

# miR-543 对胶质瘤细胞 SHG-44 增殖和凋亡的影响\*

赵云东<sup>1</sup>, 宋玉琴<sup>2</sup>, 刘娜<sup>3</sup>, 孙冬波<sup>1\*\*</sup>

(1. 沈阳医学院附属第二医院, 辽宁 沈阳 110035; 2. 沈阳市第六人民医院, 辽宁 沈阳 110006; 3. 沈阳市第七人民医院, 辽宁 沈阳 110031)

**[摘要]** 目的: 观察 miR-543 对人胶质瘤细胞 SHG-44 增殖和凋亡的作用。方法: 设计并合成 miR-543 寡核苷酸模拟物 (miR-543 mimic) 及阴性对照 mimic NC 序列、寡核苷酸抑制物 (miR-543 inhibitor) 及阴性对照 inhibitor NC 序列, 将人胶质瘤细胞 SHG-44 株分为 Control (对照组)、mimic NC 组、inhibitor NC 组、miR-543 mimic 组和 miR-543 inhibitor 组, 各组细胞转染相应序列; Real-time PCR 检测 miR-543 及其靶基因氨酰基-tRNA 合成酶相互作用多功能蛋白 3 (AIMP3) mRNA 的表达, 应用噻唑蓝细胞增殖实验 (MTT) 评估 SHG-44 细胞的增殖, 应用流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡, 应用 Western Blot 检测细胞周期蛋白 cyclin D1、cyclin E 与细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、bax 的表达变化。结果: 与对照组相比, 转染 miR-543 mimic 后, SHG-44 细胞中 miR-543 RNA 表达水平显著上调 ( $P < 0.01$ ), 其靶基因 AIMP3 mRNA 表达水平显著下调 ( $P < 0.01$ ); 转染 miR-543 inhibitor 后, 细胞中 miR-543 RNA 表达水平显著下调 ( $P < 0.01$ ), AIMP3 mRNA 表达水平显著上调 ( $P < 0.01$ ); 转染 miR-543 mimic 后, 细胞增殖水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 转染 miR-543 inhibitor 后, 细胞增殖水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 转染 miR-543 mimic 后, 细胞处于 G1 期的细胞数量明显增加 ( $P < 0.01$ ), 同时细胞凋亡率也显著增加 ( $P < 0.01$ ), 而转染 miR-543 inhibitor 后细胞凋亡率显著减少 ( $P < 0.01$ ); Western Blot 结果显示, 与对照组相比, 转染 miR-543 mimic 后, 细胞周期蛋白 cyclin D1、cyclin E 及抗凋亡相关基因 Bcl-2 蛋白表达显著下调 ( $P < 0.01$ ), 促凋亡相关基因 bax 蛋白表达显著上调 ( $P < 0.01$ ); 转染 miR-543 inhibitor 后, 细胞中 cyclin D1、cyclin E、Bcl-2 蛋白表达显著上调 ( $P < 0.01$ ), bax 蛋白表达显著下调 ( $P < 0.01$ )。结论: miR-543 可能通过下调细胞周期蛋白 cyclin D1、cyclin E 及抗凋亡相关基因 Bcl-2 的表达, 上调促凋亡基因 bax 的表达进而抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡。

**[关键词]** miR-543; 胶质瘤细胞; 细胞周期蛋白类; Bcl-2; bax; 细胞增殖; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)12-1412-08

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.12.010

## The Effect of miR-543 on Proliferation and Apoptosis in Glioma SHG-44 Cells

ZHAO Yundong<sup>1</sup>, SONG Yuqin<sup>2</sup>, LIU Na<sup>3</sup>, SUN Dongtao<sup>1</sup>

(1. The Second Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110035, Liaoning, China;

2. The Sixth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110006, Liaoning, China; 3. The Seventh People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110031, Liaoning, China)

**[Abstract] Objective:** To observe the role of miR-543 on the proliferation and apoptosis of human glioma SHG-44 cells and to investigate its effect on the protein expression of cyclin D1, cyclin E, Bcl-2 and bax. **Methods:** miR-543 oligonucleotide mimics (miR-543 mimic) and oligonucleotide inhibitor (miR-543 inhibitor) were used to transfect SHG-44 cells. Real-time PCR was used to detect the expression of miR-543 and AIMP3 RNA; methylthiazol tetrazolium (MTT) assay was used to evaluate cell proliferation; Flow cytometry was applied to detect cell cycles and apoptosis; The expression of cyclin

\*[基金项目] 辽宁省科学技术计划项目 (20170540873)

\*\* 通信作者 E-mail: na1978dong@126.com

网络出版时间: 2018-12-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181222.1447.017.html>

D1, cyclin E, Bcl-2 and bax were detected by Western Blot. **Results:** Compared with the control group, the expression of miR-543 in SHG-44 cells was significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ) and the expression of AIMP3 mRNA was significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ) after transfection of miR-543 mimic; the expression of miR-543 in SHG-44 cells was significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ) and that of AIMP3 mRNA was significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ) after transfection of miR-543 inhibitor. The cell proliferation level significantly decreased after transfection of miR-543 mimic ( $P < 0.01$ ), but after transfection of miR-543 inhibitor, the cell proliferation level significantly increased; The number of cells in G1 phase and also the apoptosis rate significantly increased ( $P < 0.01$ ) after transfection of miR-543 mimic ( $P < 0.01$ ); but the apoptosis rate significantly decreased ( $P < 0.01$ ) after transfection of miR-543 inhibitor. Compared with the control group, Western Blot results showed that the expression of cyclin D1, cyclin E and Bcl-2 was significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ), meanwhile the expression of bax protein was significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ) after transfection of miR-543 mimic, while the expression of cyclin D1, cyclin E and Bcl-2 was significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ) and the expression of bax protein was significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ) after transfection of miR-543 inhibitor. **Conclusion:** miR-543 can inhibit cell proliferation and promote apoptosis by lowering the cyclin D1, cyclin E and Bcl-2 expression level meanwhile elevating bax expression level.

[**Key words**] miR-543; glioma cells; cyclins; Bcl-2; bax; cell proliferation; apoptosis

脑胶质瘤是成年人中最常见的原发性脑瘤,患者即使经手术切除和化疗放疗,但治疗效果仍然不佳,平均生存期大约为 1 年,综合治疗生存期不超过 2 年<sup>[1]</sup>,因此寻找新的脑胶质瘤相关基因治疗靶点对延长患者生存期具有重要意义。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度为 19-25 nt 的内源非编码小 RNA<sup>[2]</sup>,可与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合进而调控基因的表达<sup>[3]</sup>。miR-543 作为 miRNA 家族的成员,可抑制胶质瘤细胞增殖、侵袭,诱导细胞凋亡<sup>[4]</sup>,然而 miR-543 在人胶质瘤细胞 SHG-44 中的作用尚不明确。为了明确 miR-543 对胶质瘤细胞 SHG-44 的作用,本实验采 miR-543 寡核苷酸模拟物(miR-543 mimic)及寡核苷酸抑制物(miR-543 inhibitor)分别转染脑胶质瘤 SHG-44 细胞,观察 miR-543 对 SHG-44 细胞增殖和凋亡的作用,探讨 miR-543 对细胞周期蛋白 cyclin D1、cyclin E 及细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、bax 表达的影响,为脑胶质瘤的发病机制研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

胎牛血清购自以色列 Biological Industries (BI), RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco, 转染试剂 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 购自美国 Invitrogen, 噻唑蓝

MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司, TRIpure 总 RNA 提取试剂、Super M-MLV 反转录酶均购自北京百泰克生物技术有限公司, SYBR Green 购自北京索莱宝科技有限公司, 细胞周期检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司, 流式细胞凋亡检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Bcl-2 抗体、bax 抗体、cyclin D1 抗体、cyclinE 抗体均购自沈阳万类生物科技有限公司, PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。SHG-44 细胞购自中国科学院上海细胞库。miR-543 mimic 及阴性对照 mimic NC 序列、miR-543 inhibitor 及阴性对照 inhibitor NC 序列均由上海吉玛公司合成。miR-543 mimic 序列为 5'-AAACAUUCGCGGUGCA-CUUCUU-3', 5'-GAAGUGCACCGCGAAUGUUUUU-3'; mimic NC 序列为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACG UTT-3', 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'; miR-543 inhibitor 序列为 5'-AAGAAGUGCACCGCGAAU GUUU-3', inhibitor NC 序列为 5'-CAGUACUUUU-GUGUAGUACAA-3'。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及转染** SHG-44 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养, 根据 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 操作说明转染 miR-543 mimic 及 mimic NC 序列、miR-543 inhibitor 及 inhibitor NC 序列。实验分为 5 组: Con-

trol(对照组)、mimic NC 组、inhibitor NC 组、miR-543 mimic 组和 miR-543 inhibitor 组。细胞转染 48 h 后,进行后续实验。

**1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 miR-543 及 AIMP3 表达** 细胞转染 48 h 后,根据 TRIpure 总 RNA 提取试剂操作说明提取各组细胞总 RNA,在 Super M-MLV 反转录酶的作用下得到 cDNA。逆转录反应体系及反应条件如下:在冰浴的无核酸酶的离心管中加入 oligo(dT)<sub>15</sub> 1  $\mu$ L 及随机引物 random 1  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 至总反应体系为 12.5  $\mu$ L,70  $^{\circ}$ C 加热 5 min 后迅速在冰上冷却 2 min,简短离心收集反应液后加入 2.5 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L、5  $\times$  Buffer 4  $\mu$ L、Rnase inhibitor 0.5  $\mu$ L,混匀后加入 M-MLV 1  $\mu$ L(200 U),轻轻用移液器混匀,25  $^{\circ}$ C 温浴 10 min,42  $^{\circ}$ C 温浴 50 min,80  $^{\circ}$ C 加热 10 min 终止反应,以上步骤由 PCR 仪完成,最终得到 cDNA 20  $\mu$ L。将得到的 cDNA 放入 Exicycler<sup>TM</sup> 96 荧光定量仪(BIONEER,韩国)进行荧光定量反应,反应体系 20  $\mu$ L,cDNA 模板 1  $\mu$ L、上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L、SYBR GREEN mastermix 10  $\mu$ L 及 ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L;反应条件,94  $^{\circ}$ C 5 min 预变性,94  $^{\circ}$ C 10 s、60  $^{\circ}$ C 20 s、72  $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。采用 2- $\Delta\Delta$ CT 法对 mRNA 进行定量分析。小鼠各基因引物序列如下,miR-543-F 为 5'-GCTCAAACATTCGCGGTGC-3',miR-543-R 为 5'-GTGCAGGGTC-CGAGGTATTC-3';miR-543 内参基因 U6-F 为 5'-GCTTCGGCAGCACATATACT-3',U6-R 为 5'-GTG-CAGGGTCCGAGGTATTC -3'; AIMP3-F 为 5'-CGAGCGACAGATTCCAGTTC-3', AIMP3-R 为 5'-AGTGCCCATCTACTTGAGTG-3'; AIMP3 内参基因  $\beta$ -actin-F 为 5'-CTTAGTTGCGTTACACCCTTCTTG-3', $\beta$ -actin-R 为 5'-CTGTCACCTTCACCGTTCCAGTTT-3。

**1.2.3 MTT 检测细胞增殖** 细胞转染 48 h 后进行 MTT 检测,将各组细胞弃去培养基,加入 1  $\times$  MTT 50  $\mu$ L,置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4 h,小心吸去上清,加入 DMSO 150  $\mu$ L 以溶解细胞形成的紫色结晶,在酶标仪上测定其在 570 nm 处 OD 值,进行数据分析。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞周期** 细胞转染 48 h 后,收集各组细胞,加入预冷 70% 乙醇,4  $^{\circ}$ C 固定 2 h,弃去上清液,PBS 清洗 2 次,离心 5 min,弃上清,每管细胞样品中加入染色缓冲液 500  $\mu$ L,缓慢并充分重悬,加入碘化丙啶染色液 25  $\mu$ L 混匀,加入 RNase A 10  $\mu$ L,混匀,37  $^{\circ}$ C 避光温育 30 min,冰

浴避光存放,随即进行流式细胞术检测。

**1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡** 细胞转染 48 h 后,收集各组细胞,PBS 清洗 2 次,每管细胞样品中加入 Binding Buffer 500  $\mu$ L 轻轻重悬细胞,加入 AnnexinV-FITC 5  $\mu$ L 混匀,加入 PropidiumIodide 5  $\mu$ L,混匀,室温避光温育 15 min,流式细胞术检测细胞凋亡。数据结果中包含 4 个象限,其中上左象限(UL)表示碎片或损伤细胞,右上象限(UR)表示晚期凋亡细胞,下左象限(LL)表示正常细胞,下右象限(LR)表示早期凋亡细胞。

**1.2.6 Western Blot 检测 Bcl-2、bax、cyclin D1、cyclin E 蛋白表达** RIPA 裂解法提取样本总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白进行定量,取 20 ~ 40  $\mu$ g 蛋白上样,行 SDS-PAGE 并转印至 PVDF 膜,经 5% (M/V) 脱脂奶粉封闭 1 h 后,放入一抗 Bcl-2 (1:500)、bax (1:500)、cyclin D1 (1:500)、cyclin E (1:500)、 $\beta$ -actin (1:1000) 工作液中 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育,TBST 缓冲液清洗 PVDF 膜,放入二抗羊抗小鼠 IgG-HRP (1:5000) 工作液中 37  $^{\circ}$ C 孵育 45 min,ECL 底物发光,采用凝胶图象处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带光密度值。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本  $t$  检验, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

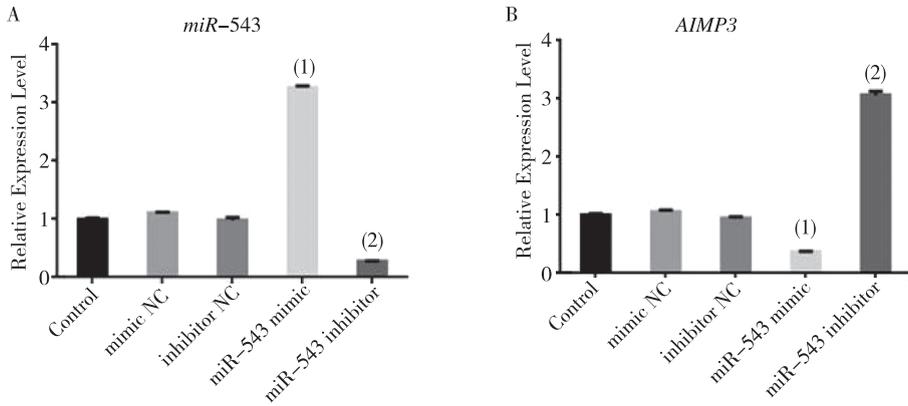
## 2 结果

### 2.1 miR-543 与 AIMP3 基因表达

将 miR-543 mimic 及 NC 序列、miR-543 inhibitor 及 NC 序列转染 SHG-44 细胞 48 h 后,miR-543 mimic 组细胞中 miR-543 的表达与 mimic NC 组相比显著上调( $P < 0.01$ ),miR-543 inhibitor 组细胞中 miR-543 的表达与 inhibitor NC 组相比显著下调( $P < 0.01$ ),见图 1A;与之相反,miR-543 mimic 组细胞中 AIMP3 mRNA 的表达与 mimic NC 组相比显著下调( $P < 0.01$ ),miR-543 inhibitor 组细胞中 AIMP3 mRNA 的表达与 inhibitor NC 组相比显著上调( $P < 0.01$ ),见图 1B。

### 2.2 SHG-44 细胞增殖

转染 48 h 后,MTT 检测各组 SHG-44 细胞增殖水平,结果显示,miR-543 mimic 组与 mimic NC 组

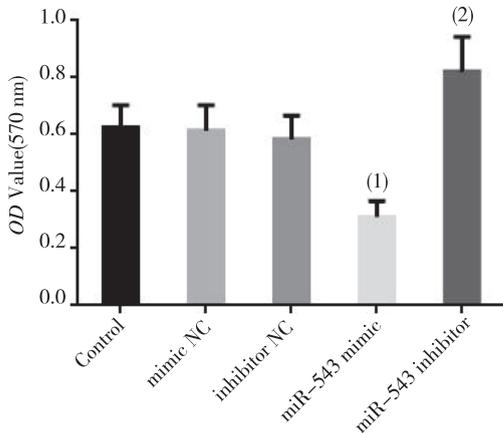


(<sup>1</sup>)与 mimic NC 组比较,  $P < 0.01$ ; (<sup>2</sup>)与 inhibitor NC 组比较,  $P < 0.01$

图1 miR-543 与 AIMP3 在各组 SHG-44 细胞中基因表达水平

Fig. 1 Relative expression level of miR-543 and AIMP3 in different groups

相比细胞增殖水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), miR-543 inhibitor 组与 inhibitor NC 组相比细胞增殖水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), 见图 2; 由此可见 miR-543 过表达可抑制 SHG-44 细胞增殖, 抑制 miR-543 的表达可促进 SHG-44 细胞增殖。



(<sup>1</sup>)与 mimic NC 组比较,  $P < 0.01$ ;

(<sup>2</sup>)与 inhibitor NC 组比较,  $P < 0.01$

图2 各组 SHG-44 细胞增殖水平

Fig. 2 Cell proliferation was detected by MTT assay

### 2.3 SHG-44 细胞周期

转染 48 h 后, 流式细胞术检测各组 SHG-44 细胞周期变化, 结果显示 miR-543 mimic 组与 mimic NC 组相比, 处于 G1 期的细胞数量显著增加 ( $P < 0.01$ ), 见表 1 和图 3, 可见 miR-543 将 SHG-44 细胞阻滞在 G1 期。表明 miR-543 在一定程度上可抑制 SHG-44 细胞 G1 期向 S 期转变, 从而影响细胞增殖。

表 1 miR-543 对 SHG-44 细胞周期的影响

Tab. 1 The effect of miR-543 on cell cycle in different groups

组别	G1 期	S 期	G2 期
Control	66.58 ± 1.40	9.67 ± 0.41	23.24 ± 1.01
mimic NC	63.52 ± 0.55	9.78 ± 0.54	26.35 ± 0.80
inhibitor NC	65.24 ± 1.10	9.84 ± 0.97	23.12 ± 0.27
miR-543 mimic	72.11 ± 1.03 <sup>(1)</sup>	5.44 ± 0.42	21.14 ± 0.61
miR-543 inhibitor	63.51 ± 1.44	16.60 ± 1.44	19.55 ± 0.95

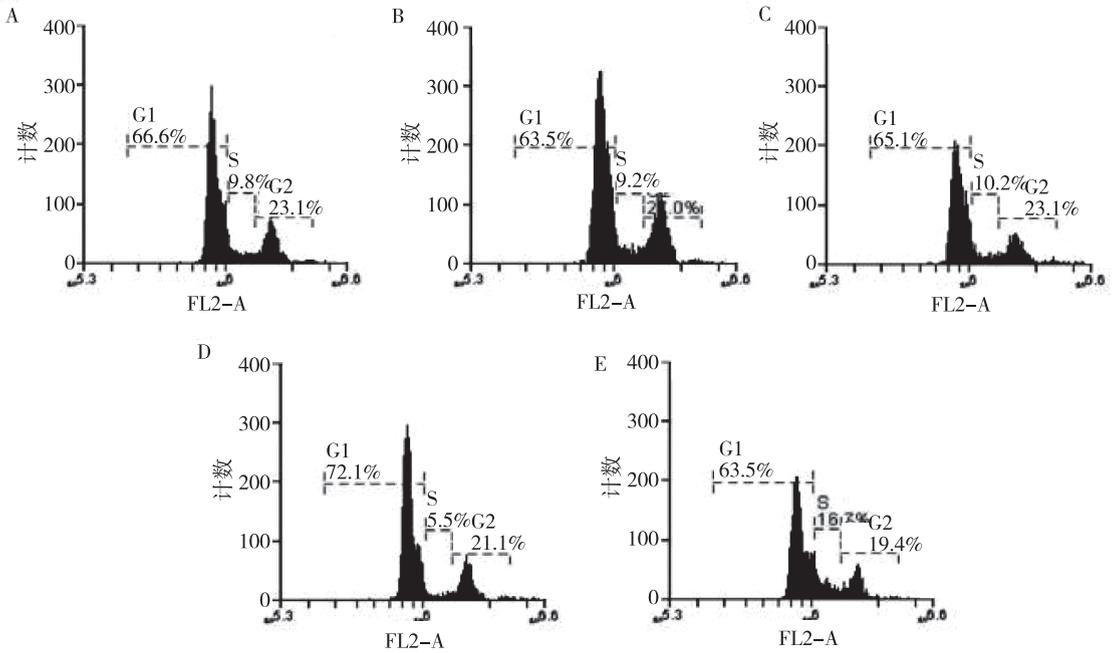
(<sup>1</sup>)与 mimic NC 组比较,  $P < 0.01$

### 2.4 SHG-44 细胞凋亡

转染 48 h 后, 流式细胞术检测各组 SHG-44 细胞凋亡情况, 结果显示 miR-543 mimic 组与 mimic NC 组相比细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.01$ ); miR-543 inhibitor 组与 inhibitor NC 组相比, 细胞凋亡率显著减少 ( $P < 0.01$ ), 见表 2 和图 4。由此可见, 过表达 miR-543 可促进 SHG-44 细胞凋亡, 抑制 miR-543 表达可抑制细胞凋亡。

### 2.5 cyclin D1、cyclin E、Bcl-2 与 bax 蛋白表达

Western Blot 检测结果显示, miR-543 mimic 组 cyclin D1、cyclin E 蛋白表达与 mimic NC 组相比显著下调 ( $P < 0.01$ ), miR-543 inhibitor 组 cyclin D1、cyclin E 蛋白表达与 inhibitor NC 组相比显著上调 ( $P < 0.01$ , 图 5); miR-543 mimic 组 Bcl-2 蛋白表达与 mimic NC 组相比显著下调 ( $P < 0.01$ ), miR-543 inhibitor 组 Bcl-2 蛋白表达与 inhibitor NC 组相比显著上调 ( $P < 0.01$ , 图 6A); miR-543 mimic 组 bax 蛋白表达与 mimic NC 组相比显著上调 ( $P < 0.01$ ), miR-543 inhibitor 组 bax 蛋白表达与 inhibitor NC 组相比显著下调 ( $P < 0.01$ , 图 6B)。



注:A为control组,B为mimic NC组,C为inhibitor NC组,D为miR-543 mimic组,E为miR-543 inhibitor组

图3 miR-543对SHG-44细胞细胞周期的影响

Fig. 3 The effect of miR-543 on cell cycle in different groups

表2 miR-543对SHG-44细胞凋亡的影响

Tab. 2 The effect of miR-543 on apoptosis in different groups

分组	UL(%)	UR(%)	LL(%)	LR(%)	细胞凋亡率(%) UR + LR
Control	2.04	3.70	90.37	3.89	7.59 ± 0.96
mimic NC	1.79	4.09	89.64	4.49	8.58 ± 0.39
inhibitor NC	1.47	4.47	91.22	2.84	7.30 ± 0.30
miR-543 mimic	5.14	10.30	71.15	13.41	23.72 ± 1.10 <sup>(1)</sup>
miR-543 inhibitor	0.17	0.77	97.79	1.27	2.04 ± 0.29 <sup>(2)</sup>

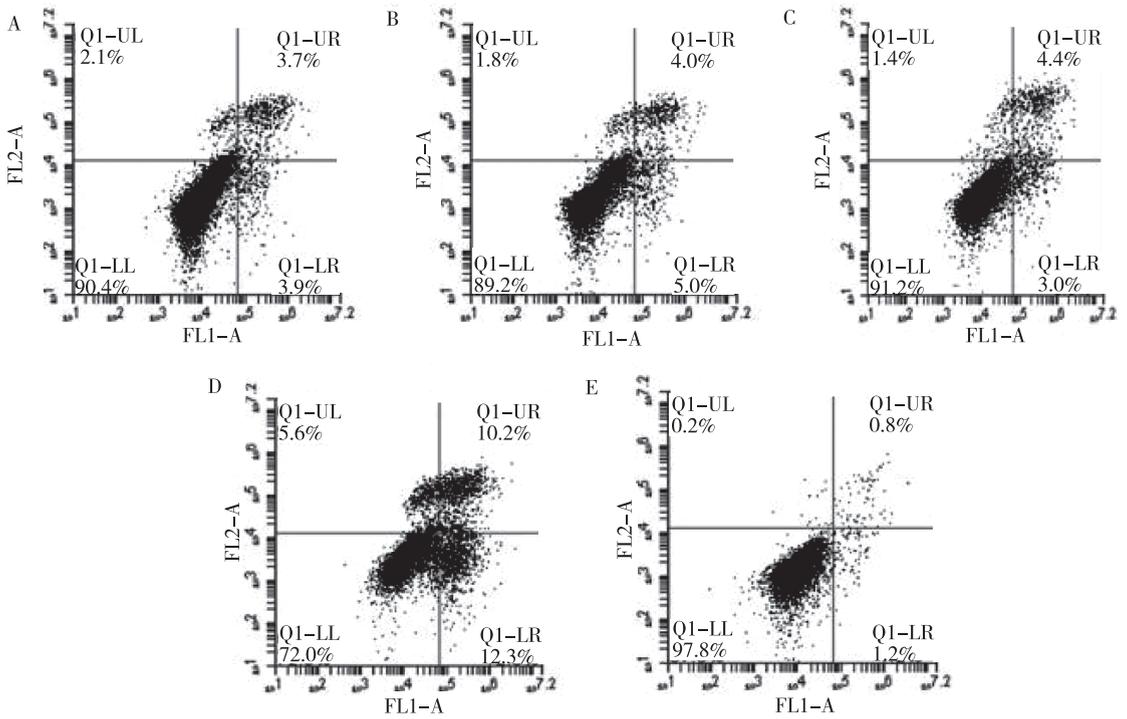
<sup>(1)</sup>与mimic NC组比较,  $P < 0.01$ ; <sup>(2)</sup>与inhibitor NC组比较,  $P < 0.01$

### 3 讨论

miR-543是新近发现的microRNA家族的一员,位于人14号染色体Dlk1-Dio3印记基因区域<sup>[5]</sup>,作为致癌基因或肿瘤抑制基因,它与人类第一大杀手癌症密切相关,在肝癌<sup>[6]</sup>、结直肠癌<sup>[7]</sup>、胃癌<sup>[8]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[9]</sup>、食管癌<sup>[10]</sup>、前列腺癌<sup>[11]</sup>、肾透明细胞癌<sup>[12]</sup>、骨肉瘤细胞<sup>[13]</sup>、子宫内膜癌<sup>[14]</sup>、乳腺癌<sup>[15]</sup>中发挥着重要作用。Xu等<sup>[16]</sup>研究发现miR-543在脑胶质瘤组织样本及脑胶质瘤细胞U87、U251、U343、A172、T98G与LN229中呈

现低表达,过表达miR-543可抑制胶质瘤细胞U251、U87细胞的增殖,然而miR-543在SHG-44细胞中的作用尚不明确。为了进一步研究miR-543在SHG-44细胞中的功能,本研究在SHG-44细胞中分别过表达及抑制miR-543表达,通过Real-time PCR检测miR-543及其靶基因AIMP3<sup>[17]</sup> mRNA的表达验证转染效果,结果显示过表达miR-543可抑制AIMP3 mRNA的表达,抑制miR-543的表达可促进AIMP3 mRNA的表达,表明miR-543模拟物及抑制物序列转染成功;继续通过MTT、流式细胞周期和流式细胞凋亡检测细胞增殖和凋亡作用,结果表明过表达miR-543可抑制胶质瘤SHG-44细胞的增殖,促进细胞凋亡,抑制miR-543的表达可促进SHG-44细胞增殖,抑制细胞凋亡,与Xu等<sup>[16]</sup>研究结果一致。

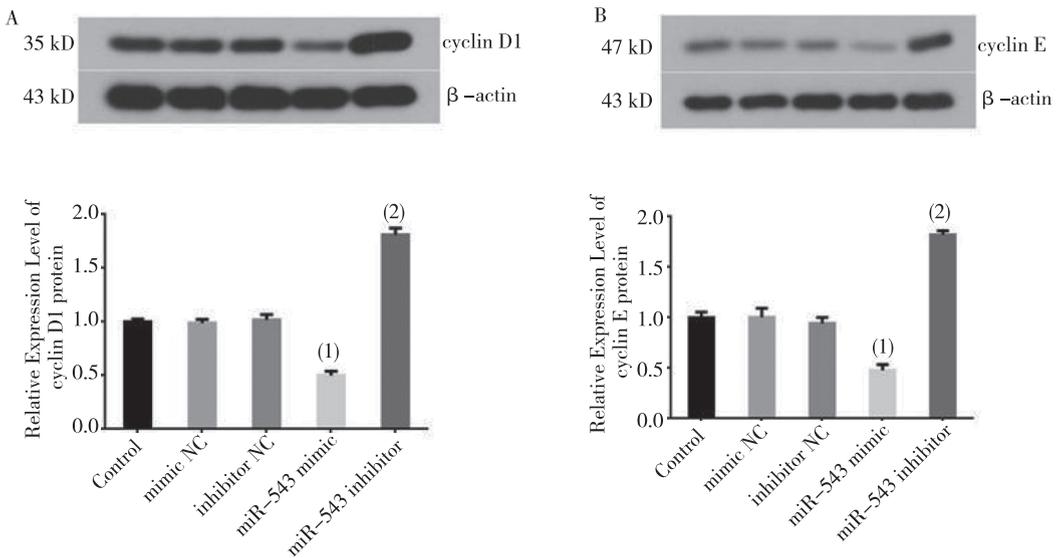
细胞周期蛋白cyclin D1和cyclin E是细胞周期G1期的两个关键表达蛋白。在G1期cyclin D1和cyclin E积累达到一定阈值后,与细胞周期依赖蛋白激酶CDK(Cyclin-dependent kinase)结合形成复合物,使Rb(retinoblastoma gene product)磷酸化,磷酸化的Rb与E2F分离,失去对E2F转录活化功能的抑制,使细胞从G1期进入S期<sup>[18]</sup>。cyclin D1和cyclin E过表达可使细胞加速从G1期转



注:A 为 control 组,B 为 mimic NC 组,C 为 inhibitor NC 组,D 为 miR-543 mimic 组,E 为 miR-543 inhibitor 组

图 4 各组 SHG-44 细胞凋亡情况

Fig. 4 Cell apoptosis in each group



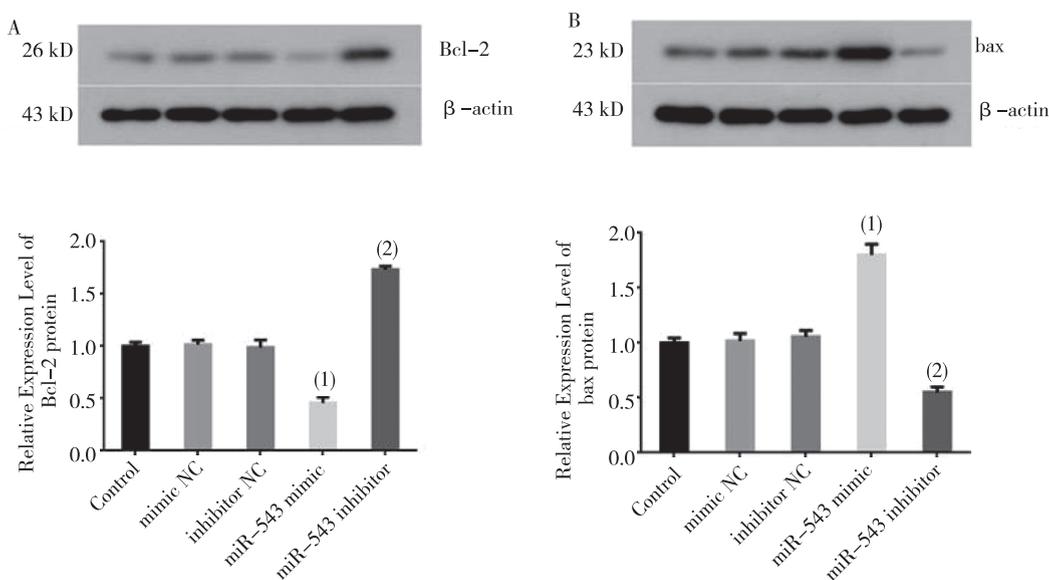
(<sup>1</sup>) 与 mimic NC 组比较,  $P < 0.01$ ; (<sup>2</sup>) 与 inhibitor NC 组比较,  $P < 0.01$

图 5 miR-543 对 SHG-44 细胞 cyclin D1 与 cyclin E 蛋白表达的影响

Fig. 5 The effect of miR-543 on the protein expression of cyclin D1 and cyclin E

换到 S 期, G1 期缩短; 阻断或敲除 cyclin D1 和 cyclin E 可使细胞不能从 G1 期进入 S 期, 发生细胞周期阻滞, 诱导细胞发生凋亡<sup>[19]</sup>。本研究通过流

式细胞术检测细胞周期变化, 结果显示过表达 miR-543 可将 SHG-44 细胞阻滞在 G1 期; 通过 Western Blot 检测了 G1 期关键周期蛋白 cyclin D1



(<sup>1</sup>)与 mimic NC 组比较,  $P < 0.01$ ; (<sup>2</sup>)与 inhibitor NC 组比较,  $P < 0.01$

图 6 miR-543 对 SHG-44 细胞 Bcl-2 与 bax 蛋白表达的影响

Fig. 6 The effect of miR-543 on the protein expression of Bcl-2 and bax

和 cyclin E 的表达变化,结果显示,过表达 miR-543 可显著下调 cyclin D1 和 cyclin E 的表达,而抑制 miR-543 的表达可显著上调 cyclin D1 和 cyclin E 的表达,表明 miR-543 可能通过阻断 cyclin D1 和 cyclin E 的表达,抑制 SHG-44 细胞 G1 期向 S 期转变,进而抑制细胞增殖,诱导细胞发生凋亡。

Bcl-2 家族成员在细胞凋亡过程中起重要作用。Bcl-2 家族可分为两类,一类在肿瘤细胞中发挥抗凋亡的作用,主要有 Bcl-2、Bcl-XL、Mcl、Bcl-W、Bcl-B/Bcl-2L10,另一类在肿瘤细胞中发挥促凋亡的作用,主要有 bax、BAK、BOK/MTD<sup>[20]</sup>,其中 Bcl-2 和 bax 是参与细胞凋亡调控比较重要的两个基因,Bcl-2 高表达可降低内质网  $Ca^{2+}$  离子浓度,抑制线粒体膜的通透性并抑制细胞色素 C 的释放,同时抑制线粒体膜电位的降低进而抑制细胞凋亡;而 bax 可拮抗 Bcl-2,使  $Ca^{2+}$  浓度迅速持续升高,改变线粒体膜的通透性,促进细胞色素 C 的释放,降低线粒体膜电位,激活 Caspase 通路进而促进细胞凋亡。本研究通过 Western Blot 方法检测了 Bcl-2 与 bax 的蛋白表达变化,结果显示过表达 miR-543 可上调 bax 表达、下调 Bcl-2 的表达,而抑制 miR-543 的表达结果与之相反,揭示 miR-543 可能通过调控 bax 和 Bcl-2 的表达激活 Caspase 通路,进而抑制细胞增殖促进细胞凋亡。

综上所述,推测在脑胶质瘤细胞中 miR-543 通

过激活 Caspase 凋亡信号通路进而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。本实验为 miR-543 抑制脑胶质瘤细胞增殖作用机制的进一步研究提供了证据,揭示 miR-543 可作为新的脑胶质瘤相关基因治疗靶点,为延长脑胶质瘤患者生存期提供新方向。

#### 4 参考文献

- [1] LIANG C, SU J, JIA X, et al. Treating malignant glioma in Chinese patients: update on temozolomide[J]. *Oncotargets & Therapy*, 2014, 7:235 - 244.
- [2] BORCHERT G M, LANIER W, DAVIDSON B L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs [J]. *Nat Struc Mol Biol*. 2006, 13(12):1097 - 1101.
- [3] MAQBOOL R, UL H M. MicroRNAs and human diseases: diagnostic and therapeutic potential[J]. *Cell & Tissue Research*, 2014, 358(1):1 - 15.
- [4] JI T, ZHANG X, LI W. MicroRNA-543 inhibits proliferation, invasion and induces apoptosis of glioblastoma cells by directly targeting ADAM9 [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(5):6419.
- [5] HAGA C L, PHINNEY D G. MicroRNAs in the imprinted DLKI-DIO3 region repress the epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the TWIST1 signaling network [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(51): 42695 - 42707.
- [6] LIU L P, YANG M, PENG Q Z et al. UBE2T promotes

- hepatocellular carcinoma cell growth via ubiquitination of p53[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(1): 20–27.
- [7] FAN C, LIN Y, MAO Y, et al. MicroRNA-543 suppresses colorectal cancer growth and metastasis by targeting KRAS, MTA1 and HMG2A[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 21825–21839.
- [8] LI J, DONG G, WANG B, et al. miR-543 promotes gastric cancer cell proliferation by targeting SIRT1[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2016, 469(1): 15–21.
- [9] BI M, CHEN W, YU H, et al. miR-543 is up-regulated in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer and promotes cell proliferation and invasion via phosphatase and tensin homolog[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2016, 480(3): 369–374.
- [10] ZHAO H Y, DIAO C Y, WANG X H et al. MiR-543 promotes migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of esophageal cancer cells by targeting phospholipase A2 group IVA[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(4): 1595–1604.
- [11] DU Y, LIU X H, ZHU H C, et al. MiR-543 promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer via targeting RKIP[J]. *Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology*, 2017, 41(3): 1135.
- [12] YANG F, MA J J, TANG Q S et al. MicroRNA-543 promotes the proliferation and invasion of clear cell renal cell carcinoma cells by targeting Krüppel-like factor 6[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 616–623.
- [13] ZHANG H, GUO X, FENG X, et al. MiRNA-543 promotes osteosarcoma cell proliferation and glycolysis by partially suppressing PRMT9 and stabilizing HIF-1 $\alpha$  protein[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(2): 2342–2355.
- [14] BING L, HONG C, LI X S, et al. MicroRNA-543 suppresses endometrial cancer oncogenicity via targeting FAK and TWIST1 expression[J]. *Archives of Gynecology & Obstetrics*, 2014, 290(3): 533–541.
- [15] CHEN P, XU W, YI L, et al. MicroRNA 543 suppresses breast cancer cell proliferation, blocks cell cycle and induces cell apoptosis via direct targeting of ERK/MAPK[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 1423–1431.
- [16] Xu L, Yu J, Wang Z, et al. miR-543 functions as a tumor suppressor in glioma in vitro and in vivo[J]. *Oncology Reports*, 2017, 38(2): 255–261.
- [17] LEE S, YU KR, RYU YS, et al. miR-543 and miR-590-3p regulate human mesenchymal stem cell aging via direct targeting of AIMP3/p18[J]. *Age Dordr*, 2014, 36(6): 9724.
- [18] LUO Y, HURWITZ J, MASSAGUÉ J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21 Cip1[J]. *Nature*, 1995, 375(6527): 159–161.
- [19] SONG D D, LIANG H S, QU B et al. Moxidectin inhibits glioma cell viability by inducing G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis. [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(3): 1348–1358.
- [20] DEWSON G, KLUCK R M. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease[J]. *Cell Health & Cytoskeleton*, 2010, 2(1): 60–67.

(2018-09-18 收稿, 2018-11-23 修回)  
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 丁廷森