

MiR-150 在大鼠垂体瘤细胞中的表达及其对细胞增殖的影响

王义彪, 赵建农, 王鹏程, 刘小丘, 彭浩
(海南省人民医院神经外科, 海南 海口 570311)

【摘要】 目的 探讨微小核糖核酸-150 (miR-150)在大鼠垂体瘤细胞中的表达及其对垂体细胞增殖的影响。方法 选用5周龄Fischer344雌性大鼠20只,按实验要求分为对照组($n=10$)与观察组(垂体瘤组, $n=10$)。观察组大鼠皮下埋置10 mg雌激素缓释泵诱导垂体瘤模型,对照组小鼠皮下埋置生理盐水缓释泵作为对照。造模成功后,观察组及对照组分别取垂体瘤组织及正常垂体组织,采用实时荧光定量PCR (qPCR)检测miR-150的表达。培养正常的大鼠垂体细胞,用miR-150 mimics和miR-150 mimics control分别转染正常的垂体细胞,并观察其对细胞增殖功能的影响。结果 结果显示观察组组织中miR-150的表达量为 (0.39 ± 0.10) ,明显低于对照组的 (1.47 ± 0.37) ,差异有统计学意义($P<0.05$);转染miR-150 mimics的正常垂体细胞增殖 (1.16 ± 0.11) ,相对于转染miR-150 mimics control的 (1.82 ± 0.13) 显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 miR-150在垂体瘤中表达下调,其可能调控垂体细胞的增殖从而抑制垂体瘤的发生。

【关键词】 微小核糖核酸-150;垂体瘤;垂体瘤细胞;增殖

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2017)14-2243-03

Expression of microRNA-150 and its effect on cell proliferation of microRNA-150 in pituitary tumor cells of rats. WANG Yi-biao, ZHAO Jian-nong, WANG Peng-cheng, LIU Xiao-qiu, PENG Hao. Department of Neurosurgery, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the expression of microRNA-150 (miR-150) and its effect on cell proliferation in pituitary tumor cells of rats. **Methods** Twenty Fischer344 female rats of five weeks old were selected. They were divided into control group ($n=10$) and observation group (pituitary adenoma group, $n=10$) according to experiment requirements. The observation group was treated by embedding estrogen slow-release pumps subcutaneously to induce model of pituitary adenoma, and the control group were treated with saline sustained-release pump subcutaneously as control. After successful modeling, pituitary adenoma and normal pituitary tissue were respectively extracted in the observation group and the control group. The expressions of miR-150 was detected by real-time quantitative PCR (qPCR). Human pituitary adenoma cells were cultured *in vitro*. MiR-150 mimics and miR-150 mimics control were respectively transfected into normal pituitary cells, and their effect on cell proliferation function was observed. **Results** MiRNA-150

基金项目:海南省自然科学基金(编号:20158354)

通讯作者:彭浩。E-mail:haozigogo@163.com

[4] Pan Y, Bai J, Shen F, et al. Glucocalyxin B induces apoptosis and autophagy in human cervical cancer [J]. Cells. Mol Med Rep, 2016, 14 (2): 1751-1755.

[5] Axiotis CA, Monteagudo C, Merino MJ, et al. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in endometrial adenocarcinoma [J]. Am J Pathol, 1991, 138(4): 799-806.

[6] 刘兰娣, 叶丽卡, 潘东军, 等. 蓝萼香茶菜对大鼠全心缺血&再灌注时心肌C-fos基因表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 358-361.

[7] 李梦姣, 顾振纶, 董丽霞, 等. 蓝萼甲素对人肺癌A-549细胞的作用及其机制[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(6): 88.

[8] 杨文华, 张健, 高立文, 等. 蓝萼甲素诱导K562细胞毒作用机制的初步研究[J]. 中国实验方剂学, 2011, 17(19): 181-184.

[9] Wang BJ, Won SJ, Yu ZR, et al. Free radical scavenging and apoptotic effects of Cordyceps sinensis fractionated by supercritical carbon dioxide [J]. Food Chem Toxicol, 2005, 43(4): 543-552.

[10] 夏维, 王修珍, 蒋小岗, 等. 蓝萼甲素对人宫颈鳞癌SiHa细胞株生长抑制作用[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(7): 1035-1036.

[11] 黄敬敬, 王修珍, 蒋小岗, 等. 蓝萼甲素对宫颈癌HeLa细胞的作用及其相关机制研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(3): 421-424.

[12] 李嘉铨, 孙力, 何全中, 等. 蓝萼甲素对宫颈癌HeLa细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 中国保健营养, 2014, 2(中): 576-577.

[13] 李晓敏, 潘莹, 尹宝靓, 等. 蓝萼甲素对人宫颈癌裸鼠移植瘤的作用机制研究[J]. 中国妇幼保健杂志, 2015, 30(35): 6353-6356.

[14] 海广范, 李生莹, 白素平, 等. 蓝萼香茶菜乙素对AGZY细胞周期及细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(7): 1420-1422.

[15] 张雨晴, 张丽慧, 魏尔, 等. Beclin 1在凋亡和自噬中的调节作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(4): 331-338.

[16] Wang ZH, Xu L, Duan ZL, et al. Beclin 1-mediated macroautophagy involves regulation of caspase-9 expression in cervical cancer HeLa cells [J]. Gynecol Oncol, 2007, 107(1): 107-113.

[17] Hu YF, Lei X, Zhang HY, et al. Expressions and clinical significance of autophagy-related markers Beclin1, LC3, and EGFR in human cervical squamous cell carcinoma [J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 2243-2249.

[18] Wang R, Cong WH, Guo G, et al. Synergism between carnosic acid and arsenic trioxide on induction of acute myeloid leukemia cell apoptosis is associated with modulation of PTEN/Akt signaling [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(12): 934-941.

[19] Chang L, Graham PH, Hao J, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways [J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1437.

(收稿日期:2017-03-06)

expression in observation group was (0.39 ± 0.10) , which was significantly lower than (1.47 ± 0.37) in control group ($P < 0.05$). The cell proliferation of normal pituitary cells transfected with miRNA-150 mimics was (1.16 ± 0.11) , which was significantly lower than (1.82 ± 0.13) of those transfected with miR-150 mimics control ($P < 0.05$). **Conclusion** Expression of miRNA-150 is decreased in pituitary adenoma, which may regulate the proliferation of pituitary cells, thereby inhibiting the occurrence of pituitary adenomas.

【Key words】 miRNA-150 (miR-150); Pituitary adenoma; Pituitary tumor cell; Proliferation

目前垂体瘤的发病机制尚未明确,小分子RNA的出现为临床研究垂体瘤致病基因提供了新的途径,microRNA(微RNA,miRNA)作为小RNA的一种,是一种非编码调控RNA家族。研究表明miRNA参与了肿瘤形成的调节过程^[1]。miR-150在胃癌、胰腺癌等肿瘤的发生发展中起到重要作用^[2]。研究发现Let-7a、miR-15a、miR-16、miR-21、miR-141、miR-143、miR-145和miR-150参与了ACTH型垂体瘤的发病,且与肿瘤的大小和复发率相关性比较高^[3]。本研究探讨微小核糖核酸-150(miR-150)在垂体瘤细胞中的表达及垂体瘤细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 总RNA提取试剂Trizol (Invitrogen, USA),反转录试剂盒miRNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen, USA),SYBR Green PCR Kit (BIO-RAD, USA),普通PCR仪(BIO-RAD, USA),NanoDrop 2000c紫外分光光度计(ThermoScientific, USA),荧光定量PCR仪(BIO-RAD, USA)。PCR扩增引物由生工生物公司合成,miR-150 mimics购自锐博公司。细胞培养DMEM培养基及胎牛血清购自Hyclone公司。蛋白提取试剂及BCA定量试剂盒购自碧云天公司。双荧光素酶报告基因系统(Dual-Luciferase Reporter Assay System)试剂盒购自美国Promega公司。MTT增殖检测试剂盒购自碧云天公司。

1.2 动物模型建立 观察组10只Fischer344雌性大鼠;对照组10只相同体质量范围及相同周龄的Fischer344雌性大鼠。实验用大鼠均购自海南大学实验动物中心,在海南大学医学中心的SPF级动物房饲养。观察组大鼠皮下埋置10 mg雌激素缓释泵诱导垂体瘤模型,对照组小鼠皮下埋置生理盐水缓释泵作为对照。饲养室温保持18℃~20℃环境,相对湿度40%~70%。造模8周后,彩超观察垂体瘤形成情况,如无明显垂体瘤形成,继续放置缓释泵或更换新的缓释泵继续造模。观察组及对照组分别取垂体瘤组织及正常垂体组织,用于下一步实验。

1.3 细胞培养 垂体细胞取自Fischer344雌性大鼠的正常垂体组织。在超净台中将用干冰保存的细胞悬液转入含有5 mL配制好的1640培养基的小号无菌细胞培养瓶中,在37℃,5% CO₂细胞培养箱中进行培养。体外实验均分为两组,其中观察组转染miR-150 mimics(模拟生物体内源的miRNA),对照组转染miR-150 mimics control(miR-150 mimics的阴

性对照)。按照Lipo2000转染试剂说明转染miR-150 mimics和miR-150 mimics control,之后按照相应实验需要孵育后收集细胞进行实时荧光定量PCR(qPCR)实验^[4]。

1.4 RNA提取 每100 mg垂体瘤组织和正常垂体组织标本中加入1 mL Trizol试剂,冰上充分裂解。将混匀后的组织标本加入Eppendorf管中,剧烈震荡15 s,静置5 min。加入氯仿0.2 mL,充分混匀后室温静置5 min。在4℃下,以12 000 r/min离心10 min。吸去上清后转入新的Eppendorf管中,加入异丙醇0.2 mL,混匀后放置于冰上10 min。再次在4℃,12 000 r/min条件下离心10 min。去上清后留取沉淀。加入1 mL 75%已经预冷的乙醇,洗涤沉淀RNA。7 000 r/min离心5 min。吸去乙醇后空气干燥3 min。加入4℃ DEPC水以充分溶解。

1.5 qPCR 将培养好的正常垂体细胞分别通过转染miRNA-150 mimics和miR-150 mimics control提取RNA,并按照SYBR Green PCR试剂盒说明书,以合成的cDNA作为模版在荧光定量PCR仪上进行qPCR反应。PCR反应体系为:模版cDNA 0.2 μL,miR-150引物0.6 μL,SYBR Green PCR Mix 5 μL,miRNA-150上游引物为5'-CGGAATGTGAAGTACTAAGTAT-3',下游引物为Qiagen公司试剂盒提供的通用引物;以U6为作为内参,U6上游引物为5'-CTCGCTTCGCGCAGCACA-3',下游引物为5'-ACGCTTACGAATTTGCGT-3',加DEPC水至反应总体积为10 μL。PCR反应条件为:95℃ 2 min,随后95℃ 5 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共40个循环。经qRT-PCR扩增得到各目的基因的循环阈值(Ct)值,以2^{-ΔΔCT}相对定量的方法分析miR-150与U6拷贝数的比值。

1.6 增殖实验 96孔板内每孔培养7 000个正常垂体细胞,实验分为miR-150 mimics组和miR-150 mimics control组。细胞转染后使用MTT增殖检测试剂盒检测转染细胞48 h后的增殖率,酶标仪490波长下检测细胞的增殖情况。以上所有的实验至少独立重复3次^[5]。

1.7 统计学方法 应用SPSS22.0软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较和组内比较分别采用成组t检验和配对t检验;以P < 0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-150在大鼠垂体瘤组织和正常垂体组

织中的表达特征 观察组组织中 miRNA-150 的表达量为(0.39±0.10), 对照组织 miRNA-150 的表达量为(1.47±0.37), 观察组 miRNA-150 表达量明显低于对照组, 差异有显著统计学意义($t=0.376, P<0.01$)。

2.2 miR-150 对正常垂体细胞增殖的影响 为了验证 miR-150 对正常垂体细胞增殖的影响, 使用 miR-150 mimics 和 miR-150 mimics control 分别转染正常垂体细胞, 使用 MTT 法检测细胞增殖。结果显示, 转染 miR-150 mimics 的正常垂体细胞增殖(1.16±0.11), 相对于转染 miR-150 mimics control 的(1.82±0.13)显著减少, 差异有统计学意义($t=1.795, P<0.05$) (图 1、图 2)。

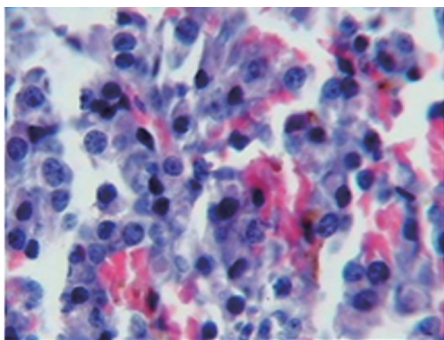


图 1 转染 miR-150 mimics control 的正常垂体细胞明显增多(HE×400)

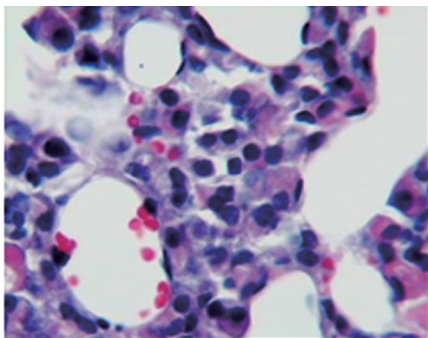


图 2 转染 miR-150 mimics 的正常垂体细胞数量较少(HE×400)

3 讨论

近年来, miRNAs 作为细胞生命活动的重要调控因子, 越来越多地被用于研究肿瘤细胞的生命活动改变^[6]。miRNAs 是一类非编码小型 RNA 分子, 几乎参与人体的每一项生理活动过程^[7]。miRNAs 主要在转录后水平调节细胞的生理功能, 它们特异性地结合到其靶基因 mRNA 的 3' 非编码区段, 调节靶基因 mRNA 的转录, 使其降解或抑制其转录, 进而抑制相应蛋白质的合成, 最终发挥调节细胞的生命活动功能, 如细胞的生长、增殖、分化、迁移和凋亡等^[8-10]。目前, miR-150 在垂体瘤中研究尚未见文献报道。本研究通过构建垂体瘤模型对 miR-150 在垂体瘤中的作用做了一些相关研究^[11]。本研究发现 miR-150 在大鼠垂体瘤中的表达相对于正常垂体中明显下调, 提示

miR-150 在垂体瘤的形成和发展中起到了一定的作用, 但 miR-150 在垂体瘤的形成和发展中发挥什么作用, 以及通过什么机制调控垂体瘤的进展目前尚不清楚^[14]。垂体瘤细胞的增殖活力从某种程度上可以反映肿瘤的恶性程度^[12]。通过本研究我们发现当增加 miR-150 的表达时可抑制正常垂体细胞的增殖, 提示 miR-150 在垂体细胞转变为垂体瘤细胞的发展过程中, 通过对垂体细胞的增殖和凋亡两个过程起到调节作用。

综上所述, miR-150 在垂体瘤中的表达下调, 并通过细胞学方法在模拟环境中运用 miR-150 mimics 干预正常的垂体细胞, 降低垂体细胞增殖能力, 提示 miR-150 参与垂体细胞向垂体瘤细胞的转变的发生和发展过程。

参考文献

- [1] Wm G, Berezikov E. Controlling miRNA regulation in disease [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 822: 1-18.
- [2] Palumbo T, Faucz FR, Azevedo M, et al. Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTEN-AKT pathway [J]. *Oncogene*, 2013, 32(13): 1651-1659.
- [3] 王东. 神经肽 Y 和 miRNA 在垂体瘤细胞中的作用及相关性[D]. 天津: 天津医科大学, 2011.
- [4] 李东. miRNA 对垂体瘤细胞株中增生细胞核抗原、垂体瘤转化基因、血管内皮细胞生长因子表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(24): 7033-7035.
- [5] 段家峰, 张秋娟, 施扬, 等. miRNA 与垂体瘤发病机制关系的研究进展[J]. *齐鲁医学杂志*, 2016, 31(2): 240-241.
- [6] Amaral FC, Torres N, Saggioro F, et al. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(1): 320-323.
- [7] Hayashi H, Sakai K, Baba H, et al. Thrombospondin-1 is a novel negative regulator of liver regeneration after partial hepatectomy through transforming growth factor-beta activation in mice [J]. *Hepatology*, 2012, 55(5): 1562-1573.
- [8] 徐川, 张怀璧, 康继辉, 等. miRNA 在 PRL 型垂体瘤患者血清中的表达[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(7): 1602-1605.
- [9] 许橙. miRNA-141-3P 和 miRNA-346 在大鼠腺垂体中靶基因的识别与验证[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [10] Recouvreux MV, Camilletti MA, Rifkin DB, et al. Thrombospondin-1 (TSP-1) analogs ABT-510 and ABT-898 inhibit prolactinoma growth and recover active pituitary transforming growth factor-beta (TGF-beta) [J]. *Endocrinology*, 153(8): 3861-3871.
- [11] Jiang M, Mou CZ, Han T, et al. Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta levels in prolactinoma and their clinical significance [J]. *J Int Med Res*, 40(4): 1284-1294.
- [12] Dayer C, Stamenkovic I. Recruitment of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) to the fibroblast cell surface by lysyl hydroxylase 3 (LH3) triggers transforming growth factor-beta (TGF-beta) activation and fibroblast differentiation [J]. *J Bio Chem*, 2015, 290(22): 13763-13778.

(收稿日期: 2017-03-15)