

· 基础研究 ·

SHG-44 神经胶质瘤干细胞分化为胶质瘤细胞前、后 miR-92b 基因的表达变化*

詹秀琴¹, 袁榴娣²

(1. 南京中医药大学中西医结合一级学科, 南京 210023; 2. 东南大学医学院, 南京 210009)

摘要:目的 观察 SHG-44 神经胶质瘤干细胞分化为胶质瘤细胞前、后 miR-92b 基因表达的变化。**方法** 从人胶质瘤 SHG-44 细胞中筛选出肿瘤干细胞并进行荧光免疫鉴定; 将肿瘤干细胞诱导分化为胶质瘤细胞; 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法和实时荧光定量 PCR 法测定分化前、后 miR-92b 基因前体的转录水平。**结果** RT-PCR 产物的电泳结果显示, 在干细胞及分化后的胶质瘤细胞中均出现 miR-92b 基因前体的目标条带。运用实时荧光定量 PCR 法对目的基因进行表达相对定量的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 以干细胞 miR-92b 前体基因为参照, 分化后的胶质瘤细胞 miR-92b 基因前体表达量为 2.95, 约为干细胞表达量的 3 倍。**结论** miR-92b 基因可能在神经胶质瘤干细胞的分化过程中发挥了重要作用。

关键词: miR-92b 基因; microRNA; 神经胶质瘤细胞; 肿瘤干细胞

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.24.023

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)24-2881-03

The expression of miR-92b gene in SHG-44 glioma cells and glioma stem cells*

Zhan Xiuqin¹, Yuan Liudi²

(1. Discipline of Chinese and Western Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Medical School of Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To compare the expression level of miR-92b in SHanG-44 glioma cells and glioma stem cells. **Methods** The tumor stem cells were screened from the SHG-44 glioma cells and identified by immunofluorescence. Then it was induced to differentiate. The transcription level of miR-92b was determined by RT-PCR and real-time quantitative PCR before and after differentiation. **Results** The miR-92b expression level in differentiated tumor cells was about 3 times higher than in tumor stem cells. **Conclusion** The miR-92b gene is involved in the process of differentiation of glioma stem cells.

Key words: miR-92b; microRNA; glioma cells; tumor stem cells

肿瘤干细胞假说认为, 并非肿瘤中的所有细胞在肿瘤的增殖和生长中起作用, 仅仅是肿瘤中一小部分被称为肿瘤干细胞的细胞, 具有增殖和广泛的自我更新能力。大部分肿瘤细胞失去了自我更新和增殖的能力, 分化成为肿瘤细胞, 构成了肿瘤的表型特征^[1]。脑胶质瘤干细胞(BGSCs)是脑胶质瘤的“种子”细胞, 具有自我更新、增殖和多向分化潜能等干细胞属性。随着目前对 GSCs 的深入研究, 它可能为临床治疗胶质瘤提供一种新思路^[2-3]。

小分子 RNA-92b(microRNA-92b, miR-92b)是含有 22 个核苷酸的小分子 RNA, 被发现参与了细胞的增殖、肿瘤细胞的转移等功能。miR-92b 还被发现在原发性脑肿瘤中表达程度高于从其他组织转移来的脑肿瘤^[4]。此外, 有人以低剂量的放射线照射人成纤维细胞, 发现细胞中 miR-92b 表达量下降^[5]。那么, miR-92b 是否参与了肿瘤干细胞的分化过程? 本研究以 SHG-44 神经胶质瘤细胞中筛选出的干细胞为研究对象, 检测其在分化前、后 miR-92b 前体表达水平的差异, 探讨其在 SHG-44 神经胶质瘤干细胞分化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂 SHG-44 人胶质瘤细胞系购自中科院细胞库; DMEM 高糖培养基(Gibco 公司); DMEM/F12(1:1)培养基(Gibco 公司); B27 添加剂(Gibco 公司); 人表皮生长因子

(EGF, Pepro Tech 公司); 人碱性成纤维生长因子(bFGF, Pepro Tech 公司); 特级胎牛血清(Hyclone 公司); 青霉素和链霉素(华北制药); 左旋多聚赖氨酸(Sigma 公司); 山羊血清; 小鼠抗人 Nestin 单克隆抗体(Chemicon 公司); 兔抗人胶质纤维酸性蛋白(GFAP)多克隆抗体(Sigma 公司); 小鼠抗人 β -tubulin Ⅲ单克隆抗体(Bioworld 公司); FITC 标记山羊抗小鼠二抗(Bioworld 公司); TRITC 标记羊抗兔标记二抗(Bioworld 公司); TaKaRa SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒。

1.1.2 仪器 荧光显微镜; Light Cycler Real Time PCR 扩增仪(Roche Diagnostics 公司)。

1.2 方法

1.2.1 胶质瘤干细胞的筛选培养 将培养在含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中的 SHG-44 肿瘤细胞, 经胰酶消化后更换为神经干细胞培养基 DMEM-F12(内含 2% B27、EGF 20 μ g/L、bFGF 20 μ g/L)培养, 每隔 1 d 添加 1 mL 培养基。动态观察细胞球的形成过程。

1.2.2 胶质瘤干细胞的鉴定 取活力良好的细胞球, 植入经多聚赖氨酸包被的玻片上, 37 $^{\circ}$ C 晾干, 用 PBS 液反复漂洗 3 次, 每次 10 min, 以除去残存培养基, 室温下 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 液洗 3 次, 5% 山羊血清封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min, 加入小鼠抗人 Nestin 单克隆抗体(1:200), 兔抗人 GFAP 多克隆抗体(1:200)和小鼠抗人 β -tubulin Ⅲ单克隆抗体(1:

* 基金项目: 江苏高校优势学科建设工程基金资助项目[苏政办发(2011)6 号]。 作者简介: 詹秀琴(1966~), 博士, 副教授, 主要从事小分子 RNA 的研究。

200)于湿盒内 4℃过夜,次日 PBS 液冲洗后加入 FITC 标记山羊抗小鼠二抗(1:50)、TRITC 标记羊抗兔标记二抗(1:50),37℃孵育 30 min,同时做阴性对照(用 PBS 液代替荧光二抗),PBS 液漂洗 3 遍后荧光显微镜下镜检。

1.2.3 胶质瘤干细胞的诱导分化及分化鉴定 取活力良好的细胞球,轻轻吹打后接种到预先放有多聚赖氨酸包被好的盖玻片的 6 孔板中,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养 5~7 d,待细胞球周围伸出较长突起或散在细胞变为多形、星形或梭形时,用前述类似方法行 Nestin、GFAP 和 β -tubulin III 免疫荧光检测。

1.2.4 miR-92b 基因前体的检测方法 分别取肿瘤干细胞细胞球和分化后的贴壁细胞,用 Trizol 抽提总 RNA,取 3 μ g 总 RNA 合成 cDNA,取 3 μ L cDNA 进行 RT-PCR 扩增,反应总体积 25 μ L。miR-92b 基因前体引物序列为:F: CCA AGG TGA ACC CAA CTC CCC AGC;R: ATG CCC GAA GTC CTC CCA GAC C。反应条件为:94℃ 10 min,94℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 45 s,40 个循环;72℃ 5 min。扩增产物以琼脂糖凝胶电泳鉴定。

实时荧光定量 PCR 以 β -actin 为内参,按照 TaKaRa SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit 说明书要求,配置定量 PCR 反应体系,每组设 3 个复孔。根据结果对 miR-92b 基因前体表达水平进行相对定量。

2 结果

2.1 胶质瘤干细胞的筛选培养及其在 2 种培养条件下的相互转化 将在含血清培养基条件下培养的 SHG-44 细胞接种到无血清的神经干细胞培养基中,开始细胞呈圆形悬浮生长,1 d 后细胞开始贴壁生长;1 周后,部分细胞形成凸起的克隆球,且球体积不断增大,此即为肿瘤干细胞。2 周后,将悬浮克隆球取出重新接种到含 10%胎牛血清高糖培养基,克隆球在数小时内出现贴壁生长,贴壁细胞形态与母代 SHG-44 细胞基本一致,说明肿瘤干细胞分化为瘤细胞。

悬浮克隆球在血清培养基中传代培养 1 个月,再次以相同密度接种到无血清的神经干细胞培养基,仍然有克隆球形成,球体增长迅速。一旦转变为血清培养基,细胞生长方式以及形态仍与母代血清中的 SHG-44 细胞基本一致。

2.2 胶质瘤干细胞和分化细胞的鉴定 细胞球的神经干细胞标志物 Nestin 表达阳性(呈现绿色荧光),星形胶质细胞标志物 GFAP 和神经元标志物 β -tubulin III 表达阴性,表明细胞球表达神经干细胞特异性抗原,为胶质瘤中的干细胞。细胞球分化 5 d 后的细胞,贴壁生长,Nestin 表达阴性,GFAP(呈现红色荧光)和 β -tubulin III(呈现绿色荧光)表达阳性,说明干细胞分化为胶质瘤细胞。

2.3 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 结果 miR-92b 基因前体 RT-PCR 产物的电泳结果见图 1,贴壁细胞和细胞球在 300 bp 左右皆有一目标条带,初步判断贴壁细胞中 miR-92b 基因前体的表达水平高于细胞球。进一步进行实时荧光定量 PCR 测定,采用对目的基因进行相对表达定量的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,以细胞球 miR-92b 基因前体为参照,贴壁细胞的 miR-92b 基因前体表达量为 2.95,约为干细胞表达量的 3 倍。

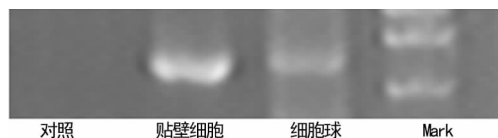


图 1 RT-PCR 产物电泳图谱

3 讨论

当前脑肿瘤的诊断与预后标准是以肿瘤的全体肿瘤细胞群的组织病理学和分子学特点为依据的,这可能不能够充分体现占较少比例的肿瘤干细胞中的关键性改变。而脑肿瘤中存在有肿瘤干细胞的理论,提示尽管在许多肿瘤中有固有的细胞异质性,但可能仅仅是一个细胞类型在对肿瘤的产生和持续发生起作用。因此,这一细胞类型的鉴定可能为肿瘤的监测和诊断提供重要标志物。而且,针对它进行适当的药物及分子生物学治疗,可能是治疗中最为关键也是最为有效的。

目前,人们对 miRNAs(microRNA)已经有了较多的认识,证实了它们在细胞增殖、分化、凋亡中起着重要作用,miRNAs 特异性的表达还可能参与了肿瘤的发生和发展,在胶质瘤中也扮演着重要的作用。对其进行深入研究将有助于进一步阐明胶质瘤的发病机制,进而对胶质瘤的诊断、治疗及预后判断有帮助。

miRNAs 通过与靶 mRNAs 的完全或部分互补结合引起靶 mRNAs 的降解,或抑制其靶蛋白的翻译。miRNA 的 5'端 2~8 或 1~7 核苷酸区被称为“种子区”,对 miRNA 与靶 mRNA 的 3'端非转录区(3'UTR)配对非常重要。miRNA 种子区通常和相应的靶序列完全配对,因此,可以用种子区序列预测 miRNA 的靶基因。在大多数情况下,miRNA 种子区和相应靶基因序列的完全配对是其起调控作用的前提条件。根据生物信息学预测,一种 miRNA 可作用于多种 mRNA 靶点,多个 miRNA 也可以作用于一个 mRNA。mRNA 的 3'UTR 可以包含多个 miRNA 的作用位点,并且和抑制翻译的程度有关,而 RNA 结合的位点越多,抑制的程度就越大。由此形成复杂而又精确的调节网络,调节着生物体的基因表达及生理功能,一旦 miRNA 的水平失衡,将可能导致疾病的发生^[6]。

胶质细胞瘤是中枢神经系统最常见的高度恶性肿瘤^[7]。有人对人脑胶质细胞瘤中多种 miRNAs 的表达水平测定发现,miRNA-21、miRNA-26a、miRNA-296、miRNA-221-222 表达上调,表达下调的有 miRNA-146b、miRNA-7、miRNA-124、miRNA-137、miRNA-128、miRNA-181a/b/c^[8-11]。在胶质细胞瘤的发生、发展中,miRNAs 表达水平上调可能起着癌基因的作用,而 miRNAs 表达水平下调则起着抑癌基因的作用^[8]。

Hilal 等^[12]发现将 Smad 转染进胶质瘤细胞中可以抑制其生长,而且他们还发现 Smad 可以通过上调 miR-451 途径促进胶质瘤干细胞分化为 CD133-细胞并抑制它产生肿瘤的特性。Silber 等^[8]证实 miR-124 和 miR-137 可以诱导小鼠神经干细胞、小鼠胶质瘤干细胞和人恶性胶质瘤干细胞的分化。

通过对 miRNA-21 的进一步研究发现^[13],miRNA-21 调控着包括 p53 通路、转化生长因子- β (TGF- β)通路和线粒体凋亡通路中多种重要因子的表达。其中部分因子的 mRNA 为 miRNA-21 直接作用的靶基因,这说明 miRNA-21 作为一种癌基因参与到了 p53 通路、TGF- β 通路和线粒体凋亡通路,行使其促进肿瘤生长的作用。

尽管迄今为止还没有胶质瘤细胞中的 miR-92b 的报道,但作者发现,miR-92b 参与了某些细胞的分化过程。进一步的文献研究发现^[14],人胚胎干细胞(ES)的 G₁ 期比体细胞 G₁ 期短,其原因可能是 ES 中 miR-92b 表达水平较高,通过抑制靶基因 p57 的表达使细胞 G₁ 期缩短。此外,miR-92b 的作用还与致癌基因 MYCN 和 Wnt 信号通路调节蛋白 DKK3 有关,MYCN 能上调 miR-92b 的表达,进而下调 miR-92b 靶基因 DKK3 的表达水平,对 Wnt 信号通路发挥作用^[15]。

因此,本研究试图发现 miR-92b 是否参与了胶质瘤干细胞的分化过程,从而将其纳入胶质瘤治疗的靶标。本研究首次发现,SHG-44 胶质瘤细胞中存在部分肿瘤干细胞,经过特异培养基的筛选,可使其中的干细胞快速增殖,以球状生长,并表现干细胞特异的表面抗原。干细胞以含血清培养基诱导后,可以分化为胶质瘤细胞,并表达胶质细胞或神经元细胞的特异性表面抗原。胶质瘤干细胞分化后的 miR-92b 基因前体表达水平提高,说明 miR-92b 基因参与了分化过程相关基因表达的调节。至于通过其表达水平的变化,调节下游哪些靶基因的表达,是下一步需要研究的问题。

参考文献:

- [1] 冯军峰. 神经干细胞及肿瘤干细胞与脑肿瘤发生关系的研究[J]. 国外医学: 神经病学神经外科学分册, 2005, 32(2): 167-169.
- [2] Lefranc F, Facchini V, Kiss R. Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas[J]. *Oncologist*, 2007, 12(12): 1395-1403.
- [3] 黄强. 胶质瘤起源细胞探讨[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2003, 8(8): 337-340.
- [4] Nass D, Rosenwald S, Meiri E, et al. MiR-92b and miR-9/9* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors[J]. *brain pathology*, 2009, 19(3): 375-383.
- [5] Maes OC, An J, Sarojini H, et al. Changes in microRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 105(3): 824-834.
- [6] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [7] Miller CR, Perry A. Glioblastoma-Morphologic and molecular genetic diversity [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2007,

- 131(3): 397-406.
- [8] Silber J, Lim DA, Petritsch C, et al. MiR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells[J]. *BMC Medicine*, 2008, 6(1): 14.
- [9] Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(11): 1327-1337.
- [10] Kefas B, Godlewski J, Comeau L, et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the akt pathway and is down-regulated in glioblastoma[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(10): 3566-3572.
- [11] Xia H, QI Y, Ng SS, et al. microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs[J]. *Brain Res*, 2009, 1269: 158-165.
- [12] Hilah G, Gopal P, Andrew A, et al. MIR-451 and Imatinibmesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 38(31): 86-89.
- [13] 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.
- [14] Sengupta S, Nie J, Wagner RJ, et al. MicroRNA 92b controls the G1/S checkpoint gene p57 in human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(7): 1524-1528.
- [15] Haug BH, Henriksen JR, Buechner J, et al. MYCN-regulated miRNA-92 inhibits secretion of the tumor suppressor DICKKOPF-3(DKK3) in neuroblastoma[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(7): 1005-1012.

(收稿日期: 2013-03-06 修回日期: 2013-05-13)

(上接第 2880 页)

- nephropathy in Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II α (Thr286Asp) transgenic mice[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(11): 2953-2962.
- [8] Yasukagawa T, Niwa Y, Simizu S, et al. Suppression of cellular invasion by glybenclamide through inhibited secretion of platelet-derived growth factor in ovarian clear cell carcinoma ES-2 cells[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(10): 1504-1509.
- [9] Keramati AR, Singh R, Lin A, et al. Wild-type LRP6 inhibits, whereas atherosclerosis-linked LRP6R611C increases PDGF-dependent vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(5): 1914-1918.
- [10] Park ES, Yoo JM, Lim Y, et al. Inhibitory effects of docetaxel on platelet-derived growth factor(PDGF)-BB-induced proliferation of vascular smooth muscle cells through blocking PDGF-receptor β phosphorylation[J]. *J Pharmacol Sci*, 2011, 116(2): 204-213.
- [11] Johanna A, Radosa G, Christer B. Role of platelet-derived

- growth factors in physiology and medicine [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(10): 1276-1312.
- [12] Li X, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(1): 118-127.
- [13] Banfi A, von Degenfeld G, Gianni-Barrera R, et al. Therapeutic angiogenesis due to balanced single-vector delivery of VEGF and PDGF-BB[J]. *FASEB J*, 2012, 26(6): 2486-2497.
- [14] 姜坤, 李传勇, 孟庆友, 等. 内皮祖细胞移植治疗慢性深静脉血栓形成的实验研究[J]. *中国普通外科学杂志*, 2010, 25(1): 61-63.
- [15] Wägsäter D, Zhu C, Björck HM, et al. Effects of PDGF-C and PDGF-D on monocyte migration and MMP-2 and MMP-9 expression [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(2): 415-423.

(收稿日期: 2013-01-09 修回日期: 2013-04-22)