神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000952

MiRNA376a/c靶向调控 TGFA 对 CD133⁺U251 胶质瘤细胞增殖的影响

杜　鹏，栾新平，木依提，苑　杨，徐敬轩，张晶晶，杨　岩
（新疆医科大学第二附属医院神经外科，乌鲁木齐　830063）

【摘　要】**目的**：探讨微小核糖核酸（MicroRNA，MiRNA）376a/c 靶向调控转化生长因子 α（transforming growth factor alpha，TGFA）在 CD133⁺U251 胶质瘤细胞增殖中作用方式及其机制。**方法**：构建 MiR376a/c 靶向调控 TGFA 慢病毒克隆体，根据MiR376a/c 与 TGFA 结合位点分为 4 组，检测各组酶活性。根据转染体外 MiR376a/c 和 MiR376a/c 模拟物（MiR-SCR）不同，将 CD133⁺U251 细胞分为 4 组，通过细胞培养、Gimsa 染色，检测 TGFA 蛋白表达量和细胞生长曲线，观察细胞增殖情况，收集资料并进行统计学分析。**结果**：CD133⁺组与 CD133⁻组 MiR376a/c 表达比较，差异有统计学意义（$P<0.001$）；wt-TGFA 组与 mut-TGFA 组质粒荧光素酶活性表达差异比较，差异有统计学意义（$P=0.000$）；将 MiR376a/c 慢病毒导入 CD133⁺ U251 细胞中，MiR376a/c 组 TGFA 蛋白表达相对于 MiR-SCR 组和空白对照组明显下调，差异有统计学意义（$P=0.000$）；生长曲线检测示：随时间延长，MiR376a/c 组细胞生长速度慢于对照组，差异有统计学意义（$P=0.000$）。**结论**：MiRNA376a/c 靶向调控 TGFA 抑制 CD133⁺ U251 胶质瘤细胞增殖、克隆。

【关键词】MiRNA376a/c；CD133⁺U251；增殖；靶向调控
【中图分类号】R79.4　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-12-05

Effects of MiRNA376a/c target regulation of TGFA on CD133⁺ U251 glioma cell proliferation

Du Peng, Luan Xinping, Mu Yiti, Yuan Yang, Xu Jingxuan, Zhang Jingjing, Yang Yan
(*Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the mode and mechanism of MiRNA376a/c targeted regulation of transforming growth factor alpha (TGFA) in CD133⁺U251 glioma cell proliferation. ***Methods***: Lentivirus clones of MiR376a/c target regulation of TGFA was built and were divided into four groups according to MiR376a/c and TGFA binding sites. Enzyme activity of each group was detected. CD133⁺ U251 cells were divided into four groups according to the transfection in MiR376a/c and MiR-SCR. Cell culture and Gimsa staining were used to detect and observe TGFA protein expression, cell growth curve, and cell proliferation. Information was collected and statistical analysis was conducted. ***Results***: There were statistically significant differences in MiR376a/c expression between CD133⁺ group and CD133⁻ group ($P=0.000$). There were statistically significant differences in plasmid luciferase activity expression between wt-TGFA group and mut-TGFA group ($P=0.000$). MiR376a/c lentivirus was imported into CD133⁺ U251 cells and TGFA protein expression was down regulated in MiR376a/c group than in MiR-SCR group and blank control group, with statistical differences ($P<0.001$). Growth curve test showed that with the extension of time, cell growth speed was slower in MiR376a group than in control group, with statistical significant differences ($P=0.000$). ***Conclusion***: MiRNA376a/c target regulation of TGFA inhibits clone and proliferation of CD133⁺U251 glioma cells.

【Key word】MiRNA376a/c; CD133⁺U251; proliferation; target regulation

作者介绍：杜　鹏，Email：13699994376@163.com，
研究方向：主治医师，胶质瘤诊治。
通信作者：栾新平，Email：luanxinping@sohu.com。

基金项目：新疆自治区基金资助项目（编号：2015211C108）；阿勒泰地区基金资助项目（编号：201510）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1026.050.html（2016-05-13）

脑胶质瘤是脑内最常见原发性肿瘤，其中恶性胶质瘤约占 60%，近年来尽管尝试了各种改进治疗及诊断方案，生存期仍没有明显提高[1]。MiRNA 是一类存在于病毒和高等生物中，进化上高度保守内源性非编码 RNA。Choudhury 等[2]发现成熟编码 MiRNA376a/c 与胶质瘤恶性程度呈负相关。Dufour 等[3]研究发现转化生长因子 α（transforming growth factor alpha，TGFA）在胶质瘤早期过度表达，通过延长胶质瘤组织中 TGFA 表达可以促进肿瘤增殖、浸润、恶化。Barrie[4]等通过基因芯片预测 MiRNAs 调控TGFA、MAPK1、CCND1 等抑制胶质瘤的增殖、浸润。通过以上文献综合分析，提出 MiRNA376a/c 通过调节TGFA 表达调控胶质瘤增殖假设。

1 资料与方法

1.1 实验材料 Amresco-N676DMEM 低糖培养基、Amresco-0032 牛血清白蛋白、DMSO、elisa3462 胰酶等购于上海玉博生物科技有限公司；RG005 双萤光酶报告基因检测试剂盒（Promega 公司，美国）；ANT-207 CD133（AC133）、B103 羊抗鼠 IgG（二抗）、BA1125 FITC、BA1092 TRITC 等购于上海拜力生物科技有限公司；CBP60300 人脑胶质瘤 U251 细胞株（南京科佰生物科技有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养、分离及分组 （1）细胞培养、分离 细胞。培养采用克隆化培养技术（有限稀释法），自细胞培养瓶中收集长势良好的人脑胶质瘤 U251 细胞制成悬液。先用无血清培养基将细胞稀释，再用用含 10%胎牛血清 DMEM 培养基培养 U251 细胞。细胞分离采用培养 U251 细胞中按 1:11 稀释比例加入 PE 标记小鼠抗人 CD133 抗体，4 ℃避光孵育 15 min 后，用缓冲液洗涤细胞 2 次，缓冲液重悬细胞，按 1:5 稀释比例加入抗 PE 磁珠，重复以上步骤。经过液洗、过柱、加压，收集洗液为分离的阳性细胞。（2）分组。根据 MiR376a/c 与 TGFA 结合位点不同，分 4 组（MiR376a/wt-TGFA、MiR376a/mut-TGFA、MiR376c/wt-TGFA、MiR376c/mut-TGFA）；根据细胞转染体外 MiR376a/c 和 MiRSCR 不同，分 4 组（control 组、MiRSCR 组、MiR376a 组、MiR376c 组）。每组 4 份标本，重复 3 次（n=12）。

1.2.2 四氮唑盐（MTT）比色法[5] 检测细胞存活率和生长，将 4 组细胞分别离心、漂洗、脱水、醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色，透射电镜下观察拍照。

1.2.3 慢病毒构建、包装以及质粒荧光素酶活测定 将设计好的 VEGFA-shRNA 合成短发夹结构 RNA 片断，直接连入慢病毒骨架载体上。用质粒抽提试剂盒提取慢病毒 3 种质粒 RNA，用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 试剂共转染至慢病毒包装细胞 293T 包装出毒。通过 3'-UTR 双荧光素酶报告基因表达系统建立[6]（采用检测试剂盒，具体操作按说明书进行），检测基因的表达。

1.2.4 qRT-PCR 采用目标专一性侦测 TaqMan MiR376a/c Assays（Assays ID001960）对 MiR376a/c 进行相对定量，用Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA，紫外分光光度计检测 mRNA 纯度并计算其浓度。根据 GenBank 序列，设计上述凋亡相关因子和对照 β-actin 引物序列并合成。cDNA 在引物指导下扩增 PCR 产物。获得产物经凝胶电泳后，在凝胶成像系统上分析相关因子 mRNA 丰度。

1.2.5 Western blot 检测 TGFA 蛋白水平变化 提取各组全细胞蛋白质，Bradford 法测定蛋白质含量。电泳后以半干式电泳转移法将蛋白条带转移到 PVDF 膜上。分别用结合辣根过氧化物酶二抗孵育。ECL 化学发光法进行显色，曝光、显影、定影，进行定量分析。

1.3 统计方法

采用 SPSS 17.0 统计分析，多组间比较应采用两独立样本 t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 $CD133^+$ U251 细胞中 MiR376a/c 表达

两组比较，$CD133^+$ U251 细胞 CD133 高表达，细胞生长、细胞增殖得更快，MTT 检测示随时间延长 $CD133^+$ U251 接种量明显优于 $CD133^-$ U251。t 检验显示 $CD133^+$ U251 和 $CD133^-$ U251 2 组克隆比较差异有统计学意义（P=0.002）$CD133^+$ U251 克隆数量明显高于 $CD133^-$ U251。以上结果显示 $CD133^+$ U251 增殖能力更强（图 1）。

qRT-PCR 结果及其 t 检验显示 MiR376a/c 在 $CD133^+$ U251 和 $CD133^-$ U251 2 组质粒表达比较，差异有统计学意义（P=0.000），在 $CD133^+$ U251 组中质粒呈低表达（见图 2）。

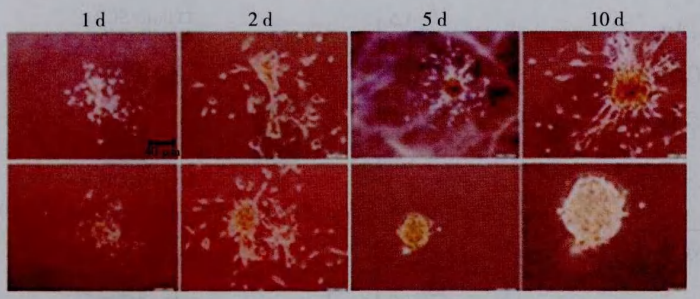
2.2 MiR376 a/c 作用 TGFA 序列及效果

根据在线 MiRanda 软件预测 MiR376 a/c 与 TGFA'-UTR 结合（图 3A）。构建 2 个 TGFA 3'-UTR 克隆型，野生型（wt-TGFA）是 MiR376a/c 结合位点附近 TGFA 3'-UTR 序列，另一个是突变序列（mut-TGFA）是与 MiR376a/c 种子区结合 TGFA 3'-UTR，设立 MiRNA 无义序列对照组（MiR-SCR）。结果显示 wt-TGFA 3'-UTR 质粒荧光素酶活性比 MiR-SCR 对照组减弱，为对照组 60%，而 mut-TGFA3'-UTR 荧光素酶活性均与 MiR-SCR 对照组无明显差异（图 3B、C）。

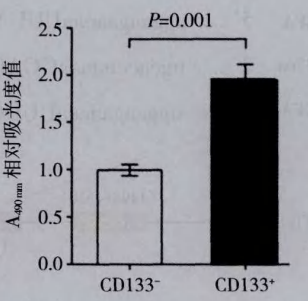
将 MiR376a/c 导入 $CD133^+$ U251 细胞中，和 MiR-SCR组、空白对照组比较 MiR376a/c 组质粒过度表达（P=0.000，图 4A、B）。通过 Western blot 检测（图 4C）及 t 检验统计学分析（图 4D）得出：MiR376a/cTGFA 组与空白对照组、无义序列组比较，TGFA 蛋白表达显著下调（分别为 P=0.000 1 和 P=0.000 7）。说明 $CD133^+$ U251 中转染 MiR376a/c 慢病毒后，质粒过表达和 TGFA 蛋白低表达。

2.3 MiR376a/c 靶向调控 TGFA 对 $CD133^+$ U251 细胞增殖作用

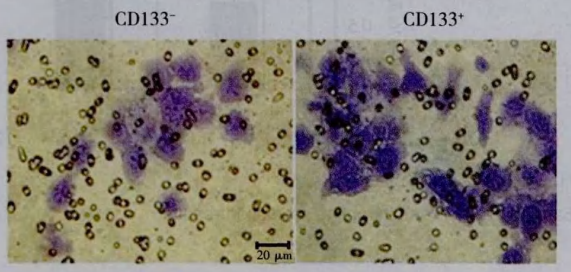
MTT 比色法生长曲线检测示 MiR376a/c 组随时间延长，



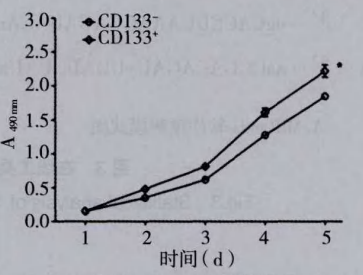
A. 磁珠法分离 CD133⁺ U251 细胞(标尺:40 μm)



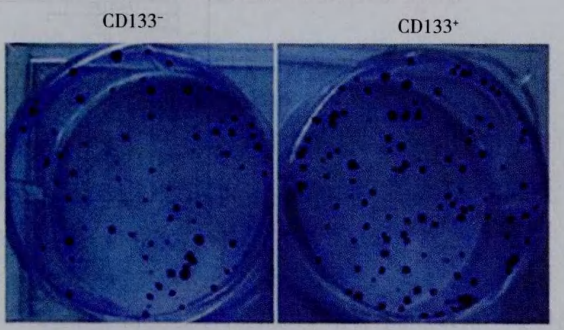
B. CD133⁺ U251 细胞中 CD133 高表达（n=12）



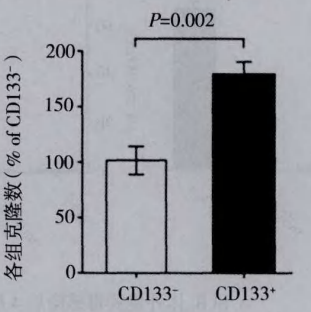
C. U251 细胞增殖情况(标尺:20 μm)



D. MTT 检测 U251 细胞接种量（n=12）



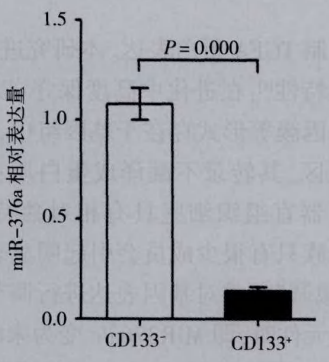
E. 细胞培养克隆数量

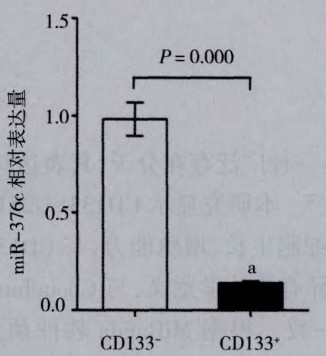


F. 克隆结果 t 检验（n=12）

图 1　CD133⁺ 和 CD133⁻ U251 增殖、克隆的比较

Fig.1　Comparison of CD133⁺/CD133⁻ U251 cell proliferation and cloning



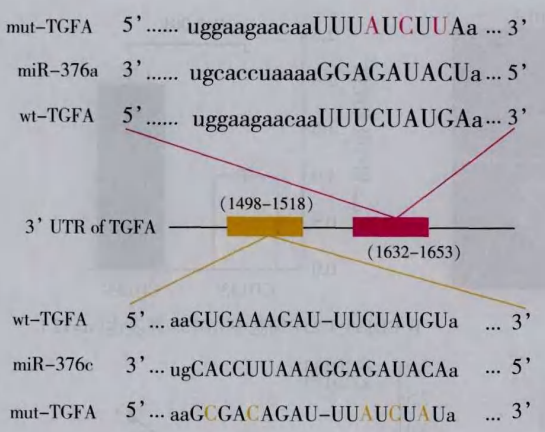


注:2 组 MiR376a/c 表达比较差异有统计学意义,P=0.000

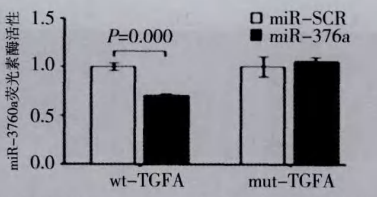
图 2　2 组 U251 细胞 MiR376a/c 表达

Fig.2　MiR376a/c expression in U251 cells in two groups

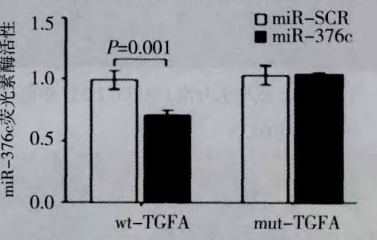
CD133⁺ U251 细胞生长速度慢于无义序列对照组(图 5A),其差别有统计学意义(图 5B)。Gimsa 染色示:MiR-376a/c 慢病毒感染组染色细胞显著减少(图 5C)。因此,MiR-376c 过表达可抑制 CD133⁺ U251 细胞增殖能力。克隆形成及细胞培养检测示:MiR376-a/c 抑制 CD133⁺ U251 细胞增殖(图5D),其差别有统计学意义(图 5E)。



A. MiRanda 软件预测模式图



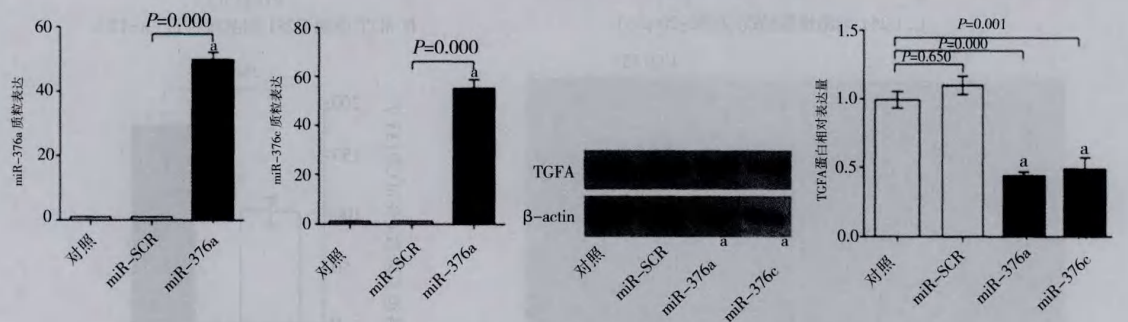
B. wt-TGFA 组和 mut-TGFA 组 MiR-376a 表达差异（n=12）



C. wt-TGFA 组和 mut-TGFA 组 MiR-376c 表达差异（n=12）

图 3　在线工具预测 MiR-376 a/c 结果及表达统计学分析

Fig.3　Statistical analysis of MiR-376a/c expression and its online prediction results



A.和 B. 体外慢病毒感染后 4 组荧光素酶活性差异（n=12）；C. 检测各组 TGFA 蛋白表达差异；D. 各组 TGFA 蛋白表达（n=12）；a，差异有统计学意义。

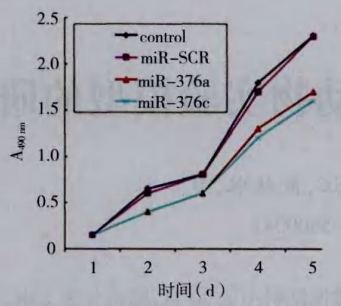
图 4　体外 MiR376a/c 慢病毒感染结果及表达统计学分析

Fig.4　Statistical analysis results of MiR376a/c infection and expression

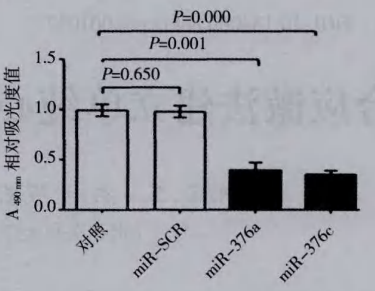
3　讨　论

MiRNA是一种广泛存在分子，其表达具有组织和时间特异性[7]。本研究显示 CD133$^+$ U251 细胞明显提高 U251 细胞生长、增殖能力，与 CD133$^-$ U251 细胞比较，差异有统计学意义，与 Choudhury 等[2]临床研究结果一致。根据 MiRanda 软件预测 MiR-376a/c 与 TGFA3'-UTR 结合。同时实验研究显示 MiR376a/c 确实可以与野生型 TGFA 3'-UTR 结合，抑制基因酶活性，而且这种抑制作用存在MiR376a/c 结合元件依赖性。同时体外 CD133$^+$ U251 细胞感染 MiR376a/c 慢病毒后，MiR376a/c 质粒表达量相对于 MiR-SCR 组和空白对照组具有显著过度表达，进而可抑制 TGFA 蛋白表达。本研究进一步验证 MiRNA 所具特性[8]：在进化中高度保守；以单拷贝、多拷贝或基因簇等形式存在于基因组中，且绝大多数位于间隔区，其转录不翻译成蛋白质；不同发育阶段、不同器官组织细胞具有相对独特MiRNA 表达谱；其家族只有很少成员会引起明显表型改变，主要是以“微调”方式对基因表达进行调节；当人为突变破坏该元件时，即 MiR376a/c 变为未成熟未编码状态，不能对报告基因活性产生抑制效应。

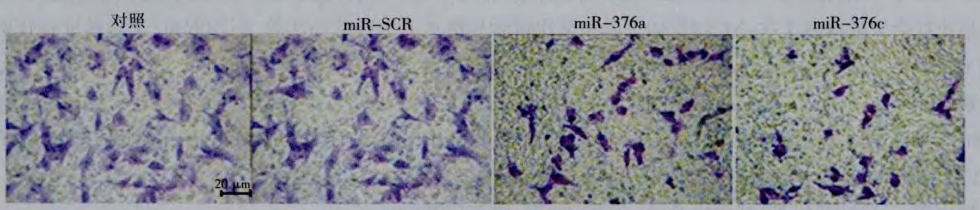
TGFA 是一类小分子多肽，它产生于巨噬细胞、脑细胞与角质形成细胞，能诱导上皮发展，以高度亲和力与细胞表面表皮生长因子受体结合，引起受体酪氨酸憐酸化，启动信号传导级联，参与对细胞增殖和分化调节[8]。在线 MiRanda 软件预测示MiR376a/



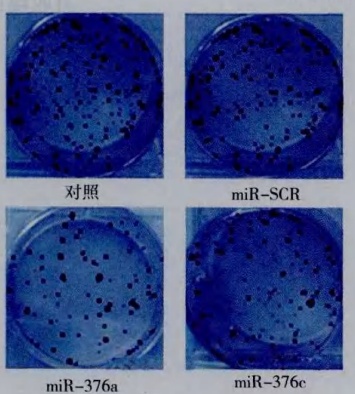
A. 各组细胞生长曲线比较（n=12）



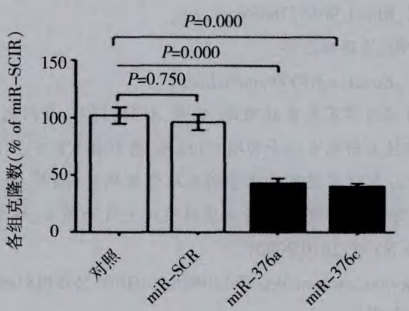
B. 细胞生长 t 检验（n=3）



C. 细胞培养结果（标尺：20 μm）



D. 各组 PCR 染色结果



E. 各组 PCR 结果 t 检验统计学分析（n=12）

图 5　MiRNA-376a/c 靶向调控 TGFA 对细胞增殖影响

Fig.5　Effect of MiR-376a/c targeted regulation of TGFA on cell proliferation

c与TGFA3'-UTR结合。通过qRT-PCR发现,MiR376a/c在CD133⁺ U251组织、细胞呈特异性低表达。而TGFA荧光酶活性在CD133⁺ U251细胞中呈特异性高表达;当MiR376 a/c高表达时,CD133⁺ U251阳性细胞中TGFA荧光酶活性呈低表达。进一步验证了TGFA多见于生长快速细胞及组织,如骨肉瘤、消化道肿瘤、妇科肿瘤和肺癌中都有显著增高,切除病灶后血清中TGFA含量可以恢复正常[8]。进一步得出MiR376a/c通过靶向抑制TGFA降低肿瘤细胞的增殖。验证了MiRNA具有更高稳定性和组织相容性,在肿瘤发生过程中起到调控枢纽作用,主要是通过作用于其靶基因实现对基因表达调控[9]。

本研究认为MiR376a/c可通过下调TGFA,抑制TGFA蛋白表达,间接抑制CD133⁺ U251细胞增殖。本研究通过构建和包装MiR-376a/c慢病毒,慢病毒对胶质瘤细胞感染效率在80%以上,排除了转染效率低问题,MiR-376a/c过表达均可以抑制细胞增殖能力。同时通过转染TGFA可增强CD133⁺ U251细胞增殖能力,而共转染MiR-376c和TGFA可回复MiR-376c对CD133⁺U251细胞增殖能力抑制作用。充分说明MiR-376c可靶向抑制TGFA表达,MiR376a/c靶向调控TGFA抑制CD133⁺U251细胞增殖,与Choudhury[2]研究结果基本相符。与Tivnan和Mcdonald[10]预测(MiRNA作为肿瘤生物治疗靶分子将比编码基因更加有效,更符合生物规律)相一致。对MiR-376a/c及调控网络深入理解,以及对MiR-376a/c功能和相关靶位点全面阐明,将给胶质瘤诊断和治疗提供一个新思路。

神经病学 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001017

联合应激法建立单纯心理应激动物实验模型的研究

徐东宝，王 杰，于燕妮，汪元河，黄 江，戴佳琳，夏 冰
（贵州医科大学法医学系，贵阳 550004）

【摘 要】目的：应用联合应激法建立单纯心理应激小鼠实验模型。**方法**：雄性昆明小鼠 30 只，随机分为 2 组，分别为心理应激（psychological stress，PS）组和正常对照（normal control，NC）组。适应环境 1 周后，连续给予 PS 组小鼠隔离应激 30 d，并每天随机给予捕食应激或社会失败应激 1 次；NC 组群居饲养。末次应激后第 2 天进行旷场实验，断颈取血，通过酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immuno-sorbent assay，ELISA）检测血清中促肾上腺皮质激素释放激素（corticotropin releasing hormone，CRH）、促肾上腺皮质激素（adrenocorticotropic hormone，ACTH）、皮质醇（cortisol，CORT）水平，并与 NC 组进行比较。**结果**：PS 组经联合心理应激后，5 min 旷场活动明显减少（$P<0.01$）。PS 组与 NC 组比较，血清中 CRH、ACTH 及 CORT 水平均明显升高，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。**结论**：通过联合应激法，可建立一种可靠的单纯心理应激动物实验模型。

【关键词】心理应激；动物实验模型；捕食应激；社会失败应激；隔离应激
【中图分类号】R331 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-12-07

作者介绍：徐东宝，Email：908877686@qq.com，研究方向：法医病理学。
通信作者：王 杰，Email：wj6400@gmc.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81341130）；贵州省高校工程技术研究中心资助项目（编号：黔科合 KY 字[2013]114 号）；贵州省教育厅产学研基地资助项目（编号：黔教合 KY 字[2012]031 号）；贵州省科技攻关资助项目（编号：黔科合 NY 字[2010]3090）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20160706.1635.018.html（2016-07-06）

此研究在细胞和分子 2 个层面阐明 MiR376a/c 靶向调控 TGFA 调控脑胶质瘤干细胞增殖机制。实验研究显示 MiR376a/c 靶向抑制 TGFA 降低 $CD133^+$ U251 增殖，这为肿瘤生物治疗提供了新思路。

参 考 文 献

[1] Jazayeri SB，Rahimi-Movaghar V，Shokraneh F，et al. Epidemiology of primary CNS tumors in Iran：a systematic review[J]. Asian Pac J Cancer Prev，2013，14(6)：3979-3985.

[2] Choudhury Y，Tay FC，Lam DH，et al. Attenuated adenosine-to-inosine editing of microRNA-376a* promotes invasiveness of glioblastoma cells[J]. J Clin Invest，2012，122 (11)：4059-4076.

[3] Dufour C，Cadusseau J，Varlet P. Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation[J]. Stem Cells，2009，27(10)：2373-2382.

[4] Barrie S，Joseph C，Clinton J. Differential expression of microRNAs as predictors of glioblastoma phenotypes[J]. BMC Bioinformatics，2014，18(1)：15-21.

[5] 罗奇志，林 琳，王芙艳，等. MTT 方法的优化[J]. 激光生物学报，2014，23(3)：279-283.

[6] 殷 俊，陈 磊，翟国锁，等. MicroRNA-494 通过下调 Survivin 诱导神经胶质瘤细胞凋亡[J]. 重庆医科大学学报，2013，38(9)：984-989.

[7] 吕 娟，宋 鑫. miR130a/b 与肿瘤关系的研究进展[J]. 重庆医科大学学报，2014，39(4)：273-277.

[8] Andy C，Lee L，Denise Y. Study of transforming growth factor alpha for the maintenance of human embryonic stem cells[J]. Cell Tissue Res，2012，350(2)：289-303.

[9] Henriksen M，Johnsen KB，Andersen HH，et al. MicroRNA expression signatures determine prognosis and survival in glioblastoma multiforme-a systematic overview[J]. Mol Neurobiol，2014，50 (3)：896-913.

[10] Tivnan A，Mcdonald KL. Current progress for the use of MiRNAs in glioblastoma treatment[J]. Mol Neurobiol，2013，48(3)：757-768.

（责任编辑：张辉洁）