

miR-107 抑制胶质瘤细胞的体外增殖、迁移和侵袭

孙茂苍, 李 鑫*

(聊城市第四人民医院 神经内科, 山东 聊城 252000)

摘要:目的 探讨 miR-107 对胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的调控机制。方法 运用 RT-qPCR 检测人正常的星形胶质细胞系 NHA、神经胶质瘤细胞系 U87、A172、U251 中 miR-107 和 FOXK1 的表达;将细胞分为 miR-NC 组(转染 miR-NC)、miR-107 组(转染 miR-107 mimics)、si-NC 组(转染 si-NC)、si-FOXK1 组(转染 si-FOXK1)、miR-107+pcDNA3.1 组(共转染 miR-107 mimics 和 pcDNA3.1)和 miR-107+pcDNA3.1-FOXK1 组(共转染 miR-107 mimics 和 pcDNA3.1-FOXK1);用脂质体法分别转染至 U87 细胞;CCK-8 法检测细胞的增殖;Transwell 小室实验检测细胞的迁移和侵袭;Western blot 检测细胞中 FOXK1 的蛋白表达;双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性。结果 与正常的星形胶质细胞 NHA 相比,神经胶质瘤细胞 U87、A172、U251 中 miR-107 表达明显下调,FOXK1 表达明显上调($P<0.05$);过表达 miR-107、敲减 FOXK1 均可抑制 U87 细胞的增殖、迁移和侵袭;miR-107 可抑制野生型 FOXK1 的细胞荧光活性,并负向调控 FOXK1 的表达;过表达 FOXK1 可逆转 miR-107 对 U87 细胞增殖迁移侵袭的抑制作用。结论 miR-107 抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的作用机制可能与靶向负调控 FOXK1 有关,将可为胶质瘤的诊断和治疗提供靶向治疗的依据。

关键词: miR-107;FOXK1;胶质瘤

中图分类号:R739.43 文献标志码:A

miR-107 inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells *in vitro*

SUN Mao-cang, LI Xin*

(Department of Neurology, Liaocheng Fourth People's Hospital, Liaocheng 252000, China)

Abstract: Objective To investigate the regulation mechanism of miR-107 on proliferation, migration and invasion of glioma cells. **Methods** RT-qPCR was used to detect the expression of miR-107 and FOXK1 in human normal astrocytes NHA, glioma cell lines U87, A172 and U251. miR-NC(miR-NC group), miR-107 mimics(miR-107 group), si-NC(si-NC group), si-FOXK1(si-FOXK1 group), miR-107+pcDNA3.1(miR-107 mimics and pcDNA3.1 group), miR-107+pcDNA3.1-FOXK1(miR-107 mimics and pcDNA3.1-FOXK1 group), were transfected respectively into U87 cells by liposome method. The proliferation of the cells was detected by CCK-8 method. The migration and invasion of the cells were detected by Transwell chamber assay. The protein expression of FOXK1 in the cells was detected by Western blot. The fluorescence activity of the cells was detected by the dual luciferase reporter assay. **Results** Compared with normal astrocyte NHA, the expression of miR-107 was down-regulated and the expression of FOXK1 was up-regulated in glioma cell lines U87, A172 and U251($P<0.05$). Over-expression of

收稿日期:2019-05-27 修回日期:2019-11-04

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划(2015wsa15040)

*通信作者(corresponding author):lixinlc@qq.com

miR-107 and knockdown of FOXK1 inhibited U87 cell proliferation, migration and invasion. MiR-107 can inhibit the cytosolic activity of wild-type FOXK1 and negatively regulate the expression of FOXK1; over-expression of FOXK1 can reverse the inhibitory effect of miR-107 on proliferation and migration of U87 cells. **Conclusions** The mechanism of miR-107 inhibiting proliferation, migration and invasion of glioma cells may be related to the targeted negative regulation of FOXK1, which will provide a basis for the diagnosis and targeted therapy of glioma.

Key words: miR-107; FOXK1; glioma

恶性胶质瘤是儿童和成人最常见、最具侵袭性的脑肿瘤,预后较差,5年生存率为10%^[1]。获得最佳的治疗方案仍然是最大的挑战。针对脑肿瘤分子特征的新的基因表达谱研究已经显示其遗传和表观遗传的改变。microRNA(miRNA)为18~25个核苷酸组成的短链非编码内源性微小的RNA分子,据报道,其参与神经胶质瘤发生、肿瘤细胞增殖、凋亡以及抗癌基因转录后调控的基因的功能^[2],miR-107为其中之一^[3]。叉头盒(forkhead box, FOX)基因家族是一组高度保守的转录因子。越来越多的证据表明,FOX蛋白在肿瘤发生、胚胎发育、器官发生和多种生物过程的调节中起着关键作用。如细胞增殖,代谢,免疫反应等^[4]。叉头盒k1(forkhead box k1, FOXK1)是FOX家族的成员^[5],其在人类多种癌症中失调,但在胶质瘤中的作用及与miR-107之间的关系尚未清楚。本研究拟以胶质瘤细胞系细胞为研究对象,检测其中miR-107和FOXK1的表达,观察过表达miR-107、敲减FOXK1及过表达FOXK1对胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响,以揭示其与miR-107靶向FOXK1关系,为胶质瘤的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人正常的星形胶质细胞系NHA、神经胶质瘤细胞系U87、A172及U251(ATCC)DMEM培养基、胎牛血清、CCK-8试剂及胰蛋白酶(Selleck公司);RNA抽提试剂盒及反转录试剂盒(TaKaRa公司);PVDF膜(Roche公司);RIPA蛋白裂解液(上海碧云天生物技术公司);Matrigel基质胶及Transwell小室(Corning公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养:用含有10%胎牛血清的

DMEM培养基置于37℃,5%CO₂的恒温培养箱中常规培养人正常的星形胶质细胞NHA、神经胶质瘤细胞U87、A172、U251,待细胞增殖至汇合度75%左右,用胰蛋白酶消化约1min,按照1:3的比例更换培养基,每2d传代。

1.2.2 细胞的转染与分组:将miR-NC、miR-107 mimics、si-NC、si-FOXK1、miR-107+pcDNA3.1、miR-107+pcDNA3.1-FOXK1按照脂质体lipofectamine™2000试剂说明书要求,转染至U87细胞,转染6h后,更换新鲜培养基培养48h,分别标记为miR-NC组、miR-107组、si-NC组、si-FOXK1组、miR-107+pcDNA3.1组、miR-107+pcDNA3.1-FOXK1组,用RT-qPCR法检测转染效率,转染成功后,用于后续的实验研究。

1.2.3 RT-qPCR检测细胞中miR-107和FOXK1的表达:取适量对数增殖期1.2.2各组细胞,按miRNA抽提试剂盒说明书要求操作提取RNA,进行定量,然后按反转录试剂盒说明书操作合成cDNA。最后按qRT-PCR试剂盒说明书操作进行miR-107、FOXK1检测。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算miR-107、FOXK1的表达。引物信息(5'-3'):miR-107:GCCGAATTCAAAGCGAGATTCATCAGCA, GCCGGATCCTGTCAACCCAGAACTCAAAGG; U6: CTCGCTTCGGCAGCACA, AACGCTTCACGAATTTGCGT; FOXK1: ACACGTCTGGAGGAGACAGC, GAGAGGTTGTCCCGGATAGA; GAPDH: TCCCTCAAGATTGCTAGCAA, AGATCCACAACGGATACATT。

1.2.4 CCK-8法检测细胞的增殖:调整各组细胞为 10^5 个/mL的细胞悬液,以100μL/孔接种96孔板,37℃,5%CO₂培养24h。每组设3个重复,分别转染24、48、72和96h加入CCK-8溶液20μL,450nm波长测吸光度(A_{450} 值)。计算细胞增殖,细胞增殖能力与细胞的 A_{450} 值之比。

1.2.5 Transwell小室检测细胞的迁移和侵袭:将

Transwell 小室置于孔上,放入细胞培养箱平衡 30 min。调整细胞至 5×10^5 个/mL 的细胞悬液。每个小室加入 200 μ L 细胞悬液,即每孔细胞约为 1×10^5 个。将上室放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,取出上室,用棉签擦去上室膜下表面迁移的细胞,PBS 洗 2 次,甲醇固定 30 min。自然晾干后,用 1 g/L 结晶紫染液染色 20 min。弃染液,双蒸水洗 2 次,再取出后于倒置显微镜下观察拍照(400 倍),计数上、下、左、右、中 5 个不同视野的总细胞数取平均值。

将基质胶和培养基按 1 : 8 稀释后(60 μ L)铺于小室上表面,风干后备用,其他步骤同 Transwell 迁移实验。

1.2.6 Western blot 检测细胞中 FOXK1 的蛋白表达:收集细胞,加入裂解液,冰上裂解 30 min。沸水浴 10 min 进行变性,12 000 r/min 离心 10 min,取上清置于 EP 管,加入 5 \times SDS 上样缓冲液。电泳后用转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉将膜封闭 2 h,洗膜,加入 I 抗,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,洗膜,加 II 抗,4 $^{\circ}$ C 2 h。加发光液,曝光。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测实验检测 miR-107 与 FOXK1 的结合力:将 FOXK1 3' UTR-WT (含 FOXK1 3' UTR 片段)和 FOXK1 3' UTR-MUT (含 FOXK1 3' UTR 片段突变体)的荧光素酶报告载体,用 LipofectamineTM 2000 分别与 miR-107、miR-NC 共转染,24 h 后,按双荧光素酶报告基因检测试剂盒技术手册操作,记录萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶激活值,以两者的比值评价 FOXK1 基因的激活程度。

1.3 统计学分析

用 SPSS 21.0 软件进行分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,每组数据代表 3 个平行复孔,每个实验重复 2 次。多组间数据比较采用单因素方差分析,两组比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 miR-107 和 FOXK1 在胶质瘤细胞中的表达

与 NHA 组相比,U87、A172 和 U251 组细胞中 miR-107 的表达显著降低,FOXK1 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高($P < 0.05$)(图 1)。

2.2 过表达 miR-107 对胶质瘤细胞增殖、迁移及侵袭的影响

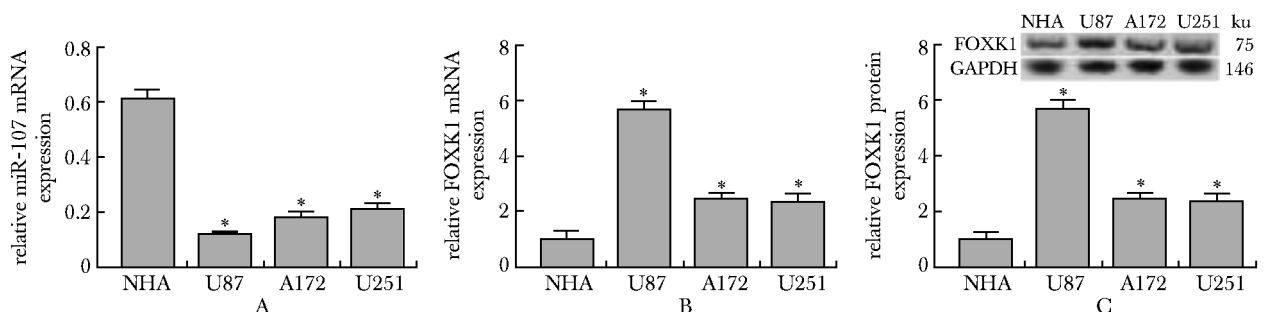
与 miR-NC 组相比,miR-107 组细胞中 miR-107 表达显著升高,48 和 72 h,细胞增殖显著降低,迁移细胞数和侵袭细胞数均显著降低($P < 0.05$)(图 2)。

2.3 miR-107 靶向 FOXK1

用 miRcode 数据库预测到 miR-107 与 FOXK1 3' UTR 存在结合位点(图 3A);与 miR-NC 组相比,miR-107 组 WT-FOXK1 细胞中荧光活性显著降低,MUT-FOXK1 细胞中荧光活性不受影响(图 3B);与 miR-NC 组相比,miR-107 组细胞中 FOXK1 蛋白表达显著降低,与 anti-miR-NC 组相比,anti-miR-107 组细胞中 FOXK1 蛋白表达显著升高(图 3C)($P < 0.05$)。

2.4 敲减 FOXK1 对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭的影响

与 si-NC 组相比,si-FOXK1 组 U87 细胞中 FOXK1 蛋白表达显著降低,48 或 72 h,细胞增殖显著降低,迁移细胞数和侵袭细胞数均显著降低($P < 0.05$)(图 4)。



A. expression of miR-107 in glioma cells; B. expression of FOXK1 mRNA in glioma cells; C. expression of FOXK1 protein in glioma cells; $P < 0.05$ compared with the NHA group

图 1 miR-107、FOXK1 在胶质瘤细胞中的表达

Fig 1 Expression of miR-107 and FOXK1 in glioma cells

2.5 过表达 FOXK1 逆转了 miR-107 对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用

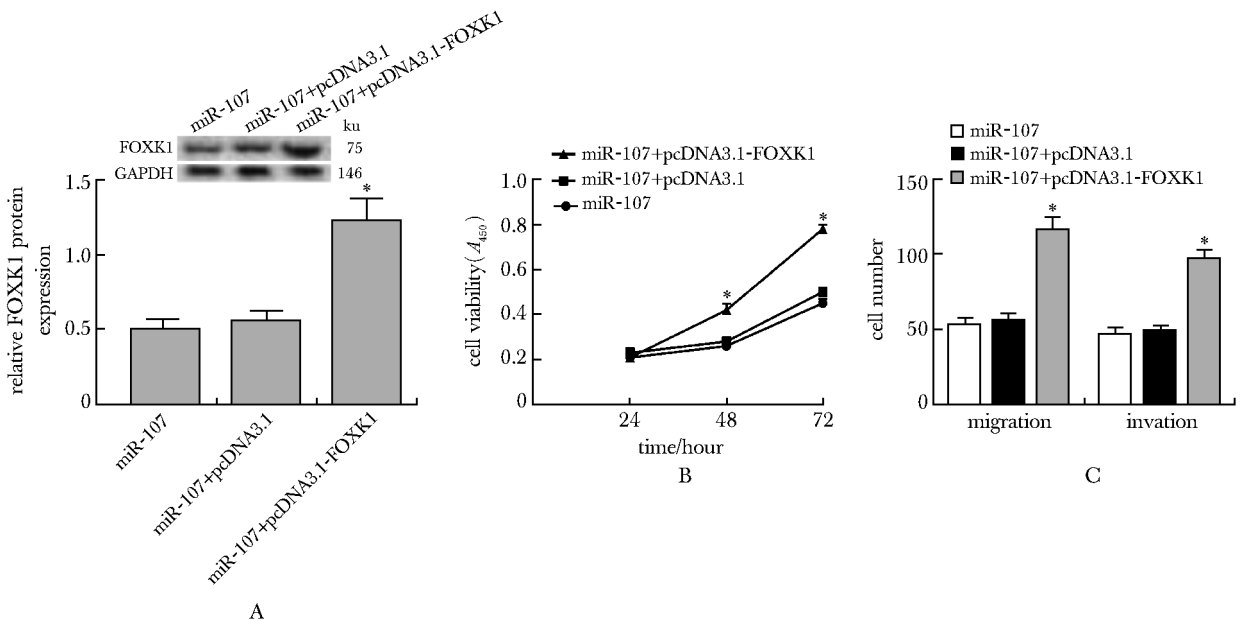
与 miR-107 + pcDNA 3.1 组相比, miR-107 + pcDNA 3.1-FOXK1 组 U87 细胞 FOXK1 蛋白表达显著升高, 48 或 72 h, 细胞增殖显著升高, 迁移细胞数和侵袭细胞数均显著升高 ($P < 0.05$) (图 5)。

3 讨论

miRNA 参与人类多种疾病的发生发展过程, 尤其是肿瘤, 其通过与靶 mRNA 的 3' 非编码区 (un-translation region, UTR) 结合, 调节靶基因的表达, 作为肿瘤抑制因子或致癌基因发挥作用^[6]。miR-107 在多种肿瘤中出现异常表达, 据报道, miR-107 在胶质瘤细胞的细胞表型中具有重要的调控作用, 其发挥作用的机制与调控下游靶标细胞周期蛋白依赖性激酶 6 (CDK6)^[7]、Notch-2^[8]、类果蝇 sal4 (SALL4)^[9] 和雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)^[10] 有关。本研究通过 RT-qPCR 法检测了胶质瘤细胞中 miR-107 的表达发现, miR-107 的表达在胶质瘤中明显的下调, 且过表达 miR-107 可抑制胶质瘤细胞的增殖、

迁移和侵袭, 这均与前人的研究结果相一致; 进一步研究, 通过生物信息学预测、双荧光素酶报告基因检测实验及 Western blot 实验验证了 miR-107 可靶向负调控 FOXK1 表达。

FOXK1 是 FOX 类转录因子之一, 在骨肉瘤、肝癌、胃癌、结直肠癌、前列腺癌等多种实体肿瘤中均存在转录失调并发挥重要作用^[11]。FOXK1 在胶质瘤中的研究甚少。FOXK1 通过与基质金属蛋白酶 1 (MMP1)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和 E-钙黏蛋白的启动子结合抑制转录, 抑制神经胶质瘤细胞的血管生成^[12]。FOXK1 通过激活 wnt / β -catenin 信号通路促进胶质瘤细胞增殖, 并且在胶质瘤中被 miR-137 靶向负调控^[13]。本研究检测了胶质瘤细胞中 FOXK1 的 mRNA 和蛋白的表达发现, FOXK1 在胶质瘤细胞中的表达明显升高, 敲减 FOXK1 可抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭, 这与已有的研究结果相一致; 进一步研究发现, 过表达 FOXK1 可逆转 miR-107 对胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。不仅 miR-107 可靶向负调控 FOXK1 的表达, 相反, FOXK1 也可负向调控 miR-107 的表达和作用,



A. over-expression of FOXK1 on the expression of FOXK1 protein in U87 cells; B. over-expression of FOXK1 on the proliferation of U87 cells; C. effect of over-expressing FOXK1 on migration and invasion of U87 cells; * $P < 0.05$ compared with miR-107+pcDNA 3.1 group

图 5 过表达 FOXK1 逆转了 miR-107 对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用

Fig 5 Over-expression of FOXK1 reverses the inhibitory effect of miR-107 on proliferation, migration and invasion of glioma cells

揭示了 miR-107 在胶质瘤中的作用机制与 FOXK1 之间的紧密关系。

综上所述,miR-107 可抑制体外胶质瘤细胞的

增殖、迁移和侵袭,其机制可能与靶向 FOXK1 有关,为胶质瘤的靶向治疗提供理论依据。

参考文献:

- [1] Azam Z, Quillien V, Wang G, *et al.* The potential diagnostic and prognostic role of extracellular vesicles in glioma: current status and future perspectives[J]. *Acta Oncologica*, 2019, 58: 1-10.
- [2] Riddick G, Fine HA. Integration and analysis of genome-scale data from gliomas[J]. *Nature Rev Neuro*, 2011, 7:439-450.
- [3] Wuchty S, Arjona D, Li A, *et al.* Prediction of Associations between microRNAs and gene expression in glioma biology[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e14681-e14681. doi: 10.1371/journal.pone.0014681.
- [4] Melo S, Sugimoto H, O'Connell, *et al.* Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26:707-721.
- [5] Kuroyanagi H. Fox-1 family of RNA-binding proteins[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66:3895-3907.
- [6] Guo L, Zhang Q, Ma X, *et al.* miRNA and mRNA expression analysis reveals potential sex-biased miRNA expression[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39812. doi:10.1038/srep39812(2017).
- [7] Yang X, Xiao Z, Du X, *et al.* Silencing of the long non-coding RNA NEAT1 suppresses glioma stem-like properties through modulation of the miR-107/CDK6 pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37: 555-562.
- [8] Chen L, Chen XR, Zhang R, *et al.* miR-107 inhibits glioma cell migration and invasion by modulating Notch2 expression[J]. *J Neurooncol*, 2013, 112:59-66.
- [9] He J, Zhang W, Zhou Q, *et al.* Low-expression of microRNA-107 inhibits cell apoptosis in glioma by upregulation of SALL4[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45: 1962-1973.
- [10] Su PF, Song SQ. Regulation of mTOR by miR-107 to facilitate glioma cell apoptosis and to enhance cisplatin sensitivity[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22: 6864-6872.
- [11] Zhang Z, Zhang W, Mao J, *et al.* miR-186-5p Functions as a tumor suppressor in human osteosarcoma by targeting FOXK1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52: 553-564.
- [12] Li X, Xue Y, Liu X, *et al.* ZRANB2/SNHG20/FOXK1 axis regulates vasculogenic mimicry formation in glioma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 68.
- [13] Ji ZG, Jiang HT, Zhang PS. FOXK1 promotes cell growth through activating wnt/ β -catenin pathway and emerges as a novel target of miR-137 in glioma[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10: 1784-1792.