doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2021.10.001

·论著·

microRNA-515-5p 调控 c-MYC-p53 信号轴对神经母细胞瘤细胞增殖、侵袭和迁移的影响

季士亮,洪蕾,郭东凯,江翊国,徐飞,黄立峰(南京医科大学附属苏州科技城医院,江苏苏州 215153)

[摘要]**目的**:探讨 microRNA-515-5p(miR-515-5p)对神经母细胞瘤(NB)SK-N-BE(2)和 SK-N-AS 细胞增殖、侵袭、迁移的影响及分子机制。**方法**:采用生物信息学技术结合多种软件预测方法,检测 miR-515-5p 在 NB 细胞中的表达。在 NB 细胞中瞬时转染 miR-515-5p mimics,应用 CCK8 法和克隆形成实验、Transwell 侵袭小室实验和体外划痕实验检测 miR-515-5p 对 NB 细胞转染后的增殖、侵袭和迁移的影响。采用 Western 免疫印迹(Western Blot)检测 miR-515-5p 对 c-MYC-p53 信号轴的调控机制。**结果**:与对照组比较,转染 miR-515-5p mimics 的细胞集落平均形成率降低,细胞活性下降,且细胞侵袭和迁移能力降低($P<0.05$)。Western Blot 检测结果显示 miR-515-5p 抑制 c-MYC 蛋白表达,但可促进 P-p53 活化($P<0.05$),对 p53 的表达无影响。**结论**:miR-515-5p 通过调控 c-MYC-p53 信号轴抑制 NB 细胞的增殖、侵袭和迁移能力,可能作为 NB 分子治疗的潜在靶点。

[关键词]神经母细胞瘤;microRNA-515-5p;c-MYC-p53;侵袭;转移
[中图分类号]R739.4 [文献标识码]A [文章编号]1672-108X(2021)10-0001-04

Effects of microRNA-515-5p on Proliferation, Invasion and Migration of Neuroblastoma Cells by Regulating c-MYC-p53 Signal Axis

Ji Shiliang, Hong Lei, Guo Dongkai, Jiang Yiguo, Xu Fei, Huang Lifeng (*The Affiliated Suzhou Science and Technology Town Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Suzhou* 215123, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To probe into the effects of microRNA-515-5p (miR-515-5p) on proliferation, invasion, migration and molecular mechanisms of SK-N-BE(2) and SK-N-AS of neuroblastoma (NB) cells. **Methods**: Bioinformatics techniques combined with multiple software prediction methods were used to detect the expression of miR-515-5p in NB. The miR-515-5p mimics were transiently transfected in NB cells, and effects of miR-515-5p on the proliferation, invasion and migration of NB cells after transfection were examined by CCK8 method and colony-forming unit assay, Transwell invasion cell assay and in vitro scratch assay. Western Blot was used to detect the regulatory mechanism of miR-515-5p on the c-MYC-p53 signal axis. **Results**: Compared with the control group, cells transfected with miR-515-5p mimics had the reduced mean colony formation rate, decreased cell activity, and reduced cell invasion and migration ability ($P<0.05$). Western Blot showed that miR-515-5p inhibited the expression of c-MYC protein, yet promoted the activation of P-p53 ($P<0.05$), and had no effect on the expression of p53. **Conclusion**: The miR-515-5p inhibits the proliferation, invasion and migration of NB cells by regulating the c-MYC-p53 signaling axis, which may be the potential target for molecular therapy of NB.

[**Keywords**] neuroblastoma; microRNA-515-5p; c-MYC-p53; invasion; migration

神经母细胞瘤(neuroblastoma,NB)是起源于神经外胚层原始神经嵴细胞的颅外恶性实体肿瘤,年发病率 0.3/100 000 ~ 5.5/100 000,占儿童恶性肿瘤的 8% ~ 10%,已成为儿童主要死亡病因之一[1]。近年来,临床对 NB 的治疗手段不断完善和改进,但疗效并无显著提升,约 15% 患者对诱导治疗无反应,约 50% 患者临床症状缓解后复发,平均 5 年生存率 30% ~ 60%,病死率约为儿童时期肿瘤死亡病例的 15%[2]。目前 NB 发病机制尚不明确,一般被认为是一系列遗传性改变累积导致,包括癌基因、抑癌基因和 DNA 修复基因的改变[3]。癌基因(MYC)的过度表达被认为是 NB 发生发展的一个重要原因[4]。MYC 是 NB 大量基因及遗传通路失调的原因,MYC 介导的致癌作用是通过调控与肿瘤相关的 microRNA(miRNA)实现的。miRNA 参与细胞分化、增殖、凋亡及器官发育等生理过程,并在肿瘤发生发展中发挥着重要作用,是肿瘤恶性行为的重要调控因子。近期有研究表明,microRNA(miR)-515-5p 在乳腺癌和前列腺癌中的表达异常[5]。miR-515-5p 家族在 NB 细胞中表达异常及作用机制尚不清楚。因此,本研究探讨了 NB 细胞中 miR-515-5p 对 c-MYC-p53 信号轴的调控作用及其对 NB 细胞系体外增殖和侵袭能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

SK-N-BE(2)和 SK-N-AS 购自上海中科院细胞库;胎牛血清购自 Gibco 公司;miR-515-5p、mimics-NC 购自

基金项目:苏州市高新区医疗卫生科技项目,编号 2018Q012。
作者简介:季士亮(1990.02-),男,硕士,主管药师,主要从事临床药学工作,E-mail:szkjcyy_jsl@126.com。
通讯作者:黄立峰(1973.05-),男,博士,主任药师,主要从事肿瘤个体化药学研究,E-mail:huanglifeng@yeah.net。

Gene Pharma 公司；脂质体 Lipo 2000 购自 Thermo Fisher 公司，c-MYC、p53、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体及辣根过氧化物酶抗体（HRP）标记二抗购自 Santa 公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养与转染　SK-N-BE(2)和 SK-N-AS 细胞培养于含有 10% 胎牛血清（FBS）的 DMEM/FBS（Gibco）培养基，并放置于含有 5% CO_2 的 37 ℃孵箱中。采用胰蛋白酶将细胞消化后，将其浓度调整为 1×10^5/mL，取 1 mL 接种至 12 孔板，37 ℃恒温培养 24 h。当细胞密度接近 50% 时，采用 Lipo 2000 将接种的细胞分为 miR-515-5p 过表达组（miR-515-5p mimics 组）和阴性对照组（NC mimics 组），未进行转染组即空白对照组（Control 组），转染步骤按说明书操作。转染 48 h 后进行相关检测。利用 Gene Pharma miRNA 提取试剂盒说明书的要求提取细胞中的 miRNA。检测 RNA 浓度，并取 500 ng RNA 进行逆转录反应，以 U6 RNA 作为内源性对照。在 SYBR Green 5×PCR Master Mix 作用下进行实时定量 PCR 反应。

1.2.2　MTT 检测　将转染的细胞以 3 000 个/孔接种到 96 孔板中，连续检测 5 d。根据说明书，待测孔加入 10 μL CCK-8（Dojindo，Japan）分析细胞活性，37 ℃避光孵育 2 h，于 450 nm 处检测吸光度，根据吸光度值绘制增殖曲线，每个细胞做 6 个复孔。

1.2.3　Transwell 小室和划痕实验　将转染的细胞计数并接种到 Transwell 小室（孔径 8 μm，1×10^5 个细胞），在上室加入无血清培养基，下室采用含 15% FBS 的培养液覆盖。培养 24 h 后取出 Transwell 小室，以 4% 多聚甲醛固定 15 min，PBS 洗涤 2 次，风干。采用 0.1% 结晶紫（sigma）染色，在显微镜下随机选择 4 个视野观察发生侵袭的细胞，并计数每个视野下发生侵袭的细胞。同理，转染的细胞密集度达到 90% 左右时，利用 500 mL 的枪头垂直均匀划出交叉横线，每孔至少穿过 5 条线。采用 PBS 清洗细胞，加入无血清培养基继续培养。在显微镜下观察划痕后 0、24、48、72 h 划痕愈合情况，反映细胞的迁移能力。

1.2.4　平板克隆形成实验　将转染的细胞接种到 6 孔板（300 个细胞/板），每 3 d 换液一次，7～10 d 出现肉眼可见的克隆球时终止培养，4% 多聚甲醛固定 30 min，采用吉姆萨染色，以显微镜观察并计数。

1.2.5　细胞凋亡与周期实验　取转染后 48 h 的细胞，消化离心用预冷 PBS 洗 2 次，调整细胞终浓度为 1×10^6/mL，先后加入 5 μL Annexin V-FITC 染液和 10 μL 碘化丙啶（PI）染液，室温孵育 15 min，流式细胞仪检测细胞凋亡率。同理，收集转染后各组细胞，用预冷 PBS 洗 2 次，缓慢滴加 3 mL 70% 预冷的无水乙醇，4 ℃静置过夜。离心重悬后加入 20 μL 核糖核酸酶（RNase），37 ℃温箱孵育 30 min；加入 PI 20 μL 至终浓度 50 μg/mL，用锡箔纸包住，24 h 内上机检测。

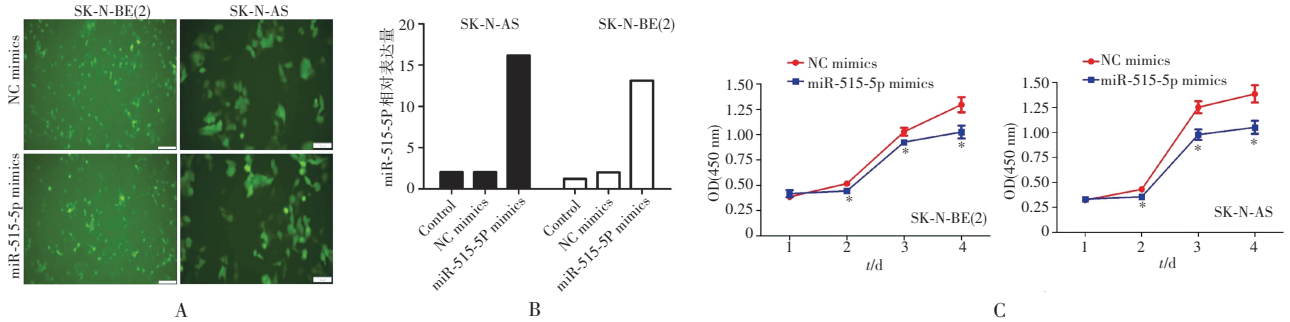
1.2.6　Western 免疫印迹检测　细胞转染 48 h 后，利用 RIPA 裂解液裂解细胞提取细胞蛋白，进行聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）电泳。采用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 进行封闭。最后利用电化学发光（ECL）显影，并分析条带的强弱。

1.2.7　统计学方法　应用 SPSS 16.0 统计学软件，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用非配对 t 检验进行数据分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　miR-515-5p 对 NB 细胞形态和细胞活性的影响

采用实时定量 PCR 检测 miR-515-5p 在 SK-N-BE(2)和 SK-N-AS 细胞中的转染效率，见图 1A。通过荧光显微镜观察到过表达 miR-515-5p 的细胞形态略有变化，细胞面积有所增加，见图 1B。利用 CCK8 实验对细胞的活性进行检测，结果显示，与阴性对照组比较，转染 miR-515-5p mimics 的 SK-N-BE(2)和 SK-N-AS 细胞活性均降低（$P<0.05$），见图 1C。因此，miR-515-5p 通过改变细胞形态抑制 NB 细胞的活性。



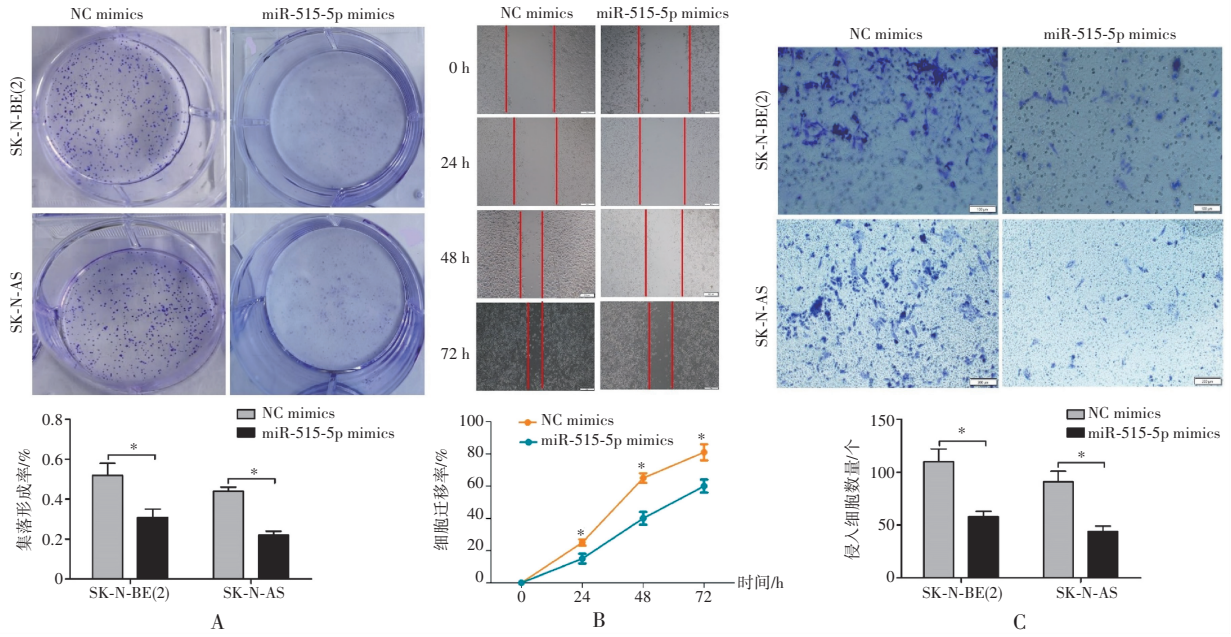
注：A. 转染 miR-515-5p 48 h 后细胞形态变化；B. 转染 48 h 后 RT-PCR 检测 miR-515-5p 表达水平；C. 转染 miR-515-5p 24、48、72 和 96 h 后 CCK8 法观察细胞活性变化。＊与 NC mimics 组比较，$P<0.05$

图 1　miR-515-5p 对 NB 细胞形态和活性的影响

2.2　miR-515-5p 对 NB 细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响

与 NC mimics 组比较，miR-515-5p 组细胞增殖、侵袭和迁移能力均降低（$P<0.05$），其中，过表达 miR-515-5p 后，miR-515-5p mimics 组细胞集落平均形成率明显减少（0.33±0.02），与 NC mimics 组（0.42±0.05）比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 2A。划痕实验显示，过表

达 miR-515-5p 的细胞在 72 h 后划痕仍未愈合，而 NC mimics 组基本愈合（$P<0.05$），见图 2B。此外，Transwell 小室侵袭实验显示，过表达 miR-515-5p 降低了细胞侵袭能力（$P<0.05$），见图 2C。



注：A. 转染 miR-515-5p 后 SK-N-BE(2)和 SK-N-AS 细胞克隆形成率；B. 转染 miR-515-5p 后通过划痕实验测定 0、24、48 和 72 h 细胞迁移能力；C. 转染 48 h 后通过 Transwell 小室检测细胞侵袭能力。* 与 NC mimics 组比较，$P<0.05$

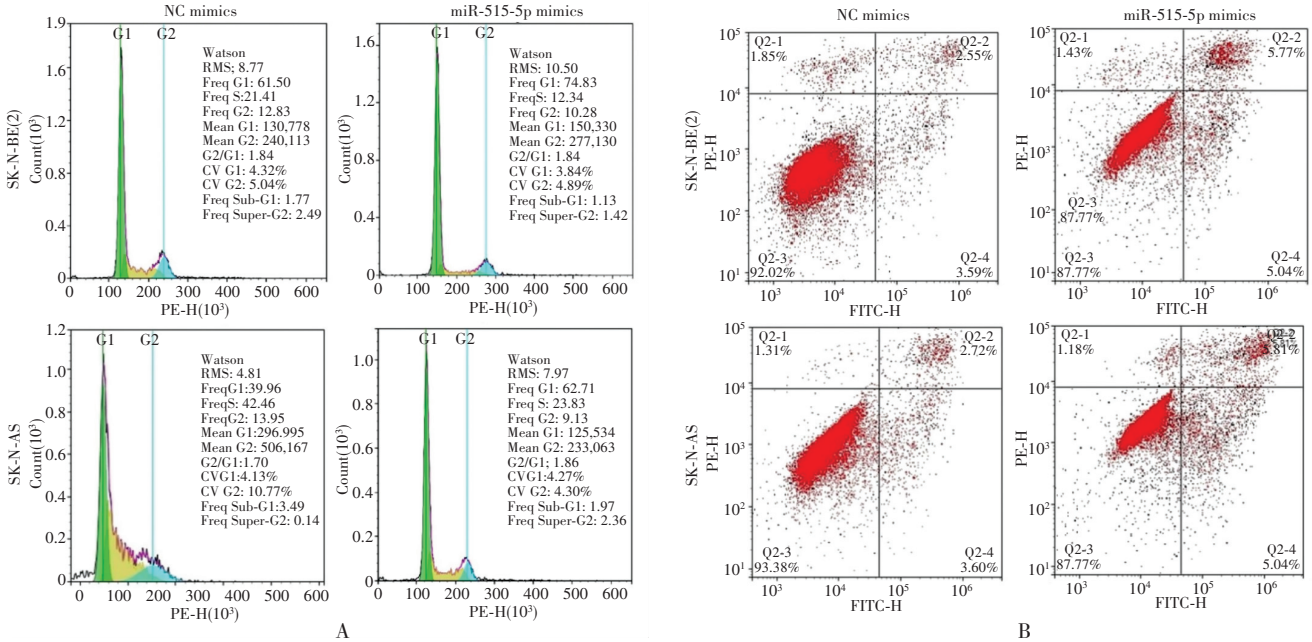
图 2　miR-515-5p 对 NB 细胞的增殖、侵袭和迁移能力的影响

2.3　miR-515-5p 对 NB 细胞凋亡与自细胞周期的影响

采用流式细胞仪检测细胞周期与凋亡率，与 NC mimics 组比较，转染 miR-515-5p 后细胞 G1 期比例明显增加，S 期比例明显减少（$P<0.05$），见图 3A。同时，转染 miR-515-5p 后细胞凋亡率增加（$P<0.05$），且与转染 miR-515-5p 的浓度呈正比，见图 3B。因此，miR-515-5p 可影响 NB 细胞的凋亡与自我更新能力。

2.4　miR-515-5p 对 c-MYC-p53 信号通路的影响

采用 Western Blot 法检测 miR-515-5p 对 MYC 及抑癌基因 *p53* 表达水平的影响。与 NC mimics 组比较，转染 miR-515-5p mimics 的细胞中 c-MYC 水平降低，P-p53 水平升高，而 *p53* 的表达水平没有明显变化，见图 4。因此，miR-515-5p 通过调控 c-MYC-p53 信号轴抑制细胞增殖、侵袭和迁移。



注：A. 转染 miR-515-5p 后 SK-N-BE(2)和 SK-N-AS 细胞 G1 期比例明显增加，S 期比例明显减少；B. 转染 miR-515-5p 后细胞凋亡率增加。* 与 NC mimics 组比较，$P<0.05$

图 3　miR-515-5p 对 NB 细胞凋亡及细胞周期的影响

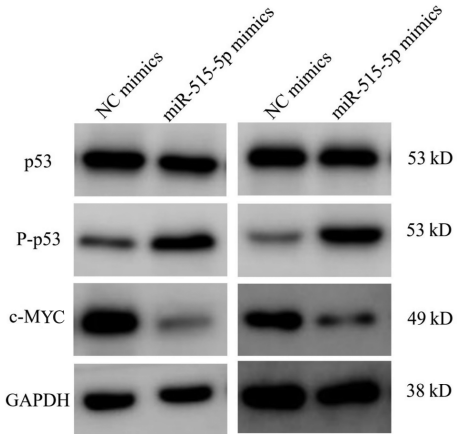


图 4　Western Blot 法检测 miR-515-5p 对相关蛋白水平表达的影响

3　讨论

近年来,有研究表明 NB 的发生发展与 miRNA 密切相关[6-7]。miRNA 是一类内源性非编码单链小 RNA 分子,通过碱基互补配对的方式,导致靶基因 mRNA 降解或 mRNA 的翻译抑制,从而在转录后水平调控靶基因表达[8]。笔者前期通过生物信息学技术和多种软件预测方法,发现 miR-515-5p 在 NB 的表达不同于正常组织。本研究结果显示,过表达 miR-515-5p 后,NB SK-N-BE(2)和 SK-N-AS 细胞的增殖、侵袭和迁移能力均下降,提示 miR-515-5p 可能作为 NB 诊断及预测预后的新分子。

有研究表明,MYC 通过作用于一系列细胞周期和细胞凋亡相关的下游靶基因,导致细胞周期和增殖改变,最终引发肿瘤[9-10]。MYC 下游靶分子包括 p53、S 期相关蛋白激酶-2、鸟氨酸脱羧酶-1、双微体-2、miRNA 和长链非编码 RNA(lncRNA),这些分子在 NB 细胞的增殖、凋亡及分化等方面具有重要作用[11]。有研究发现,在 MYC 扩增且预后不良的 NB 患者中,包括 miR-184 在内的多种 miRNA 显著下调[12]。为系统研究 MYC 调控的 miR-515-5p 在 NB 中的作用,本研究在前期工作中利用 RNA 干扰技术在 NB 细胞中抑制了内源性 MYC 高表达,并通过 miRNA 芯片检测比较其与对照细胞 miRNA 的表达谱,证实 miR-515-5p 的表达水平低于正常组织。

p53 是细胞中重要的肿瘤抑制因子之一,>50% 肿瘤患者有 p53 基因突变。p53 突变体丧失了与 DNA 结合的能力,因此失去了肿瘤抑制功能。有研究显示,p53 突变能够抑制 miR-27a 的转录和表达,从而促进细胞增殖及肿瘤形成[13]。部分 miRNA 在高级别 NB 细胞中的表达发生变化,从而改变 p53 活性,促进上皮间质转化和转移[14]。本研究在利用生物信息学手段预测 miR-515-5p 转录调控机制中发现,在其上游保守区域内有 MYC 结合位点,而转染 MYC 的表达载体后,miR-515-5p 的转录受到显著抑制。进一步表明 miR-515-5p 可通过 c-MYC-p53 信号轴调控 NB 瘤细胞的生长。部分 miRNA 在高级别 NB 细胞中的表达发生变化,从而改变 p53 的活性,促进上皮间质转化和转移[14]。

综上所述,MYC 调控的 miR-515-5p 在 NB 恶性行为中的功能及其机制值得深入探讨。本研究验证了 miR-515-5p 可能通过调控 c-MYC-p53 信号轴在 NB 发生和转移中发挥促抑制作用。此外,本研究将进行动物实验进一步探讨 miR-515-5p 在传递 MYC 恶性行为信号过程中的功能和意义,并为 NB 的诊断和预测、预后提供具有应用价值的新分子,为 NB 的生物治疗提供新的作用靶点。

参考文献:

[1] MARIS J M. Recent advances in neuroblastoma [J]. N Engl J Med, 2010, 362(23): 2202-2211.
[2] SCHLEIERMACHER G, JANOUEIX L I, DELATTRE O. Recent insights into the biology of neuroblastoma [J]. Int J Cancer, 2014, 135(10): 2249-2261.
[3] PADOVAN-MERHAR O M, RAMAN P, OSTROVNAYA I, et al. Enrichment of targetable mutations in the relapsed neuroblastoma genome [J]. PLoS Genet, 2016, 12(12): e1006501.
[4] HUNGATE E A, APPLEBAUM M A, SKOL A D, et al. Evaluation of genetic predisposition for mycn-amplified neuroblastoma [J]. J Natl Cancer Inst, 2017, 109(10): 93.
[5] PARDO O E, CASTELLANO L, MUNRO C E, et al. miR-515-5p controls cancer cell migration through MARK4 regulation [J]. EMBO Rep, 2016, 17(4): 570-584.
[6] FAHEEM H P, ABUL B, MOHAMMAD A A, et al. Nanotechnological based miRNA intervention in the therapeutic management of neuroblastoma [J]. Seminars in cancer biology, 2019. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.017.
[7] 周栩平, 魏琛. SNHG1 靶向调控 miR-145 对神经母细胞瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2020, 55(1): 69-73.
[8] DAVID P B. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
[9] ALTHOFF K, BECKERS A, BELL E, et al. A cre-conditional mycn-driven neuroblastoma mouse model as an improved tool for preclinical studies [J]. Oncogene, 2015, 34(26): 3357-3368.
[10] VALENTIJN L J, KOSTER J, HANEVELD F, et al. Functional mycn signature predicts outcome of neuroblastoma irrespective of mycn amplification [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(47): 19190-19195.
[11] CHAVA S, REYNOLDS C P, PATHANIA A S, et al. miR-15a-5p, miR-15b-5p, and miR-16-5p inhibit tumor progression by directly targeting MYCN in neuroblastoma [J]. Mol Oncol, 2020, 14(1): 180-196.
[12] TIVNAN A, FOLEY N H, TRACEY L, et al. MicroRNA-184-mediated inhibition of tumour growth in an orthotopic murine model of neuroblastoma [J]. Anticancer Res, 2010, 30(11): 4391-4395.
[13] WANG W, CHENG B, MIAO L, et al. Mutant p53-R273H gains new function in sustained activation of EGFR signaling via suppressing miR-27a expression [J]. Cell death and disease, 2013, 4: e574. doi: 10.1038/cddis.2013.97.
[14] BECKERS A, VAN P G, CARTER D R, et al. Mycn-Driven regulatory mechanisms controlling LIN28B in neuroblastoma [J]. Cancer Lett, 2015, 366(1): 123-132.

(编辑:邓境)
(收稿日期:2020-12-02　修回日期:2021-01-21)