为研究对象,将其模拟物及抑制剂转染至胶质瘤细胞系 SHG-44 中,通过裸鼠皮下成瘤实验观察 miR-195 对胶质瘤模型生长的影响,并探究其可能的机制。

材料与方 法

1. 材料:人脑胶质瘤细胞系 SHG-44 购自中国科学院上海细胞库, BALB/C 健康裸鼠(雌性, 4~6 周, 18~20 g), 购自湖南斯莱克景达实验动物公司, RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自武汉博士德(Boster) 生物工程有限公司, miR-195 模拟物(miRBase Accession: MIMAT-0000461)、miR-195 抑制剂、miRNA 模拟物 Negative Control 购自广州锐博生物科技有限公司, LipofectaminTM RNAiMAX 购自美国 Invitrogen 公司。SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 检测试剂盒和 RNAiso Plus 提取试剂及 miR-195 引物、U6 内参购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。P21、Cyclin D1 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。Scanscope 病理切片扫描器购自美国 Aperio 公司。

2. 细胞培养、转染及实验分组: SHG-44 细胞以含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml

链霉素的 RPMI-1640 培养液于 37 °C、5% CO₂ 温箱培养, 每日观察生长情况, 2~3 d 细胞传代一次。转染方法按照 LipofectaminTM 2000 试剂说明书进行。实验分组: (1) miR-195 mimics 组 (SHG-44 转染 miR-195 mimics); (2) 空白对照组 (加等量 PBS); (3) 阴性对照组 (转染无义序列); (4) miR-195 inhibitor 组 (转染 miR-195 inhibitor)。hsa-miR-195-5p 序列: 5'-UAGCAGCACAGAAAU AUUGGC-3'; miRNA 模拟物 Negative Control 序列: 5'-UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA-3'。

3. qRT-PCR 检测转染前后 miR-195 的表达: 收集转染后 48 h 各组细胞, 分别用 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA, 获得的 RNA 作为模板用于 RT-PCR 检测, 然后按照 SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 检测试剂盒进行反转录和 RT-PCR 过程, 分别用 miR-195 和 U6 引物于荧光定量 PCR 仪进行扩增。反转录反应液包括总 RNA 和 miRNA Primer Script RT Enzyme Mix 等共 20 μ l, 反应条件为 37 °C 60 min, 85 °C 5 s。荧光定量 PCR 反应总体积为 20 μ l, 反应条件为预变性 95 °C 30 s, 变性 95 °C 5 s, 退火 55 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 反应为 35~42 个循环, 溶解曲线温度范围为: 50~95 °C。采用 U6 为内参, 结果判定: $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{U6 内参}}$, $\Delta \Delta Ct = Ct_{\text{转染组}} - Ct_{\text{对照组}}$, 以 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 值表示结果, 重复 3 次。

4. 流式细胞仪检测细胞周期: 收集转染后 48 h 各组细胞分别消化吹打形成的单细胞悬液, PBS 冲洗 1 次, 预冷的 70% 乙醇固定细胞, 4 °C 过夜后 PBS 冲洗 1 次并用 400 目滤网过滤细胞悬液, 每管加入 200 μ l RNaseA 孵育 30 min, PI 避光染色 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

5. 裸鼠成瘤实验及标本采集: 将 24 只裸鼠饲

养于恒温、恒湿的 SPF 环境下(山西医科大学动物中心), 将其随机分为 4 组, 每组 6 只, 4 组分别为 SHG-44 miR-195 mimics 组、空白对照组、阴性对照组和 inhibitor 组, 分别在裸鼠两侧鼠蹊部皮下注射 5×10^6 /ml 浓度的各组细胞单细胞悬液 200 μ l, 每 3 d 注射 1 次, 共 5 次。观察肿瘤生长情况, 待肉眼可观察到肿瘤形成后每 3 d 用游标卡尺测量瘤体的长径(L)和宽径(W), 按照公式 $V = (LW^2)/2$ 计算肿瘤的体积, 绘制肿瘤生长曲线。肿瘤接种后第 33 天处死裸鼠, 剥取肿瘤。

6. Western blot 检测肿瘤组织 P21、Cyclin D1 蛋白: 分别提取各组瘤体的总蛋白, Bradford 法蛋白定量。95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, SDS/PAGE 分离蛋白, 冰浴下 80 V 转膜 1 h, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗(P21、Cyclin D1) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗(加辣根过氧化物酶标记)室温孵育 2 h。ECL 化学发光试剂盒显影, 暗室压片后扫描, 使用 Quantity One 软件分析各条带灰度值, 蛋白表达水平以目标蛋白的灰度值与内参 β -actin 灰度值的比值表示。

7. 组织标本 HE 染色及免疫组织化学检测: 所有肿瘤组织均经常规甲醛固定, 石蜡包埋, 切片(3~4 μ m), 经脱蜡, 水化, 热抗原修复。3% H_2O_2 室温孵育 10 min, BSA 室温封闭 20 min, 滴加一抗(P21、Cyclin D1) 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗涤后滴加辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 20 min, 二氨基联苯胺显色 15 s 至 1 min, 苏木素轻度复染, 封片。Scanscope 病理切片扫描器扫描并分析。以胞核染成黄褐色为阳性。高倍镜下计数 1 000 个细胞中所含阳性细胞数。阳性细胞表达率 = (阳性细胞数/总细胞数) \times 100%。

8. 统计学分析: 相关实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据, 采用单因素方差分析进行组间数据比较, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 实时荧光定量 PCR 结果: 转染后 48 h, 与空白对照组相比, miR-195 mimics 组、阴性对照组和 miR-195 inhibitor 组 miR-195 相对表达量分别为 19.34 ± 0.27 、 0.97 ± 0.14 和 0.42 ± 0.31 , 与空白对照和阴性对照组相比, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

2. 流式细胞仪检测细胞周期: miR-195 mimics 组与空白对照组和阴性对照组相比, G0/G1 期阻滞明显, S 期细胞所占比例则明显降低 ($P < 0.05$)。而 miR-195 inhibitor 组则结果相反, G0/G1 期细胞所占比例下降, 而 S 期细胞比例增加 ($P < 0.05$) (图 1)。

3. 裸鼠成瘤实验: 接种 SHG-44 各组细胞后约 1 周, 接种部位出现小结节, 成瘤率达 100%, 每 3 d 观察肿瘤生长情况, 绘制肿瘤生长曲线。miR-195 mimics 组肿瘤生长明显慢于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$), 瘤体体积明显小于空白对照组和阴性对照组; 而 miR-195 inhibitor 组则相反, 肿瘤生长速度快, 瘤体体积明显大于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$) (图 2)。

4. Western blot 检测各组肿瘤组织 P21 和 Cyclin D1 蛋白: miR-195 mimics 组、空白对照组、阴性对照组和 miR-195 inhibitor 组瘤体中的 P21/ β -actin 比值分别为 0.53 ± 0.11 、 0.29 ± 0.09 、 0.26 ± 0.08 、 0.17 ± 0.04 , Cyclin D1/ β -actin 比值分别为 0.43 ± 0.12 、 0.89 ± 0.11 、 0.84 ± 0.09 、 1.21 ± 0.21 , 比较后发现与空白对照组和阴性对照组比较, miR-195 mimics 组 P21 表达上调, 而 Cyclin D1 表达下调, miR-195 inhibitor 组结果相反 (P 均 < 0.05 , 图 3)。

5. HE 染色及免疫组化检测各组瘤体中 P21 和 Cyclin D1 的表达: HE 染色结果显示, 与空白对照组和阴性对照组相比, miR-195 mimics 组肿瘤细胞密度较低, 新生血管少, 核分裂象明显减少; 而 miR-195 inhibitor 组则可见细胞密度增高, 新生血管较多, 核分裂象增多 (图 4)。免疫组化检测结果显示 mimics 组、空白对照组、阴性对照组和 inhibitor 组中 P21 表达阳性率分别为: $39.20\% \pm 2.18\%$ vs. $16.70\% \pm 0.12\%$ vs. $16.90\% \pm 0.14\%$ vs. $9.10\% \pm 1.63\%$; Cyclin D1 的表达阳性率分别为: $7.80\% \pm 1.88\%$ vs. $18.70\% \pm 0.26\%$ vs. $17.90\% \pm 0.21\%$ vs. $33.10\% \pm 2.03\%$ 。与空白对照组和阴性对照组相比, miR-195 mimics 组的 P21 阳性率较高, 而 Cyclin D1 阳性率显著降低 (P 均 < 0.05); 而 miR-195 inhibitor 组结果则刚好相反, P21 阳性率较低, Cyclin D1 阳性率升高 (P 均 < 0.05) (图 5, 6)。

讨 论

miR-195 是 miR-15/16/195 家族中的重要成员^[6]。Zhang 等^[7]对比正常脑组织和多种胶质母细胞瘤细

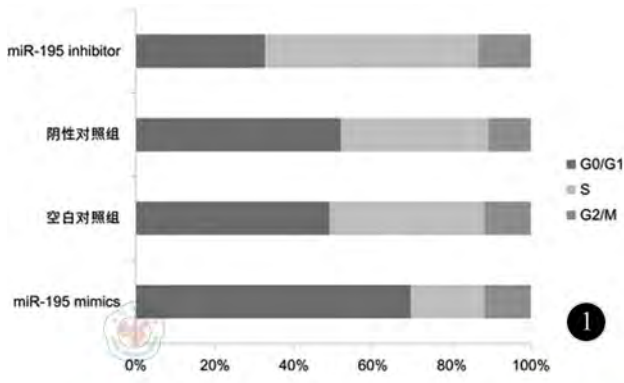


图1 各组细胞周期分布

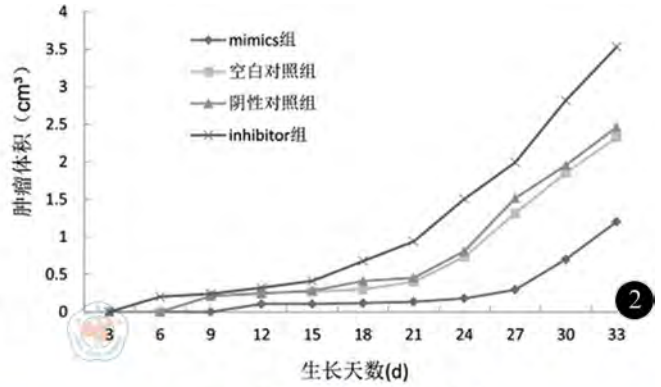


图2 各组裸鼠肿瘤生长曲线

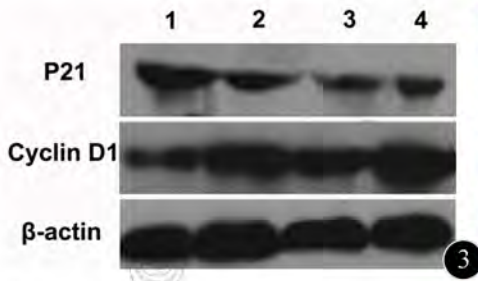


图3 各组裸鼠组织中Cyclin D1、P21的蛋白表达情况。1、2、3、4分别代表miR-195 mimics组、空白对照组、阴性对照组和miR-195 inhibitor组 图4 各组裸鼠肿瘤组织HE染色结果(×100)。4A、4B、4C、4D分别代表miR-195 mimics组、空白对照组、阴性对照组和miR-195 inhibitor组

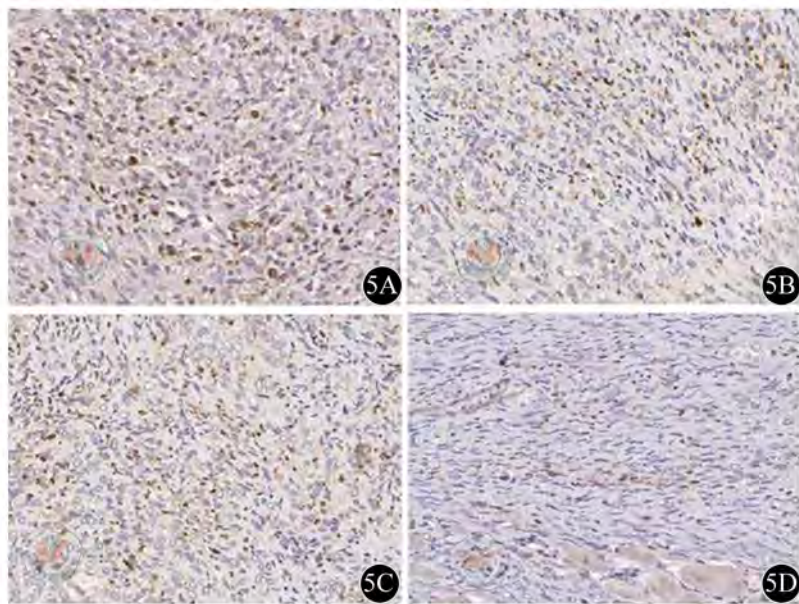
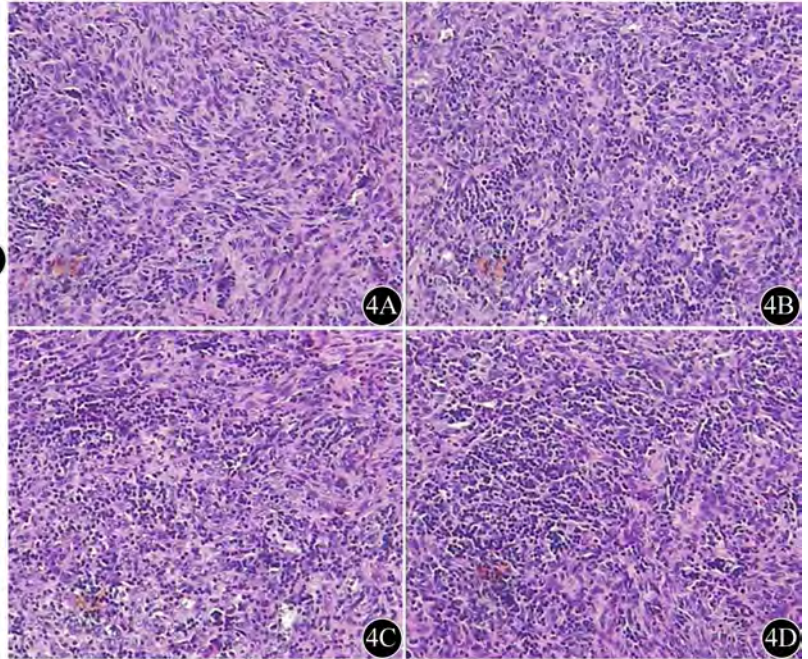


图5 各组裸鼠肿瘤组织中P21免疫组织化学染色(×200)。5A、5B、5C、5D分别代表miR-195 mimics组、空白对照组、阴性对照组和miR-195 inhibitor组

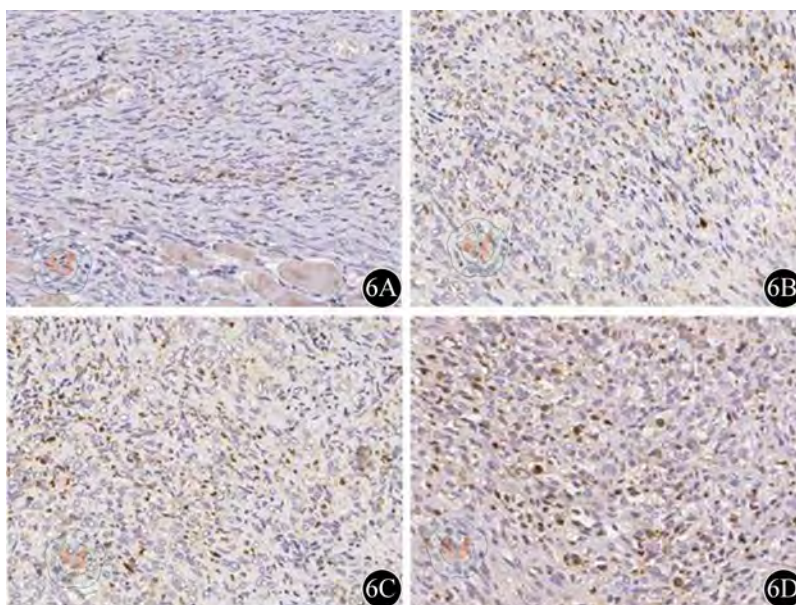


图6 各组裸鼠肿瘤组织中Cyclin D1免疫组织化学染色(×200)。6A、6B、6C、6D分别代表miR-195 mimics组、空白对照组、阴性对照组和miR-195 inhibitor组

胞系后发现 miR-195 表达显著下调,此外在包括肝癌、胃癌、乳腺癌和膀胱癌等多种恶性肿瘤中 miR-195 均广泛下调^[8-11]。目前 miR-195 的生物学功能还未完全明确,但有研究证实 miR-195 对肿瘤细胞的负性调控与其对细胞周期的抑制有关。Xu 等^[8]在 miR-195 与肝癌的相关研究中发现,过表达 miR-195 可直接调控多个 G1/S 期转换相关的基因,从而抑制细胞周期 G1/S 期的转换; Sekiya 等^[12]研究证实 miR-195 可以通过下调 Cyclin E1 同时上调 P21 的表达来抑制肝脏星状细胞的增殖;Wang 等^[13]研究发现过表达 miR-195 可通过直接作用于 Cyclin D1 和 Cyclin E1 3' UTR 来阻滞细胞周期中 G1/S 期的转换从而抑制胶质瘤细胞的生长。

本实验中,我们利用脂质体将 miR-195 mimics 和 inhibitor 瞬时转染入胶质瘤细胞系 SHG-44 中,细胞周期检测结果显示 miR-195 的过表达可明显减少 S 期细胞并使细胞大量阻滞在 G0/G1 期,而 miR-195 inhibitor 组的结果则恰恰相反,这表明在体外实验中 miR-195 可以调控细胞周期来影响胶质瘤细胞的增殖。为了进一步研究 miR-195 抑制胶质瘤细胞的作用,我们将各组细胞接种于裸鼠皮下观察其成瘤情况,结果显示与空白对照组及阴性对照组相比,miR-195 mimics 组的裸鼠成瘤能力减弱,肿瘤体积明显下降,而 miR-195 inhibitor 组结果相反。病理切片 HE 染色显示 miR-195 mimics 组肿瘤

细胞密度、新生血管数以及核分裂象减少,而 miR-195 inhibitor 组则可见细胞密度增高,新生血管较多,核分裂象增多。综合分析我们前期的研究和本次实验,miR-195 在体外和体内均可明显抑制胶质瘤细胞的增殖。

细胞增殖抑制和细胞周期的变化受多个基因调节,而 P21 和 Cyclin D1 是目前研究较多的与肿瘤发生发展密切相关的细胞周期调控基因。为此,我们采用 Western blot 检测各组肿瘤组织中 P21 和 Cyclin D1 蛋白的表达水平,结果显示 miR-195 mimics 组中 P21 蛋白的表达水平均显著高于空白对照组和阴性对照组,而 Cyclin D1 的表达水平低于其他两组;而 miR-195 inhibitor 组的结果相反,P21 表达减少而 Cyclin D1 表达明显上调。免疫组化染色结果与上述结果类似,与空白对照组和阴性对照组相比,miR-195 mimics 组中 P21 阳性率明显升高,Cyclin D1 的阳性率显著降低;而 miR-195 inhibitor 组 P21 阳性率降低,Cyclin D1 阳性率升高。

综上所述,我们通过上调及下调 miR-195 两个方面去探索其对胶质瘤增殖的影响,结果提示 miR-195 可能通过直接或间接上调 P21 表达,下调 Cyclin D1 表达,进而阻滞细胞周期进程来抑制胶质瘤细胞的增殖。因此,miR-195 有望成为治疗人脑胶质瘤新的分子靶点,为胶质瘤的治疗提供新的角度。但是,其确切的作用机制仍需要更加深入的研究。

参 考 文 献

[1] 苗旺, 刘晓东, 范益民, 等. 人脑胶质瘤中 RhoA 的表达及其临床意义[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5(9): 2549-2553.

[2] Kreisl T, Zhang W, Odia Y, et al. A phase II trial of single-agent bevacizumab in patients with recurrent anaplastic glioma[J]. Neuro Oncol, 2011, 13(10): 1143-1150.

[3] Silber J, James CD, Hodgson JG. microRNAs in Gliomas: Small Regulators of a Big Problem[J]. Neuromolecular Med, 2009, 11(3): 208-222.

[4] 王宏勤, 王新星, 苗旺, 等. MiR-195 对胶质细胞瘤 U251 增殖和凋亡的影响[J]. 中华神经外科杂志, 2013, 29(5): 473-477.

[5] 慕伟, 苗旺, 刘晓东, 等. MiR-195 对人脑胶质瘤细胞 U251 和 SHG-44 增殖的抑制作用[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(12): 5374-5377.

[6] He JF, Luo YM, Wan XH, et al. Biogenesis of MiRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2011, 25: 404-408.

[7] Zhang QQ, Xu H, Huang MB, et al. MicroRNA-195 plays a tumor-suppressor role in human glioblastoma cells by targeting signaling pathways involved in cellular proliferation and invasion[J]. Neuro Oncol, 2012, 14: 278-287.

[8] Xu T, Zhu Y, Xiong YJ, et al. MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells[J]. Hepatology, 2009, 50: 113-121.

[9] Guo JM, Miao Y, Xiao BX, et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues[J]. J Gastroen Hepatol, 2009, 24: 652-657.

[10] 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.

[11] Ichimi T, Enokida H, Okumo Y, et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer[J]. Int J Cancer, 2009, 125(2): 345-352.

[12] Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, et al. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon-β-induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation[J]. J Cell Physiol, 2011, 226: 2535-2542.

[13] Wang H, Lu YT, Luo L, et al. MicroRNA-195 Inhibits the Proliferation of Human Glioma Cells by Directly Targeting Cyclin D1 and Cyclin E1[J]. PloS One, 2013, 8(1): e54932.

(收稿日期: 2014-03-31)
(本文编辑: 戚红丹)

李晋虎, 苗旺, 刘晓东, 等. 上调及下调 MicroRNA-195 对人脑胶质瘤影响的初步研究 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (9): 1663-1668.

