

- [11] 郭海瑞,徐桂芬,张华. 二甲双胍诱导自噬的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2017,25(3):490-493.
- [12] 胡俊锋,张先娇,王沛侠,等. 二甲双胍抗肿瘤作用及其分子机制的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2015,15(31):6166.
- [13] Gao ZY, Liu Z, Bi MH, et al. Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(5):1700-1706.
- [14] 李金平,宁志丰,刘复兴,等. 老药新用,小分子药物二甲双胍的抗肿瘤研究进展[J]. 中国生化药物杂志,2016,37(8):16-21.
- [15] Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling[J]. Cell Research, 2013, 24(1):42-57.
- [16] 程贝贝,冯如,陈光侠,等. 二甲双胍对结肠癌 HCT116 细胞增殖、凋亡的影响[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2017,26(8):857.
- [17] 王立岩,张贝贝,赫东芸,等. 二甲双胍和紫杉醇对卵巢癌 SK-OV3 细胞体外增殖和凋亡的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2017,43(2):255-259.
- [18] 王小霞,尹书琴,康佳丽,等. 二甲双胍逆转人卵巢癌细胞株对顺铂耐药的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志,2017,22(1):12.
- [19] 房晓,尹华,胡腾惠,等. 奥沙利铂对结肠癌细胞 DNA 损伤修复类抗药基因表达的影响[J]. 实用临床医药杂志,2017,21(1):1-4.
- [20] 苗玉,周玮玮,张欣,等. Wnt 信号通路成员蛋白 NKD1、 $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 在结直肠癌中的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2016,32(2):146-151.

收稿日期:2017-10-21 编辑:王国品

· 实验研究 ·

## miR-138 对脑胶质瘤细胞侵袭转移能力的影响及机制

李会兵<sup>1</sup>, 姚娟<sup>2</sup>

1. 湖北省汉川市人民医院神经外科, 湖北 孝感 432300;

2. 湖北省汉川市人民医院静脉用药调配中心, 湖北 孝感 432300

**摘要:** 目的 研究微小核糖核酸-138(miRNA138, miR-138)对脑胶质瘤细胞 U87 侵袭和转移的影响及其机制。方法 将脑胶质瘤细胞株 U87 分别转染 miR-138 类似物(mimics)及阴性对照(miR-NC),实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测 miR-138 表达,Transwell 实验检测 U87 细胞侵袭转移能力,Western-blot 检测信号素(semaphorin, Sema)4C 的表达。结果 qRT-PCR 检测结果证实,miR-138 mimics 组 U87 细胞 miR-138 相对表达量明显高于 miR-NC 组( $4.43 \pm 0.96$  vs  $2.58 \pm 0.62$ ,  $P < 0.05$ )。Transwell 实验表明,miR-138 mimics 组 U87 细胞侵袭转移能力明显低于 miR-NC 组( $P < 0.01$ )。Western-blot 结果表明,miR-138 mimics 组 U87 细胞 Sema4C 相对表达量明显低于 miR-NC 组( $0.36 \pm 0.03$  vs  $1.03 \pm 0.13$ ,  $P < 0.01$ )。结论 miR-138 过表达能有效抑制 U87 细胞的侵袭转移,其机制可能是通过下调 Sema4C 表达而实现。

**关键词:** 微小核糖核酸-138; 信号素 4C 基因; 脑胶质瘤; 侵袭; 转移

中图分类号: R 730.23 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2018)04-0504-04

## Effect of miR-138 on invasion and metastasis of glioma cells and its mechanism

LI Hui-bing\*, YAO Juan

\* Department of Neurosurgery, Hanchuan People's Hospital, Xiaogan, Hubei 432300, China

Corresponding author: YAO Juan, E-mail: 37403542@qq.com

**Abstract: Objective** To study the effect of microRNA138 (miR-138) on glioma U87 cells invasion and migration and its mechanism. **Methods** Human glioma U87 cell lines were transfected with miR-138 mimics (miR-138 mimics group) and the negative control (miR-NC group), respectively. The expression of miR-138 was detected by real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The cells migration and invasion abilities were tested by Transwell assay. The expression of semaphorin-4C (Sema4C) protein was detected by Western-blot. **Results** The qRT-PCR detection showed that the expression of miR-138 in U87 cells of miR-138 mimics group was significantly higher than that of miR-NC

group ( $4.43 \pm 0.96$  vs  $2.58 \pm 0.62$ ,  $P < 0.05$ ). Transwell assay showed that the invasion and metastasis ability of U87 cells in miR-138 mimics group was significantly lower than that in miR-NC group ( $P < 0.01$ ). Western-blot results showed that the expression of Sema4C in miR-138 mimics group was significantly lower than that in miR-NC group ( $0.36 \pm 0.03$  vs  $1.03 \pm 0.13$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Overexpression of miR-138 can effectively inhibit the invasion and metastasis of U87 cells, and the mechanism may be realized by down-regulating Sema4C expression.

**Key words:** MicroRNA138; Semaphorin-4C gene; Glioma; Invasion; Metastasis

脑胶质瘤是最常见的颅内恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,占全部颅内肿瘤的 30% 以上<sup>[2]</sup>,世界卫生组织根据恶性程度将其分为四级:(I ~ II 级)为低级别脑胶质瘤,(III ~ IV 级)为高级别脑胶质瘤<sup>[3]</sup>,其中高级别脑胶质瘤发病率高、恶性程度高、死亡率高,手术与放化疗均不易根治,患者存活期短,因而积极寻找新的治疗靶点成为一种必然。

微小核糖核酸(microRNAs, miRNA)是一类非编码单链小 RNA,与多种癌症的发生相关,其在基因组上多定位于与肿瘤相关的脆性位点,并作为抑癌基因或癌基因在肿瘤发生、发展过程中起至关重要的作用<sup>[4]</sup>。miR-138 与肿瘤的发生、发展关系密切,但其在脑胶质瘤中的研究较少。本研究旨在探讨 miR-138 对胶质瘤细胞迁移和侵袭的影响,探讨其可能的分子机制,以期为临床胶质瘤的治疗提供实验参考。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** miR-138 类似物(mimics)及阴性对照(miR-NC)均由上海英俊生物技术有限公司合成;转染试剂 Lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司);RNA 提取分离试剂盒(北京天根生化科技有限公司);cDNA 合成试剂盒(美国 Thermo 公司);miRNA 荧光测定试剂盒(美国 Bio-Rad 公司);引物序列购自南京依贝仪器设备有限公司;一抗兔抗人 Sema4C 抗体(美国 Santa Cruz 公司);HRP 标记羊抗兔二抗(武汉博士德)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 人神经胶质瘤细胞株 U87 购自中国科学院细胞库,采用高糖 DMEM 培养基(Invitrogen 公司,美国),添加 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 的链霉素,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱作常规传代培养。

**1.2.2 细胞转染** 取对数生长期的细胞经胰蛋白酶

消化,铺于 6 孔板内。参照 Lipofectamine-2000 转染试剂盒说明书配置转染液:无血清 DMEM 培养基混合 miR-138 mimics 与 Lipofectamine,终浓度为 100 nmol/L(miR-138 mimics 组);无血清 DMEM 培养基混合 miR-NC 与 Lipofectamine,终浓度 100 nmol/L(miR-NC 组)。室温放置 20 min,转染细胞,6 h 后换成完全培养基培养。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)测定细胞内 miRNA 表达** 转染 48 h 后,参照 RNA 提取分离试剂盒说明书提取胶质瘤细胞 U87 中总 RNA。以 RNA 为模板,通过 cDNA 合成试剂盒进行逆转录,其具体反应体系为 20 μl:2 μl 总 RNA,1 μl 引物,6 μl ddH<sub>2</sub>O,10 μl master mix,1 μl 酶混合物;转录条件为:18 °C 5 min,43 °C 45 min,85 °C 10 min,停止在 10 °C 10 min。参照 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒对细胞中 miR-138 表达水平进行检测。其反应体系如下(30 μl):2 μl cDNA 模版,15 μl master mix,1 μl 引物,11 μl ddH<sub>2</sub>O,1 μl 酶混合物;反应条件如下:95 °C 3 min,95 °C 15 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 个循环。所有检测结果均采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 的方法进行分析。反应中所使用引物序列设计如表 1。

**1.2.4 细胞迁移与侵袭** Transwell 实验测定胶质瘤细胞 U87 的迁移与侵袭能力。实验过程如下:两组转染细胞用 200 μl 的无血清培养基重悬。重悬后置于覆有基质胶的上层小室中,而在下层小室中加入 500 μl 含有 20% 胎牛血清的细胞培养基。细胞培养 8 h 后,用 4% 多聚甲醛固定,然后用 0.1% 的结晶紫染液进行染色,并小心擦去小室上层细胞,于显微镜下观察胶质瘤细胞迁移与侵袭的情况。随机选择 10 个不同视野进行细胞计数(×200),实验重复 3 次,取平均值。

**1.2.5 Western blot 检测信号素 4C(semaphorin-4C, Sema4C)在胶质瘤细胞株 U87 中的表达** 细胞转染

表 1 miR-138 和内参 U6 引物序列

	miR-138(5'→3')	U6(5'→3')
逆转录引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT TCGCACTGGATACGACTCGACCA	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT TCGCACTGGATACGACAAAATA
上游引物	TCCGAGCCTGACTAACTGTTGTGCTCGA	TCCGATCGTGAAGCGTTC
下游引物	GTGCAGGGTCCGAGGT	GTGCAGGGTCCGAGGT

后,参照试剂盒说明书裂解细胞。在 4 °C 条件下,以 12 000 r/min 速度离心 30 min,取上清液,提取总蛋白并进行蛋白定量(采用考马斯亮蓝发蛋白定量)。灌制 10% 聚丙烯酰胺凝胶,每孔上样 30 μg,经电泳、转膜、封闭,与 Sema4C 兔抗人抗体(稀释度 1:1 000)4 °C 孵育过夜,37 °C 下与 HRP 标记的二抗(稀释度 1:1 000)孵育 1 h,ECL 曝光。同样的方法对 β-actin(按照 1:1 000)进行检测并作为内参对照。所得图像用 Image J 软件对目的基因条带的灰度值进行分析,以目的基因灰度值/内参 β-actin 灰度值半定量计算蛋白含量。

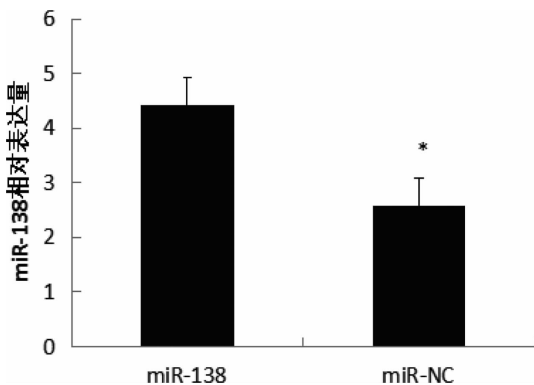
1.2.6 数据处理和分析 采用 SPSS13.0 统计软件对本研究所得的实验数据进行统计分析。定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用成组 *t* 检验,并绘制直条图。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 转染 miR-138 mimics 组与转染 miR-NC 组胶质瘤细胞 U87 miR-138 的表达 通过 qRT-PCR 检测发现,miR-138 mimics 组 U87 细胞内 miR-138 相对表达量( $4.43 \pm 0.96$ )明显高于 miR-NC 组( $2.58 \pm 0.62$ )( $P < 0.05$ ),表明 miR-138 mimics 成功转染 U87 细胞,结果如图 1 示。

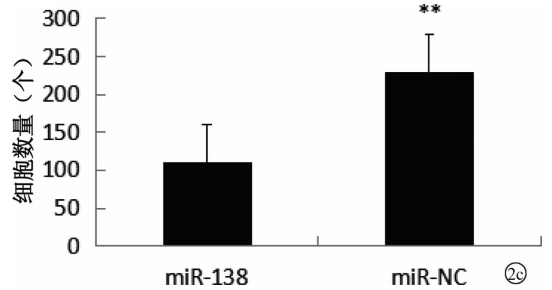
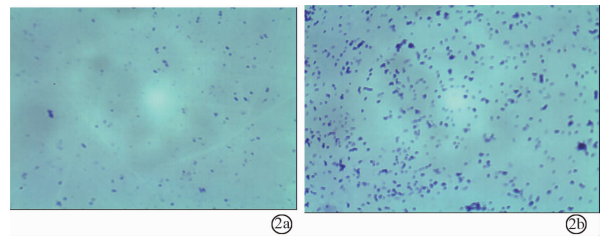
2.2 miR-138 高表达对胶质瘤细胞 U87 迁移与侵袭能力的影响 Transwell 实验细胞结晶紫染色显微镜下(图 2a、2b)可见,与 miR-NC 组相比,miR-138 mimics 组细胞迁移与侵袭数量明显减少,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 2c。说明 miR-138 高表达对 U87 细胞的侵袭具有抑制作用。

2.3 miR-138 高表达对 Sema4C 蛋白表达的影响 Western blot 检测 Sema4C 蛋白表达,结果显示:与 miR-NC 组 Sema4C 蛋白相对表达量( $1.03 \pm 0.13$ )相比,miR-138 mimics 组( $0.36 \pm 0.03$ )明显降低,差异



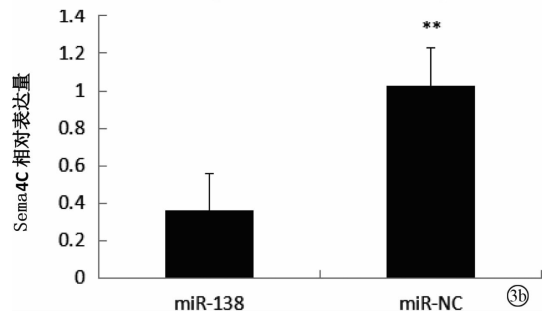
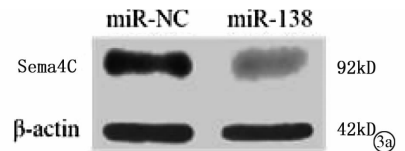
注:与 miR-138 比较,\* $P < 0.05$ 。

图 1 miR-138 mimics 组与 miR-NC 组 U87 细胞 miR-138 表达水平



注:2a:miR-138 组;2b:miR-NC 组;2c:两组 U87 细胞侵袭与迁移细胞数比较,\*\* $P < 0.01$ 。

图 2 miR-NC 组与 miR-138 mimics 组 U87 细胞侵袭与迁移数量(结晶紫染色,×200)



注:3a:两组 Sema4C 和内参 β-actin 蛋白免疫印迹电泳图;3b:两组 Sema4C 蛋白相对表达水平比较,\*\* $P < 0.01$ 。

图 3 miR-138 mimics 组与 miR-NC 组 Sema4C 蛋白表达

有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 3,说明 miR-138 高表达下调 Sema4C 蛋白的表达。

## 3 讨论

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,由于其呈浸润性生长,与脑组织无明显界限,因而难以通过外科手术将其全部切除,多主张配合化疗和放疗。即使采取联合治疗,低级别胶质瘤患者的平均存活期为 3~5 年,而高级别胶质瘤患者的平均存活期仅为 1~2 年<sup>[5]</sup>。因此,靶向控制胶质瘤的浸润、侵袭是其治疗的关键,同时也是研究的热点。

近年来很多报道指出 miRNAs 调控胶质瘤的多种生物过程,包括胶质瘤细胞的增殖、侵袭、转移、凋亡等<sup>[6]</sup>,因而,研究 miRNAs 在胶质瘤发生、发展中的作用将为胶质瘤的治疗提供新思路。miR-138 近年

来被广泛应用于不同肿瘤的研究中<sup>[7]</sup>; Chakrabarti 等<sup>[7]</sup>的动物实验结果表明, miR-138 表达上调比人端粒酶反逆转录酶下调更有力地增强促凋亡的作用, 从而控制人类恶性神经母细胞瘤的增殖; Ma 等<sup>[8]</sup>研究证实在胆囊癌进展中 miR-138 可通过靶向作用于 Bag-1 发挥其抑制细胞增殖的作用; Ye 等<sup>[9]</sup>研究证实 miR-138 可通过靶向作用于 PDK-1 抑制非小细胞肺癌细胞的增殖; 英舟等<sup>[10]</sup>研究也表明 miR-138 能够靶向调控 PDK1 基因抑制人结肠癌 SW620 细胞侵袭。这些结果提示, miR-138 在多种肿瘤的发生、发展中发挥抑癌基因的作用。本实验中通过 Transwell 实验发现 miR-138 高表达可抑制胶质瘤细胞 U87 侵袭、转移能力, 同样表明 miR-138 在胶质瘤的发展过程中发挥抑癌基因的作用, 是新的胶质瘤抑癌因子。

Sema 家族蛋白是一种与肿瘤发生、发展密切相关的蛋白分子。Sema 家族共有 20 多个分子, 根据结构不同分为 8 个亚族<sup>[11]</sup>, 其中 Sema IV 亚族与肿瘤发生、发展密切相关。Sema4C 为 Sema IV 亚族一员, 有报道认为常见恶性肿瘤乳腺癌、子宫内膜癌和前列腺癌组织和细胞水平上均见 Sema4C 较强表达, 且 Sema4C 表达率的高低与乳腺癌和子宫内膜癌是否有淋巴转移呈正相关, 与前列腺癌组织 Gleason 评分呈正相关, 且肿瘤细胞转移潜能不同, Sema4C 蛋白表达的强弱是有差别的<sup>[12]</sup>。因此, 推测 Sema4C 在人类恶性肿瘤的表达可能具有普遍意义, 并且与恶性肿瘤的侵袭和转移密切相关。miR-138 能够靶向作用于 Sema4C 蛋白抑制非小细胞肺癌细胞的生物学行为<sup>[13]</sup>, 本实验通过 Western-blot 证明在脑胶质瘤细胞中 miR-138 同样靶向下调 Sema4C 蛋白表达。

综上所述, 上调 miR-138 表达能明显抑制胶质瘤细胞 U87 的侵袭转移, 其机制可能是通过靶向下调 Sema4C 蛋白的表达来实现, 有望为未来胶质瘤治疗提供新的靶点, 其临床价值令人充满期待。

## 参考文献

[1] 张纪. 深入开展胶质瘤综合治疗及其基础研究[J]. 中华神经外

科杂志, 2003, 19 (1): 1-2.

- [2] 尤永平, 刘宁, 傅震. 中国胶质瘤规范化治疗现状[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2012, 4 (3): 129-131.
- [3] 中华医学会神经外科分会肿瘤专业组. 中国中枢神经系统恶性胶质瘤诊断和治疗共识(简化版)[J]. 中华医学杂志, 2009, 89 (43): 3028-3030.
- [4] Giordano S, Columbano A. MicroRNAs: new tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma? [J]. Hepatology, 2013, 57 (2): 840-847.
- [5] 郭劲松, 金延方. 脑胶质瘤手术后续治疗效果的评价与展望[J]. 中国医刊, 2014, 49 (5): 27-30.
- [6] Park K, Lee S, Kang E, et al. New generation of multifunctional nanoparticles for cancer imaging and therapy [J]. Adv Funct Mater, 2009, 19 (10): 1553-1566.
- [7] Chakrabarti M, Banik NL, Ray SK. miR-138 overexpression is more powerful than hTERT knockdown to potentiate apigenin for apoptosis in neuroblastoma in vitro and in vivo [J]. Exp Cell Res, 2013, 319 (10): 1575-1785.
- [8] Ma F, Zhang MD, Gong W, et al. miR-138 suppresses cell proliferation by targeting Bag-1 in gallbladder carcinoma [J]. PLoS One, 2015, 10 (5): e0126499.
- [9] Ye XW, Yu H, Jin YK, et al. miR-138 inhibits proliferation by targeting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in non-small cell lung cancer cells [J]. Clin Respir J, 2015, 9 (1): 27-33.
- [10] 英舟, 万义增, 陈素贤. MiR-138 靶向调控 PDK1 基因抑制人结肠癌 SW620 细胞侵袭 [J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43 (5): 340-344.
- [11] Kong-Beltran M, Stamos J, Wickramasinghe D. The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation [J]. Cancer Cell, 2004, 6 (1): 75-84.
- [12] 陈颖, 张磊, 刘文欣, 等. Semaphorin4C 在乳腺癌子宫内膜癌及前列腺癌中的表达及意义 [J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37 (9): 507-511.
- [13] Li J, Wang Q, Wen R, et al. miR-138 inhibits cell proliferation and reverses epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells by targeting GIT1 and SEMA4C [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19 (12): 2793-2805.

收稿日期: 2017-11-27 修回日期: 2017-12-12 编辑: 周永彬