

慢病毒介导的 miR-27a 下调对 U87 胶质瘤细胞的影响

包庆泉¹,冯素银²,邵君飞^{1*}

(¹南京医科大学附属无锡市人民医院神经外科,江苏 无锡 214023;²苏州大学附属第四医院神经外科,江苏 无锡 214062)

[摘要] 目的:探讨下调 miR-27a 对 U87 胶质瘤细胞的影响。方法:分别用慢病毒干扰质粒 miRZip-27a anti-miR-27a microRNA construct 或慢病毒空质粒 pGreenPuro Scramble Hairpin Control-Construct 与慢病毒包装质粒混合物共转染 293T 细胞,获得慢病毒颗粒命名为 Lt-I 和 Lt-NC。然后分别用慢病毒 Lt-I 和 Lt-NC 感染 U87 胶质瘤细胞,通过流式细胞仪筛选出稳定感染的 U87 胶质瘤细胞。通过定量 PCR 法分别检测稳定感染的 U87 细胞和未感染的空白 U87 细胞 miR-27a,CCK-8 法检测胶质瘤细胞增殖情况,Transwell 侵袭试验检测胶质瘤细胞的侵袭能力。结果:相对于未感染慢病毒的空白 U87 胶质瘤细胞,稳定感染 Lt-I 的 U87 胶质瘤细胞 miR-27a 表达明显下调、细胞增殖减缓、侵袭能力降低,而感染 Lt-NC 组(阴性对照组)则未见此改变。结论:miR-27a 的下调能有效抑制 U87 胶质瘤细胞的增殖,降低 U87 胶质瘤细胞的侵袭能力。

[关键词] 神经胶质瘤; miR-27a; 慢病毒

[中图分类号] R730.264

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-320-05

Effect of miR-27a knockdown mediated by lentiviral vector on U87 glioma cell

BAO Qing-quan¹, FENG Su-yin², SHAO Jun-fei^{1*}

(¹Department of Neurosurgery, Wuxi People's Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214023; ²Department of Neurosurgery, the Fourth Affiliated Hospital of Soochow University, Wuxi 214062, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of miR-27a knockdown on U87 glioma cells *in vitro*. **Methods:** The lentiviral vector miRZip-27a anti-miR-27a microRNA construct, empty lentiviral vector pGreenPuro Scramble Hairpin Control-Construct, and lentiviral packaging plasmids in supernatant were collected and transfected into 293T cells, the packaged lentivirus were named as Lt-I and Lt-NC. Then the packaged lentivirus Lt-I and Lt-NC were used to infect U87 glioma cells, the stable infected U87 glioma cells were selected by flow cytometry (FCM) for the next research. Then quantity-PCR, CCK-8, and transwell invasion assay were used to detect the effects of miR-27a knockdown. **Results:** Compared with the uninfected U87 glioma cells, the stable infected U87 glioma cells by Lt-I had significantly decreased miR-27a expression, cell proliferation and invasiveness. These changes were not observed in the U87 glioma cells stably infected with Lt-NC. **Conclusion:** Knockdown of miR-27a can inhibit the proliferation and invasiveness of the U87 glioma cells.

[Key words] glioma; miR-27a; lentivirus

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 320-324]

人脑胶质瘤是颅内最常见的原发性肿瘤,其中恶性胶质瘤约占 60%,即使联合手术、放疗和化疗,恶性胶质瘤确诊后的中位生存期也只有诊断后 9~12 个月。到目前为止,已经发现很多基因(包括癌基因、抑癌基因等)与胶质瘤的发生和进展有关,但仍未阐明胶质瘤发生发展的机制^[1-3]。近年来微小 RNA (microRNA, miRNA) 研究的兴起,无疑为胶质

瘤发生发展的机制研究及诊治提供了新的思路。

miRNA 是一类长度为 21~25 个核苷酸的非编码类 RNA,能与特定的靶 mRNA 结合促进其降解和(或)抑制其翻译过程,从而发挥转录后水平的调控作用^[4-5]。据推测,约 1% 的人类已知基因编码了 miRNA,每个 miRNA 可调控 100 多个靶基因,在肿瘤发生发展过程中发挥着癌基因或抑癌基因的作用^[6]。miR-27 分为 miR-27a 和 miR-27b,首次报道见于 2002 年,由 Mourelatos 等^[7]从 HeLa 细胞中克隆。尽管 miR-27 发现至今已有近十年,但是目前关于

[基金项目] 江苏省自然科学基金资助(BK2009078)

*通讯作者, E-mail: shaojunfei@sina.com

miR-27 功能和靶基因的研究文献仍不多,尤其是 miR-27 在神经细胞中的研究更是少见。本实验通过慢病毒技术下调了 U87 胶质瘤细胞中 miR-27a 水平,研究了 miR-27a 对胶质瘤细胞增殖的影响,同时本实验也为以 miR-27a 为靶点的胶质瘤基因治疗的后续研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

慢病毒干扰质粒 miRZip-27a anti-miR-27a microRNA construct、慢病毒空质粒 pGreenPuro Scramble Hairpin Control - Construct、慢病毒包装质粒混合物 pPACKH1 Lentivector Packaging Kit(包含 pVSV-G、pPACKH1-REV 和 pPACKH1-GAG,三者提供慢病毒包装所需的蛋白和酶),以及荧光定量 PCR 试剂、miR-27a 特异性引物和内参 U6 引物均购自美国 SBI 公司。其中,慢病毒干扰质粒和空质粒都能表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)。脂质体 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司。CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购自日本同仁公司,Transwell 细胞侵袭能力检测试剂盒 CytoSelect™ 24-Well Cell Invasion Assay Kit 购自美国 Cell Biolabs 公司。293T 细胞、U87 胶质瘤细胞购自上海中科院细胞库。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

U87 胶质瘤细胞常规培养使用含 10%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)的 DMEM 高糖培养基(含 1.5 mmol/L 左旋谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素),在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 慢病毒的包装和收集

按照说明书用德国 Qiagen 公司的质粒抽取试剂盒提取慢病毒干扰质粒、慢病毒空质粒和慢病毒包装质粒的 DNA。根据 pPACKH1 Lentivector Packaging Kit 说明书,分别将慢病毒干扰质粒、慢病毒空质粒和质粒包装系统 pPACKH1 Lentivector Packaging Kit 经脂质体 Lipofectamine2000(具体方法参考 Invitrogen 说明书)共同转染 293T 细胞,转染 48 h 后收集细胞上清液,经低温超高速离心后即得到浓缩慢病毒颗粒。所得慢病毒颗粒分别命名为 Lt-I 和 Lt-NC。

1.2.3 慢病毒滴度测定

96 孔板中加入(0.5~1.0) × 10³ 个/孔 293T 细胞,100 μl DMEM+10%FBS,37℃、5%CO₂ 过夜。慢病毒以稀释液(DMEM+10%FBS+终浓度 5 μg/ml Poly-

brene)按 1、10、100、1 000 倍稀释,各取 100 μl 加入 293T 细胞,同时建立空白对照(不添加病毒),放入 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱过夜培养。换液,以 100 μl DMEM+10%FBS 继续培养 48 h。通过荧光显微镜计数发荧光的 U87 细胞,结合稀释倍数计算病毒滴度。

1.2.4 慢病毒感染 U87 胶质瘤细胞及稳定感染细胞的筛选

将 U87 胶质瘤细胞接种在 35 mm 培养皿中常规培养至 50%~80%汇合。分别将已知滴度的病毒液 Lt-I 和 Lt-NC 用无血清 DMEM 稀释后按感染复数(multiplicity of infection,MOI)=3 加入 U87 胶质瘤细胞中。由于抑制 miR-27a 的慢病毒干扰质粒及做为阴性对照的慢病毒空质粒中均含有 GFP 基因序列,所以可在细胞感染病毒 24~48 h 后应用流式细胞仪对稳定表达的细胞进行筛选,对筛选出的稳定表达 GFP 的细胞进行传代培养。将稳定感染 Lt-I 病毒液的 U87 胶质瘤细胞命名为 F27A,感染 Lt-NC 病毒液的 U87 胶质瘤细胞命名为 FNC,未做处理的空白 U87 胶质瘤细胞命名为 BLANK。

1.2.5 定量 PCR 检测 miR-27a 表达

以 TRIzol(美国 Invitrogen 公司)提取各实验组细胞总 RNA,逆转录后用 real-time PCR 检测 miR-27a 的表达,以 U6 为内参,PCR 反应条件:95℃,3 min;95℃,12 s,62℃,40 s(40 个循环)。miR-27a 上游引物:5'-CTAATCGTGTTTCACAGTGGCTAAG-3',下游引物:5'-AAAGGTTGATCTCGTCTCTCA-3'。每组进行 3 次独立重复试验,每次试验每种样品 3 个复孔,miR-27a 相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 法。设其中 1 组空白 U87 细胞 miR-27a 表达量为 1,分别计算 3 组 F27A、3 组 FNC、余下 2 组空白 U87 的 miR-27a 相对表达量。对各组的相对表达量进行统计学分析比较差异。

1.2.6 细胞增殖检测

分别将筛选出的慢病毒 Lt-I、Lt-NC 感染的稳定传代 U87 细胞和空白 U87 细胞(F27A、FNC 和 BLANK)在 10 cm 培养皿中培养至 70%融合时,胰酶消化,调整细胞密度至 5 × 10⁴ 个/ml,100 μl/孔接种 96 孔板。每组设 3 个复孔。于 37℃、5% CO₂ 贴壁培养 2 h 后,继续培养 0、24、48、72、96 h;每孔避光加入 CCK8 10 μl,避光培养 1~4 h 后,酶标仪 450 nm 波长测光密度值。

1.2.7 Transwell 体外侵袭实验

将保存于-20℃的 Matrigel 胶置于 4℃,使之过

夜融化。用无血清的冷细胞培养基 DMEM 稀释 Matrigel 胶 (5~10 mg/ml); 取 100 μ l 稀释胶加到 24 孔 Transwell 上室中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4~5 h; 用无血清培养基轻洗凝胶。将筛选出的稳定感染慢病毒 Lt-I 和 Lt-NC 的 U87 细胞和 U87 空白细胞消化后, 以 1% FBS DMEM 调整细胞密度至 2×10^5 个/ml, 取 200 μ l 加入 Transwell 上室, 另在下室中加入 600 μ l 10%FBS 细胞培养基; 37 $^{\circ}$ C 孵育 24~48 h, 棉签擦去上室上面的非侵袭细胞; 移去 Transwell, 倒置, 风干; 0.1% 结晶紫 37 $^{\circ}$ C 染色 30 min 后, PBS 清洗。固定 4 个 (左上、左下、右上和右下) 视野计数, 取均值。

1.3 统计学方法

所有结果均采用 SPSS16.0 软件对数据进行分析。实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组间比较差异用单因素方差分析及最小显著差数法 (LSD)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒包装、收集与感染

将慢病毒质粒转染到 293T 细胞后收集细胞上清, 低温高速离心浓缩病毒后, 测定其滴度为 10^8 pfu/ml。以每高倍镜下荧光细胞数/同一视野细胞数计算感染效率。图 1 显示, 在 MOI = 3 的条件下慢病毒感染 U87 细胞效率达 80%。

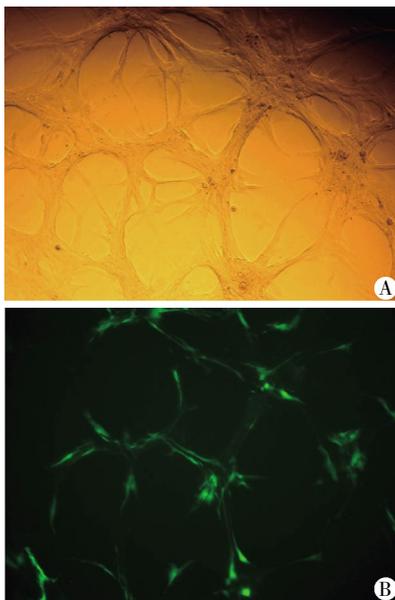
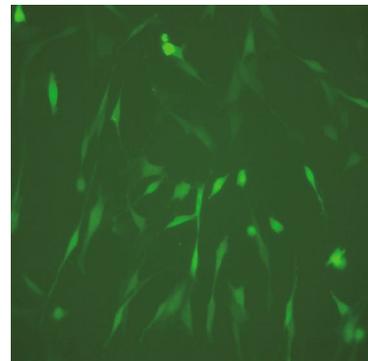


图 1 慢病毒感染 U87 细胞 72 h 后的光镜(A)和荧光镜(B)图($\times 200$)

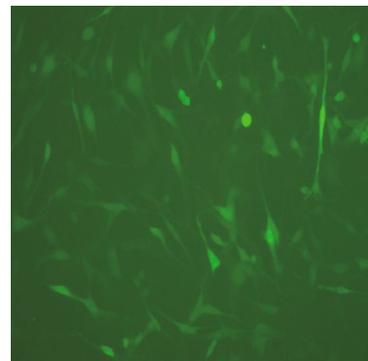
Figure 1 The figures photographed by light microscope (A) and fluorescence microscope (B) 72 h after the diluted Lt-NC infected the U87 cells ($\times 200$)

2.2 稳定感染细胞的筛选

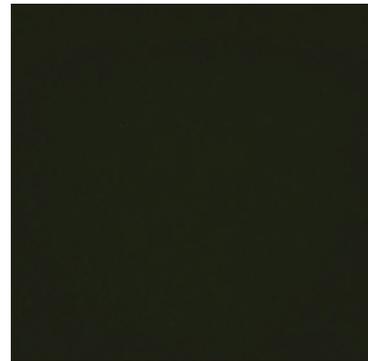
细胞感染病毒 48 h 后以流式细胞仪筛选出带荧光细胞, 得到稳定表达绿色荧光蛋白的细胞。荧光显微镜下可见细胞内绿色荧光, 意味着携带 GFP 的质粒成功进入到了 U87 细胞内 (图 2)。



稳定感染 Lt-I 的 U87 细胞



稳定感染 Lt-NC 的 U87 细胞



空白 U87 细胞

图 2 荧光显微镜下观察稳定感染细胞及空白细胞 ($\times 400$)

Figure 2 The stable infected U87 cells and uninfected U87 cells photographed by fluorescence microscope ($\times 400$)

2.3 定量 PCR 检测稳定感染的 U87 细胞中 miR-27a 的表达

稳定感染的细胞传代后检测 miR-27a 的表达, 结果发现以 BLANK 组 miR-27a 表达量为对照, F27A 组 miR-27a 表达效率较 BLANK 组明显下调 (F27A 相对 BLANK 表达量为 0.377 ± 0.012 , $P < 0.05$), FNC 组与 BLANK 组之间的差异无统计学意义 (FNC 相对

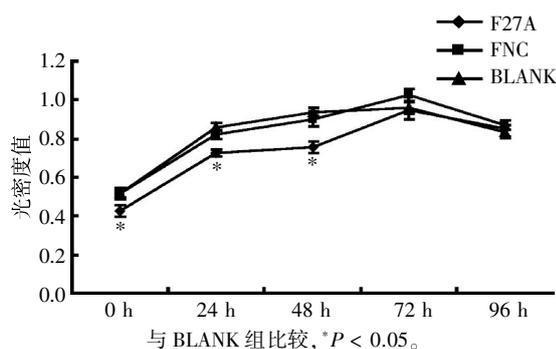
BLANK 表达量为 $0.923 \pm 0.038, P > 0.05$ 。

2.4 各组细胞增殖能力比较

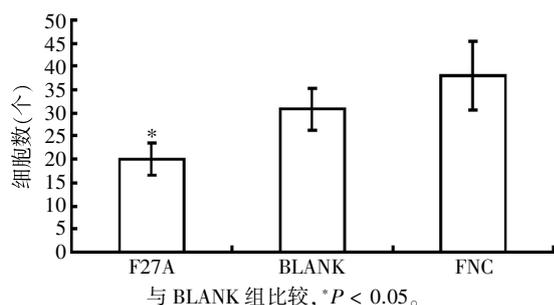
各组细胞不同时间 CCK-8 检测的光密度值显示:前期 (0, 24, 48 h) F27A 组细胞增殖能力较 BLANK 组明显减慢, 有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 FNC 组与 BLANK 组无统计学差异 ($P > 0.05$)。后期 (72 h) F27A 组细胞增殖能力较 BLANK 组仍减慢, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。最后 (96 h) 三组细胞均陆续出现了接触抑制现象, 故已无比较意义 (图 3)。

2.5 各组细胞侵袭能力比较

用 Transwell 侵袭实验观察各组细胞的侵袭能力, 结果显示, 侵袭至 Transwell 微孔膜下表面的细胞数: F27A 组为 (20.1 ± 3.4) 个, FNC 组为 (38.0 ± 7.3) 个, BLANK 组为 (30.8 ± 4.5) 个 (图 4)。这一结果提示, 与 BLANK 组相比, F27A 组细胞侵袭力明显降低 ($P < 0.05$), 而 FNC 组细胞无明显改变 ($P > 0.05$)。



与 BLANK 组比较, * $P < 0.05$ 。
图 3 各组细胞的增殖曲线
Figure 3 The proliferation curve of different groups



与 BLANK 组比较, * $P < 0.05$ 。
图 4 各组胶质瘤细胞的侵袭力比较

Figure 4 The invasiveness comparison among different groups

3 讨论

miRNA 是一类长度为 19~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA。尽管直到上世纪 90 年代初 miRNA 才发现并开始陆续报道, 但是随着研究的深入, miRNA 已被认为在肿瘤的发生发展中扮演着重要的角色。自 Croce 等^[8]首次报道了 miRNA 与肿瘤细胞增殖直接相关后, 越来越多的证据表明 miRNA

在肿瘤的发生和发展中起着重要的作用。miR-125b 在卵巢癌细胞中的表达研究^[9], 结直肠癌组织中 miR-17-92, miR-21 以及 miR-135 的表达研究^[10], miR-9 与胃癌细胞增殖关系的研究^[11]等。这些都说明了 miRNA 在肿瘤的发生和发展中起了重要的作用。至于胶质瘤与 miRNA 的关系, 相关文献报道也不少, 以近来胶质瘤中研究较多的 miR-21 为例, 最近的研究表明, miR-21 能促进胶质瘤细胞增殖、增强细胞侵袭能力和抑制胶质瘤细胞凋亡^[12]。鉴于 miRNA 对胶质瘤发生发展的重要影响, 研究 miRNA 与胶质瘤的关系就显得很有必要了。本实验借助慢病毒技术下调了 U87 胶质瘤细胞中 miR-27a 水平, 研究了 miR-27a 对胶质瘤细胞增殖能力和侵袭能力的影响。

在本实验中包装的慢病毒颗粒成功感染了 U87 胶质瘤细胞, 并且对筛选出的稳定感染细胞进行了 miR-27a 表达检测, 发现感染 Lt-I 的 U87 细胞出现 miR-27a 表达下调, 有统计学意义。而感染 Lt-NC 的 U87 细胞 miR-27a 的表达与空白对照组无统计学差异。进一步的检测也发现, miR-27a 表达下调的细胞相对于空白对照细胞出现增殖减慢、侵袭能力减弱。同样, 感染 Lt-NC 的 U87 细胞在增殖能力和侵袭能力上较空白对照组也无统计学差异。因此, 结合实验结果, 本文认为, miR-27a 在胶质瘤发生发展过程中起着促进胶质瘤细胞增殖、增强胶质瘤细胞侵袭能力的作用。本文的推测和近年来有关 miR-27a 在其他肿瘤中的研究结果类似。一项 miR-27a 与胰腺癌关系的研究表明, miR-27a 在胰腺癌中充当着原癌基因的角色, 它能通过抑制 Spry2 的表达从而促进细胞集落形成, 引起胰腺癌细胞增殖加快、细胞迁移能力增强^[13]。miR-27a 在胃癌中也被认为充当着原癌基因的角色, miR-27a 通过与 prohibitin (抑制素) 的 3' 非翻译区 (3' UTR) 结合从而减少抑制素的表达, 最终造成胃癌细胞出现生长加快的现象^[14]。此外, 在乳腺癌、肺癌的研究中也有相关报道^[15-16]。结合本实验结果以及近年来各家有关 miR-27a 的研究成果, 本研究认为, miR-27a 在胶质瘤中也充当着原癌基因的角色, 起着促进胶质瘤细胞增殖, 增强胶质瘤细胞侵袭能力的作用。

本实验使用的慢病毒技术能成功获得稳定下调 miR-27a 的 U87 细胞, 实验结果初步说明了 miR-27a 对胶质瘤细胞增殖和侵袭能力的影响。另外, 由于 miR-27a 最终通过与特定的靶 mRNA 结合促进其降解和 (或) 抑制其翻译过程, 从而发挥转录后水

平调控作用,因而本实验也为下一步通过蛋白质组学技术(二维电泳及质谱分析)对 miR-27a 靶基因的鉴定,进而加深对胶质瘤发生发展过程中分子机制的研究奠定了基础。此外,本实验也为胶质瘤的基因治疗提供新的靶点。

[参考文献]

- [1] Burgess R, Jenkins R, Zhang Z. Epigenetic changes in gliomas[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(9): 1326-1334
- [2] Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, et al. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression[J]. *Mamm Genome*, 2006, 17(3): 189-202
- [3] Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (19): 8164-8172
- [4] Gaur A, Jewell DA, Liang Y, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2456-2468
- [5] Aigner A. MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89(5): 445-457
- [6] Cummins JM, He Y, Leary RJ, et al. The colorectal microRNAome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (10): 3687-3692
- [7] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(6): 720-728
- [8] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(39): 13944-13949
- [9] Guan Y, Yao H, Zheng Z, et al. MiR-125b targets BCL3 and suppresses ovarian cancer proliferation [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(10): 2274-2283
- [10] Koga Y, Yasunaga M, Takahashi A, et al. MicroRNA expression profiling of exfoliated colonocytes isolated from feces for colorectal cancer screening[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(11): 1435-1442
- [11] Rotkrua P, Akiyama Y, Hashimoto Y, et al. MiR-9 down-regulates CDX2 expression in gastric cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(11): 2611-2620
- [12] 石磊, 程子昊, 张军霞, 等. 探讨人胶质瘤细胞系 U87 细胞中反义 miR-21 诱导凋亡机制 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2008, 25(5): 497-501
- [13] Ma Y, Yu S, Zhao W, et al. miR-27a regulates the growth, colony formation and migration of pancreatic cancer cells by targeting Sprouty2[J]. *Cancer Lett*, 2010, 298(2): 150-158
- [14] Liu T, Tang H, Lang Y, et al. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin[J]. *Cancer Lett*, 2009, 273(2): 233-242
- [15] Wang Q, Li DC, Li ZF, et al. Upregulation of miR-27a contributes to the malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by SV40 small T antigen[J]. *Oncogene*, 2011, 30(36): 3875-3886
- [16] Li X, Mertens-Talcott SU, Zhang S, et al. MicroRNA-27a indirectly regulates estrogen receptor α expression and hormone responsiveness in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(6): 2462-2473

[收稿日期] 2011-11-25