

miR-218 通过下调 Bmi-1 表达抑制人视网膜母细胞瘤细胞生长

杨林声,王理论,杜青卫

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30772373)

作者单位:(716000)中国陕西省延安市,延安大学附属医院眼科

作者简介:杨林声,男,主治医师,研究方向:眼科肿瘤及白内障。

通讯作者:王理论,男,硕士,研究方向:眼科肿瘤及白内障。

346887960@qq.com

收稿日期:2015-08-03 修回日期:2015-11-18

Growth inhibition of human retinoblastoma by miR-218 via down-regulation of Bmi-1 expression

Lin-Sheng Yang, Li-Lun Wang, Qing-Wei Du

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30772373)

Department of Ophthalmology, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Li-Lun Wang, Department of Ophthalmology, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China. 346887960@qq.com

Received: 2015-08-03 Accepted: 2015-11-18

Abstract

• AIM: To investigate the level of miR-218 in human retinoblastoma (RB) and its effect on the potential mechanism of tumorigenesis.

• METHODS: Real-time PCR was applied to detect the expression of miR-218 in human RB and the corresponding tumor-adjacent tissues to analyze the relation between miR-218 and clinic pathology characteristics. The artificial miR-218 was transiently transfected into human Y79 cells *in vitro*. The proliferation and apoptosis of the cells were detected by MTT assay and flow cytometry, respectively. The expression level of Bmi-1 mRNA and protein were determined by RT-PCR and Western blot.

• RESULTS: The expression level of miR-218 in RB tissues was significantly lower than that in the adjacent tissues, and it was associated with optic nerve infiltration and differentiated degree. Over-expressed miR-218 in Y79 cells suppressed cell proliferation and promoted cell apoptosis, and down-regulated mRNA and protein expressions of Bmi-1.

• CONCLUSION: The expression of miR-218 in RB tissues is significantly lower than that in tumor-adjacent tissues. MiR-218 could inhibit RB cell proliferation and induce apoptosis by down-regulating the expression of Bmi-1.

• KEYWORDS: miR-218; retinoblastoma; proliferation; apoptosis; Bmi-1

Citation: Yang LS, Wang LL, Du QW. Growth inhibition of human retinoblastoma by miR-218 via down-regulation of Bmi-1 expression. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(12):2045-2048

摘要

目的:探讨 miR-218 在人视网膜母细胞瘤中的表达、临床意义及其分子机制。

方法:实时定量 PCR 检测 miR-218 在视网膜母细胞瘤及瘤旁组织中的表达,并分析其与临床病理特征的关系。检测 miR-218 在视网膜母细胞瘤细胞系中的表达,并用 miR-218 模拟物转染 Y79 细胞,MTT 及流式细胞仪检测 Y79 细胞的增殖、凋亡情况,RT-PCR 和 Western-blot 法检测 Bmi-1 mRNA 及蛋白的表达。

结果:miR-218 在视网膜母细胞瘤组织中的表达水平显著低于对应瘤旁组织;miR-218 低表达与神经浸润、分化程度密切相关;miR-218 可显著抑制 Y79 细胞的增殖并促进其凋亡,并下调 Bmi-1 的 mRNA 及蛋白表达水平。

结论:miR-218 在人视网膜母细胞瘤组织中表达下调,并与临床病理相关,miR-218 抑制 Y79 细胞增殖、促进凋亡的作用可能与下调 Bmi-1 有关。

关键词:miR-218;视网膜母细胞瘤;增殖;凋亡;Bmi-1

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.12.05

引用:杨林声,王理论,杜青卫. miR-218 通过下调 Bmi-1 表达抑制人视网膜母细胞瘤细胞生长. 国际眼科杂志 2015;15(12):2045-2048

0 引言

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)是由视网膜神经上皮层来源的胚胎性恶性肿瘤,是儿童最常见的眼内恶性肿瘤^[1]。因其恶性程度高,传统的放化疗、手术的疗效均欠佳。其不仅影响视力,对患儿的生命也有巨大威胁。因此,尽早明确诊断 Rb 及判断预后意义重大^[2]。miRNAs 是高度保守的非编码 RNA,可与靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区互补结合下调其表达水平^[3],在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[4]。研究发现 miR-218 在结肠癌^[5]、前列腺癌^[6]、胃癌^[7]等肿瘤中表达缺失或下调,参与肿瘤的增殖、凋亡、侵袭和转移。miR-218 在 Rb 中的生物学功能及其分子作用机制尚不明确。本实验通过检测 miR-218 及其下游潜在靶点 Bmi-1(B cell-specific moloney murine leukemia virus insertion site 1)在人 Rb 细胞中的表达,应用人工合成的 miR-218 模拟物(miR-218 mimics)研究 miR-218 在 Rb 发生发展中的作用,为 Rb 的发生机制提供新的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 收集西安交通大学第一附属医院眼科 2003-

01/12 经病理诊断为 Rb 并行手术摘除眼球 39 眼,其中男 16 眼,女 23 眼。年龄 3 月龄~8 岁,平均 2.9 ± 1.7 岁。其分化程度按肿瘤组织中有无菊形团分化型 11 眼,未分化型 28 眼。病例中有神经浸润 24 眼。术前均未接受化疗及局部放疗等治疗。术后标本立即放入液氮,6h 后转入 -80°C 备用。癌旁组织为距肿瘤边缘 $>1\text{cm}$ 处组织。本研究获得所有患者监护人知情同意及医院的伦理学审核。miRNA 及 mRNA 逆转录试剂盒 (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, #1622) 购自 Ferments 公司, Real time PCR 试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit, RR037A) 购自 TaKaRa 公司, TRIzol 试剂及 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司; miR-218 mimics 及 Control mimic 均购自上海 GenePharma 公司, Bmi-1 上游引物为 $5' - \text{GTGCTTTGTGGAGGCTACTTCAT} - 3'$, 下游引物为 $5' - \text{TTGGACATCACAAATAGGACAATACTT} - 3'$; β -actin 上游引物为 $5' - \text{CTCCATCCTGGCCTCGCTGT} - 3'$, 下游引物为 $5' - \text{GCTGTCACCTTCACCGTTCC} - 3'$; 兔抗人 Bmi-1 多克隆抗体购自 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 利用含 10% 胎牛血清的 RMPI-1640 和 MCDB-131 培养基分别培养 Y79 和 HXO-Rb44 人视网膜母细胞瘤细胞系和 ACBRI-181 人正常视网膜血管内皮细胞系 (ATCC, Manassas, VA, 美国) 培养液在 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱中培养。

1.2.2 Real-time PCR 按 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 收集所有细胞, 并按试剂盒要求进行 RNA 提取。取 $1\mu\text{g}$ 总 RNA, 用 cDNA 第一链合成试剂盒 (fermentas, Invitrogen, USA) 进行逆转录, 最后用引物利用 SYBR Green master 试剂盒 (Applied Biosystems, USA) 取 $2\mu\text{L}$ cDNA 配置反应体系, 条件: 95°C 预变性 30s, 95°C 变性 5s, 60°C 退火延伸 30s, 扩增 35 循环。扩增结束后制作融解曲线。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 miR-218、Bmi-1 mRNA 的相对表达量。以 RNU6B 和 β -actin 分别作为内参。每个样本独立重复实验 3 次。

1.2.3 细胞转染 根据 lipofectamine™ 2000 说明书进行转染操作, 细胞接种于 6 孔板内, 实验组每孔加入 100pmol/L miR-218 mimics 及 $5\mu\text{L}$ lipofectamine™ 2000; 对照组每孔加入 100pmol/L 阴性对照 (negative control, NC) mimics 及 $5\mu\text{L}$ lipofectamine™ 2000。置于 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱中培养。

1.2.4 细胞增殖检测 采用 MTT 法进行检测, 取对数生长期的细胞, 用培养基制备细胞数为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 以 $200\mu\text{L}/$ 孔接种于 96 孔板。24、48、72h 后 MTT 检测细胞活力, 在实验结束之前 4h, 每孔加入 $20\mu\text{L}$ 5mg/mL 的 MTT, 继续孵育 4h, 实验结束后, 离心弃去培养液, 每孔加入 DMSO $150\mu\text{L}$, 于室温轻微溶解结晶 15min, 每个时间点设 5 个复孔。酶标仪在 490nm 波长处检测每孔的吸光值。

1.2.5 细胞凋亡检测 取转染后 48h 后的细胞, 用 0.01mol/L PBS 洗涤细胞, 1500r/min 离心 5min 后弃去上清, $1 \times$ 结合缓冲液重悬细胞并调整细胞数为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 每管加入 $500\mu\text{L}$ 细胞悬液、 $5\mu\text{L}$ annexin V-FITC 和 $10\mu\text{L}$ PI。混匀室温避光孵育 10min 后进行流式细胞仪检测, 每个样本独立重复 3 次。

1.2.6 Western-blot 法 利用 RIPA(强) 试剂盒提取细胞

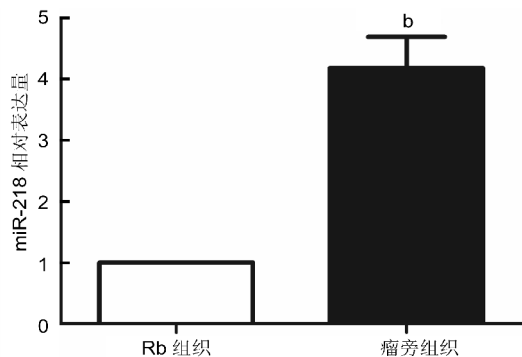


图 1 miR-218 在视网膜母细胞瘤及其对应瘤旁组织中的表达水平 $^b P < 0.01$ vs Rb 组织。

株内总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒 (BCA kit) 检测蛋白样品浓度。各组样品均加样 $40\mu\text{g}$, SDS-PAGE 电泳分离后, 转移至 PVDF 膜上。50g/L 脱脂奶粉封闭 1.5h, 加 50g/L BSA 稀释 Bmi-1 多克隆抗体 (1:500) 及 β -actin 单克隆抗体 (mAb, 1:1000) 4°C 过夜后, TBST (TBS, 1mL/L Tween-20) 洗膜 3 次, $6\text{min}/$ 次; 分别加 HRP 标记二抗 (1:5000), 室温孵育 2h, ECL 化学发光剂暗室显影。

统计学分析: 所有检测实验均重复 3 次, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 13.0 统计软件, 组间进行配对样本 t 检验, 采用 χ^2 检验分析 miR-218 表达与临床病理资料间的相关性。miR-218 在细胞中的表达水平采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-218 在视网膜母细胞瘤组织及瘤旁组织中的表达 采用 Real-time PCR 检测显示在视网膜母细胞瘤组织中 miR-218 表达量明显低于瘤旁组织中的相对表达量, 差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1)。

2.2 miR-218 的表达与 Rb 患者临床病理特征的关系 以 miR-218 在组织中的中位表达水平作为分界点, 将 39 眼 Rb 瘤组织分为 miR-218 高表达组 (23.08%, $n = 9$ 眼) 与 miR-218 低表达组 (76.92%, $n = 30$ 眼)。结果表明, miR-218 的低表达与神经浸润、分化程度显著相关 ($P < 0.05$, 表 1), 而与年龄、性别、眼别等无关。

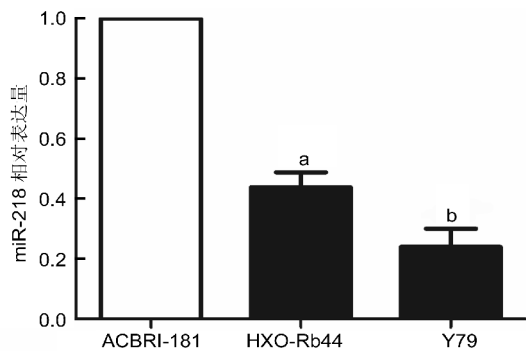
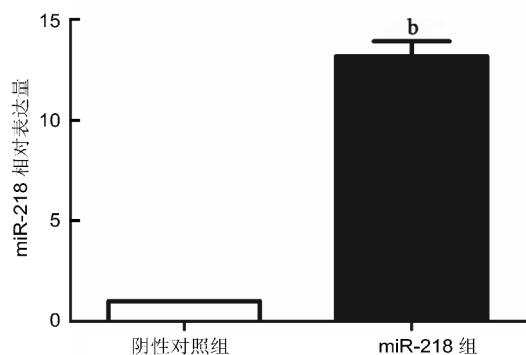
2.3 miR-218 在人视网膜母细胞瘤细胞中的表达水平 采用 Real-time PCR 检测 Y79, HXO-Rb44 人视网膜母细胞瘤细胞系和 ACBRI-181 人正常视网膜血管内皮细胞中 miR-218 的表达, 经单因素方差分析发现各细胞株 miR-218 水平对比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2), 人视网膜母细胞瘤细胞株中的表达明显高于正常视网膜血管内皮细胞中 ($P < 0.01$)。

2.4 miR-218 mimics 转染 Y79 细胞 为进一步研究 miR-218 对人视网膜母细胞瘤细胞生物学行为的影响, 将 miR-218 mimics 瞬时转染入 Y79 细胞中, 采用 Real-time PCR 检测其转染效率, 结果显示实验组 miR-218 的表达水平显著高于阴性对照组 ($P < 0.01$, 图 3)。

2.5 过表达 miR-218 对 Y79 细胞增殖能力的影响 为研究过表达 miR-218 对人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖能力的影响, 采用 MTT 法检测转染 miR-218 mimics 24、48、72h 后 Y79 细胞相对增殖情况的变化。结果显示, 与阴性对照组相比, miR-218 能明显抑制 Y79 细胞的增殖能力 ($P < 0.05$, 图 4)。

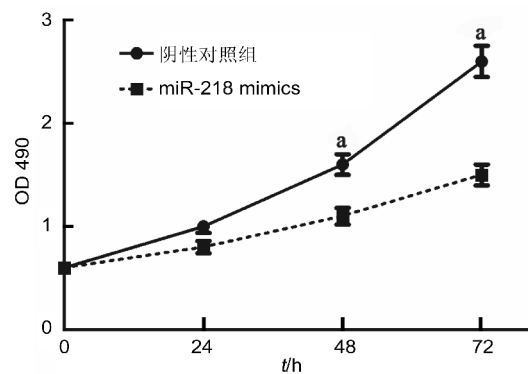
表1 miR-218 表达与 Rb 患者临床病理特征的关系 眼

项目	眼数	表达水平		P
		高表达	低表达	
年龄	39	9	30	0.697
<3 岁	28	6	22	
≥3 岁	11	3	8	
性别	39	9	30	0.812
男	16	4	12	
女	23	5	18	
眼别	39	9	30	0.718
右	15	3	12	
左	24	6	18	
视神经浸润	39	9	30	0.006
视神经受侵	24	2	22	
视神经未受侵	15	7	8	
分化程度	39	9	30	0.038
分化组	11	5	6	
未分化组	28	4	24	
淋巴结转移	39	9	30	0.674
有	15	4	11	
无	24	5	19	

图2 miR-218 在人视网膜母细胞瘤细胞系中的表达水平 ^aP<0.05, ^bP<0.01 vs ACBRI-181。图3 不同 mimics 转染 Y79 细胞后 miR-218 的表达 ^bP<0.01 vs 阴性对照组。

2.6 过表达 miR-218 对 Y79 细胞凋亡的影响 为进一步探讨 miR-218 在抑制人视网膜母细胞瘤增殖的同时并促进其凋亡,用流式细胞仪检测 miR-218 mimics 转染 Y79 凋亡细胞的比例,结果表明实验组较阴性对照组细胞凋亡率显著增加($P<0.05$,图5)。

2.7 miR-218 下调 Y79 细胞中 Bmi-1 的表达 Bmi-1 是细胞内重要的细胞增殖、凋亡调控基因,为探讨 miR-218

图4 miR-218 抑制人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的增殖 ^aP<0.05 vs 阴性对照组。

对人视网膜母细胞瘤增殖、凋亡调控的作用分子机制,用 Real-time PCR 及 Western-blot 法检测过表达 miR-218 后 Y79 细胞中 Bmi-1 mRNA 及蛋白的表达水平较阴性对照组明显降低($P<0.05$,图6)。

3 讨论

在我国视网膜母细胞瘤的发病率居眼内恶性肿瘤首位,常见于婴幼儿时期。但患者早期诊断率较低,就诊时已不适宜保守治疗。治疗方式常采用眼球摘除术、放疗等传统治疗模式,对患者的生活质量及视力造成重大影响。因此,寻找新的治疗方法成了近来研究热点。随着分子生物学的发展,分子靶向治疗为 Rb 的治疗提供了新的思路。但目前对 Rb 的发生、发展机制尚不明确,肿瘤的异常增殖及凋亡被认为是 Rb 发生机制之一。因此,研究 Rb 的致病机制,可能发现新的 Rb 诊断标记及可能的肿瘤分子治疗新靶点。

miRNA 作为细胞内小 RNA 分子,通过与其靶基因 mRNA 序列不完全互补结合,抑制其翻译过程,从而下调靶基因的表达水平,实现基因沉默的作用^[8]。目前研究表明,miRNA 在多种肿瘤中调控相关基因的表达而影响细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移等生物学行为。miR-218 是近年发现的、新的、具有多种肿瘤调控作用的 miRNA。研究表明,miR-218 在胃癌^[9]、肺癌^[10]、胰腺癌^[11]等多种恶性肿瘤中表达下调^[12-15]。本研究通过对 39 眼人视网膜母细胞瘤组织标本的检测发现,在 Rb 组织中 miR-218 的表达水平明显低于瘤旁组织,并且发现其 miR-218 的低表达与视神经浸润、分化程度密切相关。这提示 miR-218 在 Rb 的发生发展过程中发挥重要作用。

有研究表明,miR-218 具有抑制肿瘤细胞增殖并促进其细胞凋亡的生物学作用。本研究通过转染 miR-218 发现,过表达 miR-218 后,MTT 及流式细胞仪检测发现 miR-218 可显著抑制人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的增殖并促进其凋亡。Tu 等研究表明,在肝癌细胞中 miR-218 表达抑制 Bmi-1 表达水平,并诱导细胞凋亡。本研究通过生物信息学检索发现 Bmi-1 是 miR-218 下游靶点之一,通过 miR-218 转染 Y79 细胞后,Real-time PCR 及 Western-blot 法检测 Bmi-1 mRNA 和蛋白表达水平显著降低,提示在 Rb 中 miR-218 可能下调 Bmi-1 的表达。而 Bmi-1 也被研究证实在 Rb 组织中异常高表达,且 Bmi-1 与肿瘤的增殖、凋亡有密切关系^[16-19],从而间接说明 miR-218 在 Rb 组织中异常低表达,且与 Rb 的发生、发展相关。

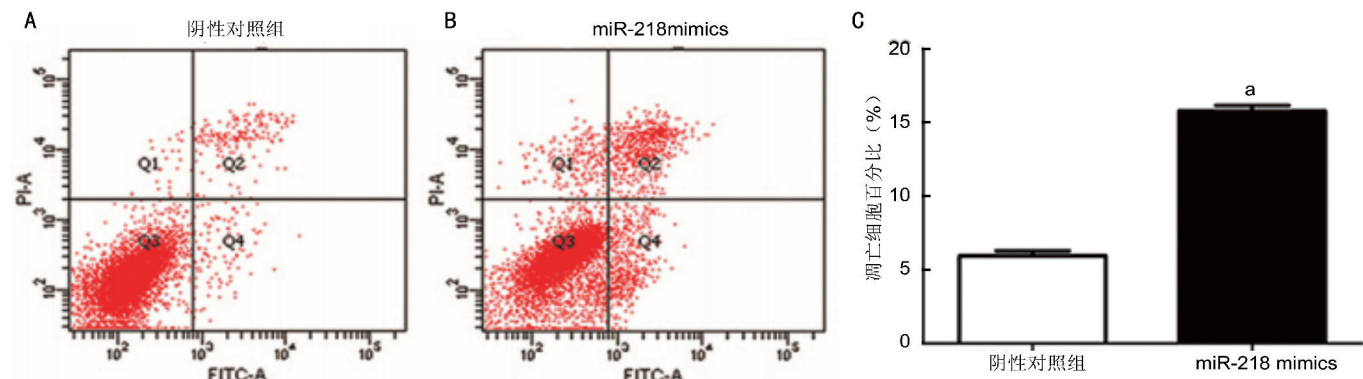


图5 miR-218 诱导人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞凋亡 A: Y79 细胞转染阴性对照后用流式细胞仪检测细胞凋亡率; B: Y79 细胞转染 miR-218 模拟物后用流式细胞仪检测细胞凋亡率; C: Y79 细胞分别转染阴性对照及 miR-218 模拟物后凋亡率的比较; ^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组。

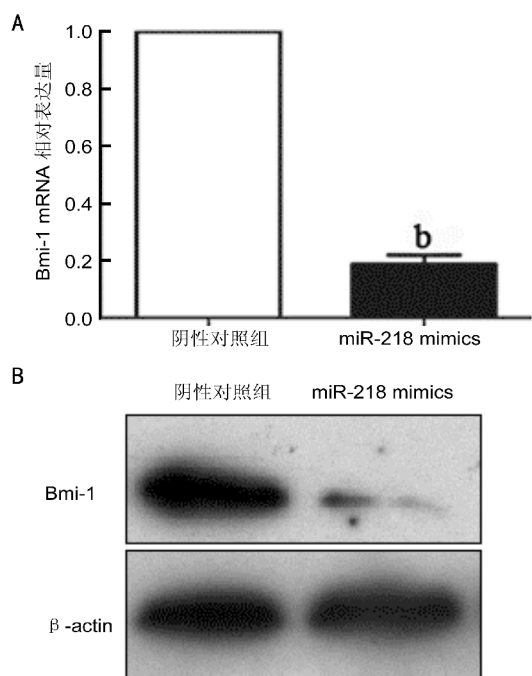


图6 miR-218 下调 Bmi-1 表达水平 A: miR-218 显著下调 Y79 细胞中 Bmi-1 mRNA 表达水平 (^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组); B: Bmi-1 的蛋白表达水平。

综上所述, miR-218 在 Rb 组织中表达显著下调, 并与 Rb 的神经浸润及分化程度密切相关。体外实验证明, miR-218 可能通过下调 Bmi-1 的表达来发挥抑制人视网膜母细胞瘤细胞增殖并促进其凋亡的作用。因此, miR-218 可能成为新的 Rb 分子标志物及生物治疗靶点。

参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69-90
- Scheffler AC, Cicciarella N, Feuer W, et al. Macular retinoblastoma; evaluation of tumor control, local complications, and visual outcomes for eyes treated with chemotherapy and repetitive foveal laser ablation. *Ophthalmology* 2007;114(1):162-169
- Gould J. Gene therapy: Genie in a vector. *Nature* 2014;515(7528):S160-161
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431(7006):350-355
- He X, Dong Y, Wu CW, et al. MicroRNA-218 inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis in colon cancer by downregulating

- Bmi1 polycomb ring finger oncogene. *Mol Med* 2012;18(8):1491-1498
- Leite KR, Sousa-Canavez JM, Reis ST, et al. Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis. *Urol Oncol* 2011;29(3):265-269
- Li BS, Zhao YL, Guo G, et al. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection. *PLoS One* 2012;7(7):e41629
- Baer C, Claus R, Plass C. Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer. *Cancer Res* 2013;73(10):473-477
- Tie J, Pan Y, Zhao L, et al. MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor. *PLoS Genet* 2010;6(3):e1000879
- Davidson MR, Larsen JE, Yang IA, et al. MicroRNA-218 is deleted and downregulated in lung squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2010;5(9):e12560
- Zhu Z, Xu Y, Du J, et al. Expression of microRNA-218 in human pancreatic ductal adenocarcinoma and its correlation with tumor progression and patient survival. *J Surg Oncol* 2014;109(2):89-94
- Suesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, et al. The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res* 2011;71(17):5765-5778
- Li J, Ping Z, Ning H. MiR-218 impairs tumor growth and increases chemo-sensitivity to cisplatin in cervical cancer. *Int J Mol Sci* 2012;13(12):16053-16064
- Song L, Huang Q, Chen K, et al. miR-218 inhibits the invasive ability of glioma cells by direct downregulation of IKK-β. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402(1):135-140
- Tu Y, Gao X, Li G, et al. MicroRNA-218 inhibits glioma invasion, migration, proliferation, and cancer stem-like cell self-renewal by targeting the polycomb group gene Bmi1. *Cancer Res* 2013;73(19):6046-6055
- Kang MK, Kim RH, Kim SJ, et al. Elevated Bmi-1 expression is associated with dysplastic cell transformation during oral carcinogenesis and is required for cancer cell replication and survival. *Br J Cancer* 2007;96(1):126-133
- Tong YQ, Liu B, Zheng HY, et al. Overexpression of BMI-1 is associated with poor prognosis in cervical cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* 2012;8(4):e55-e62
- Yin T, Wei H, Leng Z, et al. Bmi-1 promotes the chemoresistance, invasion and tumorigenesis of pancreatic cancer cells. *Chemotherapy* 2011;57(6):488-496
- Li X, Yang Z, Song W, et al. Overexpression of Bmi-1 contributes to the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by increasing the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and vascular endothelial growth factor via the PTEN/PI3K/Akt pathway. *Int J Oncol* 2013;43(3):793-802