

miR-212-3p 靶向调控 NAP1L1 抑制胶质瘤细胞增殖、 迁移和上皮-间充质转化

郭小兵, 李晓文, 李恒希, 曹 艳, 李 坪
(昆明医科大学基础医学院人体解剖学与组织胚胎学系, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 探究 miR-212-3p 在胶质瘤细胞增殖、侵袭和上皮-间充质转化(EMT)中的分子机制。**方法** RT-qPCR 用于衡量胶质瘤细胞中 miR-212-3p 和 NAP1L1 表达, 构建 NC mimic、miR-212-3p mimic、oe-NC 和 oe-NAP1L1 转染至细胞中, 利用 CCK-8、Transwell 和伤口实验评估细胞生物学行为。通过 Western blot 分析 EMT 相关标志物的蛋白表达。miR-212-3p 与 NAP1L1 的关系通过双荧光素酶报告基因和 AgO2-RIP 实验进行证实。**结果** miR-212-3p 的表达水平在胶质瘤细胞中显著下调($P < 0.0001$), 过表达 miR-212-3p 可以显著降低胶质瘤细胞增殖($P < 0.0001$)、侵袭($P = 0.0011$)和迁移能力($P < 0.0001$), 并且抑制了 EMT 标志物 N-钙黏蛋白(N-cadherin)($P = 0.000861$)和波形蛋白(Vimentin)($P = 0.007430$)的表达, 而上调了 E-钙黏蛋白(E-cadherin)($P < 0.0001$)的表达。miR-212-3p 靶向负调控 NAP1L1 的表达。过表达 NAP1L1 逆转了 miR-212-3p 对胶质瘤细胞增殖($P < 0.0001$)、迁移($P < 0.0001$)和 EMT($P < 0.0001$)的抑制作用。**结论** miR-212-3p 通过靶向负调节 NAP1L1 的表达抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和 EMT。

[关键词] 胶质瘤; miR-212-3p; NAP1L1; 上皮-间充质转化; 细胞增殖

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)11-0022-09

miR-212-3p Targeted Regulation of NAP1L1 Inhibits Glioma Cell Proliferation, Migration and EMT

GUO Xiaobing, LI Xiaowen, LI Hengxi, CAO Yan, LI Ping
(Dept. of Human Anatomy and Histoembryology, School of Basic Medical Sciences,
Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To explore the molecular mechanism of miR-212-3p in glioma cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** The expression of miR-212-3p and NAP1L1 were detected by RT-qPCR in glioma cells. NC mimic, miR-212-3p mimic, oe-NC and oe-NAP1L1 were built and transfected in cells. CCK-8, Transwell and wound healing assay were used to evaluate the cell biological behaviour. Western blot was used to detect the expression of EMT-related biomarkers. The relationship between miR-212-3p and NAP1L1 was confirmed by the dual-luciferase reporter gene and AgO2-RIP assay. **Results** miR-212-3p was lowly expressed in glioma cells ($P < 0.0001$). miR-212-3p mimic significantly inhibited the glioma cell proliferation ($P < 0.0001$), invasion ($P = 0.0011$) and migration ($P < 0.0001$), and reduced the expression of EMT-related biomarkers N-cadherin ($P = 0.000861$) and Vimentin ($P = 0.007430$), while upregulating the expression of E-cadherin ($P < 0.0001$). miR-212-3p targeted and negatively regulated the NAP1L1 expression. Overexpression of NAP1L1 reversed the inhibitory effects of miR-212-3p on glioma cell proliferation ($P < 0.0001$), migration ($P < 0.0001$), and EMT ($P < 0.0001$). **Conclusion** miR-212-3p inhibits the glioma cell proliferation, migration and EMT by targeting the negative regulation of NAP1L1 expression.

[收稿日期] 2024-06-24

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(202101AY070001-037)

[作者简介] 郭小兵(1982~), 男, 湖南邵东人, 医学硕士, 讲师, 主要从事神经系统疾病与损伤研究工作。

[通信作者] 李坪, E-mail: liping@kmmu.edu.cn

[Key words] Glioma; miR-212-3p; NAP1L1; Epithelial-mesenchymal transition; Cell proliferation

胶质瘤(Glioma)是脑部最常见的恶性肿瘤,伴随着较高的死亡率和发病率^[1]。胶质瘤细胞具有侵袭能力强,肿瘤微环境复杂,特异性高等特点,造成临床手术治疗、化疗等方法的效果不佳等现象^[2]。因此,发现新的潜在的治疗靶点对于胶质瘤的治疗和诊断十分迫切。

MicroRNA(miRNA)是1种长度约为22 nt的非编码RNA,在各种细胞中发挥其生物学功能^[3]。许多研究已经表明,miRNA通过调节各种细胞的发展过程,在各种人类疾病发挥重要作用,包括恶性肿瘤^[4]、糖尿病^[5]和心肌梗死^[6]等。在胶质瘤中,已发现miR-500a-5p^[7], miR-141^[8]和miR-106a^[9]等参与调节胶质瘤细胞的增殖,侵袭和凋亡过程,进而影响胶质瘤的进展。miR-212-3p已被证实多种癌症中具有抑癌作用,miR-212-3p过表达可以抑制膀胱癌细胞增殖、促进细胞凋亡^[10]。然而,miR-212-3p在治疗胶质瘤中的功能机制并未完全明了。miRNA通过调节不同靶基因的表达充分发挥其生物学功能,在卵巢癌中发现,miR-212-3p通过直接靶向负调控MAP3K3的表达,有效地抑制了卵巢癌的进展,并与患者预后相关^[11]。近年来,越来越多的研究报道,核小体组装蛋白1样蛋白1(nucleosome assembly protein 1-like protein 1, NAP1L1)是1种潜在的致癌基因之一,异常表达于多种肿瘤细胞中,促进了癌细胞的分化和侵袭能力^[12]。NAP1L1在结直肠癌中高水平表达,敲除NAP1L1可以有效的抑制结直肠癌细胞的恶性进展^[13]。在肝细胞癌中,靶向调控NAP1L1被报道可以抑制细胞的恶性生物学行为,已成为治疗肝细胞癌的潜在靶点^[14]。因此,本研究旨在阐明miR-212-3p和NAP1L1在胶质瘤细胞恶性增殖和侵袭中的作用机制,为胶质瘤的临床诊断和治疗提供新的潜在靶点与策略。

1 材料与方法

1.1 细胞与培养

通过中国上海细胞库获得了人星形胶质细胞(NHA, BFN60808805),人胶质瘤细胞系H4(CL-0087)、A172(CL-0012)、LN229(CL-0578)、U87(CL-0238)和U251(CL-0237)均购买于武汉普诺赛生命科技有限公司,购买的细胞通过含10%胎牛

血清(FBS; A5669701, Thermo Fisher Scientific),1%双抗(Sigma-Aldrich)的DMEM细胞培养液(Sigma-Aldrich, MO, USA)进行培养。将其置于含5%CO₂的细胞恒温(37℃)培养箱内孵育培养,当细胞长满培养皿的80%~90%时进行传代培养。

1.2 细胞转染

取出培养好的U87和U251细胞按照 1×10^5 孔的浓度转移到24孔板内,构建NCmimic、miR-212-3p mimic、oe-NC和oe-NAP1L1,利用Lipofectamine 3000试剂(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)将其分别转染到细胞中,参照试剂厂家的说明书,在无菌环境下严格进行细胞转染实验,结束实验后,将其置于含5%CO₂的细胞恒温(37℃)培养箱内孵育48h,取出细胞利用RT-qPCR评估转染成功与否。

1.3 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测

收集实验所需的各组细胞,细胞的RNA提取则是利用TRIzol试剂(Invitrogen),然后采用One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit(Takara, Kyoto, Japan)试剂盒,按照试剂盒操作步骤将RNA反转录合成单链互补DNA(cDNA),最后严格通过SYBR Green PCR Master Mix(Life Technologies, CA, USA)试剂盒进行实验,并检测mRNA水平。笔者分别以GAPDH和U6用作基因和miRNA内参,并使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[15]计算相对表达量。本实验所用的所有引物序列见表1。

1.4 结合序列查询

检索中山大学开发的RNA信息网站Starbase(<https://starbase.sysu.edu.cn/>)。

1.5 双荧光素酶报告基因

将含有miR-212-3p结合位点的NAP1L1-3'UTR克隆到荧光素酶基因上游的pGL3-Basic载体(Promega, WI, USA)中,生成野生型(wild-type, WT)重组荧光素酶报告质粒。按双荧光素酶报告基因检测试剂盒(碧云天,北京,China)说明书将报告基因细胞充分裂解,10000~15000 r/min离心3~5 min,取上清。按照厂家试剂盒说明书进行实验,并通过多功能酶标仪测定,最后将海肾荧光素酶作为内参,RLU值是通过萤火虫荧光素酶检测获得的,将其与海肾荧光素酶检测获得的RLU值作比值。

1.6 AgO2实验

将NC mimics、miR-212-3p mimic分别转染

表 1 PCR 引物序列
Tab. 1 PCR primer sequences

基因	引物	序列(5'-3')
miR-212-3p	forward	5'-GCGCGTAACAGTCTCCAGTC-3'
	reverse	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'
U6	forward	5'-CAAATTCGTGAAGCGTTCCA-3'
	reverse	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'
NAP1L1	forward	5'-GGCAGACATTGACAACAA-3'
	reverse	5'-TTCCTCCGAAATCTCATC-3'
GAPDH	forward	5'-TGACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	reverse	5'-CGCCTGCTTACCACCTTCTT-3'

到细胞中, 孵育 24 h 后, 利用 Magna RIP RNA 试剂盒(17-700, Millipore, Burlington, MA, USA), 按照之前^[16]描述的方法对 U251 细胞进行 RIP 分析。采用 SYBR Green PCR mix(QIAGEN) 实时 PCR 检测 argonaut-2 蛋白(AGO2)或 IgG 免疫沉淀中的 miR-212-3p 水平; IgG 作为阴性对照。

1.7 生存率预测

NAP1L1 在胶质瘤中的生存率预测通过检索 PrognScan 网站 (<http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/PrognScan/index.html>)。通过 GSE4412-GPL96 数据集预测 NAP1L1 在胶质瘤中的生存率, 总样本数为 74 例。

1.8 CCK-8 实验

通过北京碧云天生物技术公司获得了 CCK-8 分析试剂盒, 进行细胞增殖水平检测。收集各组处理后的细胞按 3×10^3 个/孔的浓度分别迅速的加入 96 孔板中, 按照试剂盒说明书进行操作, 每组需要设置 6 个重复孔。按要求进行实验后, 弃去原培养液, 加入新的 100 μ L 细胞培养液后, 再加入 10 μ L CCK-8 溶液, 于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1~3 h。使用酶标仪在 450 nm 处测量所有吸光度值。

1.9 Transwell 检测细胞侵袭

取各组对数生长期的细胞, 侵袭实验在 Transwell 小室(Corning, USA)中进行, 各组细胞用无血清 DMEM 培养基调整浓度为 1×10^5 个/mL。将 Transwell 小室上室中均匀涂满 Matrigel, 然后吸取 200 μ L 细胞悬液到上室中。吸取 600 μ L 含 10%FBS 的 DMEM 细胞培养液到 24 孔板下室中, 等待培养 24 h 结束后, 通过结晶紫染色(Solarbio, China)加入下室细胞进行染色, 于倒置显微镜下(CKX53, OLYMPUS, Japan)观察每个孔内固定位置的细胞数量, 并选取 5 个视野进行计数拍照, 计算平均值。

1.10 划痕实验

收集各组处理后的细胞, 以 2.5×10^5 个/孔的

浓度均匀迅速吸取到 24 孔板中, 然后将其放于细胞恒温(37 $^{\circ}$ C)培养箱内孵育, 观察细胞生长到 90% 以上的密度时, 采用无菌枪头进行划痕后, 加入 PBS 缓慢清洗掉多余细胞, 加入不含 FBS 的 DMEM 细胞培养液, 并利用倒置显微镜拍照记录, 再放入细胞恒温培养箱内 24 h 后, 再次进行拍照记录, 采用 Image J 进行分析。

1.11 蛋白印迹法分析(Western blot)

收集各组细胞后, 并提取总蛋白, 用 10% SDS-PAGE 凝胶进行分离后, 通过湿转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上(Millipore, MA, USA)。置于常温下, 加入 5% 脱脂牛奶放于摇床上 2 h 进行封闭膜, 清洗后加入一抗, 并将其放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜, 第 2 天取出后加入 HRP conjugated 二抗(1:2000, cat.no.ab205718, Abcam, UK), 置于常温 1 h。用化学发光法观察蛋白质。anti-GAPDH 抗体(1:1000, cat.no.ab181602, Abcam, UK)为对照。使用 ECL 化学发光液显影(BD Biosciences), 化学发光仪进行曝光和观察, 使用 Image J 进行蛋白条带分析。本实验中所有的一抗信息如下: Anti-N-cadherin(1:1000, ab76011, Abcam, UK), Anti-E-cadherin(1:1000, ab40772, Abcam, UK), Anti-Vimentin(1:1000, ab92547, Abcam, UK)。

1.12 统计学处理

所有研究数据都采用平均值 \pm 标准偏差($\bar{x} \pm s$)表示。数据分析和统计图是通过 Graphpad Prism 8 完成的, 2 组间的比较采用 *t* 检验(*T* tests), 超过 2 组则通过单因素方差分析(One-way ANOVA)进行分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-212-3p 在胶质瘤细胞中低表达

首先, 通过 RT-qPCR 衡量了 5 株胶质瘤细胞

中 miR-212-3p 的 mRNA 表达水平, 将正常人星形胶质细胞(normal human astrocyte, NHA)作为对照组, 发现 miR-212-3p 在 5 株细胞(H4、A172、LN229、U87 和 U251)中的表达水平均呈现低表达趋势, 尤其是 U87 和 U251 细胞中最为显著($P < 0.0001$), 见图 1, 因此后续实验将选择 U87 和 U251 2 株细胞进一步探讨 miR-212-3p 在胶质瘤中的作用机制。

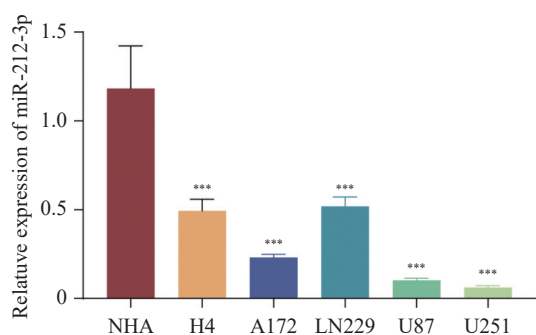


图 1 miR-212-3p 在胶质瘤细胞中低表达

Fig. 1 Low expression of miR-212-3p in glioma cells 与 NHA 组比较, *** $P < 0.001$ 。

2.2 miR-212-3p 抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和 EMT

为了明确 miR-212-3p 在胶质瘤中的作用机制, 将 NC-mimic 和 miR-212-3p mimic 转染至 U87 和 U251 细胞中, 并用 RT-qPCR 分析转染是否成功, 见图 2A, 与 NC 组相比, NC-mimic 组差异无统计学意义, 而 miR-212-3p mimic 组中 miR-212-3p 的表达水平显著升高($P = 0.0006$), 提示转染成功。通过 CCK-8 检测细胞增殖活力, 与 NC 组相比, NC-mimic 组差异无统计学意义, 而 miR-212-3p mimic 组显著抑制了 U87 和 U251 细胞增殖($P < 0.0001$), 见图 2B。侵袭和划痕实验进一步表明, 与 NC 组和 NC-mimic 组相比, miR-212-3p mimic 组显著降低了细胞侵袭能力($P = 0.0011$), 见图 2C, 和迁移能力($P < 0.0001$), 见图 2D。Western blot 结果提示, 与 NC 组和 NC-mimic 组比较, miR-212-3p mimic 组中 N-cadherin ($P = 0.000861$)和 Vimentin ($P = 0.007430$)的表达被显著抑制, 而 E-cadherin 的表达显著上调($P < 0.0001$), 见图 2E, 该结果表明过表达 miR-212-3p 抑制了 U87 和 U251 细胞增殖, 侵袭和迁移, 以及 EMT。

2.3 miR-212-3p 靶向调控 NAP1L1 的表达

利用生物信息学网站 Star Base 预测了 miR-212-3p 与 NAP1L1 的结合序列, 结果表明, NAP1L1 包含 miR-212-3p 的靶向结合位点, 见

图 3A。进一步通过双荧光素酶基因报告与 AgO2-RIP 验证 miR-212-3p 与 NAP1L1 的靶向关系, 双荧光素酶结果显示, 将 miR-212-3p mimic 与 NAP1L1-MUT(NAP1L1 突变型)、NAP1L1-WT(NAP1L1 野生型)共转染至细胞中后, 敲高 miR-212-3p 后显著抑制了 NAP1L1-WT 载体的双荧光素酶活性($P < 0.0001$), 而对 NAP1L1-MUT 无显著影响($P = 0.8386$), 见图 3B。AgO2-RIP 结果显示, 以 IgG 组作为阴性对照, 将 miR-212-3p mimic 转染至 U251 细胞中, 对 AgO2 进行免疫纯化(immuno-purification, IP), 在沉淀 AgO2 蛋白来源的 RNA 中进行 NAP1L1 的 RIP 测定, 过表达 miR-212-3p 中 NAP1L1 表达上调($P < 0.0001$), 见图 3C。综上所述表明, miR-212-3p 与 NAP1L1 之间相互作用。生存率预测结果如图 3D 所示, NAP1L1 在胶质瘤患者中具有较好的预测结果。进一步通过 RT-qPCR 检测细胞中 NAP1L1 的表达, 发现与 NC 组和 NC-mimic 组相比, miR-212-3p mimic 组显著下调了 NAP1L1 的表达水平($P < 0.0001$), 见图 3E。以上结果表明, miR-212-3p 靶向负调控 NAP1L1 的表达。

2.4 miR-212-3p 通过下调 NAP1L1 抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和 EMT

为了进一步阐明 miR-212-3p 和 NAP1L1 在胶质瘤中的具体作用机制, 笔者将 oe-NC 和 oe-NAP1L1 进一步共转染至细胞内, 并利用 RT-qPCR 评估转染时是否成功, 见图 4A, 与 NC 组比较, oe-NC 组无统计学意义($P > 0.9999$), 而 oe-NAP1L1 组 NAP1L1 的表达水平显著升高($P < 0.0001$), 提示转染成功。共转染后进一步检测 U87 和 U251 细胞中 NAP1L1 的表达水平, 与 NC 组比较, miR-212-3p mimic 组显著降低了 NAP1L1 的表达($P < 0.0001$), 与 miR-212-3p mimic 组相比, miR-212-3p mimic +oe-NAP1L1 组 NAP1L1 的表达水平显著升高($P < 0.0001$), 见图 4B。CCK-8 结果显示, 与 NC 组相比, miR-212-3p mimic 显著抑制细胞增殖($P < 0.0001$), 而共转染 oe-NAP1L1 后显著促进细胞增殖($P < 0.0001$), 见图 4C。侵袭和划痕实验进一步证明, miR-212-3p mimic 对 U87 和 U251 细胞侵袭($P = 0.0001$)和迁移($P < 0.0001$)的抑制作用, 被共转染 oe-NAP1L1 回复, 促进了细胞侵袭($P = 0.0061$)和迁移($P < 0.0001$), 见图 4D ~ 4E。最后 Western blot 检测结果表明, miR-212-3p mimic 组中 N-cadherin ($P < 0.0001$)和 Vimentin ($P = 0.0048$)的表达降低, 而 E-cadherin 的表达升高($P < 0.0001$), 同样均被

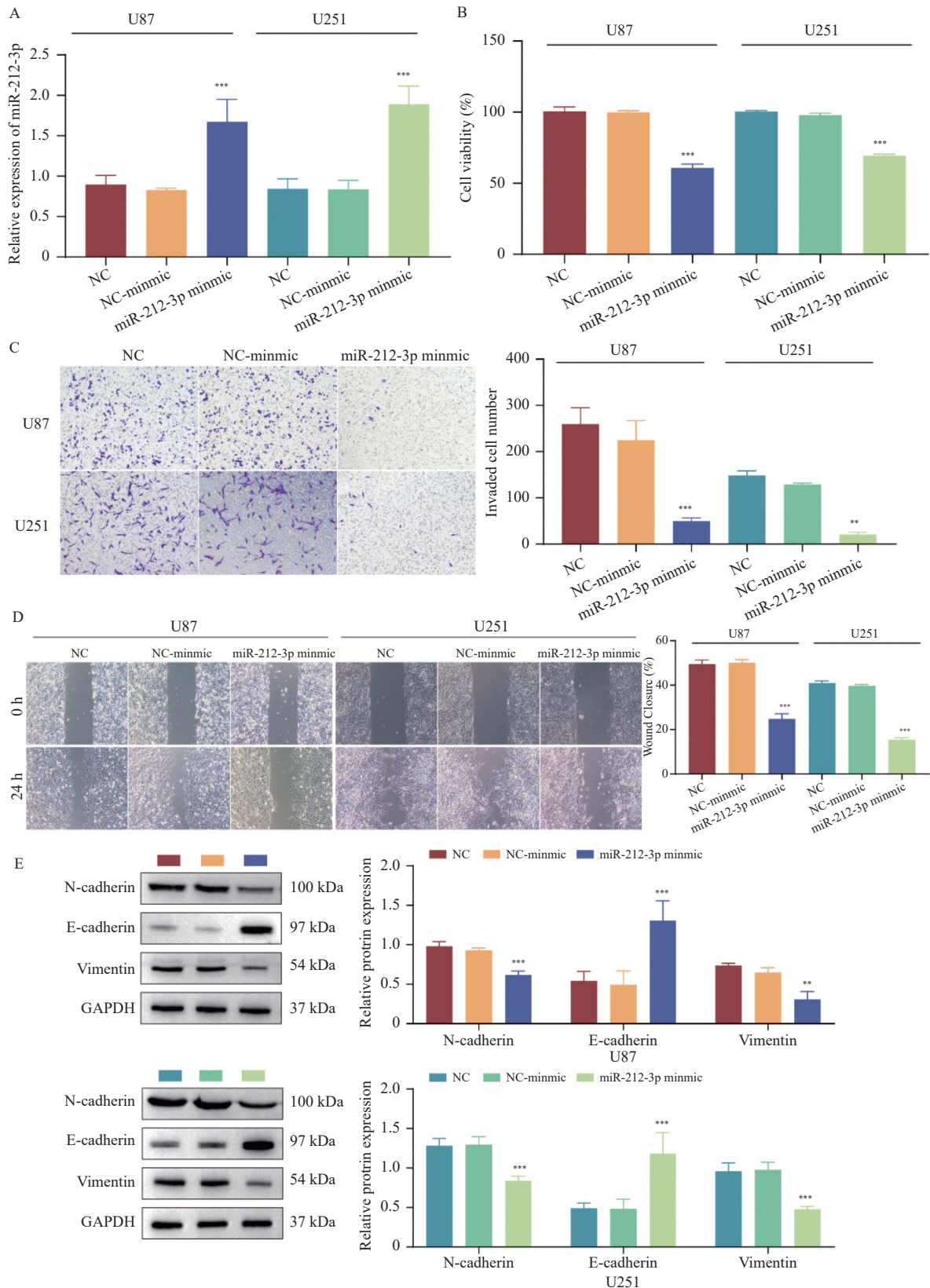


图 2 miR-212-3p 抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和 EMT

Fig. 2 miR-212-3p inhibits glioma cell proliferation, migration and EMT

A: RT- qPCR 检测 miR-212-3p 转染效率; B: CCK-8 分析; C: Transwell 评估细胞侵袭; D: 伤口愈合实验评估细胞迁移; E: Western blot 分析 EMT 相关标志物的表达(N-cadherin、E-cadherin 和 Vimentin)的蛋白水平。与 NC 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

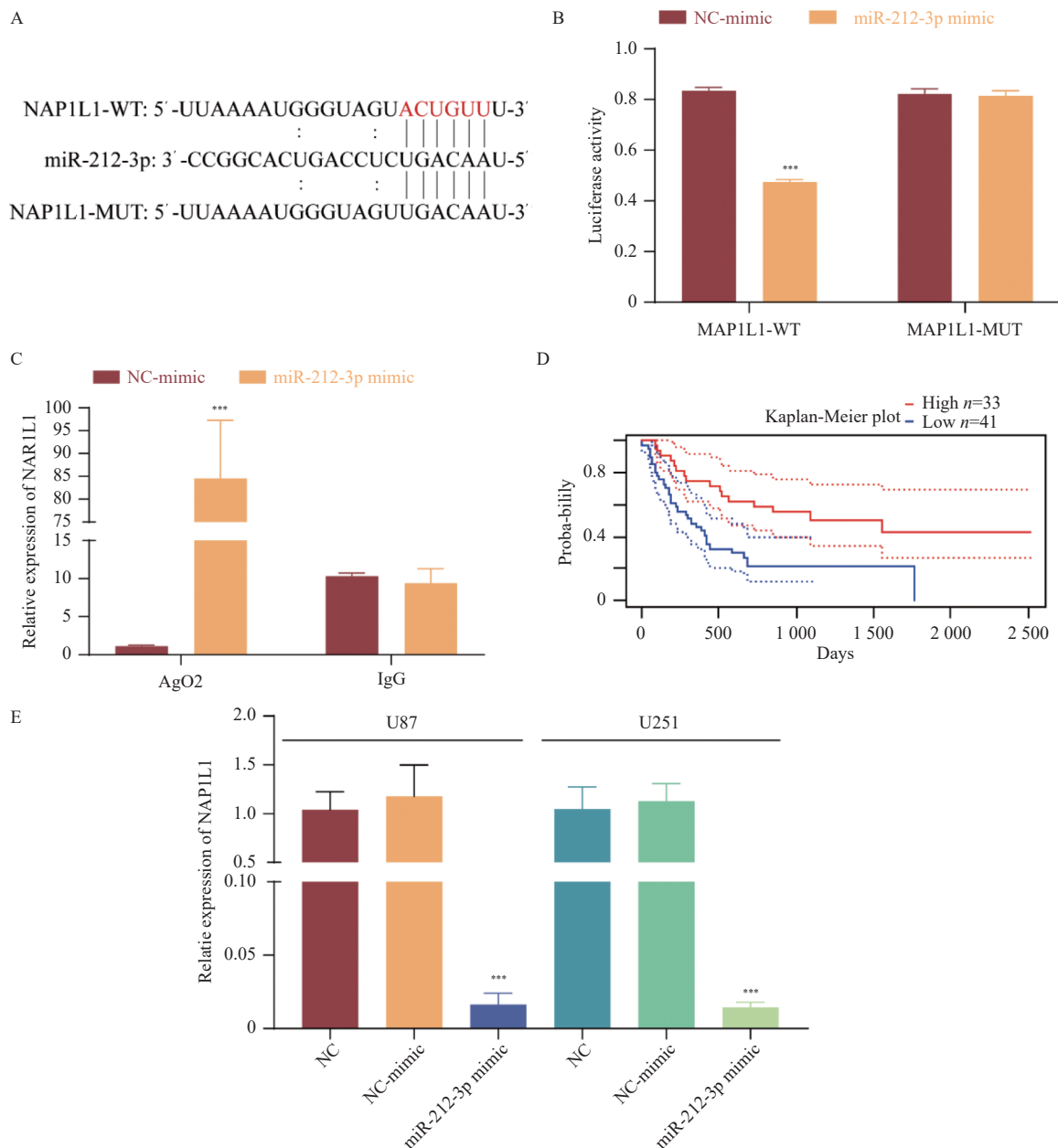


图 3 miR-212-3p 靶向调控 NAP1L1 的表达

Fig. 3 miR-212-3p targets and regulates NAP1L1 expression

A: miR-212-3p 与 NAP1L1 的结合序列; B: 双荧光素酶基因报告验证 miR-212-3p 与 NAP1L1 的靶向关系; C: AgO2-RIP 检测 miR-212-3p 与 NAP1L1 的关系; D: 生存率预测, high-risk 样本 33 例, low-risk 样本 41 例, P -value=0.023500; E: RT-qPCR 检测细胞中 NAP1L1 的表达; 与 NC-mimic 组比较, *** P <0.001。

过表达 NAP1L1 逆转, miR-212-3p mimic+oe-NAP1L1 组中 N-cadherin ($P = 0.0003$) 和 Vimentin ($P = 0.0224$) 的表达显著增加, 而 E-cadherin 的表达显著减少 ($P = 0.011885$), 见图 4F。以上结果表明, NAP1L1 回复了过表达 miR-212-3p 对胶质瘤细胞增殖、迁移和 EMT 的抑制作用。

3 讨论

众所周知, 胶质瘤是 1 种最具侵袭性和致死

率的人类脑部癌症, 并且被发现癌细胞容易扩散到其他脑组织, 患者往往会产生严重的不良预后^[17]。目前, 胶质瘤患者的治疗仍局限于手术切除和化疗辅助, 然而患者治疗后的生存率依旧很不乐观^[18]。因此, 进一步阐明胶质瘤细胞的高度侵袭和迁移的分子机制, 寻找有效的、新的生物标志物有助于胶质瘤患者的早期诊断、指导治疗、预测预后和监测疾病进展。

目前尚未确定特定的生物标志物可以广泛应用于胶质瘤的诊断和治疗, 各种不同类型的胶质

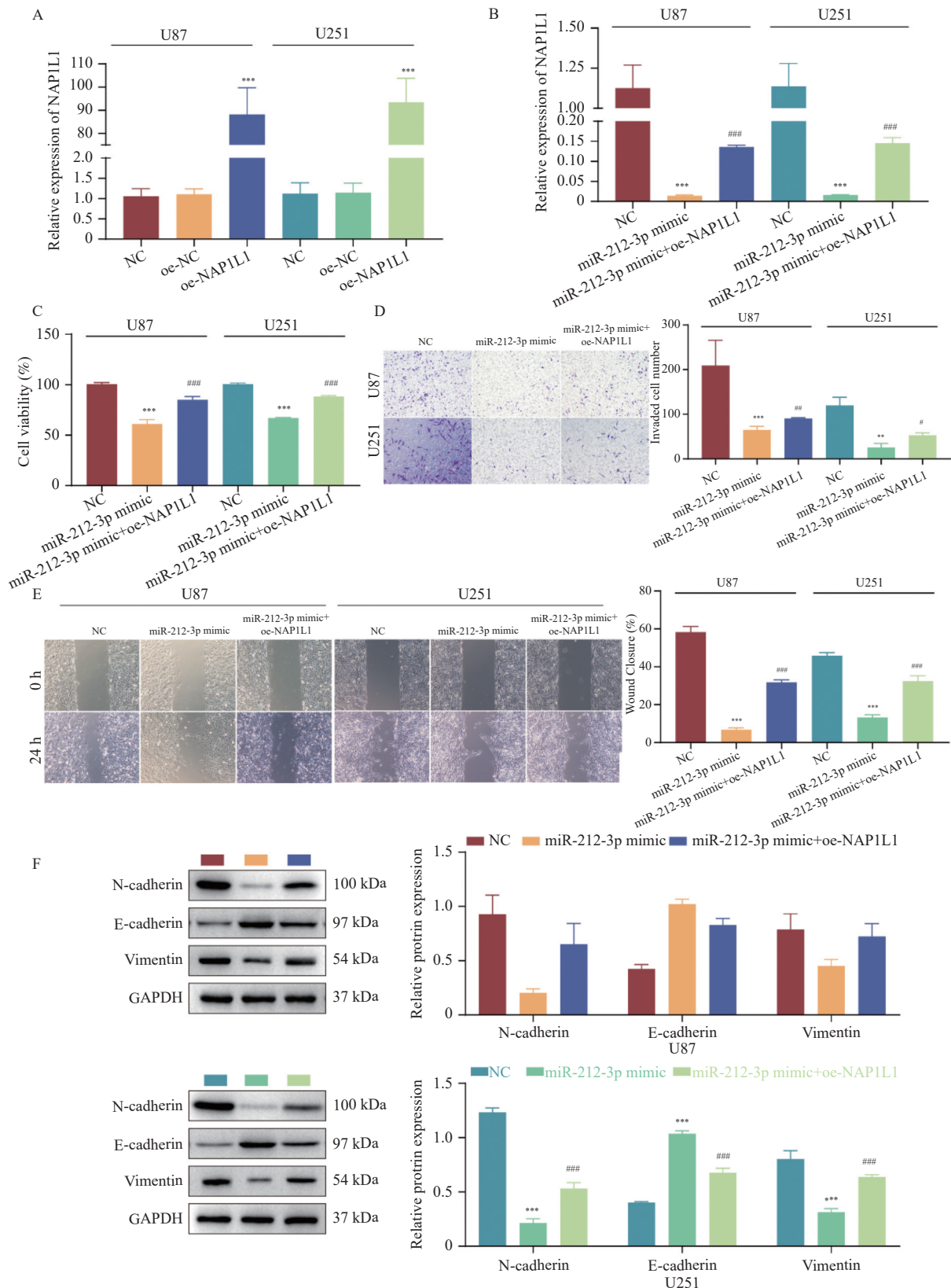


图 4 miR-212-3p 通过下调 NAP1L1 抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和 EMT

Fig. 4 miR-212-3p inhibits glioma cell proliferation, migration and EMT through down-regulation of NAP1L1

A: RT-qPCR 检测 NAP1L1 转染效率; B: RT-qPCR 检测 NAP1L1 的表达; C: CCK-8 分析; D: Transwell 评估细胞侵袭; E: 伤口愈合实验评估细胞迁移; F: Western blot 检测 N-cadherin、E-cadherin 和 Vimentin 的蛋白水平。与 NC 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 miR-212-3p mimic 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

瘤可能具有不同的生物标志物, miRNA 被认定为与胶质瘤相关, 并可能用作诊断和预后评估的标志物^[19]。miRNA 是大小约为 22 nt 的短链非编码 RNA, 通过调节靶基因 mRNA 的转录和翻译, 在肿瘤中既可能发挥促进作用, 也可能发挥抑制作用^[20]。许多研究关注于 miRNA 在胶质瘤中的作用机制, 例如 miR-29a^[21] 和 miR-200c^[22] 被发现在胶质瘤组织中的表达显著降低, 可作为胶质瘤的抑癌因子。本研究中, 笔者在胶质瘤细胞系中发现 miR-212-3p 呈低表达, 因此推测 miR-212-3p 在胶质瘤中可能具有抑癌作用。先前研究已证实 miR-212-3p 在多种癌症中发挥抑癌作用, 在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中, miR-212-3p 可以抑制细胞增殖和侵袭, 促进细胞凋亡^[23]。笔者的研究结果表明 miR-212-3p 抑制了胶质瘤细胞增殖和侵袭, 以及 EMT。EMT 是肿瘤恶性发展的重要调控过程, EMT 的特征包括上皮标志物的减少, 间质标志物的增加以及细胞外基质降解酶的表达增加。这种转变使得肿瘤细胞从紧密连接的上皮态转变为间质态, 增强了其迁移、浸润和转移的能力^[24]。在胶质瘤中, EMT 被认为与肿瘤的侵袭性生长、血管生成、免疫逃逸以及耐药性等多种重要生物学过程相关^[25]。Chen 等^[26] 的研究也证实, miR-212-3p 通过下调靶基因结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)来抑制细胞侵袭和 EMT, 发挥了重要的抗肝细胞癌作用。因此, 寻找 miR-212-3p 的靶基因, 进一步明确其在胶质瘤中的功能机制至关重要。

核小体组装蛋白 1 样 1(nucleosome assembly protein 1-like 1, NAP1L1)被报道在多种组织中表达, 在细胞增殖、迁移和分化中具有关键的调节作用^[27]。NAP1L1 促进肝细胞癌细胞增殖并导致化疗耐药性^[28]。已有研究证实 NAP1L1 是 miR-532-5p 的靶基因, miR-532-5p 通过直接下调 NAP1L1 的表达抑制肾癌细胞增殖^[29]。然而, miR-212-3p 与 NAP1L1 的关系尚未清楚。在本研究中, 进一步预测与证实 NAP1L1 是 miR-212-3p 的靶基因, 且发现 NAP1L1 在胶质瘤患者中具有较好的生存预测效果。NAP1L1 被证实是胶质瘤细胞增殖的促进剂, 肌球蛋白重链 9(myosin heavy chain 9, MYH9)通过与 NAP1L1 相互作用, 促进神经胶质瘤细胞增殖和对替莫唑胺的耐药性^[30]。Chen 等^[31] 也证实 NAP1L1 在胶质瘤中的表达增强, 敲除 NAP1L1 在体内外抑制胶质瘤细胞的增殖。在本研究中, 发现 miR-212-3p 靶向负调控 NAP1L1 的

表达, miR-212-3p 对胶质瘤细胞增殖、迁移和 EMT 的抑制作用, 均被过表达 NAP1L1 逆转。

综上所述, miR-212-3p 和 NAP1L1 在胶质瘤细胞恶性进展中都有关键的调节作用, miR-212-3p 通过靶向负调控 NAP1L1 在胶质瘤中发挥了抑制细胞增殖、迁移和 EMT 的作用, 本研究结果表明 miR-212-3p 通过靶向负调控 NAP1L1 可能是胶质瘤的潜在生物标志物。但由于胶质瘤的分类较多, 胶质瘤细胞的恶性发展复杂, 仍需要进一步的研究来验证这些潜在的生物标志物, 并确定其在临床实践中的可靠性和有效性。我们仍然需要更多的研究来识别和验证特定的生物标志物, 并将其与现有的诊断和治疗策略相结合, 以改善胶质瘤患者的管理和结果。

[参考文献]

- [1] Tan A C, Ashley D M, Lopez G Y, et al. Management of glioblastoma: State of the art and future directions[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(4): 299-312.
- [2] 程铃, 陈蓉, 李朝今, 等. 山茶花提取物抑制胶质瘤细胞 SW1088 增殖、迁移和侵袭的机制研究[J]. *西部医学*, 2023, 35(12): 1735-1739.
- [3] Smolle M A, Leithner A, Posch F, et al. MicroRNAs in different histologies of soft tissue sarcoma: A comprehensive review[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1960.
- [4] 张绍卿, 杜敏, 刘兰, 等. 微 RNA-219 通过 ERK 1/2 通路改善炎症所致新生 SD 大鼠脑内少突胶质细胞成熟障碍[J]. *海军军医大学学报*, 2023, 44(12): 1429-1434.
- [5] 向发, 吴红艳. MicroRNA 在糖尿病诊治中的应用前景[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(2): 66-75.
- [6] 赵强, 赵瑞平. 血浆 MicroRNA-296-5P、MicroRNA-107 表达水平对急性心肌梗死诊断的预测价值[J]. *包头医学院学报*, 2023, 39(12): 36-39, 54.
- [7] Liu Z, Su D, Qi X, et al. MiR-500a-5p promotes glioblastoma cell proliferation, migration and invasion by targeting chromodomain helicase DNA binding protein 5[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 2689-2696.
- [8] 任同, 杨智君, 陈思源, 等. miR-141 靶向 ZEB2 对神经胶质瘤细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. *蚌埠医学院学报*, 2023, 48(7): 862-867.
- [9] 林亦海, 吴漳益, 郭亮. miR-106a 对胶质瘤增殖和凋亡的影响及机制研究[J]. *浙江医学*, 2023, 45(4): 342-349.
- [10] Wu X, Chen H, Zhang G, et al. MiR-212-3p inhibits cell

- proliferation and promotes apoptosis by targeting nuclear factor IA in bladder cancer[J]. *J Biosci*, 2019, 44(4): 80.
- [11] Zhang L, Zhang Y, Wang S, et al. MiR-212-3p suppresses high-grade serous ovarian cancer progression by directly targeting MAP3K3[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(3): 875-888.
- [12] 譙钰琪, 惠盼, 南岩东. NAP1L1 与肿瘤的关系及其研究进展 [J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2021, 14(6): 827-829.
- [13] Liang X, Tang Z, Zhang Y, et al. NAP1L1 promotes the growth of colon cancer by activating HDGF/DDX5[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2022, 54(9): 1234-1243.
- [14] Chen Z, Gao W, Pu L, et al. PRDM8 exhibits antitumor activities toward hepatocellular carcinoma by targeting NAP1L1[J]. *Hepatology*, 2018, 68(3): 994-1009.
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [16] Li L, Lv G, Wang B, et al. The role of lncRNA XIST/miR-211 axis in modulating the proliferation and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes through CXCR4 and MAPK signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2555-2562.
- [17] Delgado-Martín B, Medina M. Advances in the knowledge of the molecular biology of glioblastoma and its impact in patient diagnosis, stratification, and treatment[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(9): 1902971.
- [18] Stupp R, Mason W P, Van Den Bent M J, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996.
- [19] Śledzińska P, Bebyn M G, Furtak J, et al. Prognostic and predictive biomarkers in gliomas[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10373.
- [20] Pang H, Zheng Y, Zhao Y, et al. miR-590-3p suppresses cancer cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma multiforme by targeting ZEB1 and ZEB2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4): 739-745.
- [21] Liu Y, Duan N, Duan S. MiR-29a inhibits glioma tumorigenesis through a negative feedback loop of TRAF4/Akt signaling[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018(1): 1-8.
- [22] Qin Y, Chen W, Liu B, et al. MiR-200c inhibits the tumor progression of glioma via targeting moesin[J]. *Theranostics*, 2017, 7(6): 1663-1673.
- [23] Wu Z, Yu B, Jiang L. MiR-212-3p mediates apoptosis and invasion of esophageal squamous cell carcinoma through inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting SOX4[J]. *J Thorac Dis*, 2020, 12(8): 4357-4367.
- [24] Tripathi S, Levine H, Jolly M K. The physics of cellular decision making during epithelial-mesenchymal transition[J]. *Annu Rev Biophys*, 2020, 49(1): 1-18.
- [25] Zhang J, Cai H, Sun L, et al. LGR5, a novel functional glioma stem cell marker, promotes EMT by activating the Wnt/ β -catenin pathway and predicts poor survival of glioma patients[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 225.
- [26] Chen J Q, Ou Y L, Huang Z P, et al. MicroRNA-212-3p inhibits the proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells by suppressing CTGF expression[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9820.
- [27] Li T, Niu Z, Yu T, et al. Nucleosome assembly protein 1 like 1 (NAP1L1) promotes cardiac fibrosis by inhibiting YAP1 ubiquitination and degradation[J]. *MedComm (2020)*, 2023, 4(5): e348.
- [28] Le Y, Kan A, Li Q J, et al. NAP1L1 is a prognostic biomarker and contribute to doxorubicin chemotherapy resistance in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(1): 228.
- [29] Zhai W, Ma J, Zhu R, et al. MiR-532-5p suppresses renal cancer cell proliferation by disrupting the ETS1-mediated positive feedback loop with the KRAS-NAP1L1/P-ERK axis[J]. *Br J Cancer*, 2018, 119(5): 591-604.
- [30] Chen Z, Yan X, Miao C, et al. Targeting MYH9 represses USP14-mediated NAP1L1 deubiquitination and cell proliferation in glioma[J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1): 220.
- [31] Chen Z, Xie Y, Luo H, et al. NAP1L1 promotes proliferation and chemoresistance in glioma by inducing CCND1/CDK4/CDK6 expression through its interaction with HDGF and activation of c-Jun[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(24): 26180-26200.