

HCG11 通过调控 miR-4425/FDFT1 通路对脑胶质瘤细胞的恶性进展的作用机制研究

杨覃 肖虹

【摘要】 目的 研究长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, LncRNA)人白细胞抗原复合物 11(Human leukocyte antigen complex group 11, HCG11)通过微小 RNA(Micro RNA, miR)-4425/法呢基二磷酸酯酶 1(Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1, FDFT1)轴抑制脑胶质瘤细胞恶性进展的作用和分子机制。**方法** 收集本院脑胶质瘤患者的肿瘤组织及邻近的正常组织,并通过实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术检测 HCG11, miR-4425 和 FDFT1 的表达水平;构建替莫唑胺耐药株,并通过细胞计数试剂盒 8(Cell counting kit 8, CCK-8)实验和流式细胞术检测空白对照组(pcDNA-negative control, pcDNA-NC)、过表达 HCG11 组(Over expression of pc-HCG11, pc-HCG11)、过表达 miR-4425 类似物组(Over expression of miR-4425 mimics, miR-4425 mimics)的细胞活力和凋亡情况;通过免疫印迹技术和双荧光素酶报告基因系统检测各组细胞的 FDFT1 蛋白表达水平和 HCG11, miR-4425, FDFT1 之间的靶向关系。**结果** HCG11 在脑胶质瘤组织和细胞系中低表达;过表达 HCG11 可抑制脑胶质瘤细胞的恶性增殖并促进凋亡;过表达 HCG11 能促进脑胶质瘤细胞的化疗敏感性;HCG11 直接靶向并负向调控 miR-4425 表达;miR-4425 通过靶向 3'端非翻译区(3' Untranslated regions, 3' UTR)负向调控 FDFT1;HCG11 通过 miR-4425 调控 FDFT1 表达并促进脑胶质瘤细胞的化疗敏感。**结论** HCG11 通过负向调控 miR-4425 以增加其靶蛋白 FDFT1 表达,从而抑制脑胶质瘤细胞增殖并促进细胞凋亡,并最终提高化疗的敏感性。

【关键词】 人白细胞抗原复合物 11 微小 RNA-4425 法呢基二磷酸酯酶 1 脑胶质瘤细胞增殖 细胞凋亡 化疗耐药

【中图分类号】 Q253 R739.41 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)01-0063-10

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.01.011

Effects of HCG11 on malignant progression of glioma cells by regulating miR-4425/FDFT1 pathway Yang Qin, Xiao Hong. Department of neurosurgery, Chongqing Liangjiang New Area First Peoples Hospital, Chongqing 401144

【Abstract】 Objective To study the inhibitory effect of long noncoding RNA HCG11 on the malignant progression of glioma cells through the miR-4425/FDFT1 axis and its molecular mechanism. **Methods** Tumor tissues and adjacent normal tissues of glioma patients were collected from our hospital, and the expression levels of HCG11, miR-4425 and FDFT1 were detected by real-time quantitative PCR. Temozolomid-resistant strains were constructed, and the effects of pcDNA-NC, pc-HCG11 and miR-4425 mimics on cell vitality and apoptosis in each group were detected by CCK-8 assay and flow cytometry. Western blotting and a dual luciferase reporter system were used to detect the expression of FDFT1 protein and the targeting relationship among HCG11, miR-4425 and FDFT1. **Results** The expression of HCG11 was low in glioma tissues and cell lines. Overexpression of HCG11 inhibited malignant proliferation and promoted apoptosis of glioma cells. HCG11 overexpression promoted the sensitivity of glioma cells to chemotherapy. HCG11 directly targeted and negatively regulated miR-4425, and miR-4425 negatively regulated FDFT1 by targeting the 3'UTR. HCG11 regulated FDFT1 through miR-4425 and promoted the chemotherapeutic sensitivity of glioma cells. **Conclusion** HCG11 negatively regulates miR-4425 to increase the expression level of its target protein FDFT1, thereby inhibiting the proliferation of glioma cells and promoting cell apoptosis and ultimately improving the sensitivity of chemotherapy.

【Key words】 HCG11 MiR-4425 FDFT1 Glioma Cell proliferation Apoptosis Chemoresistance

脑胶质瘤是成年人中最为常见的中枢神经系统恶性肿瘤^[1],其临床预后较差,约80%的脑胶质瘤患者在诊断后的5年内死亡^[2]。据统计学报道,诊断延迟是脑胶质瘤临床预后不良的主要原因,其在老年患者中更为常见^[3]。手术切除联合辅助放、化疗是脑胶质瘤的标准治疗方案^[4],然而脑胶质瘤细胞通常对放疗和化疗具有较高的抵抗性^[5]。替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)是一种烷基化抗肿瘤药物,近年来被广泛应用于脑胶质瘤患者的一线化疗。但多项研究表明,大部分的脑胶质瘤患者会迅速对TMZ治疗产生耐药性,从而导致治疗效果差和患者的不良反应^[6]。因此,迫切需要阐明脑胶质瘤对TMZ耐药的分子机制,进而提高TMZ辅助化疗的效果,并改善脑胶质瘤患者的预后情况。

近年来,长链非编码RNA(Long non-coding RNA, LncRNA)人白细胞抗原复合物11(Human leukocyte antigen complex group 11, HCG11)的失调被报道与多种恶性肿瘤发生和发展密切相关。HCG11被报道作为竞争性内源性RNA(Competing endogenous RNAs, ceRNA),通过“分子海绵”作用吸收miRNAs并抑制宫颈癌^[7]和喉癌^[8]肿瘤细胞的恶性增殖。Zhang等已报道HCG11在脑胶质瘤细胞U87MG和U118中可靶向负调控miR-4425,促进转移性肿瘤抗原家族蛋白3(Metastasis associated 1 family member 3, MTA3)的表达,进而抑制脑胶质瘤细胞的增殖和促进凋亡。本研究同样明确了HCG11和miR-4425在脑胶质瘤细胞中的作用,并首次发现了HCG11/miR-4425/FDFT1信号轴在脑胶质瘤中的重要作用^[9]。本研究旨在观察HCG11在脑胶质瘤组织和正常细胞中的表达情况,并通过转染实验评估HCG11对脑胶质瘤细胞增殖、凋亡和TMZ化疗耐药性的影响,进一步探讨HCG11潜在的分子调控机制,为脑胶质瘤治疗提供潜在的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞株

正常人星形胶质细胞M059J和脑胶质瘤细胞系U87MG, A172, U251, U118均购自中国科学院上海细胞库。

1.2 临床样本

从本院诊断为脑胶质瘤的患者中获得68对人

脑胶质瘤组织及邻近非肿瘤组织。所有患者在研究前均提交知情同意书;本院伦理委员会已批准本研究;收集后迅速将所有脑胶质瘤组织置于液氮中冷冻,并在-80℃冰箱中保存。

1.3 主要试剂与仪器

杜贝尔克改良培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基购自北京诺博莱德科技有限公司;HCG11 shRNA, pc-HCG11, miR-4425 mimics, miR-4425 inhibitor及相应对照质粒购自中国上海GenePharma公司;Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司;TMZ购自湖南凯米尔生物科技有限公司;cDNA逆转录试剂盒购自广州易锦生物技术有限公司;SYBR Premix ExTaq II试剂盒、CCK-8试剂盒购自北京智杰方远科技有限公司;PrimeScript miRNA实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒购自上海易汇生物科技有限公司;膜连蛋白5荧光素(Annexin V-fluorescein, Annexin V-FITC)凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;双荧光素酶活性检测试剂盒购自上海泽叶生物科技有限公司;FDFT1, β -肌动蛋白(β -Actin)一抗及辣根过氧化物酶结合的IgG二抗购自美国Abcam公司。酶标仪购自南京德铁实验设备有限公司;FACS Calibur系统购自美国BD公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养

用含10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 mg/mL)的DMEM培养液培养细胞,培养环境为5% CO₂、恒温37℃。

1.4.2 细胞转染

依照试剂盒说明书利用Lipofectamine 2000转染试剂进行细胞转染;U118细胞分为Control(对照组)、pcDNA-NC(转染pcDNA-NC质粒)组、pc-HCG11(转染pcDNA-HCG11质粒)组;利用100 mmol/L的TMZ^[10]处理U118细胞,从而构建耐药细胞株U118/TMZ,并按照试剂盒说明书将pcDNA-NC, pc-HCG11, pc-HCG11和NC mimics, pc-HCG11和miR-4425 mimics分别转染至各组U118/TMZ细胞,命名为pcDNA-NC + TMZ组、pc-HCG11 + TMZ组、pc-HCG11 + NC mimics +

TMZ 组、pc-HCG11 + miR-4425 mimics + TMZ 组。

1.4.3 RNA 提取和 qRT-PCR

使用曲唑试剂(Trizol reagent, Trizol)试剂从脑胶质瘤组织或细胞中提取总 mRNA;根据试剂盒说明书使用逆转录试剂盒将 RNA 反向转录为 cDNA;利用 Bio-Rad CFX96 系统和 SYBR Premix ExTaq II 试剂盒检测 HCG11 及 FDFT1 mRNA 的表达水平;利用 SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 试剂盒检测 miR-4425 水平;将甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为 HCG11 及 FDFT1 的内源性对照,核小 RNA-U6 (Small nuclear RNA-U6, U6) 为 miR-4425 的内源性对照,并通过相对定量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)法计算其相对表达水平。引物序列:HCG11 引物序列为 5'-GCTCTATGCCATCCTGCTT-3' (正向), 5'-TCCCATCTCCATCAACCC-3' (反向); miR-4425 引物序列为 5'-AGCTTTGCGAAGTGTTGTTGG-3' (正向), 5'-TACACGAATGGTCCTGCTGA-3' (反向); FDFT1 引物序列为 5'-GCAC CACATCCCAGATGTCA-3' (正向), 5'-TTC CGAATCTTCACTGCCCC-3' (反向); U6 引物序列为 5'-CCTGCGCAAGGATGAC-3' (正向), 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (反向); GAPDH 引物序列为 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3' (正向), 5'-AAGTGG TCGTTGAGGGCAATG-3' (反向)。

1.4.4 细胞增殖实验

将 U118 细胞在 96 孔板中培养,细胞密度为 3000 个/孔;转染 2 d 后按照试剂盒说明书在不同时间点(24、48、72、96 h)将 CCK-8 试剂加入每孔中,孵育 4 h 并使用酶标仪测量 450 nm 波长的吸光度。

1.4.5 细胞凋亡实验

转染 48 h 后收集 U118 细胞,并按照试剂盒说明书用 70%乙醇过夜固定;随后按照标准操作流程利用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、FACSCalibur 系统和 ModFit LT 软件进行细胞凋亡分析。

1.4.6 双荧光素酶报告基因系统

按照试剂盒说明书提取 U118 细胞的 cDNA,并利用 PCR 技术扩增 HCG11, FDFT1 序列;利用 One Step Cloning Kit 将包含 miR-4425 推测结合位点的 HCG11, FDFT1 的序列插入到 pmiR-Glo 双荧光素酶报告质粒中,构建野生型(Wild type, WT)-HCG11/WT-FDFT1 和突变型(Mutation, MUT)-

HCG11/MUT-FDFT1 质粒;将 U118 细胞在 96 孔板中培养,按照操作指南使用 Lipofectamine 2000 与设计的载体和 miR-4425 mimics/NC mimics 共转染;转染 24 h 后通过双荧光素酶报告分析系统检测荧光素酶活性。

1.4.7 Western Blot 实验

利用放射免疫沉淀法裂解缓冲液(Radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)提取细胞的总蛋白;按照说明书利用比辛基奎宁酸(Bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒对总蛋白进行定量;随后蛋白质通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)转移到聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,并在工作水平下(1:1000)利用 FDFT1, β -Actin 一抗 4℃下孵育膜过夜,次日然后与辣根过氧化物酶结合的 IgG (1:1000)孵育 2 h,并通过增强化学发光显影系统检测蛋白水平。

1.4.8 统计学处理

使用 SPSS 20.0 软件,计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组差异比较采用 Student's *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCG11 在脑胶质瘤组织和细胞系中低表达

qRT-PCR 显示,与正常组织比较,脑胶质瘤组织中 HCG11 表达水平显著下调($P < 0.05$,图 1)。此外,与正常人星形胶质细胞 M059J 比较,脑胶质瘤细胞系 U87MG, A172, U251 和 U118 中 HCG11 表达水平均显著下调($P < 0.05$,图 1)。由于 U118 细胞中 HCG11 的相对表达水平最低,故选择 U118 细胞进行后续的细胞转染实验和耐药细胞株的构建。

2.2 过表达 HCG11 可抑制脑胶质瘤细胞的恶性增殖并促进凋亡

qRT-PCR 显示,与 Control 组和 pcDNA-NC 组比较,pc-HCG11 组的 U118 细胞中 HCG11 相对表达水平显著增高($P < 0.05$,图 2);CCK8 实验显示,与 Control 组和 pcDNA-NC 组比较,pc-HCG11 组 U118 细胞在 72 和 96 h 的细胞活力显著降低($P < 0.05$,图 2);流式细胞术显示,与 Control 组和 pcDNA-NC 组比较,pc-HCG11 组细胞凋亡率显著上升($P > 0.05$,图 2)。即过表达 HCG11 能显著抑

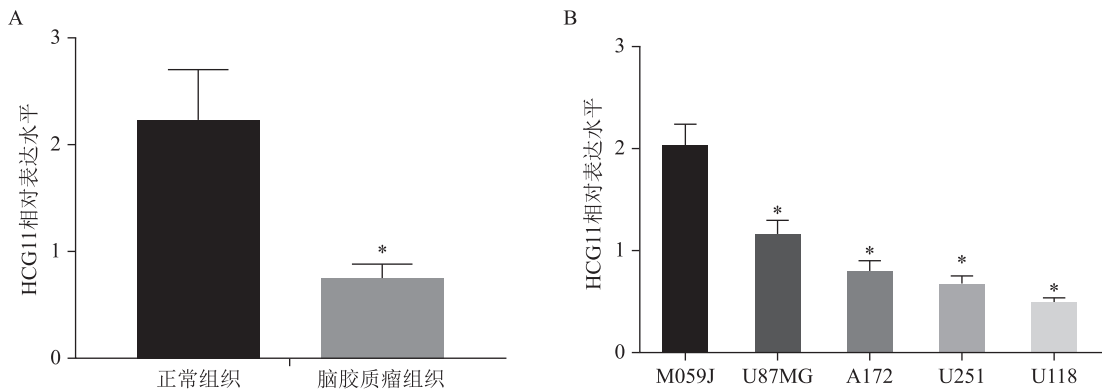


图1 HCG11在脑胶质瘤组织和细胞系中显著低表达 A为与正常组织比较,* $P < 0.05$;B为与正常人星形胶质细胞M059J比较,* $P < 0.05$

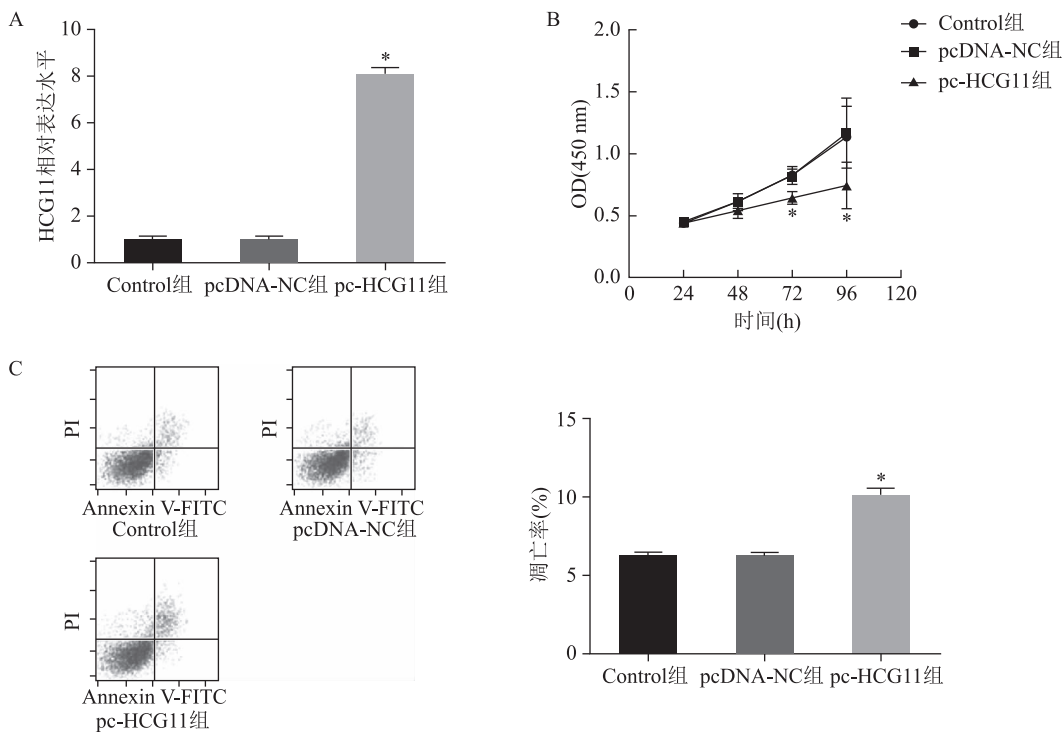


图2 HCG11抑制脑胶质瘤细胞的恶性增殖并促进细胞凋亡 A为与Control组和pcDNA-NC组比较,* $P < 0.05$;B为与Control组和pcDNA-NC组比较,* $P < 0.05$;C为与Control组和pcDNA-NC组比较,* $P < 0.05$

制脑胶质瘤细胞的恶性增殖,并促进脑胶质瘤细胞的凋亡。

2.3 HCG11过表达能促进脑胶质瘤细胞的化疗敏感性

qRT-PCR显示,与亲本U118细胞株比较, TMZ耐药性U118/TMZ细胞株中HCG11表达水平显著降低($P < 0.05$,图3);CCK8实验显示,与pcDNA-NC+TMZ组比较,pc-HCG11+TMZ组在24、48、72和96 h的细胞活力显著降低($P < 0.05$,图3);流式细胞术显示,与pcDNA-NC+TMZ组比较,pc-HCG11+TMZ组的细胞凋亡率显著增高(P

< 0.05 ,图3)。即HCG11促进了脑胶质瘤细胞对于TMZ的敏感性,其表达水平降低可能与脑胶质瘤细胞对于TMZ的耐药性有关。

2.4 HCG11直接靶向并负向调控miR-4425表达

生物信息学预测显示,miR-4425与HCG11之间存在潜在的碱基配对结合位点,即HCG11可能与miR-4425直接相互作用(图4)。荧光素酶报告基因系统显示,与NC mimics+WT-HCG11组比较,miR-4425 mimics+WT-HCG11组的荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$,图4),然而NC mimics+MUT-HCG11组和miR-4425 mimics+MUT-

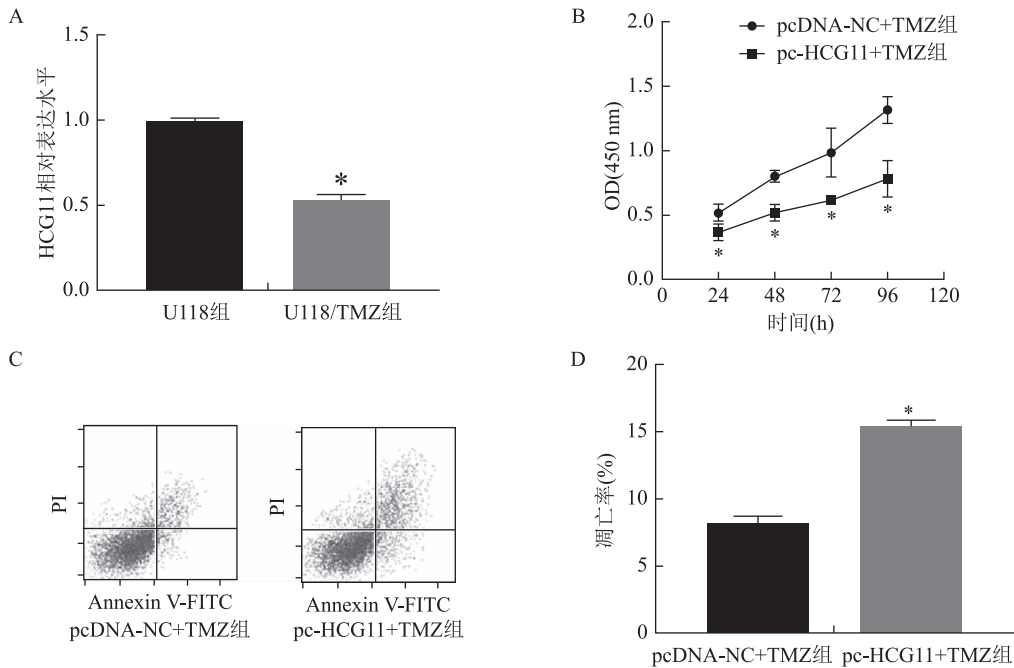


图3 HCG11 过表达能促进脑胶质瘤细胞对 TMZ 的敏感性 A 为与亲本 U118 细胞株比较, * $P<0.05$; B 为与 pcDNA-NC + TMZ 组比较, * $P<0.05$; C, D 为与 pcDNA-NC + TMZ 组比较, * $P<0.05$

HCG11 组的荧光素酶活性无显著变化 ($P>0.05$, 图 4)。此外, qRT-PCR 显示, 与 sh-NC 组比较, sh-HCG11 组 U118 细胞中 miR-4425 表达水平显著上调 ($P<0.05$, 图 4); 与 pcDNA-NC 组比较, pc-HCG11 组 U118 细胞中 miR-4425 表达水平显著下调 ($P<0.05$, 图 4)。同样地, 采用 qRT-PCR 方法检测了 TMZ 耐药性 U118/TMZ 细胞株中 miR-4425 的表达水平显示, 与亲本 U118 细胞株比较, TMZ 耐药性 U118/TMZ 细胞株中 miR-4425 表达水平显著上调 ($P<0.05$, 图 4)。此外, qRT-PCR 显示, 与 sh-NC 组比较, sh-HCG11 组 U118/TMZ 耐药株中 miR-4425 表达水平显著上调 ($P<0.05$, 图 4); 与 pcDNA-NC 组比较, pc-HCG11 组 U118/TMZ 耐药株中 miR-4425 表达水平显著下调 ($P<0.05$, 图 4)。此外, qRT-PCR 显示, 与正常组织比较, 脑胶质瘤组织中 miR-4425 的表达水平显著升高 ($P<0.05$, 图 4)。即 HCG11 直接靶向 miR-4425, 并负向调控 miR-4425 表达。

2.5 miR-4425 通过靶向 3'UTR 来负向调控 FDFT1 表达

RNAhybrid 数据库预测显示, miR-4425 与 FDFT1 的 3'UTR 之间存在潜在的碱基配对结合位点, 即 FDFT1 可能是 miR-4425 的靶基因 (图 5)。荧光素酶报告基因系统显示, 与 NC mimics + WT-

FDFT1 组比较, miR-4425 mimics + WT- FDFT1 组的荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$, 图 5), 然而 NC mimics + MUT-FDFT1 组和 miR-4425 mimics + MUT-FDFT1 组的荧光素酶活性无显著变化 ($P>0.05$, 图 5)。qRT-PCR 和 Western Blot 显示, 与 NC mimics 组比较, miR-4425 mimic 组中的 FDFT1 mRNA 和蛋白水平均显著降低 ($P<0.05$, 图 5), 而 miR-4425 inhibitor 组中的 FDFT1 mRNA 和蛋白水平均显著升高 ($P<0.05$, 图 5)。同样在 U118/TMZ 耐药株中 Western Blot 也检测了 FDFT1 的蛋白表达水平显示, U118/TMZ 耐药株中 FDFT1 的蛋白表达水平显著下调 ($P<0.05$, 图 5)。除此以外, Western Blot 显示, 与 NC mimics 组的 U118/TMZ 耐药株比较, miR-4425 mimic 组中的 FDFT1 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$, 图 5), 而 miR-4425 inhibitor 组中的 FDFT1 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$, 图 5)。此外, qRT-PCR 显示, 与正常组织比较, 脑胶质瘤组织中 FDFT1 的表达水平显著降低 ($P<0.05$, 图 5)。即 miR-4425 通过靶向 3'UTR 来负向调控 FDFT1 表达。

2.6 HCG11 通过 miR-4425 来调控 FDFT1 表达并促进脑胶质瘤细胞的化疗敏感

CCK8 实验显示, 与 pc-HCG11 + TMZ 组或 pc-HCG11 + NCmimics + TMZ 组比较, pc-HCG11 +

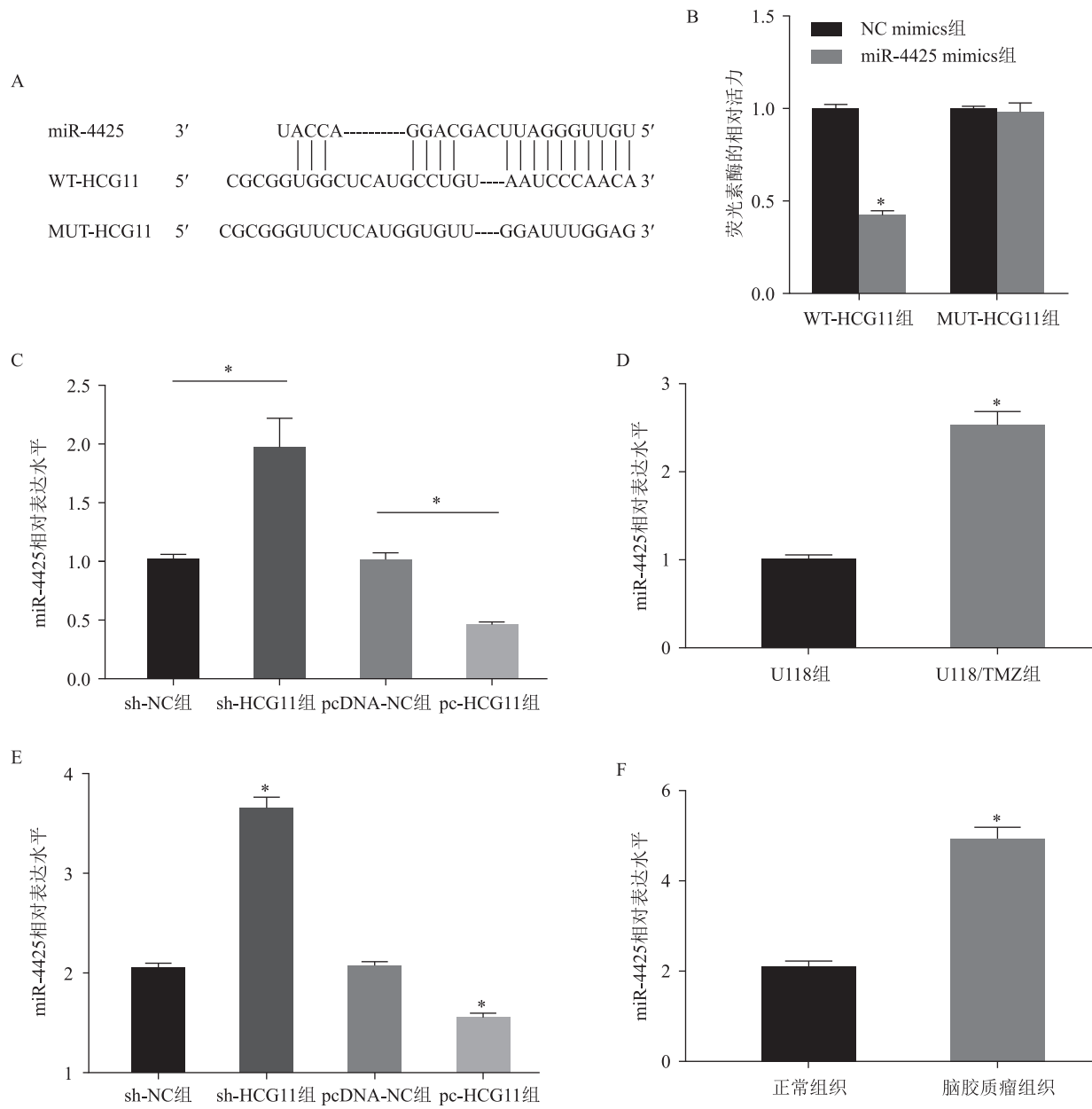


图 4 HCG11 直接靶向并负向调控 miR-4425 A 为生物信息学预测显示,miR-4425 与 HCG11 之间存在潜在的碱基配对结合位点;B 为与 NC mimics + WT-HCG11 组比较, * $P < 0.05$;C 为 2 组比较, * $P < 0.05$;D 为与亲本 U118 细胞株比较, * $P < 0.05$;E 为与 sh-NC 组和 pcDNA-NC 组比较, * $P < 0.05$;F 为与正常组织比较, * $P < 0.05$

miR-4425 mimics + TMZ 组在 48、72、96 h 的细胞活力显著升高 ($P < 0.05$, 图 6); 流式细胞术显示, 与 pc-HCG11 + TMZ 组或 pc-HCG11 + NC mimics + TMZ 组比较, pc-HCG11 + miR-4425 mimics + TMZ 组的细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$, 图 6); Western Blot 显示, 与 pcDNA-NC + TMZ 组比较, pc-HCG11 + TMZ 组的 FDFT1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$, 图 6); 与 pc-HCG11 + TMZ 组和 pc-HCG11 + NC mimics + TMZ 组比较, pc-HCG11

+ miR-4425 mimics + TMZ 组 FDFT1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$, 图 6)。即 HCG11 通过结合 miR-4425 来正向调控 FDFT1 表达, 并促进脑胶质瘤细胞的化疗敏感性。

3 讨论

近年来, LncRNA 被认为在多种肿瘤的发生和发展中参与调控多种生物过程, 并发挥重要的促癌和抑癌作用。有研究表明, HCG11 在非小细胞肺癌

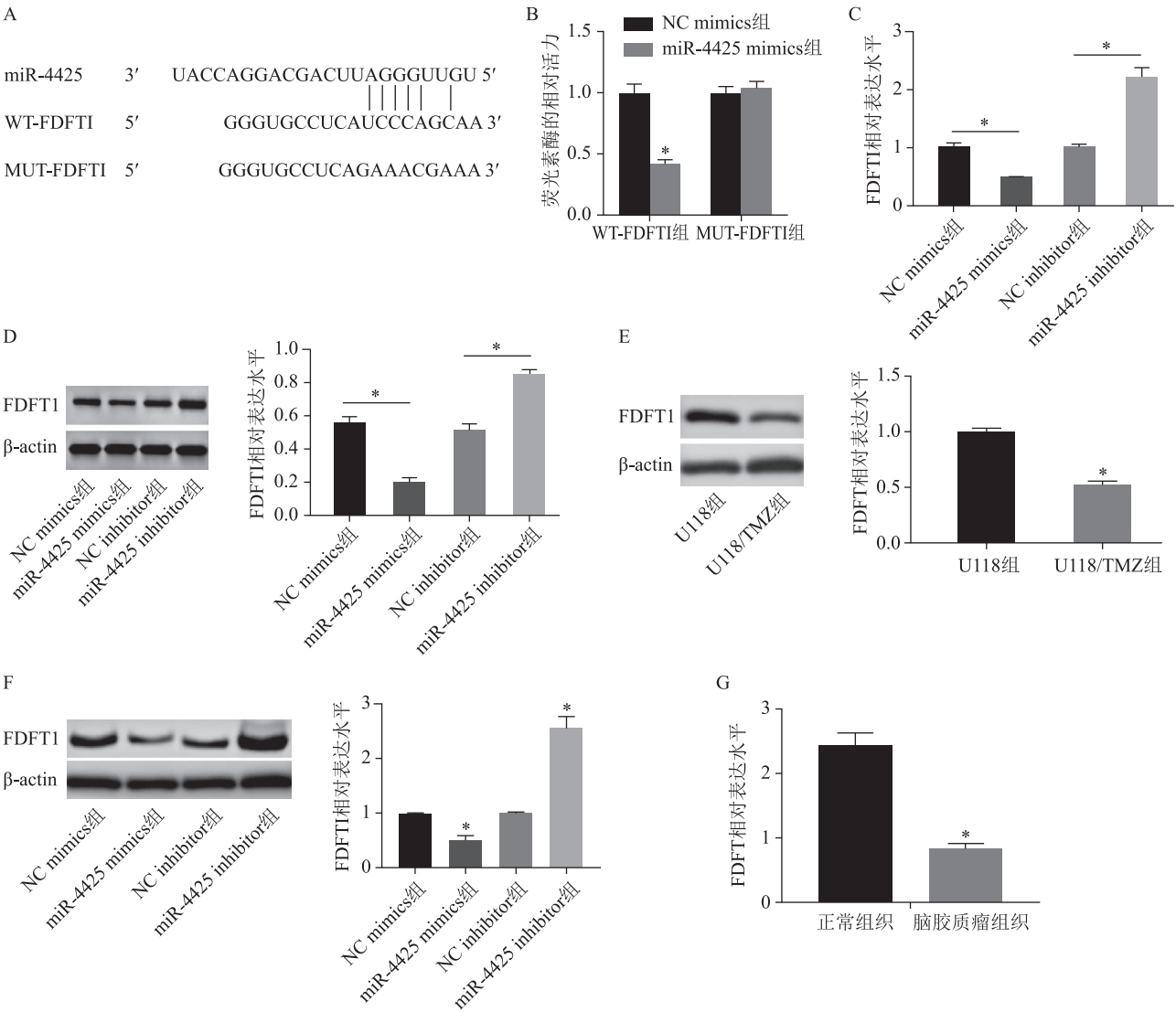


图 5 miR-4425 通过靶向 3'UTR 负向调控 FDFT1 A 为 RNAhybrid 数据库预测显示,miR-4425 与 FDFT1 的 3'UTR 之间存在潜在的碱基配对结合位点;B 为与 NC mimics + WT-FDFT1 组比较, * $P<0.05$;C,D 为 2 组比较, * $P<0.05$;E 为与亲本 U118 细胞株比较, * $P<0.05$;F 为与 NC mimics 组和 NCinhibitor 组的 U118/TMZ 耐药株比较, * $P<0.05$;G 为与正常组织比较, * $P<0.05$

中表达水平显著下调,且体外实验证明 HCG11 过表达能显著抑制肺癌细胞的恶性增殖、迁移和侵袭^[11]。此外,胃癌中的 HCG11 表达水平显著上调,可作为重要的促癌因子来加速胃癌的进展^[12]。

本研究结果显示,HCG11 在脑胶质瘤组织和 U87MG,A172,U251 和 U118 等脑胶质瘤细胞系中的表达水平均显著下调,这与先前 Zhang 等^[9]的报道一致,HCG11 在脑胶质瘤细胞系 U87MG 和 U118 中靶向负调控 miR-4425 来抑制脑胶质瘤的增殖和促进凋亡。然而,在作用机制方面 Zhang 等人认为 HCG11 可与 miR-4425 相互作用后会增加 MTA3 的表达,进而抑制脑胶质瘤细胞的生长。本

研究则发现了 HCG11/miR-4425 轴的另 1 个靶蛋白 FTFD1,明确了 HCG11/miR-4425/FTFD1 信号轴在脑胶质瘤细胞生长中发挥着重要作用。

此外,本研究通过转染 HCG11 过表达载体质粒至 U118 细胞中,证实了高表达 HCG11 可抑制 U118 的细胞活力,并促进了 U118 的细胞凋亡。以上结果提示,HCG11 抑制脑胶质瘤细胞的恶性增殖,并促进脑胶质瘤细胞的凋亡。

手术切除联合 TMZ 辅助化疗是脑胶质瘤患者的一线治疗手段^[13],然而患者对 TMZ 的治疗抵抗使得治疗效果不理想。因此,寻找新的脑胶质瘤分子靶点,提高脑胶质瘤患者的化疗敏感性是课题研

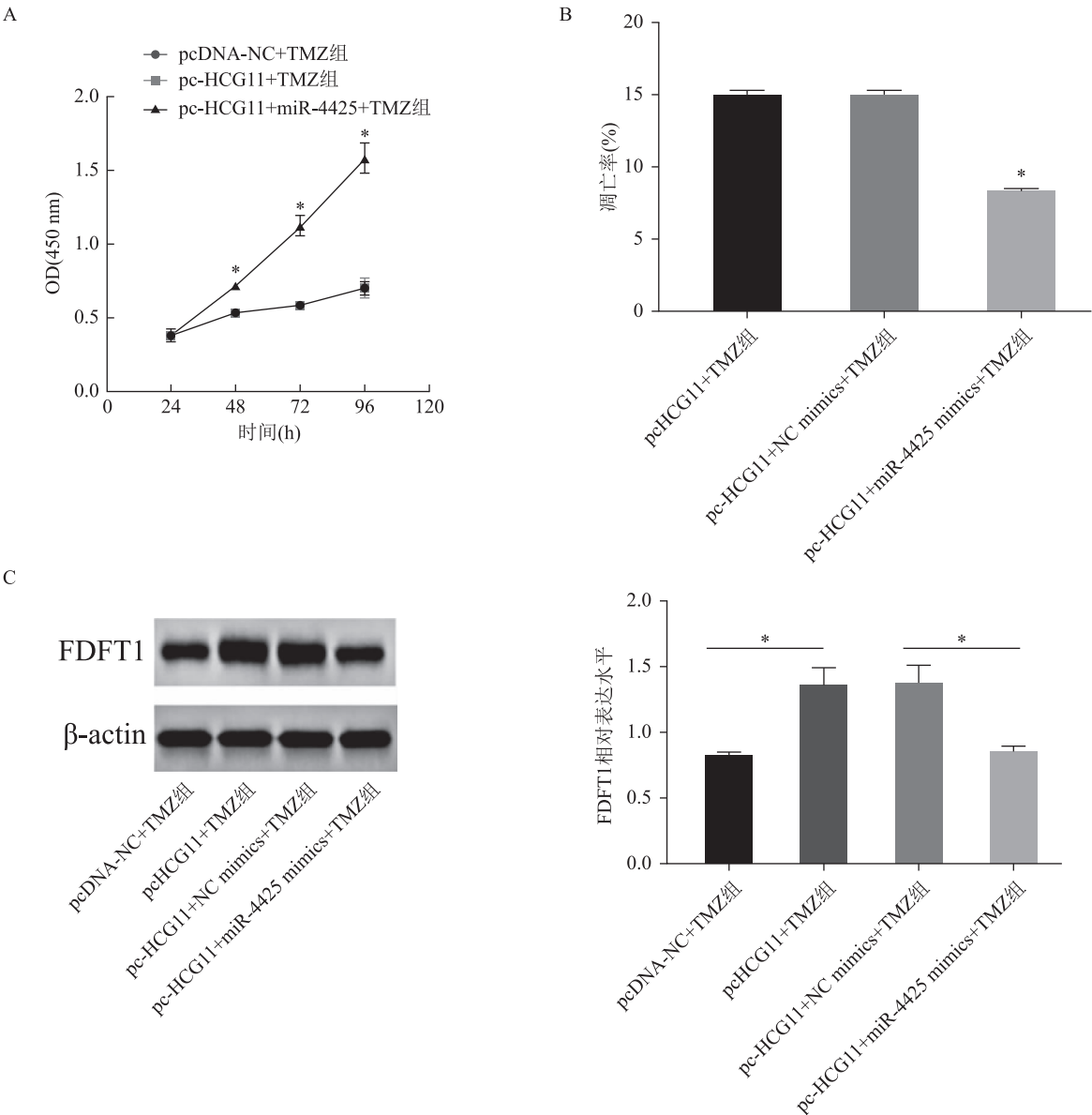


图6 HCG11通过miR-4425来调控FDF1表达并促进脑胶质瘤细胞的化疗敏感 A为与pc-HCG11+TMZ组或pc-HCG11+NC mimics+TMZ组比较,* $P<0.05$;B为与pc-HCG11+TMZ组或pc-HCG11+NC mimics+TMZ组比较,* $P<0.05$;C为2组比较,* $P<0.05$

究的重中之重。

本研究通过TMZ处理构建了U118耐药细胞株(U118/TMZ),进一步的研究发现U118/TMZ细胞株中的HCG11表达水平显著低于亲本U118细胞株。进一步分析显示,过表达HCG11可显著降低U118/TMZ的细胞活力,并显著提高U118/TMZ细胞的凋亡率。以上结果提示,过表达HCG11可增强U118耐药细胞株对于TMZ的敏感性。

LncRNA与miRNA在多种肿瘤中发挥着关键作用,它们之间的靶向关系在脑胶质瘤进展中也逐

渐被证明。例如,长链非编码RNA 00641(Long noncoding RNA 00641,LINC00641)通过靶向miR-4262来抑制神经粒蛋白(Neurogranin, NRG)表达,进而抑制脑胶质瘤细胞增殖,促进凋亡^[14];H19印记母系表达转录本(H19 imprinted maternally expressed transcript,H19)作为ceRNA通过miR-138/缺氧诱导因子(Hypoxia-inducible factor,HIF)-1 α 轴来促进脑胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成^[15];长链非编码RNA 00475(Long non-coding RNA 00475,LINC00475)通过调控miR-141-3p/Yes1相关转录调节因子(Yes1 associated

transcriptional regulator, YAP1) 通路来加速脑胶质瘤进展^[16]。以上发现均表明, LncRNA/miRNA 信号轴在脑胶质瘤中发挥着重要的功能。本研究通过生物信息学软件预测, 发现 miR-4425 是 HCG11 潜在的靶基因。miR-4425 位于染色体 1p36.11, 是近年来被发现的功能性 miRNA, 其被证实可在乳腺癌中表达水平异常升高。在机制上 miR-4425 可被合成蛋白结合蛋白 5 反义 RNA 1 (Syntaxin binding protein 5 antisense RNA 1, STXBP5-AS1) 海绵吸附, 从而影响乳腺癌细胞增殖^[17]。

本研究结果显示, miR-4425 在脑胶质瘤组织中的表达水平显著上调, 与 HCG11 在脑胶质瘤组织中的表达水平下调相反, 提示 miR-4425 可能与 HCG11 存在靶向调节关系。进一步的双荧光素酶实验发现, miR-4425 mimics 显著降低了 WT-HCG11 的荧光素酶活性, 而对 MUT-HCG11 的荧光素酶活性无明显影响。此外, 转染 sh-HCG11 可提高 miR-4425 表达水平, 转染 pc-HCG11 可降低 miR-4425 表达水平, 提示 HCG11 负向调控 miR-4425 表达, 并提示 HCG11 对脑胶质瘤细胞增殖、凋亡及化疗耐药性的影响与 miR-4425 表达有关。此外, 本研究进一步通过 CCK8 实验证明, miR-4425 mimics 能够逆转 HCG11 对脑胶质瘤细胞增殖的抑制作用。以上结果提示, HCG11 通过下调 miR-4425 来抑制 TMZ 耐药性脑胶质瘤细胞的增殖并促进凋亡。

miRNA 通常在肿瘤细胞中与下游靶基因的 3' UTR 结合, 从而抑制底物蛋白的转录、翻译过程。有研究报道, 在生理条件下 FDFT1 在甲戊酸途径中起关键调控作用, 将中间体引导到固醇分支, 进而导致胆固醇的生物合成, 是甾醇合成方向的关键分子。大量研究表明, FDFT1 在卵巢癌^[18]、结直肠癌^[19]等癌细胞中表达水平降低, 且与肿瘤的恶性进展有关。

本研究结果显示, FDFT1 mRNA 在脑胶质瘤组织样本中的表达水平显著降低, 该结果与上述研究结果一致, 提示 FDFT1 可作为抑癌基因来调控脑胶质瘤进展。有研究报道, miR-4425 可负向调节 FDFT1 水平, 进而促进卵巢癌细胞增殖和转移^[20]。因此, 本研究通过 RNAhybrid 数据库预测了 FDFT1 与 miR-4425 的结合位点, 并且构建了 HCG11 的双荧光素酶载体, 结果显示 miR-4425 mimics 显著降低了 WT-FDFT1 的荧光素酶活性, 而对

MUT-FDFT1 的荧光素酶活性无明显影响。另外, 过表达或抑制 miR-4425 表达可明显下调或上调 FDFT1 mRNA 和蛋白表达水平, 提示 FDFT1 表达被 miR-4425 负向调控。基于此, 本研究假设 HCG11 通过 miR-4425 来调控 FDFT1 表达, 进而影响脑胶质瘤细胞增殖、凋亡及 TMZ 耐药。

本研究证实, 过表达 HCG11 可上调 U118/TMZ 细胞中的 FDFT1 蛋白表达水平, 而过表达 miR-4425 可逆转 HCG11 对 FDFT1 蛋白表达水平的影响。以上结果提示, HCG11 通过下调 miR-4425 来促进 FDFT1 蛋白的表达, 并进而抑制脑胶质瘤细胞恶性增殖, 促进凋亡, 增强脑胶质瘤细胞对 TMZ 的敏感性。

综上所述, HCG11 在脑胶质瘤中表达水平降低, HCG11 抑制脑胶质瘤细胞增殖, 并促进凋亡, 其机制与负向调控 miR-4425, 从而增加其靶蛋白 FDFT1 表达有关, HCG11/miR-4425/FDFT1 信号轴有望成为脑胶质瘤治疗的潜在靶点。

参 考 文 献

- [1] Feng H, Wang J, Jiang H, et al. β -Elemene selectively inhibits the proliferation of glioma stem-like cells through the down-regulation of notch1[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(3): 830-839.
- [2] Wang B, Wang K, Jin T, et al. NCK1-AS1 enhances glioma cell proliferation, radioresistance and chemoresistance via miR-22-3p/IGF1R ceRNA pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129(5): 110395-110405.
- [3] Kaya B, Gocer E, Becker A, et al. Automated fluorescent microscopic image analysis of PTBP1 expression in glioma[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0170991.
- [4] Serventi J, Behr J. Surgery and evidence-based treatments in patients with newly diagnosed high-grade glioma[J]. *Semin Oncol Nurs*, 2018, 34(5): 443-453.
- [5] Zhang L, Yang HC, Zhang WB, et al. Clk1-regulated aerobic glycolysis is involved in glioma chemoresistance[J]. *J Neurochem*, 2017, 142(4): 574-588.
- [6] Karachi A, Dastmalchi F, Mitchell DA, et al. Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma[J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(12): 1566-1572.
- [7] Zhang Y, Zhang J, Mao L, et al. Long noncoding RNA HCG11 inhibited growth and invasion in cervical cancer by sponging miR-942-5p and targeting GF11[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(19): 7062-7071.
- [8] Xue HX, Li HF, Wang T, et al. LncRNA HCG11 suppresses laryngeal carcinoma cells progression via sponging miR-4469/APOM axis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(6): 3174-3182.
- [9] Zhang LN, Cao YF, Kou XN, et al. Long non-coding RNA HCG11 suppresses the growth of glioma by cooperating with

the miR-4425/MTA3 axis[J]. J Gene Med, 2019, 21 (4): e3074.

[10] Li B, Zhao HK, Song JM, et al. LINC00174 down-regulation decreases chemoresistance to temozolomide in human glioma cells by regulating miR-138-5p/SOX9 axis[J]. Hum Cell, 2020, 33(1): 159-174.

[11] Fan G, Jiao J, Shen F, et al. Long non-coding RNA HCG11 sponging miR-522-3p inhibits the tumorigenesis of non-small cell lung cancer by upregulating SOCS5[J]. Thoracic Cancer, 2020, 11(10): 2877-2886.

[12] Zhang H, Huang H, Xu X, et al. LncRNA HCG11 promotes proliferation and migration in gastric cancer via targeting miR-1276/CTNNB1 and activating Wnt signaling pathway[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19(1): 350-362.

[13] Liu K, Tsung K, Attenello FJ. Characterizing cell stress and GRP78 in glioma to enhance tumor treatment[J]. Front Oncol, 2020, 10(1): 608911-608928.

[14] Yang J, Yu D, Liu X, et al. LINC00641/miR-4262/NRGN axis confines cell proliferation in glioma[J]. Cancer Biol Ther, 2020, 21(8): 758-766.

[15] Liu ZZ, Tian YF, Wu H, et al. LncRNA H19 promotes glioma angiogenesis through miR-138/HIF-1 α /VEGF axis[J]. Neoplasma, 2020, 67(1): 111-118.

[16] Yu MJ, Yi BL, Zhou W, et al. Linc00475 promotes the progression of glioma by regulating the miR-141-3p/YAP1 axis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(1): 463-472.

[17] Park JE, Kim HW, Yun SH, et al. Ginsenoside Rh2 upregulates long noncoding RNA STXBP5-AS1 to sponge microRNA-4425 in suppressing breast cancer cell proliferation[J]. J Ginseng Res, 2021, 45(6): 754-762.

[18] Nakae A, Kodama M, Okamoto T, et al. Ubiquitin specific peptidase 32 acts as an oncogene in epithelial ovarian cancer by deubiquitylating farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 552(1): 120-127.

[19] Weng ML, Chen WK, Chen XY, et al. Fasting inhibits aerobic glycolysis and proliferation in colorectal cancer via the Fdft1-mediated AKT/mTOR/HIF1 α pathway suppression[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1869.

[20] Lu J, Zhou Y, Zheng X, et al. 20(S)-Rg3 upregulates FDFT1 via reducing miR-4425 to inhibit ovarian cancer progression[J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 693(1): 108569-108579.

(2023-03-27 收稿)

(上接第 27 页)

[29] 汪文兵. 急性前循环大血管闭塞性卒中患者血管内治疗后早期血脑屏障损伤及其对预后影响的临床研究[D]. 芜湖: 皖南医学院, 2020.

[30] Thorén M, Azevedo E, Dawson J, et al. Predictors for cerebral edema in acute ischemic stroke treated with intravenous thrombolysis[J]. Stroke, 2017, 48(9): 2464-2471.

[31] Li SP, Bian LG, Fu XY, et al. Gastrodin pretreatment alleviates rat brain injury caused by cerebral ischemic-reperfusion[J]. Brain Res, 2019, 1712: 207-216.

[32] De Meyer SF, Denorme F, Langhauser F, et al. Thromboinflammation in stroke brain damage[J]. Stroke, 2016, 47(4): 1165-1172.

[33] Gautier S, Ouk T, Petrault O, et al. Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia[J]. Br J Pharmacol, 2009, 156(4): 673-679.

[34] Petrone AB, Eisenman RD, Steele KN, et al. Temporal dynamics of peripheral neutrophil and lymphocytes following acute ischemic stroke[J]. Neurol Sci, 2019, 40(9): 1877-1885.

(2023-08-11 收稿)

(上接第 47 页)

[13] Schmidt JA, Fensom GK, Rinaldi S, et al. NMR metabolite profiles in male meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans, and comparison with MS metabolite profiles[J]. Metabolites, 2021, 11(2): 121.

[14] Chou TH, Tajima NM, Romero-Hernandez A, et al. Structural basis of functional transitions in mammalian NMDA receptors[J]. Cell, 2020, 182(2): 357-371. e13.

[15] Foo NP, Liu YF, Wu PC, et al. Midazolam's effects on delayed-rectifier K⁺ current and intermediate-conductance Ca²⁺-Activated K⁺ channel in jurkat t-lymphocytes[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 7198.

[16] Minutti-Zanella C, Gil-Leyva EJ, Vergara I. Immunomodulatory properties of molecules from animal venoms[J]. Toxicon, 2021, 191: 54-68.

[17] Eapen AV, Fernández-Fernández D, Georgiou J, et al. Multiple roles of GluN2D-containing NMDA receptors in short-term potentiation and long-term potentiation in mouse hippocampal slices[J]. Neuropharmacology, 2021, 201: 108833.

[18] Peng SX, Pei JW, Rinaldi B, et al. Dysfunction of AMPA receptor GluA3 is associated with aggressive behavior in human[J]. Mol Psychiatry, 2022, 27(10): 4092-4102.

[19] Hafner-Bratkovic I, Pelegrín P. Ion homeostasis and ion channels in NLRP3 inflammasome activation and regulation[J]. Curr Opin Immunol, 2018, 52: 8-17.

(2023-07-08 收稿)