

[文章编号] 1671-587X(2025)03-0663-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250311

miR-199a-5p对胶质瘤U251细胞小窝蛋白1表达及细胞迁移和凋亡的影响

刘东慧¹, 次云哲², 王春艳², 麻雯熠²

(1. 承德医学院基础医学院人体解剖学教研室, 河北 承德 067000; 2. 承德医学院基础医学院组织学与胚胎学教研室, 河北 承德 067000)

[摘要] **目的:** 探讨胶质母细胞瘤U251细胞过表达微小RNA (miR)-199a-5p后对细胞迁移和凋亡的影响, 并阐明miR-199a-5p与小窝蛋白1 (CAV-1)的靶向调控关系。**方法:** 体外培养胶质母细胞瘤U251细胞和少突胶质细胞瘤Hs683细胞, 采用Western blotting法检测2种细胞中CAV-1蛋白表达水平, 实时荧光定量PCR (RT-qPCR)法检测2种细胞中miR-199a-5p表达水平。U251细胞分为空白组(不进行转染)、mimics NC组(转染空载质粒)和miR-199a-5p mimics组(转染miR-199a-5p模拟物), Hs683细胞分为空白组(不进行转染)、inhibitor NC组(转染空载质粒)和miR-199a-5p inhibitor组(转染miR-199a-5p抑制物), 采用RT-qPCR法检测各组细胞转染效率, Western blotting法检测各组细胞中CAV-1蛋白表达水平。TargetScan数据库预测miR-199a-5p与CAV-1在3'非翻译区(3'UTR)的结合位点, 将psiCHECKTM-2-CAV-1-WT和psiCHECKTM-2-CAV-1-Mut分别与miR-199a-5p mimics和mimics NC共转染至U251细胞中, 即psiCHECKTM-2-CAV-1-WT+mimics NC组、psiCHECKTM-2-CAV-1-WT+miR-199a-5p mimics组、psiCHECKTM-2-CAV-1-Mut+mimics NC组和psiCHECKTM-2-CAV-1-Mut+miR-199a-5p mimics组, 双荧光素酶报告基因实验验证miR-199a-5p与CAV-1的靶向关系, 细胞划痕实验检测各组U251细胞划痕愈合率, 流式细胞术检测各组U251细胞凋亡率。**结果:** Western blotting法和RT-qPCR法检测, 与Hs683细胞比较, U251细胞中CAV-1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); 与U251细胞比较, Hs683细胞中miR-199a-5p表达水平明显升高($P<0.01$)。与空白组和mimics NC组比较, miR-199a-5p mimics组U251细胞中miR-199a-5p表达水平明显升高($P<0.01$), CAV-1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。与空白组比较, inhibitor NC组和miR-199a-5p inhibitor组Hs683细胞中miR-199a-5p表达水平均明显降低($P<0.01$)。各组Hs683细胞中CAV-1蛋白表达水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。双荧光素酶报告基因实验验证, 成功构建psiCHECKTM-2-CAV-1-野生型(WT)和psiCHECKTM-2-CAV-1-突变型(Mut)表达载体; 与psiCHECKTM-2-CAV-1-WT-mimics NC组比较, psiCHECKTM-2-CAV-1-WT-miR-199a-5p mimics组U251细胞WT CAV-1相对荧光素酶活性明显降低($P<0.01$)。细胞划痕实验, 转染12、24和48 h时, 与空白组比较, miR-199a-5p mimics组U251细胞划痕愈合率明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 转染48和72 h时, 与mimics NC组比较, miR-199a-5p mimics组U251细胞划痕愈合率明显降低($P<0.01$)。流式细胞术, 与空白组和mimics NC组比较, miR-199a-5p mimics组U251细胞凋亡率明显升高($P<0.01$)。**结论:** 通过向胶质母细胞瘤U251细胞转染miR-199a-5p成熟模拟物, 可降低CAV-1蛋白表达水平, 并抑制胶质瘤细胞的迁移, 促进其凋亡, 抑制肿瘤发生发展。miR-199a-5p与CAV-1

[收稿日期] 2024-07-29 [录用日期] 2024-09-26

[基金项目] 河北省卫健委医学科学研究项目(20200178); 河北省教育厅河北省高等学校科学研究青年基金项目(QN2023010)

[作者简介] 刘东慧(1987—), 女, 河北省廊坊市人, 讲师, 医学硕士, 主要从事糖尿病和肿瘤学方面的研究。

[通信作者] 麻雯熠, 讲师(E-mail: mawenyiss@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

之间的靶向关系可能为胶质瘤发生发展的潜在机制,并可能成为胶质瘤潜在的诊断和治疗靶点。

[关键词] 脑胶质瘤细胞;微小RNA-199a-5p;小窝蛋白1;细胞迁移;细胞凋亡

[中图分类号] R739.41 [文献标志码] A

Effect of miR-199a-5p on expression of Caveolin-1, cell migration and apoptosis in glioma U251 cells

LIU Donghui¹, CI Yunzhe², WANG Chunyan², MA Wenyi²

(1. Department of Human Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effects of microRNA (miR) -199a-5p overexpression on cell migration and apoptosis in the glioblastoma U251 cells, and to clarify the targeting regulatory relationship between miR-199a-5p and caveolin-1 (CAV-1). **Methods:** The glioblastoma U251 cells and oligodendroglioma Hs683 cells were cultured *in vitro*. Western blotting method was used to detect the expression levels of CAV-1 protein in 2 kinds of cells; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of miR-199a-5p in 2 kinds of cells. The U251 cells were divided into blank group (non-transfection), mimics NC group (transfected with empty vector), and miR-199a-5p mimics group (transfected with miR-199a-5p mimics). The Hs683 cells were divided into blank group (no transfection), inhibitor NC group (transfected with empty vector), and miR-199a-5p inhibitor group (transfected with miR-199a-5p inhibitor). RT-qPCR method was used to detect the transfection efficiency of the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of CAV-1 protein in the cells in various groups. TargetScan database was used to predict the binding sites between miR-199a-5p and CAV-1 in the 3' untranslated region (3'UTR); psiCHECKTM-2-CAV-1-WT and psiCHECKTM-2-CAV-1-Mut were co-transfected with miR-199a-5p mimics and mimics NC into the U251 cells, respectively, forming psiCHECKTM-2-CAV-1-WT+mimics NC group, psiCHECKTM-2-CAV-1-WT+miR-199a-5p mimics group, psiCHECKTM-2-CAV-1-Mut+mimics NC group, and psiCHECKTM-2-CAV-1-Mut+miR-199a-5p mimics group; dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-199a-5p and CAV-1; cell scratch assay was used to detect the scratch healing rates of the U251 cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the U251 cells in various groups. **Results:** The Western blotting and RT-qPCR results showed that compared with Hs683 cells, the expression level of CAV-1 protein in the U251 cells was significantly decreased ($P<0.05$); compared with U251 cells, the expression level of miR-199a-5p in the Hs683 cells was significantly increased ($P<0.01$). Compared with blank group and mimics NC group, the expression level of miR-199a-5p in the U251 cells in miR-199a-5p mimics group was significantly increased ($P<0.01$), the expression level of CAV-1 protein in the U251 cells in miR-199a-5p mimics group was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with blank group, the expression levels of miR-199a-5p in the Hs683 cells in inhibitor NC group and miR-199a-5p inhibitor group were significantly decreased ($P<0.01$). No significant differences were observed in the expression levels of CAV-1 protein in the Hs683 cells among various groups ($P>0.05$). The dual-luciferase reporter gene assay results showed that psiCHECKTM-2-CAV-1-wild type (WT) and psiCHECKTM-2-CAV-1-mutant (Mut) expression vectors were successfully constructed; compared with psiCHECKTM-2-CAV-1-WT-mimics NC group, the relative luciferase activity of WT CAV-1 in the U251 cells in psiCHECKTM-2-CAV-1-WT-miR-199a-5p

mimics group was significantly decreased ($P < 0.01$). The cell scratch assay results showed that at 12, 24, and 48 h after transfection, compared with blank group, the scratch healing rate of the U251 cells in miR-199a-5p mimics group was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The flow cytometry results showed that compared with blank group and mimics NC group, the apoptotic rate of the U251 cells in miR-199a-5p mimics group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Transfection of mature miR-199a-5p mimics into the glioblastoma U251 cells can reduce the expression of CAV-1 protein, inhibit glioma cell migration, promote apoptosis, and suppress tumorigenesis and development. The targeting relationship between miR-199a-5p and CAV-1 may represent a potential mechanism for glioma development and could serve as a potential diagnostic and therapeutic target for glioma.

KEYWORDS Glioma cells; MicroRNA-199a-5p; Caveolin-1; Cell migration; Apoptosis

脑胶质瘤是一种最常见的原发性中枢神经系统肿瘤, 目前临床治疗以手术切除联合放疗和化疗为主, 患者预后差且生存期短, 其中恶性程度较高的胶质母细胞瘤从确诊到死亡仅14~16个月, 因此寻找早期诊断指标以及新的治疗方法对脑胶质瘤的早期诊断和预后具有重要作用^[1]。微小RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度为19~22个核苷酸的短链非编码RNA, 可与目的基因3'非翻译区 (3'untranslated region, 3'UTR) 结合, 并发挥重要的生物调控功能^[2-3]。不同miRNA的差异表达在瘤细胞的增殖、凋亡和转移过程中发挥重要的作用^[4]。研究^[5]显示: miR-199a-5p与各种癌症的发生发展有密切关联, 并呈现不同表达水平。在喉癌发生发展过程中, miR-199a-5p表达水平升高能明显抑制上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的进程, 反之则发挥促进作用。过表达miR-199a-5p可靶向抑制DNA损伤调节自噬调节因子1 (DNA damage-regulated autophagy modulator protein 1, *DRAM1*) 基因的表达, 并提高急性髓系白血病对阿霉素的敏感性^[6]。钙黏蛋白表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 淋巴细胞激活基因 (lymphocyte activation gene, LAG) 七经G型受体1 (cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1, *CELSR1*) 作为脑胶质瘤促癌基因同样受到miR-199a-5p的调控, 过表达miR-199a-5p可抑制*CELSR1*的表达, 从而抑制胶质瘤细胞的增殖和迁移^[7]。小窝蛋白1 (caveolin 1, CAV-1) 通过由21个氨基酸残基组成的脚手架结构域参与分子运输、胆固醇平衡和跨膜信号传导, 不但调控正常细胞的生长、发育和增殖, 也影响肿瘤的发生、侵袭和转移及多种代谢性疾病的病理过程^[8]。研究^[9]发现: 在脑胶质瘤中, CAV-1可以促进脑胶质瘤细胞的增殖和血管的形

成, 从而影响疾病的发展进程。

根据TargetScan数据库分析, miR-199a-5p与CAV-1的3'UTR存在结合位点, 说明二者之间在疾病进程中可能存在重要的调控关系。因此, 本研究拟构建过表达miR-199a-5p的U251细胞和低表达miR-199a-5p的Hs683细胞, 通过检测CAV-1蛋白表达水平、细胞迁移率和细胞凋亡率探讨miR-199a-5p与CAV-1的靶向关系, 以期为临床开发防治脑胶质细胞瘤的靶向药物提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器

人胶质母细胞瘤U251细胞和少突胶质细胞瘤Hs683细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。10%胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司, DMEM高糖培养基、1%青-链霉素、蛋白酶抑制剂 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、RIPA裂解液、不含EDTA的胰酶、BCA蛋白浓度测定试剂盒和Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司, CAV-1和GAPDH一抗及二抗均购自武汉ABclonal生物科技有限公司, miRNA纯化试剂盒和反转录试剂盒购自美国EZbioscience公司, miR-199a-5p成熟模拟体 (miR-199a-5p mimics) 和空载质粒 (mimics NC)、miR-199a-5p抑制剂 (miR-199a-5p inhibitor) 和空载质粒 (inhibitor NC)、miR-199a-5p引物及内参U6引物均购自广州复能基因有限公司, 转染试剂Lipofectamine 3000购自美国Thermo Fisher Scientific公司, psiCHECKTM-2-CAV-1-野生型 (wild type, WT) 和psiCHECKTM-2-CAV-1-突变型 (mutant type, Mut) 由安徽通用生物科技有限公司设计并合成, 双荧光素酶报告基因试剂盒购自美国Promega公司。高速低温离心机 (型号: Fresco 21) 购自美国

Thermo Fisher Scientific公司, PCR扩增仪(型号: S1000™ Thermal Cycler)购自美国Bio-Rad公司, 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)仪(型号: FQD-96A)购自杭州博日科技股份有限公司, 酶标仪(型号: ELx808)购自基因有限公司, 电泳仪(型号: Mini PROTEAN Tetra Cell)购自美国Bio-Rad公司, 全自动化发光图像分析仪(型号: Tanon-6100)购自上海Tanon公司。

1.2 细胞培养 将U251细胞和Hs683细胞置于37℃、5%CO₂的恒温培养箱中, 用含10%胎牛血清、1%青-链霉素的DMEM培养基培养。当细胞密度达到60%~80%时, 进行传代处理, 以备后续实验, 细胞培养过程严格无菌操作。

1.3 细胞分组和转染 U251细胞分为空白组(不进行转染的U251细胞)、mimics NC组(转染空载质粒)和miR-199a-5p mimics组(转染miR-199a-5p模拟物); Hs683细胞分为空白组(不进行转染的Hs683细胞)、inhibitor NC组(转染空载质粒)和miR-199a-5p inhibitor组(转染miR-199a-5p抑制物)。根据Lipofectamine 3000脂质体转染说明书, 转染U251和Hs683细胞, 采用miR-199a-5p成熟模拟体及空载质粒分别转染U251 miR-199a-5p mimics组和mimics NC组; 采用miR-199a-5p抑制剂及空载质粒分别转染Hs683 miR-199a-5p inhibitor组和inhibitor NC组。每组设3个平行孔, 转染24或48 h后, 收集各组细胞用于后续实验。

1.4 Western blotting法检测各组细胞中CAV-1蛋白表达水平 分别收集未经处理及转染48 h后的U251和Hs683细胞, 经磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)充分清洗后, 加入含蛋白酶抑制剂苯甲磺酰氟(phenyl methane sulfonyl fluoride, PMSF)的RIPA裂解液(PMSF: RIPA=1:100)提取细胞总蛋白, 并按以上分组收集于1.5 mL EP管中, 采用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度并定量。样品于100℃下煮沸10 min, 使蛋白质变性。每孔上样量为30 μg, 蛋白通过凝胶电泳实验分离不同相对分子质量的蛋白并根据Marker标记切胶, 用湿转法将CAV-1和GAPDH转移至PVDF膜上, 室温封闭2 h后加入一抗(1:1 000), 4℃孵育过夜, 第2天TBST溶液洗膜3次, 二抗(1:2 000)室温孵育2 h, 再次TBST溶液室温洗膜后, 采用ECL检测系统检测蛋白条带, Image J

软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值。

1.5 RT-qPCR法检测各组细胞中miR-199a-5p表达水平 采用miRNA纯化试剂盒由U251和Hs683细胞中提取总RNA, 根据反转录试剂盒说明书操作, 将miRNA反转录为cDNA, 以cDNA为模板, 进行扩增, 95℃、10 min; 95℃、10 s, 60℃、20 s, 72℃、10 s, 40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算2种细胞中miR-199a-5p表达水平及转染mimics和inhibitor后miR-199a-5p表达水平。miR-199a-5p正向引物: 5'-CCCAGUGUUCAGACUAUCUGUUC-3', 反向通用型引物由公司直接提供; 内参U6引物由公司直接提供。

1.6 双荧光素酶报告基因实验验证miR-199a-5p与CAV-1的靶向关系 将目的基因CAV-1 WT及结合位点Mut构建至psiCHECK™-2载体, 分别为psiCHECK™-2-CAV-1-WT和psiCHECK™-2-CAV-1-Mut。U251细胞以每孔 3×10^4 个细胞的密度接种于12孔细胞培养板, 设3个复孔, 细胞密度达到70%时进行转染, 将psiCHECK™-2-CAV-1-WT和psiCHECK™-2-CAV-1-Mut分别与miR-199a-5p mimics和mimics NC共转染至U251细胞中, 即psiCHECK™-2-CAV-1-WT+mimics NC组、psiCHECK™-2-CAV-1-WT+miR-199a-5p mimics组、psiCHECK™-2-CAV-1-Mut+mimics NC组和psiCHECK™-2-CAV-1-Mut+miR-199a-5p mimics组, 每组设3个平行孔。转染48 h后, 重悬细胞, 按分组加入不透明96孔细胞培养板中, 每孔75 μL。加入Luciferase Assay Reagent混匀, 避光孵育10 min, 采用多功能酶标仪检测各组细胞萤火虫荧光强度。检测结束后取出96孔细胞培养板, 加入75 μL终止液, 混匀后避光孵育10 min, 上机检测海肾荧光强度。细胞相对荧光素酶活性=萤火虫荧光强度/海肾荧光强度。比较各组细胞荧光强度, WT+miR-199a-5p mimics组细胞相对荧光素酶活性明显低于WT+mimics NC组, 提示miRNA与目的基因的靶向作用。

1.7 细胞划痕实验检测各组U251细胞划痕愈合率 取处于对数生长期的U251细胞, 按每孔 1×10^5 个细胞的密度铺板于6孔细胞培养板, 待各组细胞生长至100%后, 用1 mL微量移液枪头于6孔细胞培养板内垂直划痕, PBS缓冲液润洗3次后, 对

空白组、mimics NC组和miR-199a-5p mimics组细胞进行转染, 0、12、24和48 h时, 于光学显微镜下对细胞划痕进行拍照。采用Image J软件获取细胞划痕迁移面积, 并计算细胞划痕愈合率, 代表细胞迁移情况。细胞划痕愈合率 = (0 h划痕面积 - 12 h划痕面积) / 0 h划痕面积 × 100%。

1.8 流式细胞术检测各组U251细胞凋亡率

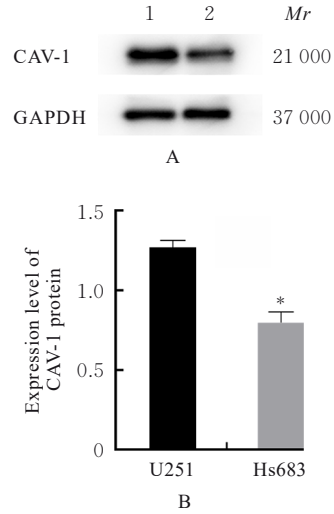
U251细胞分组转染48 h后, 将上清液收集入离心管, PBS缓冲液洗涤3次, 不含EDTA的胰酶消化细胞后收集至相应离心管, 离心, 重悬细胞并计数, 保证上机检测细胞数量在5~10万个, 细胞再次离心5 min; 根据Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒说明书操作, 加入195 μ L Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞, 设置空白组、Annexin V单染组和PI单染组进行调试后, 对空白组、mimics NC组和miR-199a-5p mimics组细胞进行双染, 室温避光孵育, 冰浴, 上机前300 μ m筛网过筛后, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况, 计算细胞凋亡率。细胞凋亡率 = 早期细胞凋亡率 + 晚期细胞凋亡率。

1.9 统计学分析 采用SPSS 26.0统计软件进行统计学分析。U251和Hs683细胞中CAV-1蛋白表达水平、miR-199a-5p表达水平、U251细胞相对荧光素酶活性、U251细胞过表达miR-199a-5p后miR-199a-5p表达水平和过表达后CAV-1蛋白表达水平、Hs683细胞抑制miR-199a-5p表达后miR-199a-5p表达水平及抑制后CAV-1蛋白表达水平、U251细胞划痕愈合率和细胞凋亡率均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。2组间样本均数比较采用两独立样本*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 U251和Hs683细胞中CAV-1蛋白及miR-199a-5p表达水平 CAV-1蛋白在U251细胞中呈高表达, 在Hs683细胞中呈低表达, 与Hs683细胞比较, U251细胞中CAV-1蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图1。与U251细胞 (1.00 ± 0.20) 比较, Hs683细胞中miR-199a-5p表达水平 (2.41 ± 0.43) 明显升高 ($P < 0.01$)。

2.2 上调miR-199a-5p表达后各组U251细胞中miR-199a-5p和CAV-1蛋白表达水平 与空白组 (1.00 ± 0.13) 比较, miR-199a-5p mimics组U251细胞中miR-199a-5p表达水平 (457.57 ± 40.21)



Lane 1: U251 cells; Lane 2: Hs683 cell. * $P < 0.05$ vs U251 cells.

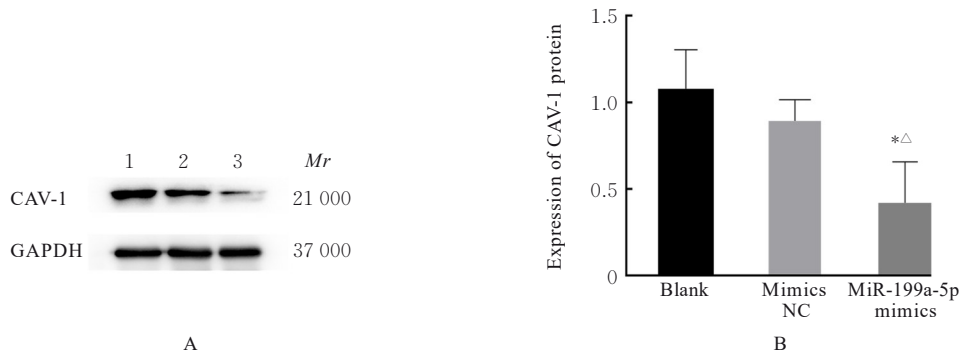
图1 2种细胞中CAV-1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 1 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expression of CAV-1 protein in two kinds of cells

明显升高 ($P < 0.01$), mimics NC组U251细胞中miR-199a-5p表达水平 (0.99 ± 0.26) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与mimics NC组比较, miR-199a-5p mimic组U251细胞中miR-199a-5p表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。与空白组比较, miR-199a-5p mimics组U251细胞中CAV-1蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), mimics NC组U251细胞中CAV-1蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与mimics NC组比较, miR-199a-5p mimics组U251细胞中CAV-1蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图2。

2.3 下调miR-199a-5p表达后各组Hs683细胞中miR-199a-5p和CAV-1蛋白表达水平 与空白组 (1.00 ± 0.08) 比较, inhibitor NC组和miR-199a-5p inhibitor组Hs683细胞中miR-199a-5p表达水平 (0.34 ± 0.02 和 0.49 ± 0.03) 均明显降低 ($P < 0.01$); 与inhibitor NC组比较, miR-199a-5p inhibitor组Hs683细胞中miR-199a-5p表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组Hs683细胞中CAV-1蛋白表达水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图3。

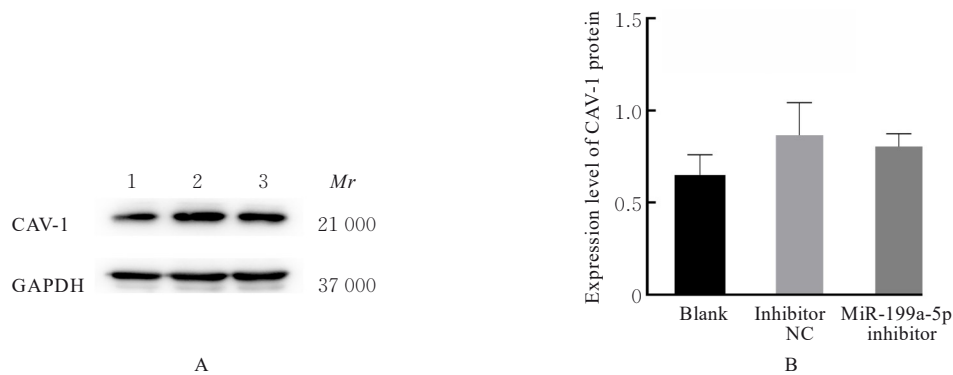
2.4 miR-199a-5p与CAV-1的结合位点及靶向关系 成功构建psiCHECKTM-2-CAV-1-WT和psiCHECKTM-2-CAV-1-Mut表达载体, miR-199a-5p与CAV-1 3'UTR端的结合位点见图4。与psiCHECKTM-2-CAV-1-Mut-mimics NC组比较,



Lane 1: Blank group; Lane 2: Mimics NC group; Lane 3: MiR-199a-5p mimics group. * $P < 0.05$ vs blank group; $\Delta P < 0.05$ vs mimics NC group.

图2 各组U251细胞中CAV-1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 2 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of CAV-1 protein in U251 cells in various groups



Lane 1: Blank group; Lane 2: Inhibitor NC group; Lane 3: MiR-199a-5p inhibitor group.

图3 各组Hs683细胞中CAV-1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 3 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of CAV-1 protein in Hs683 cells in various groups

psiCHECKTM-2-CAV-1-Mut-miR-199a-5p mimics 组 U251 细胞 WT CAV-1 相对荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 psiCHECKTM-2-CAV-1-WT-mimics NC 组比较, psiCHECKTM-2-CAV-1-WT-miR-199a-5p mimics 组 U251 细胞 WT CAV-1 相对荧光素酶活性明显降低 ($P < 0.01$)。见图5。

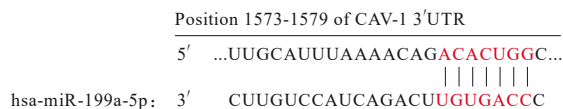
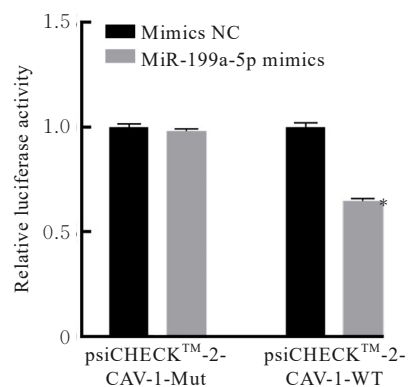


图4 miR-199a-5p与CAV-1的结合位点图

Fig. 4 Diagram of binding sites of miR-199a-5p and CAV-1



* $P < 0.01$ vs psiCHECKTM-2-CAV-1-WT-mimics NC group.

图5 2组U251细胞中CAV-1相对荧光素酶活性

Fig. 5 CAV-1 relative luciferase activities in U251 cells in two groups

2.5 上调 miR-199a-5p 表达后各组 U251 细胞划痕愈合率 转染 12、24 和 48 h 时, 与空白组比较, miR-199a-5p mimics 组 U251 细胞划痕愈合率明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。转染 48 和 72 h 时,

与 mimics NC 组比较, miR-199a-5p mimics 组 U251 细胞划痕愈合率明显降低 ($P < 0.01$)。见图 6 和 7。

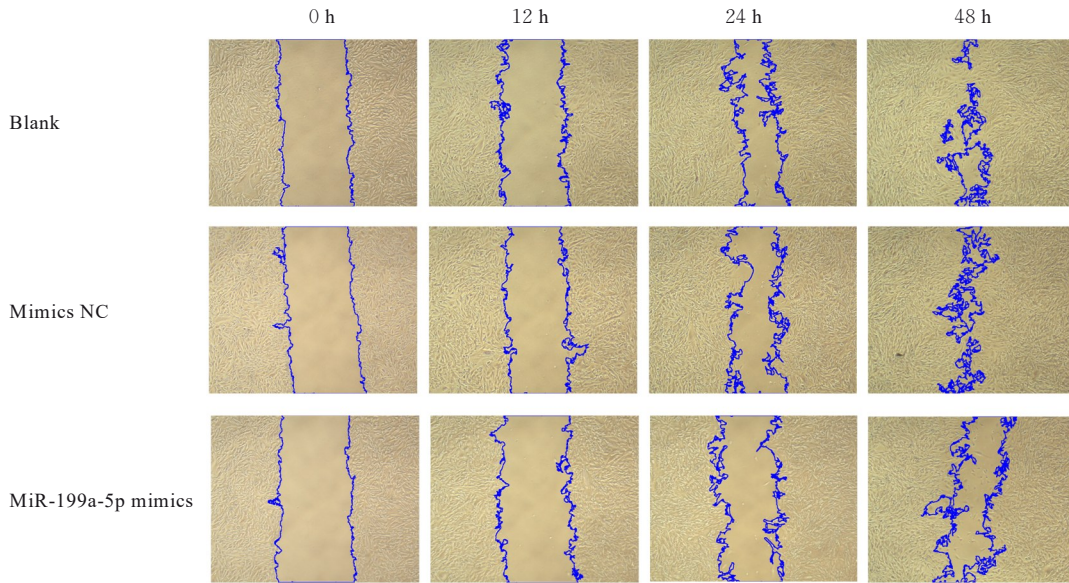
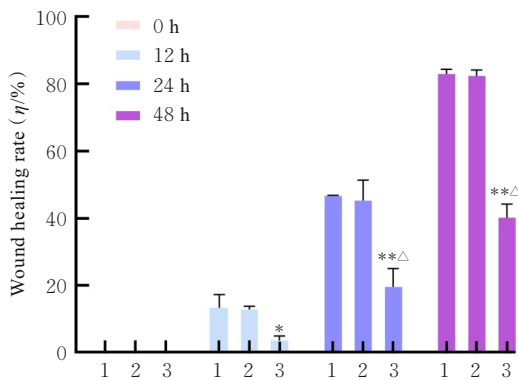


图6 细胞划痕实验检测转染不同时间各组U251细胞迁移情况

Fig. 6 Migration of U251 cells in various groups at different time points detected by cell scratch assay



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank group; $\Delta P < 0.01$ vs mimics NC group. 1: Blank group; 2: Mimics NC group; 3: MiR-199a-5p mimics group.

图7 转染不同时间各组U251细胞划痕愈合率

Fig. 7 Wound healing rates of U251 cells in various groups after transfected for different time

2.6 上调 miR-199a-5p 后各组 U251 细胞凋亡率

与空白组和 mimics NC 组比较, miR-199a-5p mimics 组 U251 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.01$)。见图 8 和 9。

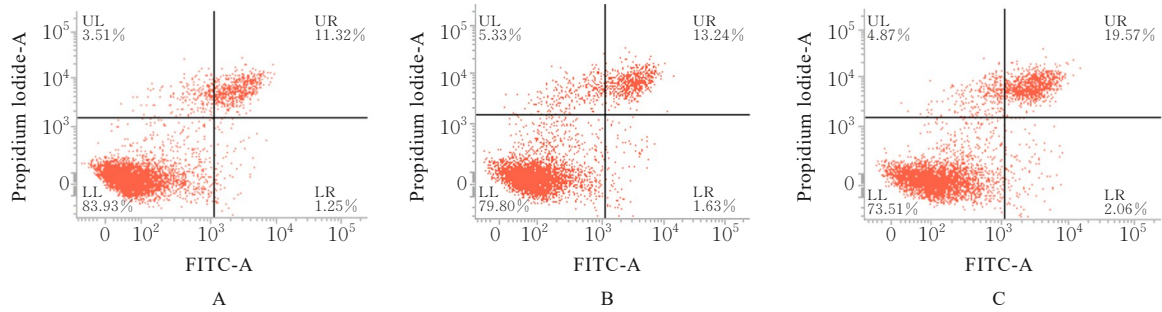
3 讨论

目前根据脑胶质瘤的恶性程度, 将其分为 1~4 级, 级别越高代表恶性程度越强。2021 年 WHO CNS5 更新了不同肿瘤类型的分子生物标志物, 通过引入单个分子生物标志物和 DNA 甲基化谱等诊断技术显著提高了诊断的精度^[10-11]。但目前阶段,

最主要的治疗手段仍然是手术联合放疗和化疗, 脑胶质瘤级别越高预后越差, 生存期越短, 疾病特异性症状越严重, 如运动功能障碍、癫痫发作或神经认知功能障碍等, 相关症状和不良反应严重降低了患者生活质量, 为患者及其亲属带来巨大的生活负担^[12]。因此, 鉴别诊断标志物和治疗手段的发现, 对胶质瘤的诊断和治疗具有非常重要的临床价值。

研究^[13]显示: CAV-1 在脑胶质瘤中的表达差异与恶性程度有关, 恶性程度较高的脑胶质瘤中 CAV-1 蛋白表达水平越高。CHEN 等^[14]研究表明: 过表达 CAV-1 可促进 U251 胶质瘤细胞增殖, 同时也促进了缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1a) 等与血管形成相关因子的表达。在 ESER 等^[15]研究的 64 例低级别和大部分高级别纯少突胶质细胞瘤患者中发现: CAV-1 蛋白表达均为阴性, 且蛋白表达阴性与 1p/19q 缺失有关, 与肿瘤的级别无关。本研究结果显示: 在胶质母细胞瘤 U251 细胞中 CAV-1 蛋白呈高表达, 少突胶质细胞瘤 Hs683 细胞则呈低表达, 与先前研究^[13-15]结果一致。

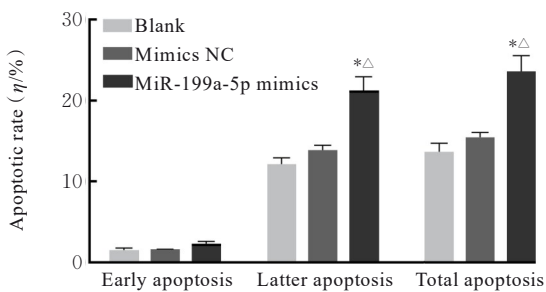
miR-199a-5p 在肿瘤的发生发展过程中发挥重要的作用, 肿瘤来源不同其表达水平也会存在较大差异, 如胃癌和黑色素瘤组织中 miR-199a-5p 表达水平明显升高, 而在结直肠癌和肝癌等组织中表达水平则呈下降趋势, 通过改变 miR-199a-5p 的表达水平, 肿瘤细胞的增殖、凋亡和侵袭等生物学特



A: Blank group; B: Mimics NC group; C: MiR-199a-5p mimics group.

图8 流式细胞术检测各组U251细胞凋亡情况

Fig. 8 Apoptosis of U251 cells in various groups detected by flow cytometry



* $P < 0.05$ vs blank group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs mimics NC group.

图9 各组U251细胞凋亡率

Fig. 9 Apoptotic rates of U251 cells in various groups

性也会发生重大变化^[16-17]。本研究结果显示：U251细胞miR-199a-5p表达水平明显低于Hs683细胞；通过构建miR-199a-5p成熟模拟体U251细胞过表达后，证实CAV-1是miR-199a-5p下游靶基因，miR-199a-5p在逆转CAV-1蛋白在U251细胞表达水平的同时，可抑制胶质瘤细胞的增殖并促进其凋亡，提示miR-199a-5p的抑癌作用可能是通过调控下游的CAV-1蛋白表达水平而实现的。研究^[18]证实：miR-199a-5p在肿瘤疾病进程中，可靶向多种基因调控疾病的进程，同时CAV-1蛋白也接受多种miRNA的调控，如miRNA-132-3p可通过靶向第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)/磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)/血肌酐(serum creatinine, Src)/Cav-1信号通路促进胶质瘤内皮细胞中小泡介导的跨细胞转运等^[19]。在脑胶质瘤发生发展过程中，miR-199a-5p可以靶向镁离子转运蛋白1(magnesium transporter 1, MAGT1)和膜相关环指蛋白8(membrane associated RING-CH protein VIII,

MARCH8)，从而抑制胶质瘤细胞的增殖和迁移，促进胶质瘤细胞的凋亡^[20-21]。因此，miR-199a-5p靶向CAV-1可能成为胶质瘤诊断和治疗的新靶点，而进一步深入研究miR-199a-5p与CAV-1的靶向关系在控制癌症发生发展过程中的作用是未来探索的方向。

Hs683细胞未受miR-199a-5p的抑制影响CAV-1蛋白表达水平，分析原因可能与细胞来源与恶性程度有关。胶质母细胞瘤是恶性程度最高的脑胶质瘤，而少突胶质细胞瘤的恶性程度普遍较低。CHIU等^[22]研究发现：与人胶质母细胞瘤细胞系U87细胞比较，Hs683细胞在mRNA和蛋白质水平上表达的谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)水平较低，在无谷氨酰胺(glutamine, Gln)培养基中孵育增加了U87细胞中GS蛋白的表达，但Hs683细胞中并未增加，且其细胞活性未受到影响。U251和U87细胞同属胶质母细胞瘤，两者具有差异性，但也具有一定的相似性，其在体外培养体现更为明显^[23]。

综上所述，通过向胶质母细胞瘤U251细胞转染miR-199a-5p成熟模拟物，可降低CAV-1蛋白表达水平，并抑制胶质瘤细胞的迁移，促进其凋亡，抑制肿瘤发生发展。miR-199a-5p与CAV-1之间的靶向关系可能为胶质瘤发生发展的潜在机制，并可能成为胶质瘤潜在的诊断和治疗靶点。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

刘东慧参与实验操作、数据采集和论文撰写，次云哲参与数据处理和统计学分析，王春艳参与研究指导、论文审阅和修订，麻雯熠参与文献检索、实验设计和论文撰写。

[参考文献]

- [1] MCKINNON C, NANDHABALAN M, MURRAY S A, et al. Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management[J]. *BMJ*, 2021, 374: n1560.
- [2] JIANG S. Perspectives on microRNA study in oncogenesis: where are we?[J]. *Neoplasia*, 2021, 23(1): 99-101.
- [3] ZHOU Q, LIU J, QUAN J, et al. microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis of glioma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(9): 2651-2659.
- [4] SHEA A, HARISH V, AFZAL Z, et al. microRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics[J]. *Cancer Med*, 2016, 5(8): 1917-1946.
- [5] LI D J, WANG X, YIN W H, et al. miR-199a-5p suppresses proliferation and invasion of human laryngeal cancer cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(23): 12200-12207.
- [6] LI Y, SUN Y, MIAO M, et al. miR-199a-5p affects sensitivity of acute myeloid leukemia to adriamycin by targeting DRAM1 [J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2020, 28(4): 1096-1104.
- [7] WANG G, LI Y, ZHANG D X, et al. CELSR1 acts as an oncogene regulated by miR-199a-5p in glioma [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 8857-8865.
- [8] WANG S Q, WANG N, ZHENG Y F, et al. Caveolin-1: an oxidative stress-related target for cancer prevention [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 7454031.
- [9] 陈劲松, 王丹. 肿瘤新抗原在肿瘤免疫治疗中的应用研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(10): 1213-1220.
- [10] LOUIS D N, PERRY A, WESSELING P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(8): 1231-1251.
- [11] WELLER M, WEN P Y, CHANG S M, et al. Glioma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2024, 10(1): 33.
- [12] VAN SOLINGE T S, NIELAND L, CHIOCCA E A, et al. Advances in local therapy for glioblastoma-taking the fight to the tumour[J]. *Nat Rev Neurol*, 2022, 18(4): 221-236.
- [13] 韩蕴, 李洪艳, 张叶军, 等. Caveolin-1和ER- α 36相互作用促进胶质瘤细胞生长[J]. *癌症*, 2022, 41(3): 142-151.
- [14] CHEN W L, CHENG X, WANG X B, et al. Caveolin-1 promotes tumor cell proliferation and vasculogenic mimicry formation in human glioma [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2021, 54(10): e10653.
- [15] ESER OCAK P, OCAK U, TANG J P, et al. The role of caveolin-1 in tumors of the brain-functional and clinical implications[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2019, 42(4): 423-447.
- [16] MENG W, LI Y L, CHAI B S, et al. miR-199a: a tumor suppressor with noncoding RNA network and therapeutic candidate in lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8518.
- [17] WANG Q W, YE B Y, WANG P, et al. Overview of microRNA-199a regulation in cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 10327-10335.
- [18] HE J, WANG M, JIANG Y, et al. Chronic arsenic exposure and angiogenesis in human bronchial epithelial cells *via* the ROS/miR-199a-5p/HIF-1 α /COX-2 pathway [J]. *Environ Health Perspect*, 2014, 122(3): 255-261.
- [19] GU Y T, CAI R P, ZHANG C, et al. miR-132-3p boosts caveolae-mediated transcellular transport in glioma endothelial cells by targeting PTEN/PI3K/PKB/Src/Cav-1 signaling pathway [J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 441-454.
- [20] WANG G, LI Y, LI J, et al. microRNA-199a-5p suppresses glioma progression by inhibiting MAGT1 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15248-15254.
- [21] ZHANG C, CHEN Q, ZHU J W, et al. microRNA-199a-5p regulates glioma progression *via* targeting MARCH8 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(17): 7482-7487.
- [22] CHIU M, TAURINO G, BIANCHI M G, et al. Oligodendroglioma cells lack glutamine synthetase and are auxotrophic for glutamine, but do not depend on glutamine anaplerosis for growth [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1099.
- [23] SCHULZ J A, RODGERS L T, KRYSZCIO R J, et al. Characterization and comparison of human glioblastoma models [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 844.