

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.009

· 临床研究 ·

下调 miR-183 靶向肿瘤抑制因子 CPEB1 增强脑胶质瘤细胞的放射敏感性

杨森^a, 董立新^a, 张彦秋^a, 付宝红^a, 曹丽艳^a, 毛羽^a, 张庆怀^a, 王光霞^a, 付占昭^a, 吴磊^b, 王东^c (秦皇岛市第一医院 a. 肿瘤放射治疗科; b. 神经外科; c. 检验科, 河北 秦皇岛 066000)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-183 对脑胶质瘤细胞放射敏感性的影响。**方法:** 2020 年 10 月至 2021 年 6 月, 收集秦皇岛市第一医院 40 例脑胶质瘤组织标本, 对 T98G 细胞进行梯度剂量 X 射线 (0、2、4、6 Gy) 照射。采用 qPCR 检测 miR-183、细胞质多腺苷酸化元件结合蛋白 1 (cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1, CPEB1) 在脑胶质瘤组织、T98G 细胞和经 X 射线照射的 T98G 细胞中的表达量。将 miR-183 inhibitor 转染 T98G 细胞后下调 miR-183 表达, 经 6 Gy X 射线垂直照射, CCK-8 法、流式细胞术和 WB 法, 分别检测 T98G 细胞增殖能力、细胞凋亡率及 BAX 和 Bcl2 蛋白表达量。Targetscan 软件预测和双荧光素酶报告基因实验检测 miR-183 与 CPEB1 的靶向关系。下调 CPEB1 表达后, 经 6 Gy X 射线照射, 分别用 CCK-8 法、流式细胞术和 WB 法检测 T98G 细胞增殖能力、细胞凋亡率及 BAX 和 Bcl2 蛋白表达量。将 pcDNA-CPEB1 或 CPEB1 siRNA 质粒转染 T98G 细胞, 分别下调或过表达 CPEB1 后, 检测 miR-183 通过 CPEB1 对 T98G 细胞放射敏感性的影响。**结果:** 脑胶质瘤组织和细胞中 miR-183 呈高表达, CPEB1 mRNA 呈低表达。T98G 细胞中 miR-183 的表达量随着 X 射线放射剂量增加而降低 ($P < 0.05$), CPEB1 表达量随着 X 射线放射剂量增加而升高 ($P < 0.05$)。6 Gy X 射线照射 T98G 细胞后, 下调 miR-183 可降低细胞增殖能力、增加细胞凋亡率, 而过表达 miR-183 则起到相反作用 ($P < 0.05$)。miR-183 靶向 CPEB1 mRNA 且负调控 CPEB1 表达。下调 CPEB1 表达后, 经 6 Gy X 射线照射可显著提高 T98G 细胞增殖能力 ($P < 0.05$)、降低细胞凋亡率 ($P < 0.05$), miR-183 可逆转 CPEB1 过表达对细胞 T98G 放射敏感性的促进作用 ($P < 0.05$)。**结论:** 下调 miR-183 的表达能够负调控 CPEB1, 从而增强脑胶质瘤细胞的放射敏感性。

[关键词] miR-183; 细胞质多腺苷酸化元件结合蛋白 1; 脑胶质瘤; 放射敏感性

[中图分类号] R730.54; R739.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2021)10-1015-08

Down-regulation of miR-183 targeted tumor suppressor CPEB1 enhances radiosensitivity of glioma cells

YANG Sen^a, DONG Lixin^a, ZHANG Yanqiu^a, FU Baohong^a, CAO Liyan^a, MAO Yu^a, ZHANG Qinghui^a, WANG Guangxia^a, FU Zhanzhao^a, WU Lei^b, WANG Dong^c (a. Department of Radiation Oncology, b. Department of Neurosurgery, c. Department of Laboratory Medicine, First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of miR-183 on radiosensitivity of glioma cells. **Methods:** From October 2020 to June 2021, tissue samples of 40 cases of brain glioma from the First Hospital of Qinhuangdao were collected. T98G cells were irradiated with gradient dose X-ray (0, 2, 4, 6 Gy). The expression of miR-183 and CPEB1 in glioma tissues, T98G cells and X-ray irradiated T98G cells were detected by qPCR. After transfection of T98G cells with miR-183 inhibitor, the expression of miR-183 was down-regulated. The proliferation ability, apoptosis rate, BAX and Bcl2 protein expression of T98G cells were detected by CCK-8 assay, flow cytometry and WB, respectively, after 6 Gy X-ray vertical irradiation. The targeting relationship between miR-183 and CPEB1 was detected by Targetscan software prediction and dual luciferase reporter gene assay. After down regulating the expression of CPEB1, after 6 Gy X-ray irradiation, the proliferation ability, apoptosis rate, BAX and Bcl2 protein expression of T98G cells were detected by CCK-8 assay, flow cytometry and WB, respectively. T98G cells were transfected with pcDNA-CPEB1 or CPEB1 siRNA plasmid, and after CPEB1 was down-regulated or overexpressed, respectively, the effect of miR-183 on radiosensitivity of T98G cells through CPEB1 was detected.

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题资助项目 (No. 20181196)。Project supported by the Key Medical Science Research Program of Hebei Province (No. 20181196)

[作者简介] 杨森 (1979—), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事肿瘤放射治疗, E-mail: yangsen200507ys@163.com

[通信作者] 董立新 (DONG Lixin, corresponding author), 硕士, 主任医师, 主要从事肿瘤放射治疗, E-mail: w18827114806@163.com

Results: The expression of miR-183 in glioma tissues and cells increased significantly, and the expression of CPEB1 mRNA decreased significantly. The expression of miR-183 in T98G cells decreased with the increase of X-ray radiation dose ($P<0.05$), and the expression of CPEB1 increased with the increase of X-ray radiation dose ($P<0.05$). After 6 Gy X-ray irradiation of T98G cells, down-regulation of miR-183 could reduce cell proliferation and increase apoptosis rate, while overexpression of miR-183 had the opposite effect ($P<0.05$). MiR-183 targeted mRNA CPEB1 and negatively regulated CPEB1 expression. After down-regulation of CPEB1, 6 Gy X-ray irradiation could significantly improve the proliferation of T98G cells ($P<0.05$) and reduce the apoptosis rate ($P<0.05$). MiR-183 could reverse the promoting effect of CPEB1 overexpression on radiosensitivity of T98G cells ($P<0.05$). **Conclusion:** Down-regulation of miR-183 expression can negatively regulate CPEB1, which might enhance the radiosensitivity of glioma cells.

[Key words] miR-183; cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1 (CPEB1); glioma; radiosensitivity

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(10): 1015-1022. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.009]

脑胶质瘤是颅内常见的恶性肿瘤,药物难以彻底治疗,手术后复发率高,预后不良多^[1]。目前,术后联合放化疗是治疗脑胶质瘤的重要手段,但脑胶质瘤对放疗不敏感,通常治疗效果不佳。因此,深入研究脑胶质瘤的发病及肿瘤放射敏感性的机制至关重要。miRNA是一类短的非编码RNA,能够作为基因表达的负调节因子通过增加特定mRNA衰变或抑制翻译来调节靶基因的表达^[2-3]。miRNA能调控细胞生长、细胞凋亡和分化等生物学过程^[4-5],可参与癌症的发生发展,并且与肿瘤的放射敏感性密切相关^[6-8]。miR-183是miRNA家族中的重要成员,其在胃癌、骨肉瘤、肝癌和结肠癌中表达异常,参与调控癌症的增殖、侵袭等过程^[9-12]。然而,miR-183在脑胶质瘤中的表达及其对脑胶质瘤放射敏感性的影响尚不清楚。胞质多聚腺苷酸化元件结合蛋白(cytoplasmic polyadenylation element-binding protein, CPEB)是一类特异序列的mRNA结合蛋白质,而胞质多聚腺苷酸化元件结合蛋白1(CPEB1)是该家族成员之一,在细胞衰老和肿瘤增殖等过程中发挥了重要作用,例如在胃癌、卵巢癌和乳腺癌中具有明显的抑癌作用。miR-183能够靶向CPEB1并在转录后水平抑制CPEB1的表达^[13],然而在胶质瘤T98G细胞中,miR-183是否通过靶向CPEB1发挥作用尚不清楚。因此,本研究对miR-183对脑胶质瘤放射敏感性的影响及其可能的调控机制进行初步探索,为进一步提高脑胶质瘤的放疗效果提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料与主要试剂、仪器

2020年10月至2021年6月从秦皇岛市第一医院收集40例脑胶质瘤组织标本,其中男22例、女18例,年龄25~79岁,中位年龄为52岁。按WHO胶质瘤病理分级标准进行分级:I级6例、II级8例、III级11例、IV级15例。低分化12例、中分化10例、高分化18例。浸润深度 $\leq 1/2$ 者17例, $>1/2$ 者23例。采集30例距病变位置约为5 cm的癌旁组织标本,经病理证实为癌旁正常脑组织。研究方案获得本院伦理委员会

的批准,标本采集经过患者和家属知情同意。标本保存在液氮中备用。脑胶质瘤T98G细胞、正常脑胶质HEB细胞购于上海中国科学院细胞库。DMEM培养基、青链霉素、胎牛血清(FBS)均购自美国Sigma公司,CCK-8试剂盒和细胞凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)和Lipofectamine™2000试剂购自日本TaKaRa公司,辣根过氧化酶标记的二抗和抗Bcl2、BAX、GAPDH多克隆抗体购自上海圣克鲁斯生物公司,inhibitor NC、miR-183 inhibitor、mimic NC、miR-183 mimic、siRNA NC、CPEB1 siRNA、pcDNA-3.1(+)和pcDNA-CPEB1质粒由北京擎科生物有限公司合成,PCR仪购自美国Bio Rad公司,流式细胞仪购自美国Coulter公司。

1.2 细胞培养

在含10% FBS、100 mg/ml链霉素、100 U/ml青霉素的DMEM培养基中培养T98G细胞和HEB细胞,置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱内常规培养。当细胞长满后用0.25%的胰蛋白酶消化并进行传代培养,取处于对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3 细胞转染

对数生长期的细胞铺于12孔板中,细胞汇合至75%时,将培养基更换成无FBS培养基,用无血清培养基稀释重组质粒和Lipofectamine™2000转染试剂,稀释好的重组质粒和Lipofectamine™2000混匀后室温孵育15 min,加到细胞中,或转染后采用0、2、4、6 Gy的X射线垂直照射细胞,收集各组细胞RNA样和蛋白样进行后续实验。

1.4 CCK-8法检测miR-183对细胞增殖能力的影响

对数生长期的细胞长满后用胰蛋白酶进行消化,细胞悬液接种于96孔板中,细胞汇合至70%~80%时,用Lipofectamine™2000转染重组质粒,或取稳定转染的细胞用6 Gy X射线照射,于37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h后弃上清,PBS清洗2次,每孔加入10 μ l CCK-8溶液,孵育4 h后用酶标仪读取450 nm处每孔的光密度(D)值,计算细胞活性,细胞存活率=[(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度)] $\times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术检测 miR-183 对细胞凋亡的影响

对数生长期的细胞长满后用胰蛋白酶进行消化,细胞悬液接种于12孔板中,细胞汇合至75%时,用Lipofectamine™2000转染试剂将各组重组质粒转染至细胞,于细胞培养箱中培养48 h后收集细胞,加入PBS清洗3次,重悬于500 μ l结合缓冲液。细胞密度调整为 1×10^6 个/ml,加入5 μ l Annexin V-FITC和10 μ l PI染液,静置15 min(注意避光)后离心处理。根据细胞凋亡检测试剂盒说明书的步骤,通过流式细胞术仪检测各组细胞的凋亡情况,收集数据进行分析。

1.6 双荧光素酶报告实验验证 miR-183 与 CPEB1 mRNA 的结合

采用Targetscan预测miR-183的靶基因。分别将含有与miR-183结合位点的CPEB1 3'UTR片段和突变体插入pMIR-REPORT载体,记为CPEB1-WT和CPEB1-MUT。将测序鉴定正确的CPEB1-WT或CPEB1-MUT质粒分别与mimic NC或miR-183 mimic共转染T98G细胞,用6 Gy X射线照射后于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养48 h。参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒,检测细胞的荧光素酶活性。

1.7 qPCR检测 miR-183 在脑胶质瘤组织和细胞中的表达

将氮液加入脑胶质瘤组织和癌旁组织标本中进行研磨,破碎后提取各组织中总RNA。取各组处于对数生长期的T98G细胞,用X射线照射后提取细胞RNA。以紫外分光光度仪检测并计算RNA的浓度与纯度,参照相对应的逆转录试剂盒操作步骤逆转录合成cDNA。再以cDNA为模板,进行qPCR检测,反应程序为95 $^{\circ}$ C预变性10 min,95 $^{\circ}$ C变性10 s、60 $^{\circ}$ C退火30 s、72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析实验结果。引物序列:GAPDH基因(450 bp),F为5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'、R为5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3';miR-183基因(188 bp),F为5'-TAT

GGCACTGGTAGAATTCAC-3'、R为5'-GCGAGCAGAGAATTAATACGAC-3';CPEB1基因(232 bp),F为5'-TGCCAGACTTCCAGGACTCA-3'、R为5'-GAGCCAGCTCCCTGGTC-3'。

1.8 WB检测蛋白的表达

根据提取蛋白说明书提取细胞中总蛋白,使用BCA试剂盒测定蛋白质浓度,取适量样品进行SDS-PAGE分离蛋白,以5%的浓缩胶、12%的分离胶进行电泳。采用湿转法将蛋白转到PVDF膜上,加入50 g/L脱脂奶粉溶液于摇床上室温封闭120 min,加入一抗Bcl2抗体(1:1 000)、BAX抗体(1:800)、GAPDH抗体(1:3 000)在4 $^{\circ}$ C下反应过夜,PBST洗涤后,于37 $^{\circ}$ C下加入辣根过氧化物酶标记的二抗反应1 h。避光条件下,滴加化学发光剂进行蛋白显影,使用ImageJ软件分析蛋白的灰度值,蛋白相对表达量=所测蛋白灰度值/GAPDH灰度值。

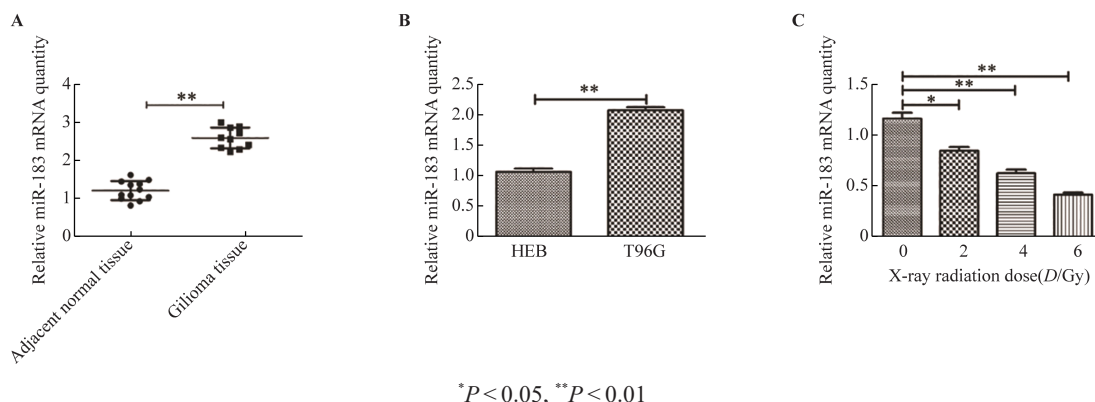
1.9 统计学处理

用GraphPad Prism 5.0软件处理数据,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,至少取3次独立实验结果。组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-183 在脑胶质瘤组织、细胞和 X 射线辐射细胞中的表达量

qPCR检测miR-183在脑胶质瘤组织和细胞中的表达量,结果显示:miR-183脑胶质瘤组织中的表达量明显高于癌旁正常组织($P < 0.01$,图1A);脑胶质瘤T98G细胞中miR-183表达量明显高于正常脑胶质HEB细胞($P < 0.01$,图1B);与未经照射的细胞相比,经不同剂量的X射线(2、4、6 Gy)照射后的细胞中miR-183的表达量呈X射线照射剂量依赖性降低($P < 0.01$,图1C)。



A: Relative expression of miR-183 in glioma and adjacent tissues; B: Relative expression of miR-183 in HEB cells and T98G cells; C: Relative expression of miR-183 in T98G cells irradiated with different doses of X-ray

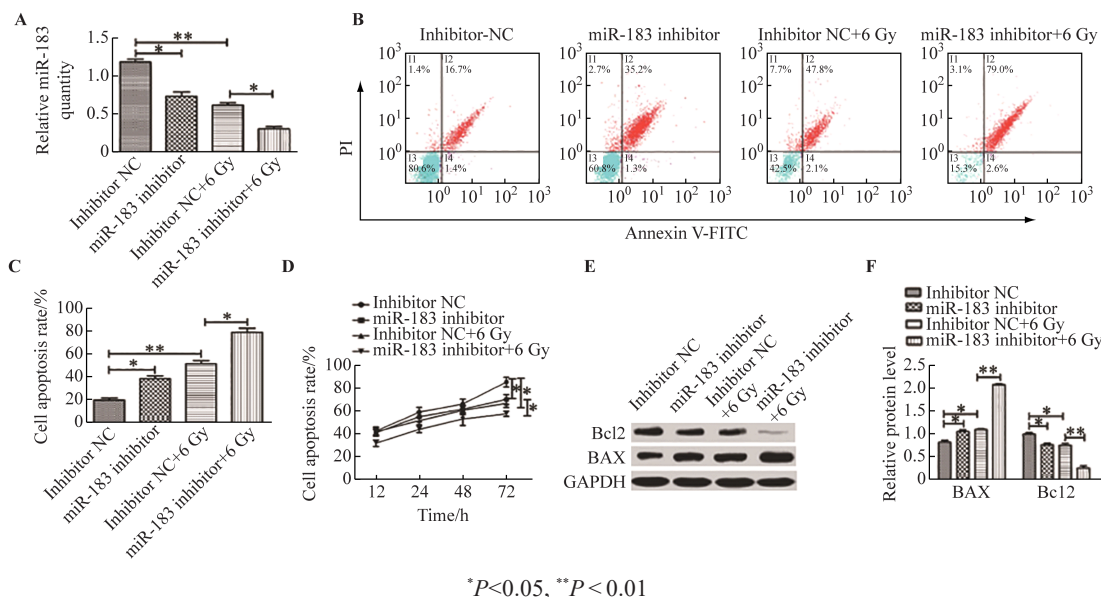
图1 miR-183在脑胶质瘤组织、细胞和X射线辐射细胞中的表达量

Fig.1 Expression of miR-183 in glioma tissues, cells, and X-ray irradiated cells

2.2 下调 miR-183 增强 T98G 细胞的放射敏感性

下调 miR-183 后检测其 T98G 细胞的放射敏感性影响, 结果(图 2)显示: 与 inhibitor NC 组相比, miR-183 inhibitor 组 miR-183 表达量降低($P<0.05$), 细胞增殖能力下降($P<0.05$), 细胞凋亡率增加($P<0.05$), BAX 表达量升高($P<0.05$), Bcl2 表达量降低($P<0.05$); 与 inhibitor NC 组相比, inhibitor NC+6 Gy 组 miR-183 表

达量明显降低($P<0.01$), 细胞增殖能力下降($P<0.05$), 细胞凋亡率明显增加($P<0.01$), BAX 表达量升高($P<0.05$), Bcl2 表达量降低($P<0.05$); 与 inhibitor NC+6 Gy 组相比, miR-183 inhibitor+6 Gy 组的 miR-183 表达量降低($P<0.05$), 细胞增殖能力下降($P<0.05$), 细胞凋亡率增加($P<0.05$), BAX 表达量明显升高($P<0.01$), Bcl2 表达量明显降低($P<0.01$)。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$

A: Relative expression of miR-183 detected by qPCR; B: Apoptosis of T98G cells measured by flow cytometry; C: Statistics of T98G cells apoptosis; D: Growth activity of T98G cells detected by CCK-8 assay; E: Expression of Bcl2 and BAX detected by WB; F: Relative expression of Bcl2 and BAX

图2 下调 miR-183 增强 T98G 细胞的放射敏感性

Fig.2 Down regulation of miR-183 enhanced the radiosensitivity of T98G cells

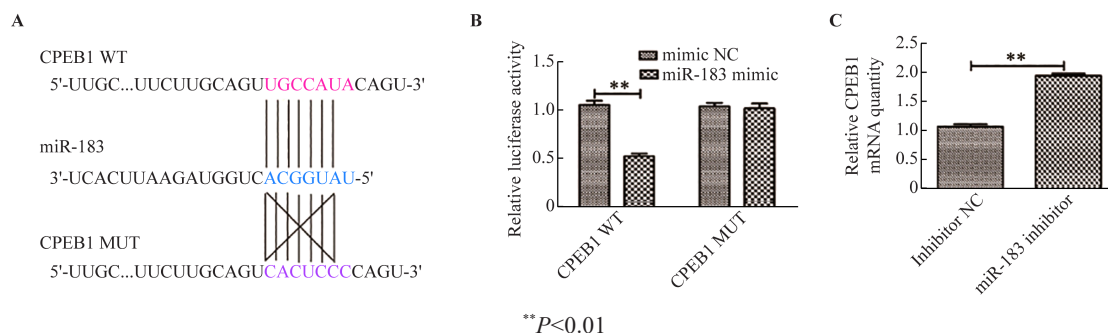
2.3 miR-183 和 CPEB1 mRNA 之间的靶向和调控关系

Targetscan 预测结果(图 3A)显示, miR-183 和 CPEB1 mRNA 之间存在结合位点。

双荧光素酶报告基因检测结果显示, 当质粒携带 CPEB1 3'UTR WT 时, miR-183 mimic 组的荧光素酶活

性较 mimic NC 组显著降低($P<0.01$, 图 3B); 当质粒携带 CPEB1 3'UTR MUT 时, miR-183 mimic 组的荧光素酶活性较 mimic NC 组无显著差异($P>0.05$, 图 3B)。

qPCR 检测结果(图 3C)显示, 与 inhibitor NC 组相比, miR-183 inhibitor 组 CPEB1 mRNA 的表达量明显上升($P<0.01$)。



** $P<0.01$

A: Binding sites between miR-183 and CPEB1 mRNA predicted by Targetscan; B: Determination of relative luciferase activity; C: Relative expression of CPEB1 mRNA detected by qPCR

图3 miR-183 和 CPEB1 mRNA 之间的靶向调控关系

Fig.3 Targeted regulatory relationship between miR-183 and CPEB1 mRNA

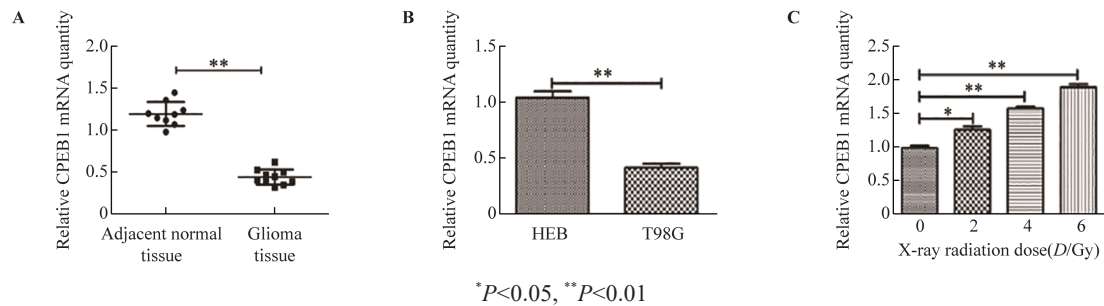
2.4 CPEB1 mRNA 在脑胶质瘤组织、细胞和 X 射线辐射细胞中的表达

在脑胶质瘤组织、细胞和 X 射线辐射细胞中检测

CPEB1 mRNA 的表达, 结果显示, CPEB1 mRNA 在脑胶质瘤组织中的表达量明显低于癌旁组织($P<0.01$, 图 4A); T98G 细胞中 CPEB1 表达量明显低

于正常脑胶质 HEB 细胞 ($P<0.01$, 图 4B); 与 0 Gy 剂量 X 射线照射的细胞相比, 经不同剂量的 X 射线

(2、4、6 Gy) 照射后的细胞中 CPEB1 的表达量随 X 射线照射剂量依赖性升高 ($P<0.01$, 图 4C)。



A: Relative expression of CPEB1 mRNA in glioma and adjacent tissues; B: Relative expression of CPEB1 mRNA in HEB cells and T98G cells; C: Relative expression of CPEB1 mRNA in T98G cells irradiated with different doses of X-ray

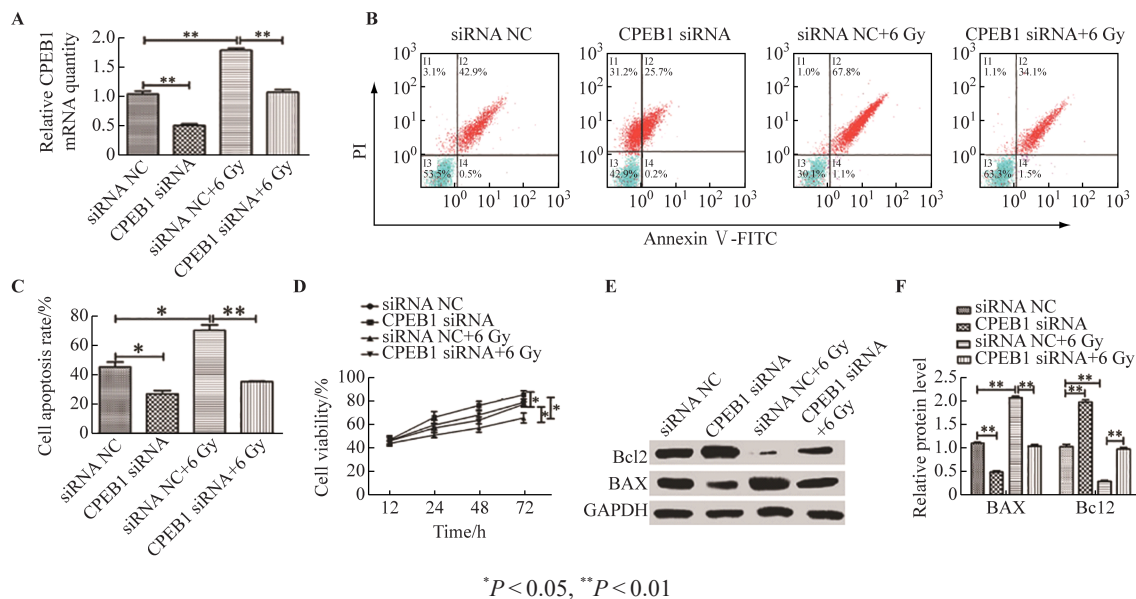
图 4 CPEB1 在脑胶质瘤组织、细胞和 X 射线辐射细胞中的表达

Fig.4 Expression of CPEB1 in glioma tissues, cells and X-ray irradiated cells

2.5 下调 CPEB1 抑制 T98G 细胞的放射敏感性

下调 CPEB1 后检测 T98G 细胞的放射敏感性, 结果 (图 5) 显示: 与 siRNA NC 组相比, CPEB1 siRNA 组 CPEB1 mRNA 表达量明显降低 ($P<0.01$), 细胞增殖能力升高 ($P<0.05$), 细胞凋亡率下降 ($P<0.05$), BAX 表达量明显降低 ($P<0.01$), Bcl2 表达量明显升高 ($P<0.01$); 与 siRNA NC 组相比, siRNA NC+6Gy 组 CPEB1

mRNA 表达量明显升高 ($P<0.01$), 细胞增殖能力降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡率增加 ($P<0.05$), BAX 表达量明显升高 ($P<0.01$), Bcl2 表达量明显降低 ($P<0.01$); 与 siRNA NC+6Gy 组相比, CPEB1 siRNA+6Gy 组的 CPEB1 mRNA 表达量明显降低 ($P<0.01$), 细胞增殖能力升高 ($P<0.05$), 细胞凋亡率降低 ($P<0.01$), BAX 表达量明显降低 ($P<0.01$), Bcl2 表达量明显升高 ($P<0.01$)。



A: Relative expression of CPEB1 mRNA detected by qPCR; B: Apoptosis of T98G cells measured by flow cytometry; C: Statistics of T98G cells apoptosis; D: Growth activity of T98G cells detected by CCK-8 assay; E: Expression of Bcl2 and BAX detected by WB; F: Relative expression of Bcl2 and BAX

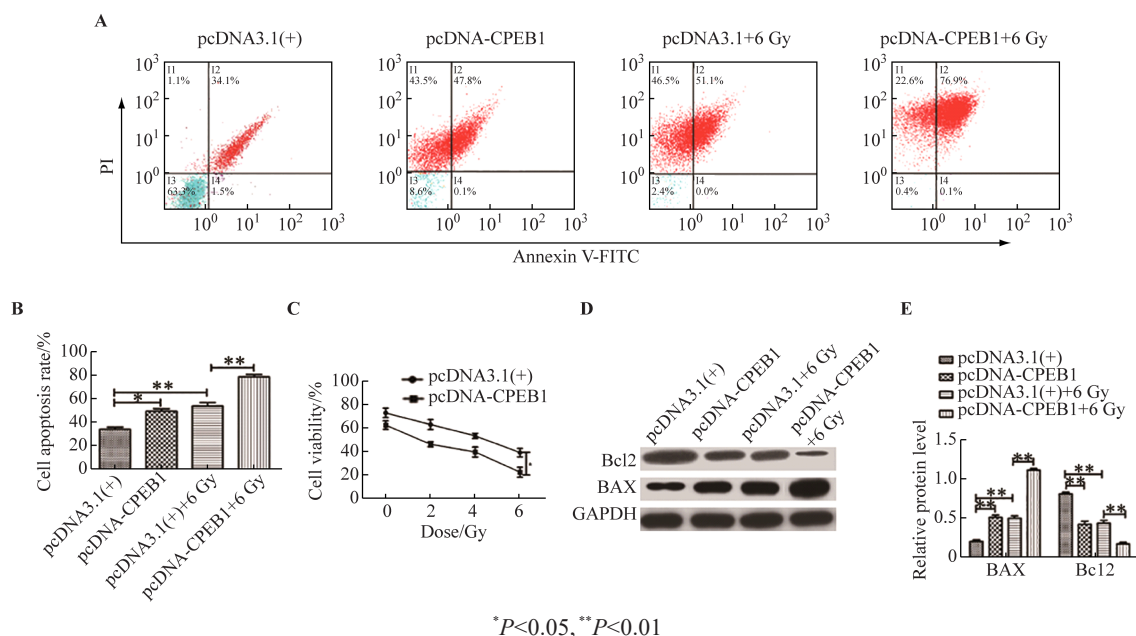
图 5 下调 CPEB1 mRNA 表达抑制 T98G 细胞的放射敏感性

Fig.5 Down regulation of CPEB1 mRNA expression inhibited the radiosensitivity of T98G cells

2.6 过表达 CPEB1 增强 T98G 细胞的放射敏感性

过表达 CPEB1 后观察其对 T98G 细胞的放射敏感性的影响, 结果 (图 6) 可见, 与 pcDNA-3.1(+) 组相比, pcDNA-CPEB1 组细胞增殖能力降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡率上升 ($P<0.05$), BAX 表达量明显升高 ($P<0.01$), Bcl2 表达量明显降低 ($P<0.01$); 与 pcDNA-3.1(+) 组相比, pcDNA-3.1(+)+6Gy 组的细胞凋亡率增加

($P<0.01$), BAX 表达量明显升高 ($P<0.01$), Bcl2 表达量明显降低 ($P<0.01$); 与 pcDNA-3.1(+)+6Gy 组相比, pcDNA-CPEB1+6Gy 组细胞增殖能力降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡率明显上升 ($P<0.01$), BAX 表达量明显升高 ($P<0.01$), Bcl2 表达量明显降低 ($P<0.01$)。上述结果表明, 过表达 CPEB1 能够增强 T98G 细胞的放射敏感性。



A: Apoptosis of T98G cells measured by flow cytometry; B: Statistics of T98G cells apoptosis; C: Growth activity of T98G cells detected by CCK-8 assay; D: Expression of Bcl2 and BAX detected by WB; E: Relative expression of Bcl2 and BAX

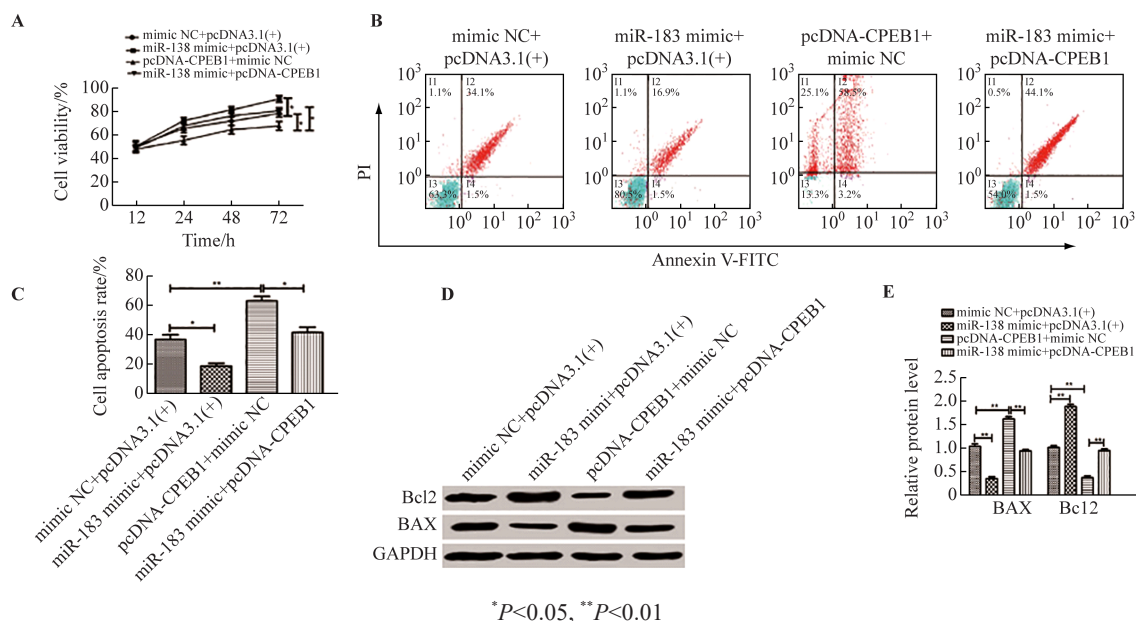
图6 过表达CPEB1 mRNA增强T98G细胞的放射敏感性

Fig.6 Overexpression of CPEB1 mRNA enhanced the radiosensitivity of T98G cells

2.7 miR-183通过CPEB1调控T98G细胞的放射敏感性

检测miR-183通过CPEB1发挥对T98G细胞放射敏感性的调控作用,结果(图7)显示:T98G细胞经X射线照射后,与mimic NC+pcDNA-3.1(+)组相比,miR-138 mimic+pcDNA-3.1(+)组细胞增殖能力增加($P < 0.05$),细胞凋亡率下降($P < 0.05$),BAX表达量明显降低($P < 0.01$),Bcl2表达量明显升高($P < 0.01$);与mimic NC+pcDNA-3.1(+)组相比,pcDNA-CPEB1+

mimic NC组的细胞增殖能力下降($P < 0.05$),细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$),BAX表达量明显升高($P < 0.01$),Bcl2表达量明显降低($P < 0.01$);与pcDNA-CPEB1+mimic NC组相比,miR-138 mimic+pcDNA-CPEB1组的细胞增殖能力上升($P < 0.05$),细胞凋亡率下降($P < 0.05$),BAX表达量明显降低($P < 0.01$),Bcl2表达量明显升高($P < 0.01$)。上述结果表明,过表达miR-183能够通过CPEB1抑制T98G细胞的放射敏感性。



A: Growth activity of T98G cells detected by CCK-8 assay; B: Apoptosis of T98G cells measured by flow cytometry; C: Statistics of T98G cells apoptosis; D: Expression of Bcl2 and BAX detected by WB; E: Relative expression of Bcl2 and BAX

图7 miR-183通过CPEB1调控T98G细胞的放射敏感性

Fig.7 miR-183 regulated the radiosensitivity of T98G cells through CPEB1

3 讨论

miRNA是一种较短的单链非编码RNA,不能被翻译成蛋白质或寡肽。在某些情况下,miRNA可通过与mRNA结合来调控转录后的基因表达。miRNA参与多种恶性肿瘤的发生发展,且通过mRNA来调控癌症的放射敏感性。例如,过表达miR-34b可增强非小细胞肺癌细胞的放射敏感性^[6],miR-200c通过靶向泛醌蛋白1(Ubiquinone protein 1,UBQLN1)抑制乳腺癌细胞的自噬并增强其放射敏感性^[7],miR-328-3p能够增强骨肉瘤细胞的放射敏感性并通过磷酸化组蛋白(Phosphorylated histone, H2AX)调节细胞凋亡和细胞增殖能力^[8],miR-320通过直接靶向叉头盒蛋白质M1(Forkhead box protein M1,FOX M1)下调信号调节因子1(silent information regulator 1,SIRT1)从而增强胶质瘤细胞的放射敏感性^[14],miR-33a-5p通过抑制黑素瘤细胞的糖酵解增加其放射敏感性^[15]。上述研究均表明,miRNA与肿瘤的放射敏感性密切相关。miR-183在脑胶质瘤中的表达和调控机制尚不清楚,因此,本研究探讨miR-183在脑胶质瘤放射敏感性中的临床意义,结果发现,miR-183在脑胶质瘤组织和细胞中的表达均上调,经X射线照射后,miR-183的表达随照射剂量的增加而降低,且下调miR-183后进行X射线照射使T98G细胞增殖能力下降、细胞凋亡率明显增加,表明下调miR-183能够增强T98G细胞的放射敏感性。

本研究通过生物信息学分析和双荧光素酶实验发现,在脑胶质瘤T98G细胞中,CPEB1可能是miR-183的靶基因,miR-183能靶向负调控CPEB1 mRNA的表达。CPEB1是CPEB蛋白家族的成员之一,在卵巢、肝脏及肾脏中均有表达,参与调节细胞分化、衰老、侵袭和血管生成等生物学过程^[16]。CPEB1可能通过调控细胞周期蛋白B1的合成来调控细胞的生长,参与调控肿瘤的发生、增殖、EMT和凋亡等过程,下调CPEB1的表达可使扭曲蛋白1(twist 1)表达升高,进一步促进乳腺癌的EMT和转移^[16-17];CPEB1通过下调发状分裂相关增强子1(hairy and enhancer of split 1, Hes1)和信号调节因子1(silent information regulator 1,SIRT1)的表达来调节胶质瘤干细胞的分化^[18]。有文献^[19]报道,在转移性逐渐增强的人乳腺癌细胞中,CPEB1表达减少,而MMP9表达增加,表明CPEB1对MMP9 mRNA表达的调控在一定程度上介导了乳腺癌细胞的转移。此外,CPEB1是放射疗法治疗局部晚期非小细胞肺癌的重要靶点^[20]。先前的研究均阐明了CPEB1在肿瘤发展过程中的关键作

用,而在本研究中发现,CPEB1在脑胶质瘤组织和细胞中均呈低表达,T98G细胞经X射线照射后,CPEB1的表达随照射剂量依赖性升高,因此推测CPEB1的异常表达可能与脑胶质瘤细胞的发展和放射敏感性有关。后续探讨发现,下调CPEB1能够抑制T98G细胞的放射敏感性,而且过表达miR-183能够通过CPEB1抑制T98G细胞的放射敏感性,提示miR-183及其作用靶点CPEB1充分参与了脑胶质瘤细胞的发展和放射敏感性,但其具体作用机制还需要进一步深入探讨。

综上所述,下调miR-183靶向肿瘤抑制因子CPEB1增强了脑胶质瘤的放射敏感性,这为深入了解脑胶质瘤的发展机制,进一步改善脑胶质瘤患者的放射敏感性提供了新的实验基础。

[参考文献]

- [1] 汪红艳,刘煜.受体介导靶向恶性脑胶质瘤递药系统的研究进展[J]. 药物资讯, 2018, 7(2): 27-32. DOI: 10.12677/pi.2018.72006.
- [2] ZHANG S W, ZHANG Q X, SHI G G, et al. MiR-182-5p regulates BCL2L12 and BCL2 expression in acute myeloid leukemia as a potential therapeutic target[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97:1189-1194. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.002.
- [3] GAN M, ZHENG T, SHEN L Y, et al. Genistein reverses isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by regulating miR-451/TIMP2[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108618. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108618.
- [4] FAN N, ZHANG J, CHENG C, et al. MicroRNA-384 represses the growth and invasion of non-small-cell lung cancer by targeting astrocyte elevated gene-1/Wnt signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 1331-1337. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.143.
- [5] WANG Y, XUE J, KUANG H, et al. microRNA-1297 inhibits the growth and metastasis of colorectal cancer by suppressing cyclin D2 expression [J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(11): 991-999. DOI: 10.1089/dna.2017.3829.
- [6] BALÇA-SILVA J, SOUSA NEVES S, GONÇALVES A C, et al. Effect of miR-34b overexpression on the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines [J]. Anticancer Res, 2012, 32 (5): 1603-1609. PMID: 22593439.
- [7] SUN Q Q, LIU T X, YUAN Y W, et al. miR-200c inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in breast cancer cells by targeting UBQLN1[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): 1003-1012. DOI: 10.1002/ijc.29065.
- [8] YANG Z, WA Q D, LU C, et al. miR3283p enhances the radiosensitivity of osteosarcoma and regulates apoptosis and cell viability via H2AX [J]. Oncol Rep, 2018, 39(2): 545-553. DOI: 10.3892/or.2017.6112.
- [9] CAO L L, XIE J W, LIN Y, et al. miR-183 inhibits invasion of gastric cancer by targeting Ezrin [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(9):5582-5594. PMID:PMC4203171.

- [10] SUN X, XU Y, ZHANG S, et al. MicroRNA183 suppresses the vitality, invasion and migration of human osteosarcoma cells by targeting metastasis associated protein 1[J]. *Experimental & Ther Med*, 2018, 15(6): 7265-7272. DOI: 10.3892/etm.2018.6068.
- [11] 杨光,王占宝,董昕,等. MiR-183及let-7家族在肝癌患者血清中的表达[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2019, (4):438-442. DOI: 10.3969/j.issn.1007-6948.2019.04.003.
- [12] 叶进军,辛乐,刘继东,等. 血清微小RNA-183在结肠癌诊断中的价值[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(10):1937-1939.
- [13] TANG H, BIAN Y, TU C, et al. The miR-183/96/182 cluster regulates oxidative apoptosis and sensitizes cells to chemotherapy in gliomas [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(2):221-31. DOI: 10.2174/1568009611313020010.
- [14] LI T F, MA J, HAN X W, et al. microRNA-320 enhances radiosensitivity of glioma through down-regulation of sirtuin type 1 by directly targeting forkhead box protein M1 [J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(2): 205-212. DOI: 10.1016/j.tranon.2017.12.008.
- [15] CAO K, LI J, CHEN J, et al. microRNA-33a-5p increases radiosensitivity by inhibiting glycolysis in melanoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(48): 83660-83672. DOI: 10.18632/oncotarget.19014.
- [16] CHEN Y, TSAI Y H, TSENG S H. Regulation of the expression of cytoplasmic polyadenylation element binding proteins for the treatment of cancer[J]. *Anti Res*, 2016, 36(11): 5673-5680. DOI: 10.21873/anticancer.11150.
- [17] NAGAOKA K, FUJII K, ZHANG H, et al. CPEB1 mediates epithelial-to-mesenchyme transition and breast cancer metastasis [J]. *Oncogene*, 2016, 35(22): 2893-2901. DOI: 10.1038/onc.2015.350.
- [18] YIN J, PARK G, LEE J E, et al. CPEB1 modulates differentiation of glioma stem cells via downregulation of HES1 and SIRT1 expression[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 6756-6769. DOI: 10.18632/oncotarget.2250.
- [19] SONG J J, FAN X X, ZHAO Z W, et al. 125I brachytherapy of locally advanced non-small-cell lung cancer after one cycle of first-line chemotherapy: a comparison with best supportive care [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 1345-1352. DOI: 10.2147/OTT.S129903.

[收稿日期] 2021-03-26

[修回日期] 2021-08-03

[本文编辑] 韩丹