DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2020.02.016

·论著:神经系统疾病·

miRNA Let-7对神经母细胞瘤细胞的抑制作用及其机制

宋 楠*,徐 宁,金 莉
(鞍山市肿瘤医院化疗四病区,辽宁 鞍山 114000)

摘 要: 为研究miRNA Let-7神经母细胞瘤(NB)的抑制作用,本研究采用小RNA干扰技术(siRNA)降低miRNA Let-7的表达,PCR法检测miRNA Let-7表达,Western blotting检测相关凋亡蛋白的表达,采用吸光度值反映细胞的增殖情况,Transwell方法检测细胞转移。结果显示,与未转染组和si-NC(携带空质粒的干扰RNA)转染组细胞相比,siRNA-Let-7转染组细胞的数量增多,Cleaved casp-3、Bax mRNA及其蛋白显著增高,而Bcl-2 mRNA及蛋白表达显著降低。结果表明,miRNA Let-7能够通过抑制细胞的增殖、迁移和侵袭能力和促进细胞的凋亡,进而对神经母细胞瘤有重要抑制作用。

关键词: Let-7; 神经母细胞瘤; 增殖; 转移
中图分类号:R729 **文献标识码:**A

The inhibitory effects of miRNA Let-7 on neuroblastoma cells

SONG Nan*, XU Ning, JIN Li
(*The 4th Ward of Chemotherapy Department, Anshan Tumor Hospital, Anshan* 114000, *Liaoning, China*)

Abstract: To explore the miRNA Let-7 on the proliferation, metastasis and apoptosis of neuroblastoma(NB), The technology of siRNA was used to interfere on the expression of miRNA Let-7 in this study, the PCR was used to test the expression of miRNA Let-7, Western blotting was used to test the expression of related proteins of apoptosis. the absorbance of cells was used to analyze the proliferation of cells, Transwell was test immigration. The results showed, compared to the no transfection group and si-NC group, the number of cells was increased, the expression of Cleaved casp-3, Bax mRNA and protein levels were significantly increased in siRNA-Let-7 group, while bcl-2 mRNA and protein levels were lower. Overall, miRNA Let-7 has an important inhibitory effect on neuroblastoma by inhibiting cell proliferation, migration and invasion and promoting cell apoptosis.

Key words: Let-7; neurocytoma; proliferation; transfer

神经母细胞瘤(neurocytoma,NB)多发生在肾上腺、腹部、胸部、颈部等神经组织,并且其恶性程度高、病情多变、易转移、易复发,所以治疗神经母细胞瘤比较困难,患者死亡率高,预后差[1-3],因此,治疗神经母细胞瘤关键是抑制其生长和转移,以提高病人的生存率。Let-7是一类高度保守的miRNA分子,最早发现于秀丽隐杆线虫中。研究发现[4],Let-7具有肿瘤抑制基因的作用,它可调节c-myc、ras等基因表达来发挥抗癌的作用。而Let-7能否用于治疗神经母细胞瘤还未见报道,因此,本文考察了miRNA Let-7对SH-SY5Y(神经母细胞瘤细胞株)细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响。

收稿日期:2019-09-26;**修回日期:**2020-01-20

* **通信作者,**E-mail:qq351059847@163.com.

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞株购自上海冠导生物有限公司,Bcl-2抗体、Bax抗体、Caspase 3抗体购自Abcam(英国),DMEM培养液(美国Gibco),Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen。相差显微镜(日本Nikon),荧光定量PCR仪购自Step oneplus PCR System(ABI),引物沈阳鼎国生物公司合成捷基合成(见表1)。

1.2 瞬时转染神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞[5]

将生长状态良好的神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞以4×10^5个/孔铺于6孔板内,当细胞融合率达到30%~40%时,将50 nmoL/L的siRNA-Let-7或si-

NC 加入 Lipofectamine 2000 转染到神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞，具体步骤参照说明书，充分混匀，放入培养箱中培养 12 h、24 h、48 h，然后进行检测，实验重复 3 次。

表 1　各引物序列

引物	序列(5′-3′)
GAPDH	上游:5′-TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC-3′ 下游:5′-TGCTGAGTATGTCG TGGAGTC-3′
si-NC	上游:5′-TGTCTATCAAGGGAGTGTGT-3′ 下游:5′-TGGAGTATTTCCGTGACCG-3′
Let-7	上游:5′-CGTCAAACTACAACTCCAAGCA-3′ 下游:5′-CGTCCATCTTCCTTCATAGCA-3′

1.3　CCK-8 法检测各组细胞增殖情况[6]

具体步骤为细胞铺 96 孔板并进行转染，转染后继续培养 12 h、24 h、48 h，加入试剂盒中相关试剂进行反应，采用酶标仪测定吸光度值，实验重复 3 次。

1.4　Real time PCR 法测定各组细胞中 Let-7 mRNA 含量及 Bcl-2、Cleaved casp-3、Bax 的 mRNA 水平[7]

具体步骤如下：采用总 RNA 的提取试剂盒(RNA Isolation Kit)提取 RNA，并采用核酸蛋白检测仪测定 RNA 纯度和浓度，采用反转录试剂盒(RNA First-Strand cDNA Synthesis Kit)合成 cDNA。采用实时荧光定量 PCR(q RT-PCR)进行 PCR 扩增。反应条件为：95 ℃预变性 30 s，60 ℃反应 40 s，30 个循环。实验重复 3 次。实验结果使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算相对表达量。△△Ct 计算公式：△△Ct = (Ct 目的基因−Ct 内参基因)实验组−(Ct 目的基因−Ct 内参基因)对照组，实验重复 3 次。

1.5　采用 Transwell 小室实验测定各组细胞的侵袭迁移能力[8]

小室采用紫外线照射杀菌，小室中加入一定量的细胞悬液(1.0×10^8/L)。下室内加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养液，放到培养箱中培养 24 h。培养到时间后用干棉签将上室内的液体擦掉，用蒸馏水浸湿的棉签擦掉表面的细胞。下室内的细胞用中性甲醛固定 30 min，用结晶紫染色，采用相差显微镜拍照观察，并对每个视野中的细胞数量进行计数统计，实验重复 3 次。

1.6　Western blot 检测各组细胞凋亡相关蛋白的表达情况[8]

收集各组细胞，用细胞裂解液提取总蛋白，进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，转膜，用 5% 的脱脂牛奶进行封闭，分别以 Bcl-2、Cleaved casp-3、Bax 抗体为一抗，辣根过氧化物酶(HRP)为二抗，涂 ECL 发光液在凝胶成像仪中成像。以 β-actin 为内参，进行吸光度值分析，实验重复 3 次。

1.7　统计学分析

应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析，首先进行正态性检验，计量资料从正态分布，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间均数的比较采用单因素(one-way ANOVA)方差分析，组内与组间不同时间点比较采用重复测量方差分析。当 $P<0.05$ 时，表示差异具有统计学意义。

2　结　　果

2.1　各组神经母细胞瘤 SH-SY5Y 中 miRNA Let-7 的表达情况比较

采用 PCR 法检测了神经母细胞瘤 SH-SY5Y 中 miRNA Let-7 的表达情况，与未转染组相比，si-NC 转染组 miRNA Let-7 mRNA 含量(1.05±0.12 *vs* 1.13±0.18)无显著差异($P>0.05$)，siRNA-Let-7 转染组 miRNA Let-7 mRNA 含量显著减少(1.05±0.12 *vs* 0.34±0.19)($P<0.05$)。与 si-NC 转染组相比，siRNA-Let-7 转染组 Let-7 mRNA 含量显著减少(1.13±0.18 *vs* 0.34±0.19)($P<0.05$)。

2.2　miRNA Let-7 对各组细胞增殖的影响

采用重复测量方差分析细胞不同时间段吸光度值。结果显示：(1)三组细胞吸光度值随时间变化呈上升趋势($F=22.510$, $P<0.001$)；(2)三组细胞吸光度值组间比较，差异均有统计学意义($F=8.200$, $P<0.019$)，其中 siRNA-Let-7 转染组细胞吸光度值显著高于未转染组和 si-NC 转染组($P<0.05$)；(3)三组细胞吸光度值不存在时间和组间的交互作用($F=1.510$, $P=0.261$)，即各组细胞吸光度值随时间变化趋势与分组无关。

表 2　各组细胞不同时间段吸光度值比较

组别	各时间点吸光度值		
	12 h	24 h	48 h
未转染组	0.47±0.11	0.51±0.06	0.62±0.05
si-NC 转染组	0.49±0.02	0.52±0.08	0.65±0.07
siRNA-Let-7 转染组	0.54±0.06	0.63±0.11[ab]	0.86±0.07[ab]

与未转染组比较，[a]$P<0.05$；与 si-NC 转染组比较，[b]$P<0.05$

2.3　miRNA Let-7 对各组细胞的迁移、侵袭状况

采用 tranwell 小室模型检测了 SH-SY5Y 细胞的

迁移、侵袭状况，结果表明，未转染组和 si-NC 转染组 tranwell 小室中细胞的数量明显比 siRNA-Let-7 转染组少，排列稀疏（见图 1）。

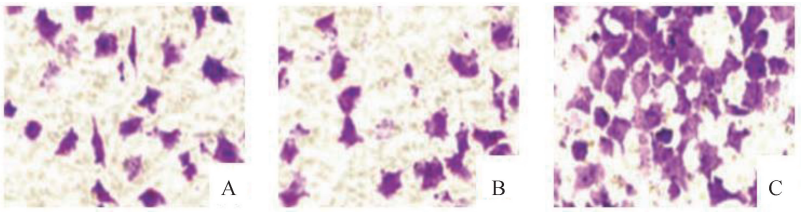

图 1　各组细胞结晶紫染色结果（×400）

A：未转染组；B：si-NC 转染组；C：siRNA-Let-7 转染组

2.4　PCR 法检测各组细胞 Bcl-2、Cleaved casp-3、Bax 的 mRNA 表达情况

与未转染组相比，si-NC 转染组 Bcl-2、Cleaved casp-3、Bax mRNA 含量无显著差异（$P>0.05$），siRNA-Let-7 转染组 Bcl-2 mRNA 含量显著减少，Cleaved casp-3、Bax mRNA 含量显著增多（$P<0.05$）；与 si-NC 转染组相比，Bcl-2 mRNA 含量显著减少，siRNA-Let-7 转染组 Cleaved casp-3、Bax mRNA 含量显著增多（$P<0.05$）（见表 3）。

表 3　各组细胞中 Bcl-2、Cleaved casp-3、Bax mRNA 含量比较

组别	Bcl-2 mRNA	Cleaved casp-3 mRNA	Bax mRNA
未转染组	1.22±0.16	0.45±0.15	0.39±0.16
si-NC 转染组	1.14±0.17	0.41±0.13	0.42±0.18
siRNA-Let-7 转染组	0.47±0.18^{ab}	1.21±0.21^{ab}	1.17±0.13^{ab}

与未转染组比较，$^{a}P<0.05$；与 si-NC 转染组比较，$^{b}P<0.05$

2.5　各组细胞 Bcl-2、Cleaved casp-3、Bax 蛋白的表达

各组 Bcl-2、Cleaved casp-3、Bax 蛋白的表达如图 2 所示，相对密度分析结果表明（见表 4）。与未转染组相比，si-NC 转染组 Bcl-2、Cleaved casp-3、Bax 蛋白表达无显著差异（$P>0.05$），siRNA-Let-7 转染组 Bcl-2 蛋白表达显著减少，Cleaved casp-3、Bax 蛋白表达增多（$P<0.05$）；与 si-NC 转染组相比，Bcl-2 蛋白表达显著减少，siRNA-Let-7Cleaved casp-3、Bax 蛋白表达增多（$P<0.05$）。

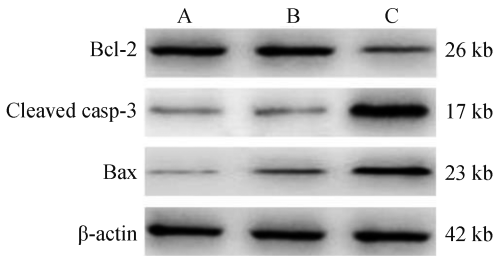

图 2　各组细胞凋亡相关蛋白表达情况

A：未转染组；B：si-NC 转染组；C：siRNA-Let-7 转染组

表 4　各组细胞中 Bcl-2、Cleaved casp-3、Bax 蛋白含量比较

组别	Bcl-2	Cleaved casp-3	Bax
未转染组	1.12±0.23	0.35±0.17	0.38±0.16
si-NC 转染组	1.08±0.14	0.41±0.13	0.35±0.09
siRNA-Let-7 转染组	0.56±0.21^{ab}	1.21±0.21^{ab}	1.02±0.11^{ab}

与未转染组比较，$^{a}P<0.05$；与 si-NC 转染组比较，$^{b}P<0.05$

3　讨　论

神经母细胞瘤属于神经内分泌性肿瘤，起源于交感神经系统的任意神经脊部位，是婴幼儿最常见的恶性肿瘤，具有高度侵袭、增殖、转移特性等特性，其得病率仅次于白血病和脑肿瘤。神经母细胞瘤转移常见于骨、脑、肺和全身骨髓转移等，大部分患者死于全身骨髓转移，所以治疗神经母细胞瘤的关键是抑制其增殖及转移[8]。研究表明，抑制 Let-7 miRNA 表达可使细胞增殖能力明显下降[9-11]，提示 Let-7 与肿瘤发生有一定得联系。本研究发现，在神经母细胞瘤中 Let-7 高表达，顺转 siRNA-Let-7 后 Let-7 在细胞中的量会明显的减少，推测 Let-7 含量减少后可能会对细胞的增殖、迁移、侵袭及凋亡等造成影响。

肿瘤的增殖活性与其生物学密切相关，增殖活性越高，其恶性程度就越高，转移的可能性越大，并且难治疗[12]。本实验结果显示，干扰 Let-7 表达能促进细胞的增殖，说明 Let-7 对神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞的增殖起抑制作用。神经母细胞瘤的特点是骨髓的转移率高，早期就会发生全身转移，治

疗效果不佳,本实验采用 Transwell 趋化侵袭实验检测了 SH-SY5Y 细胞迁移及侵袭能力,结果表明,干扰 Let-7 在细胞中表达,SH-SY5Y 细胞的迁移侵袭能力增强,说明 SiRNA-Let-7 对神经母细胞瘤的迁移和侵袭起到抑制作用。细胞凋亡是一种细胞的程序化死亡方式,其是一把双刃剑,在细胞的生命周期中起重要的作用。细胞的凋亡受到细胞内凋亡调节蛋白的调控。调节细胞凋亡的基因分为两大类:一类是抗凋亡基因,一类是促凋亡基因。Bcl-2 是一种抗凋亡基因,其过表达能使细胞的凋亡减少。Bax 是一类促凋亡基因,其过度表达时,可形成大量的 Bax-Bax 同源二聚体,使细胞凋亡增多;Bcl-2 对 Bax 起到对抗作用,当 Bcl-2 的生成增多时,会使 Bax-Bax 同源二聚体分开,使之与 Bcl-2 结合,进而减少细胞的凋亡[13]。Caspase-3 是调控凋亡的核心蛋白,也被称为细胞凋亡的执行者,是细胞凋亡的标志性蛋白,一旦 Caspase-3 被激活形成 Cleaved casp-3,即预示着凋亡[14]。本实验结果表明,Let-7 在 SH-SY5Y 细胞表达减少后,Cleaved casp-3、Bax mRNA 含量会增多,Bcl-2 mRNA 含量减少,Let-7 对 SH-SY5Y 细胞凋亡也有促进作用。

综上所述,Let-7 在 SH-SY5Y 细胞中表达减少后会促进细胞的增殖迁移侵袭及凋亡,说明 Let-7 对神经母细胞瘤有抑制作用,其机制可能与抑制细胞增殖和促进细胞凋亡有关。该研究为神经母细胞瘤的基因治疗提供了更多的可能性。

参考文献:

[1] CHEN F, JIN R, WU X, et al. Extraventricular neurocytoma in the left frontal lobe: a case report and literature review[J]. World Neurosurg. 2018,11(2):178-81.

[2] DUTTA SW, KALEEM TA, MULLER DA, et al. Central neurocytoma: clinical characteristics, patterns of care, and survival [J]. J Clin Neurosci, 2018,53(5):106-11.

[3] JIANG M, LONG L, ZENG J, et al. Imaging characteristics of cerebral extraventricular neurocytoma with pathological correlation [J]. J Neurooncol, 2018,44(5):67.

[4] DERKOW K, ROSSLING R, SCHIPKE C, et al. Distinct expression of the neurotoxic microRNA family let-7 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease[J]. PLoS One, 2018, 13(7):e0200602.

[5] DONG H, HUANG Z, ZHANG H, et al. Rs13293512 polymorphism located in the promoter region of let-7 is associated with increased risk of radiation enteritis in colorectal cancer[J]. J Cell Biochem, 2018,119(8):6535-44.

[6] KANG KH, SCHAPIRA E, NIEMIERKO A, et al. The role of proton beam therapy in central neurocytoma: a single-institution experience[J]. Pract Radiat Oncol, 2018,8(5):e305-11.

[7] KATATI M, ORTIZ GI, CHAMORRO CI, et al. Complete resection of hypervascularised extraventricular neurocytoma after preoperative embolisation[J]. Neurocirugia (Astur), 2018,35(6): 45-9.

[8] LI X, GUO L, SHENG S, et al. Diagnostic value of six MRI features for central neurocytoma[J]. Eur Radiol, 2018,28(10):4306-13.

[9] ELGHOROURY EA, ElDINE HG, KAMEL SA, et al. Evaluation of miRNA-21 and miRNA Let-7 as prognostic markers in patients with breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2018, 18(4): e721-6.

[10] GILLES ME, SLACK FJ. Let-7 microRNA as a potential therapeutic target with implications for immunotherapy[J]. Expert Opin Ther Targets. 2018,22(11):929-39.

[11] HOPKINS BL, NADLER M, SKOKO JJ, et al. A peroxidase peroxiredoxin 1-specific redox regulation of the novel FOXO3 microRNA target let-7[J]. Antioxid Redox Signal, 2018,28(1):62-77.

[12] 张景明, 雷音, 刘恒岩, 等. 红芪多糖调控磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸苏氨酸激酶信号通路抑制结肠癌细胞增殖及促进凋亡的机制[J]. 中华实验外科杂志, 2017,34(6):985-6.

[13] KATIFELIS H, LYBEROPOULOU A, MUKHA I, et al. Ag/Au bimetallic nanoparticles induce apoptosis in human cancer cell lines via P53, Caspase-3 and Bax/Bcl-2 pathways[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018,34(6):1-10.

[14] LU J, LIANG Y, TU Y, et al. Hypoxic preconditioning reduces propofol-induced neuroapoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and downregulation of activated caspase-3 in the hippocampus of neonatal rats[J]. Neurol Res, 2018,40(9):767-73.

(本文编辑:秦旭平)