

Expression of MiR-135a-3p in Non-Functional Pituitary Adenomas and Its Effect on Its Invasiveness

Weikang Tan*, Chenghao Wang, Jianpeng Wang, Zhiyong Yan*

Department of Neurosurgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong
Email: *576306132@qq.com, *zyzjh@sina.com

Received: Jul. 25th, 2020; accepted: Aug. 6th, 2020; published: Aug. 13th, 2020

Abstract

Objective: To investigate the expression of miR-135a-3p in nonfunctional pituitary adenoma (NFPA) and its effect on the invasion of NFPA cells. **Methods:** 50 NFPA tissues (25 invasive and 25 non-invasive) were detected by real-time quantitative PCR. Normal rat pituitary tumor cell lines were cultured and randomly divided into the experimental group and the negative control group. miR-135a-3p inhibitor and miR-135a-3P NC were transfected respectively, and the expression of miR-135a-3P was detected by quantitative real-time PCR. CCK8 assay was used to detect the proliferation of pituitary tumor cells after transfection. Transwell assay was used to detect the migration ability of pituitary tumor cells. **Results:** The expression level of miR-135a-3p in the invasive NFPA group was significantly higher than that in the non-invasive NFPA group ($P < 0.05$). After transfection with miR-135a-3p inhibitor, the proliferation ability of pituitary tumor cell lines decreased compared with the negative control group ($P < 0.05$). Cell migration was decreased in the miR-135a-3p inhibitor group compared with the negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Overexpression of miR-135a-3p in NFPA may regulate the proliferation of pituitary tumor cells and promote their invasion.

Keywords

MiR-135a-3p, Non-Functional Pituitary Adenomas, Proliferation, Invasiveness

Mir-135a-3p在无功能垂体腺瘤中的表达及其侵袭性的影响

谭维康*, 王成浩, 王建鹏, 闫志勇*

青岛大学附属医院神经外科, 山东 青岛

*通讯作者。

Email: *576306132@qq.com, *yzyjh@sina.com

收稿日期: 2020年7月25日; 录用日期: 2020年8月6日; 发布日期: 2020年8月13日

摘要

目的: 本文探讨miR-135a-3p在无功能垂体腺瘤(NFPA)中的表达及其对NFPA细胞侵袭性的影响。**方法:** 采用实时定量PCR分别检测50例的NFPA组织(侵袭性和非侵袭性各25例); 培育正常大鼠垂体瘤细胞株, 随机分为实验组和阴性对照组, 分别转染miR-135a-3p inhibitor和miR-135a-3p NC, 采用实时荧光定量PCR检测miR-135a-3p的表达; 转染后分别进行CCK8实验检测垂体瘤细胞增殖能力; Transwell实验检测垂体瘤细胞的迁移能力。**结果:** 结果显示, 侵袭性NFPA组中miR-135a-3p表达量明显高于非侵袭性NFPA组($P < 0.05$); 转染miR-135a-3p inhibitor后垂体瘤细胞株的细胞增殖能力较阴性对照组下降($P < 0.05$); miR-135a-3p inhibitor组垂体瘤细胞与阴性对照组相比细胞迁移能力下降($P < 0.05$)。**结论:** miR-135a-3p在NFPA中过表达, 其可能调控垂体瘤细胞的增殖从而促进其侵袭行为的发生。

关键词

miR-135a-3p, 无功能垂体腺瘤, 增殖, 侵袭性

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

垂体腺瘤是常见的中枢神经系统肿瘤之一, 占颅内肿瘤的10%~25%, 垂体腺瘤在生物学功能上大致分为三种类型: 良性腺瘤、侵袭性垂体腺瘤、垂体腺癌。按照内分泌功能分为: 功能性垂体腺瘤和无功能性垂体腺瘤, 流行病学研究显示, 无功能性垂体腺瘤(non-functioning pituitary adenomas NFPA)约占所有PA的一半[1]。多项研究指出, 侵袭性NFPA手术全切困难且复发率高, NFPA侵袭性是影响手术效果的关键因素, 并与患者预后高度相关[2][3]。MicroRNA是短片段(19~25个核苷酸, miRNA)非编码RNA, 在调节许多生物过程中起着关键作用, 包括发育、分化、肿瘤的迁移侵袭等[4]。研究[5]表明, 肿瘤细胞与正常细胞相比表现出异常的miR-135a表达谱, 提示miR-135-3p在肿瘤形成和进展中可能发挥重要作用。然而miR-135a-3p在垂体腺瘤中的表达尚未有研究报道。

2. 材料与方法

2.1. 组织标本来源

收集2018年6月~2020年3月青岛大学附属医院神经外科行垂体瘤手术患者50例NFPA组织标本(侵袭性、非侵袭性各25例), 组织标本离体-80℃保存备用。

侵袭性NFPA选择标准: 具备下述3种情况之一者:

- 1) MRI显示肿瘤侵入海绵窦(Knosp分类的3、4级; Hardy-Wilson分类的4级);
- 2) 组织病理学证实有其它周围组织侵袭(硬膜、骨质等组织侵犯);
- 3) 术中见海绵窦、硬膜及骨质侵袭。

关于本研究的目的与研究过程,所有患者均知情同意,且获得本单位伦理委员会通过。

2.2. 细胞、特殊试剂来源

大鼠垂体瘤细胞系(MMQ、GH3)购于 ATCC 细胞库; CCK-8 试剂盒(东仁化学); Lipofectamine3000 (Thermo); Transwell (Millipore); 反转录试剂盒(Takara); 荧光定量 PCR 试剂盒(Takara)。

2.3. qPCR 检测 NFPA 中 miR-135a 表达水平

将垂体瘤标本组织块放入研钵中,加入液氮研磨 3 次,按每 50~100 mg 组织加入 1 ml Trizol,离心沉淀后提取得总 RNA,以总 RNA 为模板,按反转录试剂盒说明书操作逆转录得到 cDNA。取 cDNA,根据实时荧光量 PCR 试剂盒说明书配制 PCR 体系进行反应。

2.4. 细胞培养、转染与分组

在超净台中将用干冰保存的大鼠垂体瘤细胞悬液转入 DMEM + 10% FBS 培养基中培养,细胞培养箱环境温度为 37℃,二氧化碳浓度为 5%。将细胞随机分为阴性对照组与实验组。使用 Lipofectamine3000 分别转染 miR-135a-3p inhibitor 和 miR-135a-3p NC。分别将转染后的细胞采用 qPCR 技术检测 MMQ 与 GH3 细胞中的 miR-135a-3p 表达(引物序列见表 1)。

Table 1. Primer sequence

表 1. 引物序列

Gene	Upstream primer	Downstream primer
miR-135a-3p	5'-TGCGGTGTAGGGATGGAAGCCAT-3'	5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT -3'
GAPDH	5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3'	5'-TCCACCACCTGTGTGCTGTA-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT -3'

(60℃退火 30 s)。

2.5. 细胞增殖活性检测(CCK8)

将各组细胞接种于 3 个 96 孔板内,各组设置三个复孔,各个时点(24 h、48 h、72 h)向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在 37℃的培养箱中避光孵育 2 h,应用酶标仪测定 450 nm 波长处各孔不同时点的光密度(OD)值。

2.6. 细胞迁移活性检测(Transwell)

将各组细胞于转染 12 h 后,离心、去上清,以 500 μL 无血清培养基重悬细胞,对细胞进行计数;将各组细胞加入 Transwell 小室内,每室加入 2×10^5 个细胞。小室置于 24 孔板中,含血清完全培养基中继续培养 48 h,用移液枪加入到流式管中清洗后检测管内细胞数目。

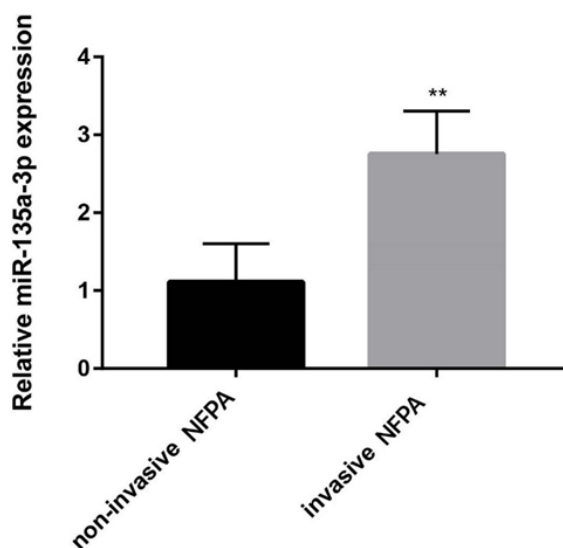
2.7. 统计学方法

应用 SPSS22.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 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。

3. 结果

3.1. MiR-135a-3p 在 NFPA 组织中的表达情况

本实验共收集侵袭性与非侵袭性 NFPA 标本各 25 例。在侵袭性 NFPA 组织中,miR-135a-3p 相对表达量与非侵袭性 NFPA 相比,明显高表达,两者比较 $P < 0.05$ (见图 1)。



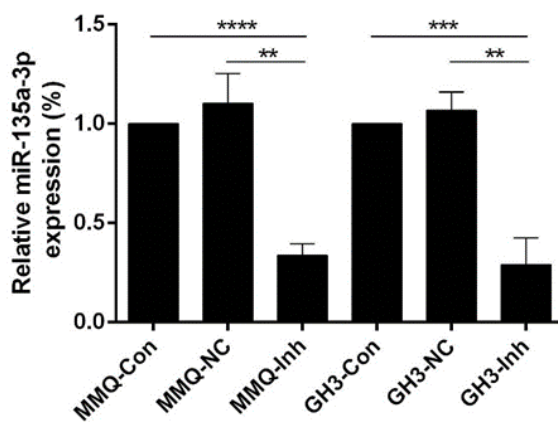
Note: *. $P < 0.05$. **. $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 1. Differential expression of Mir-135a-3p in invasive and non-invasive NFPA tissues

图 1. MiR-135a-3p 在侵袭性与非侵袭性 NFPA 组织中的差异表达

3.2. 细胞转染结果

转染后运用 qPCR 分别检测大鼠垂体瘤细胞株中的 miR-135a-3p 的表达, 其中实验组 miR-135a-3p 表达量较 NC 组与空白组明显下降($P < 0.05$), 而 NC 组与空白组相比较未见明显差异(见图 2)。



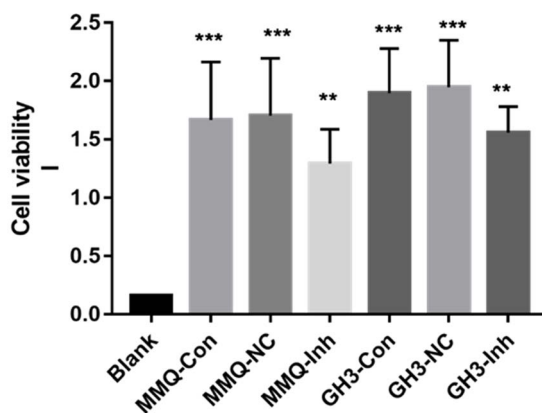
Note: *. $P < 0.05$. **. $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 2. Expression of pituitary tumor cells after transfection with miR-135a-3p-inhibitor in both groups

图 2. 两组垂体瘤细胞转染 miR-135a-3p-inhibitor 后表达情况

3.3. 细胞增殖实验结果

CCK-8 法检测结果显示, 与 NC 组与空白对照组比较, miR-135a-3p inhibitor 组 GH3 与 MMQ 细胞的增殖活性明显降低, $P < 0.05$ (图 3)。上述结果表明敲降 miR-135a-3p 抑制了垂体瘤细胞增殖。



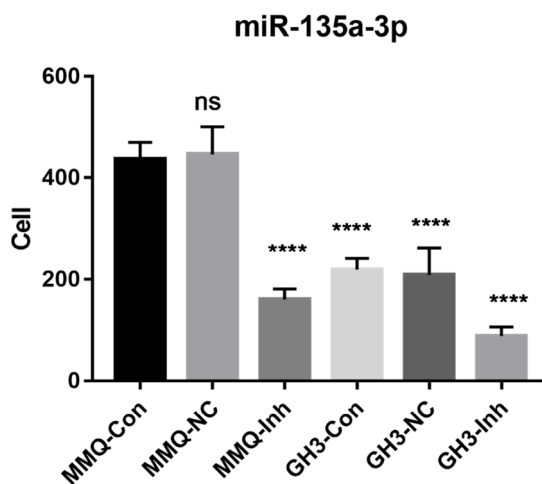
Note: *. P < 0.05. **. P < 0.01. ***. P < 0.001. ****P < 0.0001.

Figure 3. After transfection with Mir-135a-3p-inhibitor, the proliferative activity of pituitary tumor cells was significantly decreased

图 3. 转染 miR-135a-3p-inhibitor, 垂体瘤细胞增殖活性明显减低

3.4. 细胞迁移实验结果

Transwell 实验检测结果显示, miR-135a-3p inhibitor 组, 与 NC 组和空白对照组比较, miR-135a-3p inhibitor 组中垂体瘤细胞迁移跨胶能力显著下降(均 P < 0.05)。上述结果表明, 敲降 miR-135a-3p 抑制了垂体瘤细胞的迁移及侵袭能力(图 4)。



Note: *. P < 0.05. **. P < 0.01. ***. P < 0.001. ****P < 0.0001.

Figure 4. After transfection with Mir-135a-3p-inhibitor, the migration ability of pituitary tumor cells was decreased

图 4. 转染 miR-135a-3p-inhibitor, 垂体瘤细胞迁移能力下降

4. 讨论

垂体腺瘤起源于蝶鞍内脑垂体细胞, 约占所有颅内肿瘤的 10%~25%。垂体腺瘤按照临床表现和血清激素水平可分为功能性腺瘤和无功能性腺瘤, 泌乳素瘤是最常见的功能性垂体腺瘤, 多巴胺激动剂(DA)

是主要的治疗方法[6]。而无功能垂体腺瘤尚未有明确疗效的药物,临床上仍以手术为主。先前的研究已经证实了大多数垂体瘤的良性性质。然而在临床上,约三分之一的垂体腺瘤呈浸润性生长。例如垂体腺瘤常表现出朝向外周组织、神经侵袭性生长,并因此被称为侵袭性垂体瘤[7]。侵袭性垂体腺瘤进展快速,在手术过程中是很难完全切除,并且手术后短期复发率高,是临床治疗的一大挑战。垂体瘤的侵袭性生长是引起疾病的复发,进一步影响临床疗效和预后的重要因素之一。因此,垂体腺瘤的侵袭性是影响手术效果的关键因素,并与患者预后高度相关[8]。

miRNA 是一类由 19~25 个核苷酸组成的内源性非编码单链小分子 RNA,通过与靶基因的配对,转录后调控基因的表达,在器官形成、细胞增殖凋亡、肿瘤形成等一系列生命过程中起着重要的调控作用[9]。近些年的研究表明,miR-135a-3p 在多种恶性肿瘤的中异常表达。例如,在乳腺癌、鼻咽癌等肿瘤中低表达[10][11],但在肝癌、结肠癌等肿瘤中却异常高表达[12][13],下调肿瘤细胞中 miR135a-3p 水平可抑制肿瘤的生长及转移速度。由此可见,miR-135a-3p 在不同的肿瘤中存在明显的差异性。

miR-135a-3p 在垂体腺瘤中的作用机制尚未有研究报道,本文中我们对其在 NFPA 中的表达及对肿瘤侵袭性的影响进行了初步研究。首先我们应用实时定量 PCR 技术分别检测侵袭性与非侵袭性 NFPA 组织标本中 miR-135a-3p 的相对表达量,结果表明与非侵袭性 NFPA 对比,侵袭性 NFPA 中 miR-135a-3p 明显高表达。为了明确 miR-135a-3p 在垂体腺瘤中的作用机制,我们在细胞水平设计试验,将大鼠 MMQ/GH3 细胞株进行敲降转染,模拟低表达水平,转染成功后通过 CCK8、Transwell 实验表明低表达水平的 miR-135a-3p 抑制了肿瘤的增殖、迁移能力。

5. 结论

综上所述,miR-135a-3p 在侵袭性 NFPA 组织中过表达,敲降肿瘤细胞中 miR-135a-3p 水平,可以明显抑制垂体瘤细胞的增殖及迁移能力,提示 miR-135a-3p 在 NFPA 中可能通过影响肿瘤的增殖及迁移能力促进其侵袭性的发生,为侵袭性 NFPA 的靶向治疗提供了新的方向。

致 谢

感谢闫志勇教授山东省自然科学基金项目(ZR2017MH077, EGFL7 通过介导 Notch 信号通路调控 GH 垂体腺瘤侵袭生物学行为的机制研究)对于本研究的支持,感谢王建鹏主任对于文章撰写提供的指导,感谢王成浩同学提供的实验帮助。

基金项目

山东省自然科学基金项目(ZR2017MH077)。

参考文献

- [1] Ezzat, S., Asa, S.L., Couldwell, W.T., *et al.* (2004) The Prevalence of Pituitary Adenomas: A Systematic Review. *Cancer*, **101**, 613-619. <https://doi.org/10.1002/cncr.20412>
- [2] Herbert, S.P. and Stainier, D.Y. (2011) Molecular Control of Endothelial Cell Behaviour during Blood Vessel Morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **12**, 551-564. <https://doi.org/10.1038/nrm3176>
- [3] Oldfield, E.H. (2014) Editorial: Management of Invasion by Pituitary Adenomas. *Journal of Neurosurgery*, **121**, 501-503. <https://doi.org/10.3171/2014.5.JNS132817>
- [4] Zhang, Y., Hu, Y., Fang, J.Y., *et al.* (2016) Gain-of-Function miRNA Signature by Mutant p53 Associates with Poor Cancer Outcome. *Oncotarget*, **7**, 11056-11066. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4905457/>
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7090>
- [5] Wang, Q.J., Zhang, H.C., Shen, X.J., *et al.* (2017) Serum microRNA-135a-5p as an Auxiliary Diagnostic Biomarker for Colorectal Cancer. *Annals of Clinical Biochemistry*, **54**, 76-85. <https://doi.org/10.1177/0004563216638108>

-
- [6] Liu, X., Liu, Y., Gao, J., *et al.* (2018) Combination Treatment with Bromocriptine and Metformin in Patients with Bromocriptine-Resistant Prolactinomas: Pilot Study. *World Neurosurgery*, **115**, 94-98. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.02.188>
- [7] Oldfield, E.H. (2014) Editorial: Management of Invasion by Pituitary Adenomas. *Journal of Neurosurgery*, **121**, 501-503. <https://doi.org/10.3171/2014.5.JNS132817>
- [8] Ribatti, D., Nico, B. and Crivellato, E. (2009) Morphological and Molecular Aspects of Physiological Vascular Morphogenesis. *Angiogenesis*, **12**, 101-111. <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9125-1>
- [9] Sorel, O. and Dewals, B.G. (2016) MicroRNAs in Large Herpesvirus DNA Genomes: Recent Advances. *BioMolecular Concepts*, **7**, 229-239. <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0017>
- [10] Ahmad, A., Zhang, W., Wu, M., *et al.* (2018) Tumor-Suppressive miRNA-135a Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation by Targeting ELK1 and ELK3 Oncogenes. *Genes Genomics*, **40**, 243-251. <https://doi.org/10.1007/s13258-017-0624-6>
- [11] Wang, L.X., Kang, Z.P., Yang, Z.C., *et al.* (2018) MicroRNA-135a Inhibits Nasopharyngeal Carcinoma Cell Proliferation through Targeting In-Terleukin-17. *Cellular Physiology & Biochemistry*, **46**, 2232-2238. <https://doi.org/10.1159/000489591>
- [12] Zeng, Y.B., Liang, X.H., Zhang, G.X., *et al.* (2016) miRNA-135a Promotes Hepatocellular Carcinoma Cell Migration and Invasion by Targeting Forkhead Box O1. *Cancer Cell International*, **16**, 63. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0328-z>
- [13] Zhou, W., Li, X., Liu, F., *et al.* (2012) MiR-135a Promotes Growth and Invasion of Colorectal Cancer via Metastasis Suppressor 1 *In Vitro*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, **44**, 838-846. <https://doi.org/10.1093/abbs/gms071>