

脑胶质瘤恶性进展关键 miRNA 表达的研究^{*}

马瑞敏, 康熙雄, 杨春娇, 赵 晖, 张国军[△] (首都医科大学附属北京天坛医院检验科/北京市免疫试剂临床工程技术研究中心 100050)

【摘要】 目的 寻找影响胶质瘤恶性进展的关键微小 RNA(miRNA)。**方法** 使用 miRNA 表达谱芯片检测 198 例不同级别胶质瘤组织标本 miRNA 的表达情况, 挑选代表性差异表达 miRNA, 采用荧光定量 PCR 方法进行验证。在人胶质瘤细胞系, 通过 MTT 试验、平板克隆形成试验、细胞周期试验, 探讨关键 miRNA 对肿瘤细胞增殖能力的影响。**结果** 相对于Ⅱ级胶质瘤组织, Ⅲ级胶质瘤组织中 miR-374a、miR-590-3p、miR-374b、miR-29c、miR-153 表达上调, 而 let-7c、miR-544、let-7a、miR-132、miR-7d 等表达下调。对 miR-374a、miR-544 表达水平进行验证, 结果与芯片方法一致。人胶质瘤 H4 细胞转染 miR-374a mimics 后, 细胞生长率明显增高, 细胞克隆数量明显增加。H4 细胞转染 miR-544 mimics 后, 细胞生长率明显降低, 细胞克隆数量明显减少。与Ⅱ级或Ⅲ级胶质瘤组织相比, miR-196b 在Ⅳ级胶质母细胞瘤组织中表达水平明显增高, 转染 miR-196b 可明显增加 U251 细胞的生长率, S 期细胞比例增加。**结论** 在不同级别胶质瘤中差异表达的 miR-374a、miR-544、miR-196b, 可能是通过影响细胞增殖能力推动胶质瘤恶性进程。

【关键词】 miRNA; 胶质瘤; 恶性进展

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.09.012 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)09-1184-03

The expression study of the key miRNAs involved in the malignant progression of gliomas^{*} MA Rui-min, KANG Xi-xiong, YANG Chun-jiao, ZHAO Hui, ZHANG Guo-jun[△] (Department of Clinical Laboratory, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University/Beijing Engineering Research Center of Immunological Reagents Clinical Research, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To identify the key miRNAs involved in the malignant progression of gliomas. **Methods** Comprehensive miRNAs profiling was performed in 198 glioma tissues with different pathological grade using miRNA array. Quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) was used to validate the expression levels of the key miRNAs, which expressed differentially in glioma tissues with different pathological grade. The MTT assay, cell cycle assay and colony formation assay were performed to investigate the effect of key miRNAs on the proliferation of tumor cells. **Results** Compared to grade Ⅱ gliomas miR-374a, miR-590-3p, miR-374b, miR-29c, miR-153 were upregulated, and let-7c, miR-544, let-7a, miR-132, miR-7d were downregulated in grade Ⅲ gliomas. The expression levels of miR-374a and miR-544 were validated by qRT-PCR and the results were consistent with the results of array. The H4 cells transfected with miR-374a mimics showed increased cell proliferation rates, and the number of colony formation was increased. The H4 cells transfected with miR-544 mimics showed decreased cell proliferation rates, and the number of colony formation was decreased. GBMs demonstrated a significant increase in miR-196b transcript levels compared to the mean expression levels observed in grade grade Ⅱ and Ⅲ gliomas. The glioma cells transfected with miR-196b mimics showed increased cell proliferation rates and could increase the fraction of S-phase proportion of cell cycle. **Conclusion** MiR-374a, miR-544 and miR-196b, which expressed differentially in glioma tissues with different pathological grade, may push the malignant progression of gliomas by influencing cell proliferation.

【Key words】 miRNA; glioma; malignant progression

脑胶质瘤是最常见的颅内肿瘤, 约占脑肿瘤半数以上。根据瘤细胞分化程度和增殖潜能, 世界卫生组织分类系统中将胶质瘤分为Ⅰ~Ⅳ 4 个病理级别, 低级别胶质瘤有局部复发和向高级别胶质瘤天然进展的趋势^[1-2]。胶质瘤从低级别向高级别恶性进展的过程中, 肿瘤侵袭性更强, 并常伴发对放疗和化疗的耐药, 最终, 患者几乎均死于肿瘤复发、局部扩散和局部侵袭^[3]。近 20 年来, 胶质瘤的治疗及预后没有明显改善, 成为神

经外科的重大难题。首先, 需要明确胶质瘤的发病机制。一般认为胶质瘤恶性表型的出现主要是通过不同机制对多基因表达及其信号通路的异常调控来完成。微小 RNA(miRNA) 是 1 类大小约为 22 nt 的内源性、非编码小 RNA, 研究发现, 其可通过不同信号通路直接参与人类多种肿瘤的形成与发展, 通过表达的上调或下调, 起到肿瘤基因或抑肿瘤基因的作用。本研究旨在通过 miRNA 芯片技术筛选不同级别胶质瘤间差异表达

^{*} 基金项目: 北京市自然科学基金项目(7154193); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(2-13-3-052)。

作者简介: 马瑞敏, 女, 住院医师, 博士, 主要从事脑胶质瘤发病机制及早期标志物的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: tiantanzgj@163.com。

的 miRNA,对其中关键 miRNA 进行生物学功能研究,以揭示 miRNA 在胶质瘤恶性进展中的作用,为胶质瘤的诊断、预后判断提供新的标志物,也为肿瘤的靶点治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 胶质瘤组织标本均取自本院神经外科2006~2009 年手术患者,经病理确诊为神经胶质瘤,分别用于 miRNA 芯片检测(试验组)和定量 PCR 检测(验证组)。试验组 198 例,其中世界卫生组织标准 II 级标本 63 例,III 级 44 例,IV 级 91 例。验证组 128 例,其中世界卫生组织标准 II 级标本 30 例,III 级 30 例,IV 级 68 例。选择 10 例健康脑组织作为对照标本,7 例为严重脑创伤清创术标本,3 例为原发癫痫病灶切除标本。

1.2 仪器与试剂 miRNA 表达谱芯片购自美国 Illumina 公司,RNA 提取试剂盒、TaqMan miRNA 反转录试剂盒、TaqMan PCR 试剂盒购自美国 Applied BioSystems 公司,人胶质瘤 U251 细胞株、人胶质瘤 H4 细胞株购自中国科学院上海细胞库,miRNA mimics 购自上海吉玛公司,MTT 试剂盒购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 组织标本 RNA 提取 提取 RNA 前,将肿瘤组织冰冻切片进行苏木精-伊红染色评估肿瘤细胞的范围。选择肿瘤细胞大于 80%的组织,使用 mirVana miRNA Isolation Kit 试剂,按照说明书提取 RNA。应用 NanoDrop1000 紫外分光光度仪进行 RNA 定量,并用琼脂糖甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 完整性,然后将总 RNA 样品贮存于-80℃。

1.3.2 miRNA 表达谱芯片检测 采用 Illumina's Human v2.0 miRNA Expression BeadChip 芯片(包含 1 146 种人类 miRNA,约占 miRBase 12.0 数据库的 97%),筛选不同级别胶质瘤组织差异表达的 miRNA。

1.3.3 miRNA 定量 PCR 反应 对于基因芯片结果中不同级别胶质瘤组织差异表达的代表性 miRNA,在验证组的组织标本用实时荧光定量 PCR 法进行验证。使用 mirVana miRNA Isolation Kit 试剂,按照说明书提取 RNA,使用 TaqMan MiRNA Reverse Transcription Kit 试剂盒进行 RNA 逆转录,使用 TaqMan Gene Expression Master Mix 试剂盒进行 PCR 检测,具体操作均按照说明书进行。反应条件:95℃ 10 min;95℃ 15 s;60℃ 60 s;共 40 次循环。反应结束得到各反应管循环阈值 Ct,计算相对表达量,试验重复 3 次。

1.3.4 miRNA 对胶质瘤细胞增殖能力的影响 采用人胶质瘤细胞系进行细胞增殖试验。对于在 II、III 级胶质瘤组织中差异表达的 miRNA,选择来源于 II~III 级人胶质瘤的 H4 细胞。对于 IV 级胶质母细胞瘤组织中高表达的 miRNA,选择 IV 级人胶质母细胞瘤的 U251 细胞。体外化学合成 miR-374a mimics、miR-544 mimics,采用脂质体转染的方法将其转染至 H4 细胞,采用 MTT 试验、平板克隆形成试验检测其对细胞增殖能力的影响。体外化学合成 miR-196b mimics,采用脂质体转染的方法将其转染到 U251 细胞,采用 MTT 试验、细胞周期分析检测其对细胞增殖能力的影响。

1.4 统计学处理 采用微阵列显著性分析软件识别芯片表达谱之间差异表达的 miRNA,采用 SPSS 13.0 进行数据处理,分别采用 t 检验、单因素方差分析比较各组间差异。以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在 II 级和 III 级脑胶质瘤中差异表达 miRNA

2.1.1 miRNA 微阵列芯片结果 miRNA 芯片分析结果显示,相对于 II 级胶质瘤组织,III 级胶质瘤组织中 miR-374a、miR-590-3p、miR-374b、miR-29c、miR-153 等表达上调,let-7c、miR-544、let-7a、miR-132、miR-7d 等表达下调。见表 1。

表 1 II 级与 III 级胶质瘤组织差异表达 miRNA

组别	miRNA	得分(d)	倍数变化	q-value(%)
表达上调	hsa-miR-374a	21.551 4	2.840 4	0
	hsa-miR-590-3p	17.296 8	3.547 3	0
	hsa-miR-374b	13.070 5	1.385 7	0
	hsa-miR-29c	12.377 8	2.570 7	0
	hsa-miR-153	12.271 9	6.061 3	0
表达下调	hsa-let-7c	-10.834 1	0.548 6	0
	hsa-miR-544	-10.408 9	0.538 6	0
	hsa-let-7a	-9.045 8	0.745 4	0
	hsa-miR-132	-9.015 1	0.435 5	0
	hsa-miR-7d	-7.359 3	0.522 3	0

2.1.2 实时定量 PCR 结果 挑选微阵列芯片结果中具有代表性、表达水平升高及下降的 miR-374a、miR-544,采用实时荧光定量 PCR 法进行组织标本验证。结果发现,miR-374a 表达水平在 III 级胶质瘤组织明显高于 II 级,miR-544 表达水平在 III 级胶质瘤组织明显低于 II 级。见图 1。

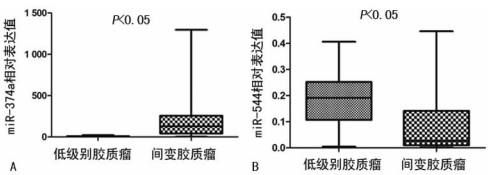


图 1 miR-374a、miR-544 在验证组标本中的差异表达

2.1.3 MTT 试验结果 MTT 结果显示,与未转染 miR-374a mimics 组相比,H4 细胞转染 miR-374a mimics 24、48 h 后,细胞生长率明显增高,提示 miR-374a 能促进细胞增殖(P<0.05)。H4 细胞转染 miR-544 mimics 24、48 h 后,细胞生长率明显降低,提示 miR-544 能抑制细胞增殖(P<0.05)。见图 2。

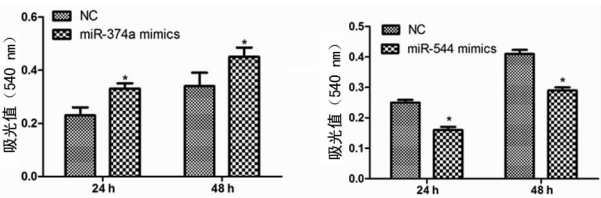


图 2 miR-374a、miR-544 对细胞生长的影响

2.1.4 平板克隆形成试验结果 平板克隆形成试验结果显示,miR-374a mimics 转染组克隆形成率为(39.2±3.1)%,对照组为(23.1±2.4)%;转染 miR-374a mimics 后细胞克隆数量明显增加,差异有统计学意义(P<0.05),见图 3A。miR-544 mimics 转染组克隆形成率为(13.3±1.2)%,对照组为(28.7±2.6)%;转染 miR-544 mimics 后细胞克隆数量明显减少,差异具有统计学意义(P<0.05),见图 3B。

2.2 IV 级胶质母细胞瘤组织中差异表达的 miRNA

2.2.1 miRNA 微阵列芯片结果 与 II 级(P<0.05)或 III 级

($P<0.05$)胶质瘤组织相比,在Ⅳ级胶质母细胞瘤组织中 miR-NA-miR-196b 表达水平明显增高,见图 4A;而在Ⅱ、Ⅲ级胶质瘤组织之间,miR-196b 表达水平没有明显差异($P=0.11$)。

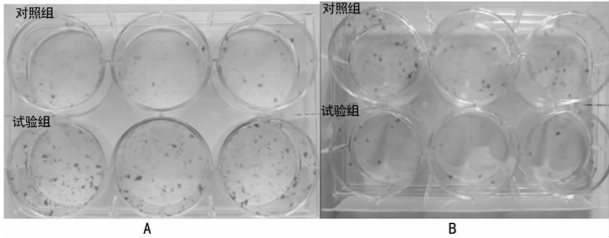


图 3 平板克隆形成试验结果

2.2.2 实时定量 PCR 结果 Ⅱ、Ⅲ级胶质瘤组织之间,miR-196b 表达水平没有明显差异($P=0.18$)。与健康脑组织相比,miR-196b 在Ⅱ级($P=0.84$)或Ⅲ级($P=0.19$)胶质瘤组织的表达没有明显差异,但 miR-196b 在胶质母细胞瘤的表达水平明显高于健康脑组织($P<0.05$),见图 4B。

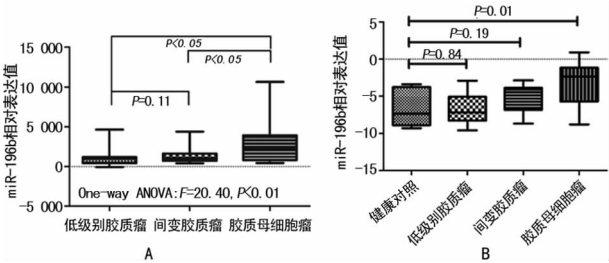


图 4 miR-196b 在不同级别胶质瘤组织中的差异表达

2.2.3 MTT 试验 MTT 结果显示,与未转染 miR-196b 组相比,U251 细胞转染 miR-196b 24、48 h 后,细胞生长率明显增高,miR-196b 能促进细胞增殖($P<0.05$),见图 5。

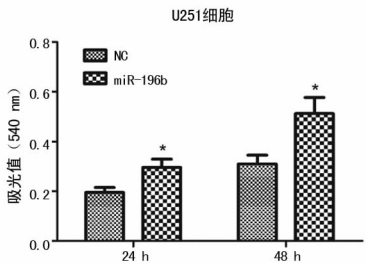


图 5 miR-196b 对细胞生长的影响

2.2.4 细胞周期试验结果 细胞周期结果显示,阴性对照组 S 期比例为 22.53%,细胞转染 miR-196b 后 S 期比例为 35.83%,2 组差异有统计学意义($P<0.05$),细胞转染 miR-196b 后 S 期比例增高。见图 6。

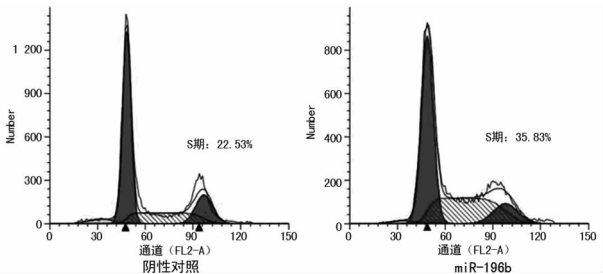


图 6 miR-196b 对细胞周期的影响

3 讨 论

胶质瘤从低级别向高级别恶性转化过程中,多个基因相继

激活或失活,共同促进肿瘤发展^[4]。寻找和检测恶性进展的标志基因,以指导肿瘤的诊断和治疗,仍是目前研究的重要任务。近年来,miRNA 在肿瘤调控中的作用越来越受到重视,通过与靶基因 mRNA 特异性结合而导致靶 mRNA 降解或抑制翻译,对基因进行转录后调控,在个体发育及细胞分化、增殖、凋亡、应激等生物学过程中发挥重要作用^[5-6]。

本研究采用 miRNA 芯片,在不同级别胶质瘤组织间筛选差异表达的 miRNA。相对于Ⅱ级胶质瘤组织,在Ⅲ级胶质瘤组织中 miR-374a、miR-590-3p、miR-374b、miR-29c、miR-153 等表达上调,而 let-7c、miR-544、let-7a、miR-132、miR-7d 等则表达下调。挑选代表性 miRNA 进行验证,在上调的 miRNA 中,miR-374a 表达水平增高最多;在下调的 miRNA 中,let-7c 表达水平降低最多。let-7c 在其他文献中报道较多^[7-8],对于胶质瘤而言特异性不高。为寻找胶质瘤特异性标志物,本研究选择报道较少的 miR-544 进行验证。最终实时定量 PCR 结果与芯片结果一致。体外试验中,通过 MTT 分析及平板克隆形成试验发现,miR-374a 能促进细胞增殖,miR-544 则抑制细胞增殖。由此可见,在高级别胶质瘤组织中表达上调及下调的 miRNA 可能通过影响细胞增殖能力而促进肿瘤恶性进展,其异常表达可成为恶性进展的重要分子标志,指导肿瘤的诊断及治疗。

研究中发现,miRNA-miR-196b 在Ⅳ级胶质母细胞瘤组织中的表达水平明显高于Ⅱ、Ⅲ级胶质瘤组织及健康脑组织,体外试验也证实 miR-196b 过表达促进肿瘤细胞增殖,转染 miR-196b 明显增加了 U251 细胞生长率,S 期细胞比例增加。有研究报道,细胞周期调控失衡是肿瘤恶性增殖的根本原因^[9-10],miRNA 异常表达引起的调控机制紊乱也是其中重要因素。本研究证实 miR-196b 过表达与肿瘤细胞增殖的关系,miR-196b 过表达可能通过促进细胞增殖而推进肿瘤进程。

今后研究中将进一步分析上述 miRNA 异常表达与患者预后的关系,深入探讨其影响胶质瘤恶性进程的分子机制,为胶质瘤的诊断、预后判断提供新的标志物,也为肿瘤的靶点治疗提供新的思路。

参考文献

[1] Louis DN,Ohgaki H,Wiestler OD,et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. Acta Neuropathologica,2007,114(2):97-109.

[2] Appin CL,Brat DJ. Molecular pathways in gliomagenesis and their relevance to neuropathologic diagnosis[J]. Advances in Anatomic Pathology,2015,22(1):50-58.

[3] Batchelor TT,Reardon DA,Groot JF,et al. Antiangiogenic therapy for glioblastoma: current status and future prospects[J]. Clinical Cancer Research, 2014, 20 (22): 5612-5619.

[4] Huse JT,Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma[J]. Nature Reviews Cancer, 2010, 10 (5): 319-331.

[5] Brower JV,Clark PA,Lyon W,et al. MicroRNAs in cancer: glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells [J]. Neurochemistry international,2014(10):319-331.

[6] Zhang Y,Dutta A,Abounader R. The (下转第 1189 页)

疗不敏感,CR 率低,预后较差。

按染色体核型分组的性别、血红蛋白、血小板计数及原始细胞比例(流式细胞分析仪/骨髓细胞形态学)差异无统计学意义($P>0.05$),年龄和白细胞计数差异有统计学意义($P<0.05$);预后中等组年龄高于预后良好组和预后不良组,白细胞计数预后中等组高于预后良好组。预后中等组除外正常核型后年龄 $[(51.3\pm13.3)$ 岁]、白细胞计数 $[(23.6\pm34.0)\times10^9/L]$ 差异无统计学意义($P>0.05$),说明此类差异由正常核型引起;预后中等组正常核型者大于 60 岁 30 例,正常核型高白细胞 14 例(21.5%)高于其他 2 组(3.1%和 7.7%),说明年龄、白细胞计数及核型在 AML 预后是相对独立的指标。

AML 患者联合化疗达 CR,经巩固化疗可行自体或异基因造血干细胞移植,本研究中行异基因干细胞移植 10 例(7 例 M2,2 例 M5,1 例 M1),其中 9 例在 CR 后行干细胞移植术,另有 1 例属难治性 AML,联合化疗 5 个疗程仍未达 CR。死亡 7 例,病死率高于 Wang 等^[7]报道。死亡患者移植后生存期 51~362 d,死亡原因为急、慢性移植物抗宿主病或免疫力低下而继发感染。

结合染色体核型、初诊临床资料和初期缓解状况的 Kaplan-Meier 生存曲线,显示 3 组生存期有明显差异,低危组优于中危组和高危组。低危组主要为 M3(13/23),均通过至少 1 个疗程的全反式维甲酸(ATRA)、柔红霉素(DNR)和(或)三氧化二砷(ATO)联合化疗。1 例复发患者通过 ATRA、阿糖胞苷(Ara-c)、善唯达联合化疗 1 个疗程再次缓解,1 例缓解后行自体干细胞移植术,至随访日期止 14 个月未复发。ATRA 对白血病细胞具有很强的诱导分化作用,ATO 可直接杀伤白血病细胞并抑制其增殖,使得 M3 的 CR 率高,长期预后良好。中危组以 M2 亚型为主(14/27),大部分患者通过 1 个疗程的联合化疗后达到 CR。本组有 12 例复发,7 例复发后未缓解,于 2~3 个月内死亡。1 例 CR 后行多次自体干细胞移植术存活至随访截止日期。复发主要是由于反复化疗促使白血病细胞对化疗药物产生了继发性耐药,导致生存期短,预后差。高危组中包含 8 例复发和 19 例难治性 AML 患者,复发患者死亡 4 例:1 例继发于 MDS,2 例为复杂核型,1 例高白细胞;难治性 AML 患者死亡 10 例:6 例继发于血液病,2 例高白细胞,2 例 70 岁以上的高龄患者。难治性 AML 多是由于对化疗药物的原发性耐药引起,需更换无交叉耐药的新药或行异基因干细胞移植术。在本组研究中,继发于其他血液病的 AML 共 25 例,其中死亡 13 例(52%),这是由于 MDS 和 AA 等血液疾病正常造血储备能力低下,对联合化疗的耐受性强,且患者骨髓抑制

明显,出血、感染等风险增加,导致中位存活期短^[8]。

本研究由于样本量少,随访数量及时间不足,未能进行中位生存期分析。但从上述研究可初步说明通过染色体核型的预后分析,结合初诊临床资料和治疗达 CR 时间,采取合适的治疗方案,能提高患者的生存期。

参考文献

- [1] 中华医学会血液学分会.成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2011 年版)[J].中华血液学杂志,2011,32(11):804-807.
- [2] 中华医学会血液学分会.急性早幼粒细胞白血病中国诊疗指南(2011 年版)[J].中华血液学杂志,2011,32(12):885-886.
- [3] 中华医学会血液学分会.急性髓系白血病(复发难治性)中国诊疗指南(2011 年版)[J].中华血液学杂志,2011,32(12):887-888.
- [4] Swerdlow SH,Campo E,Harris NL,et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [M]. 4th ed. Lyon:International Agency for Research on Cancer(IARC),2008:80-107.
- [5] 张之南,沈悌.血液病诊断与疗效标准[M]. 3 版.北京:科学出版社,2007:108-134.
- [6] 陈玉梅,刘天峰,阮敏,等.79 例儿童 t(8;21)急性髓系白血病的核型及预后分析[J].中国医学科学院学报,2009,31(5):542-546.
- [7] Wang Y,Liu DH,Fan ZP,et al. Prevention of relapse using DLI can increase survival following HLA-identical transplantation in patients with advanced-stage acute leukemia:a multi-center study[J]. Clinical Transplantation, 2012,26(4):635-643.
- [8] Lubbert M,Suciu S,Baila L,et al. Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate-or high-risk myelodysplastic syndrome(MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European organisation for research and treatment of cancer leukemia group and the German MDS study group[J]. Journal of Clinical Oncology,2011,29(15):1987-1996.

(收稿日期:2015-10-27 修回日期:2015-12-20)

(上接第 1186 页)

- role of microRNAs in glioma initiation and progression [J]. Frontiers in Bioscience,2012(17):700-712.
- [7] Dou H,Wang Y,Su G,et al. Decreased plasma let-7c and miR-152 as noninvasive biomarker for non-small-cell lung cancer[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine,2015,8(6):9291-9298.
 - [8] Malta M,Ribeiro J,Monteiro P,et al. Let-7c is a candidate biomarker for cervical intraepithelial lesions:a pilot study [J]. Molecular Diagnosis and Therapy,2015,19(3):191-196.

- [9] Griss T,Vincent EE,Egnatchik R,et al. Metformin antagonizes cancer cell proliferation by suppressing mitochondrial-dependent biosynthesis [J]. PLoS Biology, 2015, 13(12):e1002309.
- [10] Gao J,Zhang JY,Li YH,et al. Decreased expression of SOX9 indicates a better prognosis and inhibits the growth of glioma cells by inducing cell cycle arrest[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015,8(9):10130-10138.

(收稿日期:2015-10-25 修回日期:2015-12-21)