

. 实验研究 .

沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 对脑胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响

龙银波 李贺扬 金治宾

【摘要】目的 探讨沉默长链非编码 RNA(lncRNA) SLC16A1-AS1 对脑胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响。**方法** PCR 检测 2021 年 5 月至 2023 年 1 月手术切除的 62 例脑胶质瘤组织 lncRNA SLC16A1-AS1、微小 RNA(miR)-584-5p 以细胞外蛋白调节激酶 1(MAPK1) mRNA,免疫印迹法检测 MAPK1 蛋白表达;以瘤旁组织(距离肿瘤边缘>2 cm)作为正常脑组织。从胶质瘤组织中分离、培养胶质瘤细胞,进行 CD133、Neatin 免疫荧光染色鉴定;转染不同质粒沉默 lncRNA SLC16A1-AS1、上调或下调 miR-584-5p 表达;应用 CCK-8 法、划痕实验、Transwell 实验和流式细胞术检测细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡情况;免疫印迹法检测细胞 MAPK1、细胞周期素 D1(CyclinD1)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、caspase-3 蛋白表达;双荧光素酶报告基因实验验证 lncRNA SLC16A1-AS1、miR-584-5p 和 MAPK1 的靶向关系。**结果** 胶质瘤组织 lncRNA SLC16A1-AS1、MAPK1 呈高表达($P<0.05$),miR-584-5p 呈低表达($P<0.05$)。免疫荧光染色显示,分离培养的细胞 CD133、Nestin 均呈阳性表达。沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 表达,明显抑制体外培养的胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭($P<0.05$),促进细胞凋亡($P<0.05$),明显下调细胞 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达($P<0.05$),明显上调 miR-584-5p、caspase-3 表达。抑制 miR-584-5p 明显逆转沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 对体外培养的胶质瘤细胞的作用。双荧光素酶报告基因实验证实 lncRNA SLC16A1-AS1 与 miR-584-5p/MAPK1 存在靶向调节关系。**结论** 胶质瘤组织 lncRNA SLC16A1-AS1 呈高表达,沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 可以上调 miR-584-5p 表达,抑制 MAPK1 表达,进而抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭,促进细胞凋亡。

【关键词】 脑胶质瘤;长链非编码 RNA SLC16A1-AS1;微小 RNA-584-5p;细胞外蛋白调节激酶 1;细胞增殖;细胞凋亡
【文章编号】 1009-153X(2024)01-0035-07 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41

Effects of silencing lncRNA SLC16A1-AS1 on malignant biological behaviors of brain glioma cells

LONG Yin-bo, LI He-yang, JIN Zhi-bin. Department of Neurosurgery, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of silencing long non-coding RNA (lncRNA) SLC16A1-AS1 on the malignant biological behaviors of glioma cells. **Methods** LncRNA SLC16A1-AS1, miR-584-5p and MAPK1 mRNA were detected by PCR in glioma tissues obtained from 62 patients who underwent surgery from May 2021 to January 2023, and MAPK1 protein expression was detected by Western blotting. Para-tumor tissues (>2 cm from the edge of the tumor) were used as control. Glioma cells were isolated and cultured from the glioma tissues, and CD133 and Neatin were identified by immunofluorescence staining. Different plasmids were transfected to silence lncRNA SLC16A1-AS1, up-regulate or down-regulate the expression of miR-584-5p. CCK-8 method, scratch experiment, Transwell experiment and flow cytometry were used to detect the proliferation, migration, invasion and apoptosis of the cultured glioma cells. The protein expressions of MAPK1, CyclinD1, MMP-2 and caspase-3 were detected by Western blotting. The dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between lncRNA SLC16A1-AS1, miR-584-5p and MAPK1. **Results** LncRNA SLC16A1-AS1 and MAPK1 were significantly highly expressed in glioma tissues ($P<0.05$), and miR-584-5p was significantly lowly expressed ($P<0.05$). The immunofluorescence staining showed that the isolated and cultured cells were positive for CD133 and Nestin. Silencing of lncRNA SLC16A1-AS1 significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of the glioma cells *in vitro* ($P<0.05$), promoted cell apoptosis ($P<0.05$), significantly down-regulated the protein expressions of CyclinD1, MMP-2 and MMP-9 ($P<0.05$), and significantly up-regulated the expressions of miR-584-5p and caspase-3. Inhibition of miR-584-5p significantly reversed the effects of lncRNA SLC16A1-AS1 silencing on the glioma cells *in vitro*. Dual luciferase reporter gene assay confirmed that lncRNA SLC16A1-AS1 was targeted to regulate miR-584-5p/MAPK1. **Conclusions** LncRNA SLC16A1-AS1 is highly expressed in glioma tissues. Silencing lncRNA SLC16A1-AS1 can up-regulate the expression of miR-584-5p and inhibit the expression of MAPK1, thereby inhibiting the proliferation, migration and invasion of glioma cells and promoting cell apoptosis.

【Key words】 Brain glioma; Long non-coding RNA SLC16A1-AS1; miRNA-584-5p; MAPK1; Malignant biological behaviors

的特异性靶点具有重要意义。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一组长度超过 200 个核苷酸的非蛋白编码转录物,广泛参与基因表达和多种生理病理过程。研究表明 lncRNA 可作为致癌基因或肿瘤抑制剂在肿瘤的发生和发展中发挥重要的调节作用,调节肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭和转移^[3]。lncRNA SLC16A1-AS1 在胶质瘤细胞中高表达,促进胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[4,5]。有研究表明,lncRNA 可通过调控 miRNA 的表达来影响肿瘤细胞的上皮间质转化和干性^[6],过表达 miR-584-5p 可以抑制胶质瘤细胞的增殖、血管生成和侵袭^[7]。MAPK 信号通路在肿瘤细胞存活和增殖中起着至关重要的作用,miRNA 靶向抑制 MAPK1 表达,可以抑制脑胶质瘤增殖,促进其凋亡^[8]。生物信息库 (<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) 预测发现 lncRNA SLC16A1-AS1 与 miR-584-5p、miR-584-5p 与 MAPK1 存在结合位点。本研究探索 lncRNA SLC16A1-AS1 能否通过调控 miR-584-5p/MAPK1 轴调节胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

1 材料和方法

1.1 样本来源 收集 2021 年 5 月至 2023 年 1 月手术切除的脑胶质瘤组织 62 例,以瘤旁组织(距离肿瘤边缘>2 cm)作为正常脑组织。纳入标准:①符合脑胶质瘤的病理诊断标准;②首次手术;③术前无放、化疗及其他辅助性治疗。排除标准:①精神疾病;②传染性疾病。所有标本由医院病理科专家对其组织学诊断进行复核确认。本研究经沧州市中心医院伦理委员会批准(批号为 2020-084-02(Z))。

1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养基、胎牛血清,均购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物公司;RT-qPCR 试剂盒购自日本 Takara 公司;GAPDH、CyclinD1、MMP-2、MMP-9、MAPK1 一抗及二抗均购自英国 Abcam 公司。

1.3 胶质瘤细胞的分离、培养及鉴定 参考文献[9]的方法分离胶质瘤组织中胶质瘤细胞。在无菌条件下收集肿瘤组织,置于培养皿中,用含两性霉素 B (2 μg/ml)、链霉素 (500 μg/ml) 的培养液浸泡 10 min, PBS 洗涤 3 次,使用眼科剪刀、镊子剔除组织中的血管及结缔组织等,剪成 0.5~1 mm³ 小块, PBS 洗涤 3 次。加入 5~6 倍体积 0.25% 胰蛋白酶在 37 ℃ 水浴箱中消化 40 min (每 5 min 震荡 1 次,防止细胞与胰酶结块),加入含 20% 胎牛血清的培养基终止消化,随后

吸管吹散组织,静置 5~10 min。使用 400 目过滤网过滤未消化组织并弃去,将滤液离心 10 min (1000 转/min),收集细胞沉淀,然后加入 RPMI-1640 培养基重悬细胞,调整细胞浓度为 (1~2)×10⁵/ml,接种到 50 ml 培养瓶中常规培养,每 2~3 d 换液一次,观察细胞生长情况,待生长至对数期时进行 1:2 传代,取 3 代以后细胞进行实验。

将胶质瘤细胞接种于 20 mm×20 mm 盖玻片上,待细胞伸展后,4% 多聚甲醛固定 10 min,使用 5% 山羊血清室温封闭 1 h,分别加入 CD133 抗体以及 Neatin 抗体 4 ℃ 孵育过夜,加入荧光二抗在室温下避光孵育 1 h,然后使用 DAPI 染液核染 10 min,使用荧光显微镜观察采集图像。

1.4 细胞培养与分组 取对数期生长期胶质瘤细胞,利用脂质体转染法分别转染 si-NC 质粒、si-SLC16A1-AS1 质粒至胶质瘤细胞,记为 si-NC 组、si-SLC16A1-AS1 组。分别将 si-SLC16A1-AS1 质粒与 miR-NC 质粒、si-SLC16A1-AS1 质粒与 miR-584-5p inhibitor 质粒共转染至胶质瘤细胞,记为 si-SLC16A1-AS1 + miR-NC 组和 si-SLC16A1-AS1 + miR-584-5p inhibitor 组,以正常培养(不转染质粒)的胶质瘤细胞为对照组 (NC)。所有转染细胞均转染 48 h 后进行后续实验。

1.5 RT-qPCR 检测 lncRNA SLC16A1-AS1、miR-584-5p、MAPK1 mRNA 的表达 提取细胞和组织总 RNA,反转录为 cDNA,根据 PCR 试剂盒进行扩增,扩增条件:95 ℃/4 min,95 ℃/30 s,60 ℃/30 s,72 ℃/30 s,共 40 个循环。引物序列见表 1,以 GAPDH 和 U6 为内参。根据 2^{-ΔΔCt} 法计算 lncRNA SLC16A1-AS1、miR-584-5p、MAPK1 mRNA 相对表达量。

1.6 细胞增殖活性的检测 收集转染后的细胞,调整

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

基因	引物序列
SLC16A1-AS1	上游:5'-TGGACGATGCATATGTGGGG-3'
	下游:5'-CACGTTGGTTATGCGGTCAC-3'
miR-584-5p	上游:5'-TTATGGTTTGCTCTGG-GACTGAG-3'
	下游:5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'
MAPK1	上游:5'-GCGCTACACCAACCTCTCGT-3'
	下游:5'-CACGGTGCAGAACGTTAGCTG-3'
GAPDH	上游:5'-TGTTGCCATCAATCACCCTT-3'
	下游:5'-CTCCACGACGTACTCAGCG-3'
U6	上游:5'-CGCTTCGGCAGCACATATACTA-3'
	下游:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-3'

浓度至 2×10^4 个/ml, 接入 96 孔板, 在培养 24、48 h 后, 分别加入 10 μ l CCK-8 试剂, 继续培养 1 h, 酶标仪检测 OD450 值, 吸光值越高代表活性越强。

1.7 细胞迁移能力的检测 收集转染的细胞, 调整浓度为 4×10^5 个/ml, 接入 6 孔板, 使用无菌 10 μ l 枪头在底部垂直划痕, 培养 24 h, 使用倒置荧光显微镜观察 0 h 和 24 h 的细胞, 根据划痕宽度计算划痕愈合率。

1.8 细胞侵袭能力的检测 将转染后的细胞浓度调整至 2×10^5 个/孔, 接种于涂有基质胶 (Matrigel) 的 Transwell 小室上室, 下室为 600 μ l 含血清的 RPMI 1640 培养基, 在细胞培养箱中培养 24 h 后, 将过膜细胞进行结晶紫染色, 倒置荧光显微镜观察。

1.9 细胞凋亡水平的检测 收集转染后的细胞, 调整浓度至 2×10^4 个/ml, 接入 6 孔板, 培养 24 h 后, 预冷的 PBS 洗涤细胞两次, 加入结合缓冲液重悬细胞。再加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 染液, 混匀后, 避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测。

1.10 免疫印迹法检测蛋白表达 使用蛋白裂解液提取细胞总蛋白, 测定蛋白浓度后, 取适量蛋白上样、电泳、转膜、封闭后, 加入一抗 MAPK1 (1:1 000)、Cyclin D1 (1:1 000)、MMP-2 (1:1 000)、MMP-9 (1:2 000)、caspase-3 (1:2 000), 以 GAPDH (1:1 000) 为内参, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜, 加入二抗 (1:5 000), 室温下孵育 2 h, 化学发光法显影, Image J 软件评估蛋白的灰度值。

1.11 靶向关系的验证 采用双荧光素酶报告实验验证 lncRNA SLC16A1-AS1、miR-584-5p、MAPK1 之间的靶向关系。构建 SLC16A1-AS1、MAPK1 的野生

型 (WT) 和突变型 (MUT) 质粒, 将 SLC16A1-AS1-WT、SLC16A1-AS1-MUT 分别与 miR NC 或 miR-584-5p mimic 共转染于胶质瘤细胞; 将 MAPK1-WT、MAPK1-MUT 分别与 miR NC 或 miR-584-5p mimic 共转染于胶质瘤细胞, 48 h 后观察荧光素酶活性。

1.12 统计学分析 采用 SPSS 26.0 进行分析; 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA SLC16A1-AS1、miR-584-5p 和 MAPK1 mRNA 在胶质瘤组织中的表达 与正常脑组织比较, 胶质瘤组织 lncRNA SLC16A1-AS1、MAPK1 mRNA 及蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), miR-584-5p 表达水平明显下降 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 胶质瘤细胞的鉴定结果 CD133 表达阳性呈绿色, Neatin 表达阳性呈红色, 细胞核为蓝色。培养的细胞 CD133 与 Neatin 表达均呈阳性表达 (图 2), 提示胶质瘤细胞分离成功。

2.3 沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 对胶质瘤细胞 miR-584-5p 和 MAPK1 表达的影响 与 NC 组、si-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1 组细胞 SLC16A1-AS1、MAPK1 mRNA 和蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$), miR-584-5p 表达水平明显上升 ($P < 0.05$); 与 si-SLC16A1-AS1 组、si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1+miR-584-5p inhibitor 组细胞 MAPK1 mRNA 和蛋白表达水平明显上升 ($P < 0.05$), miR-584-5p 表达水平明显下降 ($P < 0.05$)。见图 3。

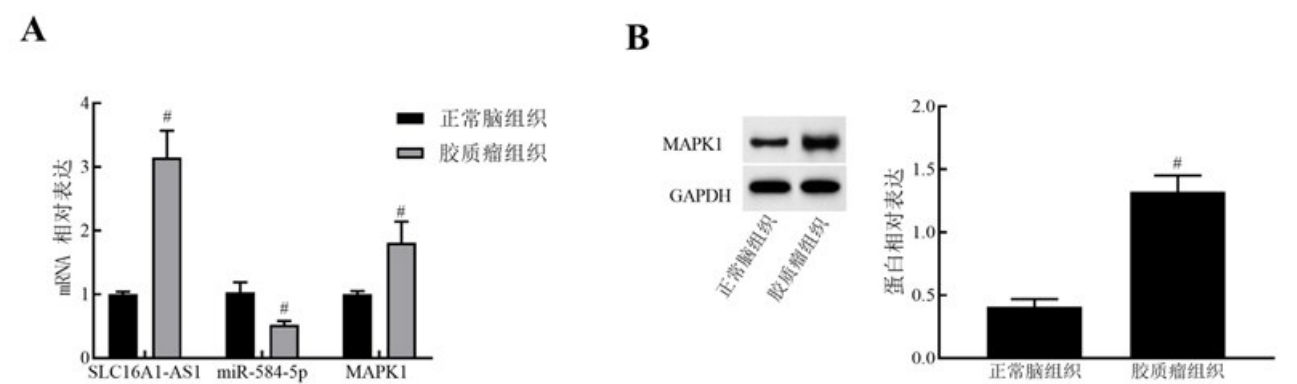


图 1 lncRNA SLC16A1-AS1、miR-584-5p 和 MAPK1 在组织中的表达

A. RT-qPCR 检测 lncRNA SLC16A1-AS1、miR-584-5p 和 MAPK1 mRNA 表达; B. 免疫印迹法检测 MAPK1 蛋白表达; 与正常脑组织比较, # $P < 0.05$

Figure 1 Expression of lncRNA SLC16A1-AS1, miR-584-5p and MAPK1 in different tissues

A: RT-qPCR detection of lncRNA SLC16A1-AS1, miR-584-5p and MAPK1 mRNA. B: Western blotting detection of MAPK1 protein expression. # showing $P < 0.05$ vs. normal brain tissues

2.4 沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 对胶质瘤细胞增殖活性的影响 与 NC 组、si-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1 组胶质瘤细胞 OD450 值明显下降($P<0.05$)。与 si-SLC16A1-AS1 组、si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1+miR-584-5p inhibitor 组胶质瘤细胞 OD450 值明显上升($P<0.05$)。见图 4。

2.5 沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 或抑制 miR-584-5p 对胶质瘤细胞迁移能力的影响 与 NC 组、si-NC 组比

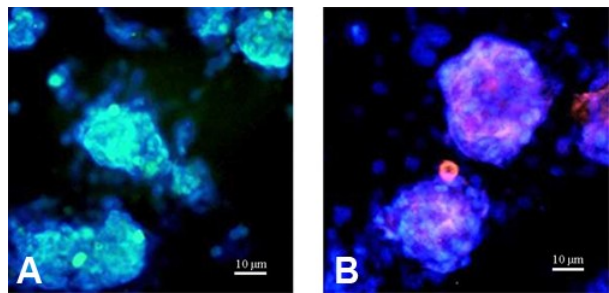


图 2 免疫荧光染色鉴定胶质瘤细胞
A. CD133 阳性表达; B. Nestin 阳性表达
Figure 2 Identification of glioma cells by immunofluorescence staining
A: CD133 positive expression. B: Nestin positive expression

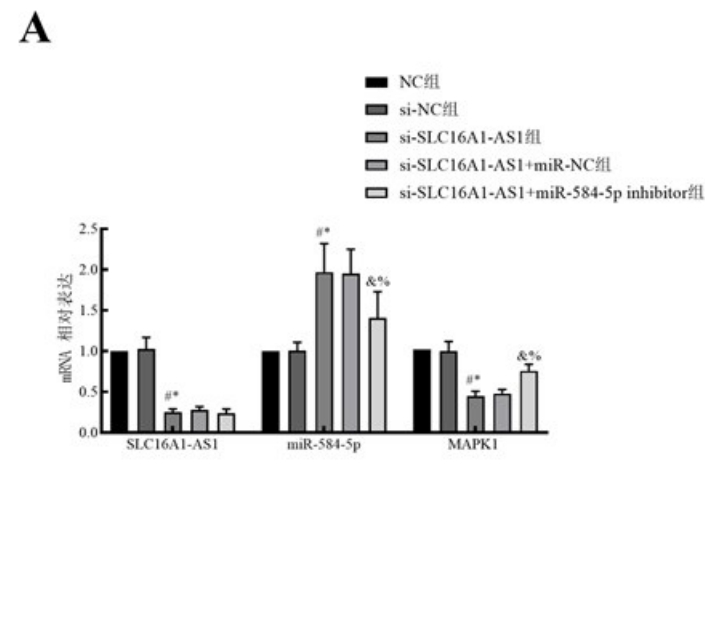


图 3 胶质瘤细胞 lncRNA SLC16A1-AS1、miR-584-5p 和 MAPK1 的表达水平的比较
A. RT-qPCR 检测细胞 lncRNA SLC16A1-AS1、miR-584-5p 和 MAPK1 mRNA 表达; B. 免疫印迹法检测细胞 MAPK1 蛋白表达(a. NC 组; b. si-NC 组; c. si-SLC16A1-AS1 组; d. si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组; e. si-SLC16A1-AS1+miR-584-5p inhibitor 组); 与 NC 组比较, # $P<0.05$; 与 si-NC 组比较, * $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1 组比较, & $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, % $P<0.05$

Figure 3 Expression levels of lncRNA SLC16A1-AS1, miR-584-5p and MAPK1 in cultured glioma cells
A: RT-qPCR detection of lncRNA SLC16A1-AS1, miR-584-5p and MAPK1 mRNA in cultured glioma cells. B: Western blotting detection of MAPK1 protein in cultured glioma cells (a: NC group. b: si-NC group. c: si-SLC16A1-AS1 group. d: si-SLC16A1-AS1+miR-NC group. e: si-SLC16A1-AS1+miR-584-5p inhibitor group.). # showing $P<0.05$ vs. NC group. * showing $P<0.05$ vs. si-NC group. & showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1 group. % showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1+miR-NC group

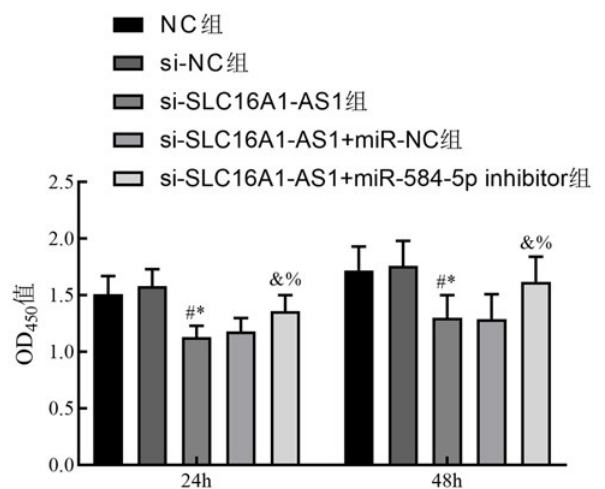
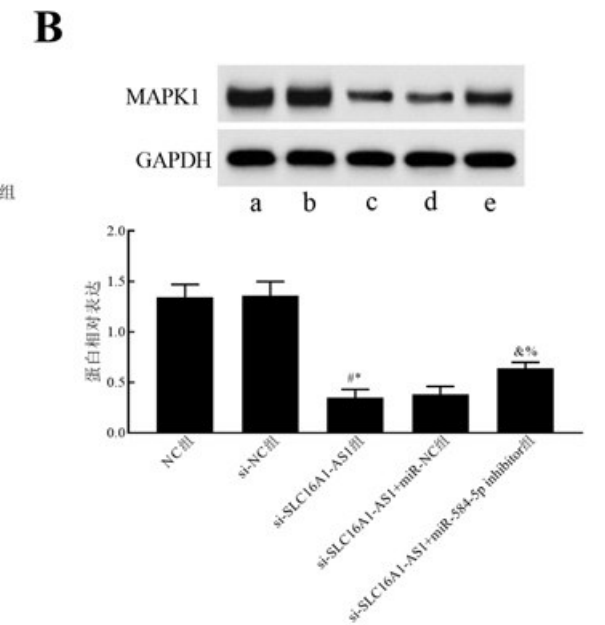


图 4 胶质瘤细胞增殖活性的比较
与 NC 组比较, # $P<0.05$; 与 si-NC 组比较, * $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1 组比较, & $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, % $P<0.05$
Figure 4 Proliferation activity of cultured glioma cells
showing $P<0.05$ vs. NC group. * showing $P<0.05$ vs. si-NC group. & showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1 group. % showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1+miR-NC group



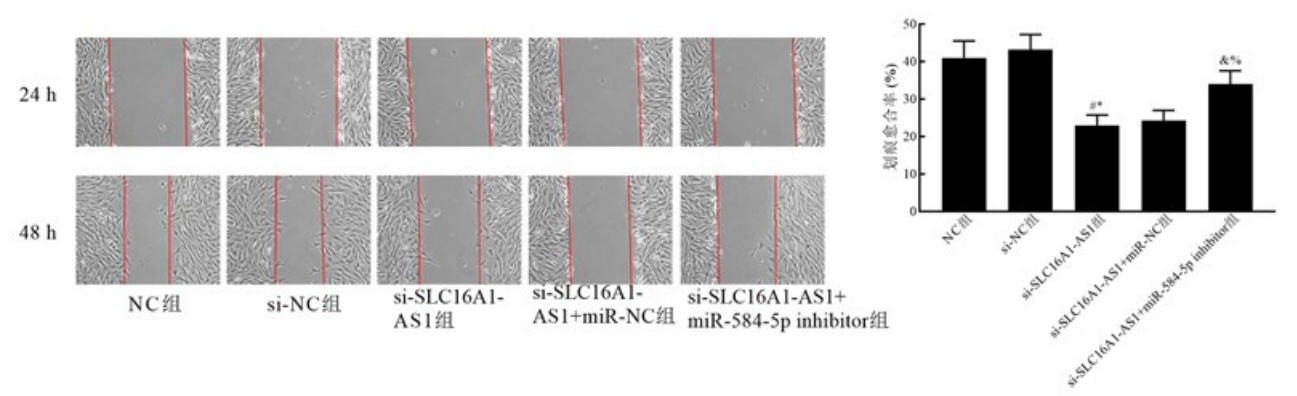


图5 胶质瘤细胞迁移能力的比较

与 NC 组比较, # $P<0.05$; 与 si-NC 组比较, * $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1 组比较, & $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, % $P<0.05$

Figure 5 Migration ability of cultured glioma cells

showing $P<0.05$ vs. NC group. * showing $P<0.05$ vs. si-NC group. & showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1 group. % showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1+miR-NC group

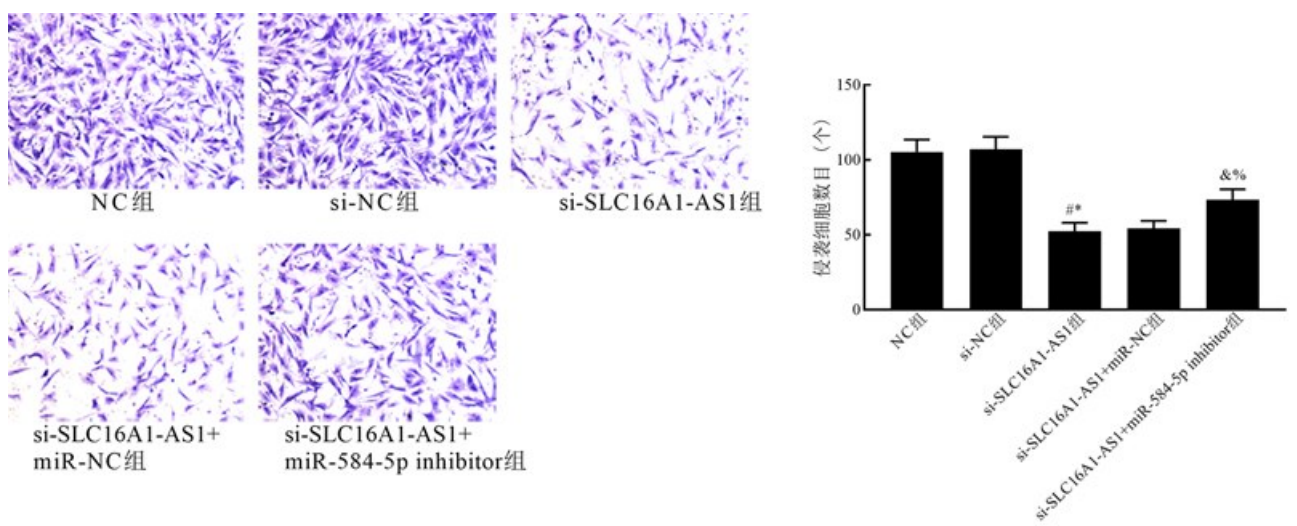


图6 胶质瘤细胞侵袭能力的比较

与 NC 组比较, # $P<0.05$; 与 si-NC 组比较, * $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1 组比较, & $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, % $P<0.05$

Figure 6 Invasion ability of cultured glioma cells

showing $P<0.05$ vs. NC group. * showing $P<0.05$ vs. si-NC group. & showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1 group. % showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1+miR-NC group

较, si-SLC16A1-AS1 组胶质瘤细胞划痕愈合率明显下降 ($P<0.05$), 提示迁移能力明显减弱。与 si-SLC16A1-AS1 组、si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1+miR-584-5p inhibitor 组胶质瘤细胞划痕愈合率明显上升 ($P<0.05$), 提示迁移能力明显增强。见图5。

2.6 沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 对胶质瘤细胞侵袭能力的影响 与 NC 组、si-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1 组胶质瘤细胞侵袭数目明显降低 ($P<0.05$), 提示侵袭能力明显减弱。与 si-SLC16A1-AS1 组、si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1+

miR-584-5p inhibitor 组胶质瘤细胞侵袭数目明显上升 ($P<0.05$), 提示侵袭能力明显增强。见图6。

2.7 沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 对胶质瘤细胞凋亡的影响 与 NC 组、si-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1 组胶质瘤细胞凋亡率明显上升 ($P<0.05$)。与 NC 组、si-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1 组胶质瘤细胞凋亡率明显上升 ($P<0.05$)。见图7。

2.8 沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 对胶质瘤细胞蛋白表达的影响 与 NC 组、si-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1 组细胞 Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平明显下降 ($P<0.05$), caspase-3 蛋白表达水平明显

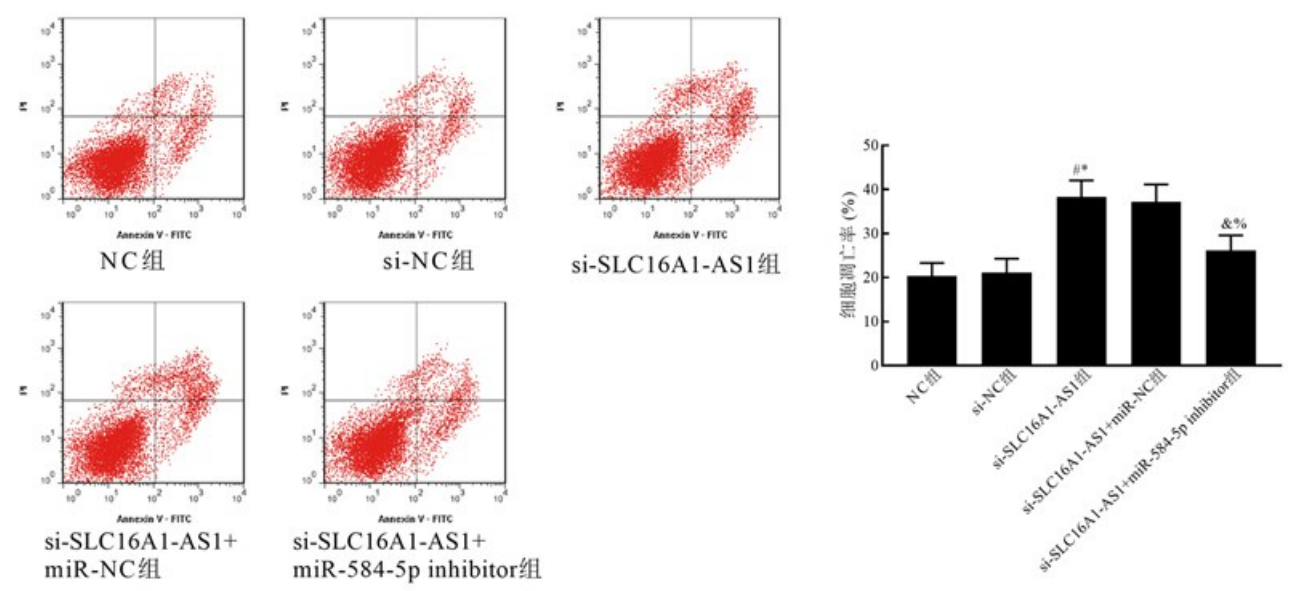


图 7 胶质瘤细胞凋亡率的比较

与 NC 组比较, # $P<0.05$; 与 si-NC 组比较, * $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1 组比较, & $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, % $P<0.05$

Figure 7 Apoptosis rates of cultured glioma cells

showing $P<0.05$ vs. NC group. * showing $P<0.05$ vs. si-NC group. & showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1 group. % showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1+miR-NC group

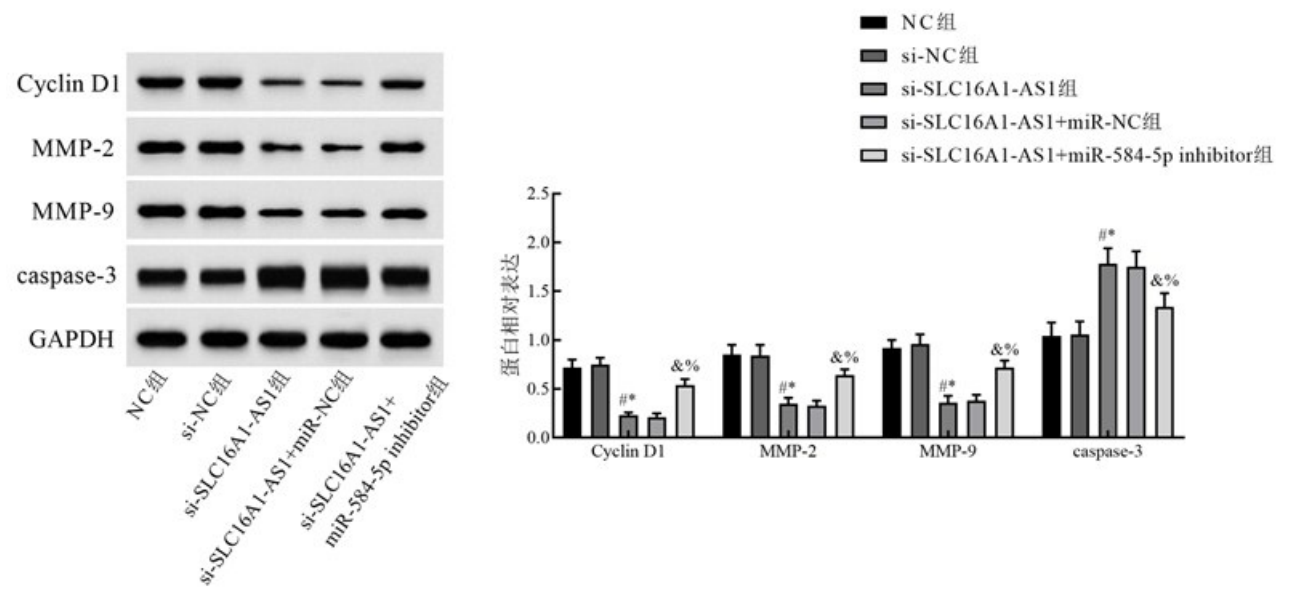


图 8 胶质瘤细胞蛋白表达水平的比较

与 NC 组比较, # $P<0.05$; 与 si-NC 组比较, * $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1 组比较, & $P<0.05$; 与 si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, % $P<0.05$

Figure 8 Comparison of protein expression levels in cultured glioma cells

showing $P<0.05$ vs. NC group. * showing $P<0.05$ vs. si-NC group. & showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1 group. % showing $P<0.05$ vs. si-SLC16A1-AS1+miR-NC group

上升 ($P<0.05$)。与 si-SLC16A1-AS1 组、si-SLC16A1-AS1+miR-NC 组比较, si-SLC16A1-AS1+miR-584-5p inhibitor 组细胞 Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平明显上升 ($P<0.05$), caspase-3

蛋白表达水平明显下降 ($P<0.05$)。见图 8。

2.9 lncRNA SLC16A1-AS1 调节 miR-584-5p/ MAPK1 轴 starbase 预测发现 lncRNA SLC16A1-AS1 与 miR-584-5p、miR-584-5p 与 MAPK1 存在结合位

点(图 9A、9B)。与 mimic NC 与 SLC16A1-AS1-WT 共转染组比较,miR-584-5p mimic 与 SLC16A1-AS1-WT 共转染组荧光素酶活性明显降低($P<0.05$;图 9C)。与 mimic NC 与 MAPK1-WT 共转染组比较,miR-584-5p mimic 与 MAPK1WT 共转染组荧光素酶活性明显降低($P<0.05$;图 9C)。与 mimic NC 与 MAPK1-WT 共转染组比较,miR-584-5p mimic 与 MAPK1WT 共转染组荧光素酶活性明显降低($P<0.05$)。

3 讨论

胶质瘤是起源于神经胶质细胞的常见脑肿瘤,呈侵袭性生长,手术无法实现根治性治疗,即便术后辅以放、化疗,预后难以令人满意,尤其是高级别胶质瘤,中位生存时间小于 2 年,因此,探讨其治疗的新方法一直是神经外科的前沿课题。随着靶向治疗的出现,需要寻找更多能够抑制肿瘤生长的特异性靶点,为实现胶质瘤的个体化治疗提供可能性^[10]。

lncRNA SLC16A1-AS1 存在于多种恶性肿瘤中,可以调节肿瘤细胞增殖和侵袭,如膀胱癌^[11]、三

阴性乳腺癌^[12]、非小细胞肺癌^[13]等。据报道,lncRNA SLC16A1-AS1 在胶质瘤中高表达,沉默其表达可以抑制胶质瘤细胞增殖、转移^[4,5]。miR-584-5p 参与多种肿瘤的发生、发展,例如 miR-584-5p 可作为非小细胞肺癌的潜在抗癌靶点,并可以抑制甲状腺癌、神经胶质瘤和胃癌的进展^[14]。研究表明,胶质瘤 miR-584-5p 的表达下调^[7]。本研究结果显示,胶质瘤细胞 lncRNA SLC16A1-AS1 呈高表达,miR-584-5p 呈低表达,沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 可上调 miR-584-5p 表达;双荧光素酶报告基因验证,过表达 miR-584-5p 可抑制 lncRNA SLC16A1-AS1 的活性,表明 lncRNA SLC16A1-AS1 与 miR-584-5p 存在靶向关系,提示沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 可能通过上调 miR-584-5p 抑制胶质瘤的发展。

研究发现 MAPK1 在脑胶质瘤中高表达,可通过增加胶质瘤细胞存活蛋白的表达,增强胶质瘤细胞对治疗药物的抗性,抑制其表达可抑制脑胶质瘤细胞侵袭^[15-17]。本研究结果显示,miR-584-5p 与 MAPK1 存在靶向关系,沉默 lncRNA SLC16A1-AS1,上调 miR-584-5p 表达,抑制 MAPK1 表达,推测 lncRNA SLC16A1-AS1 可能通过上调 miR-584-5p 的表达,下调 MAPK1 表达,在胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭中发挥重要作用。

总之,沉默 lncRNA SLC16A1-AS1 可通过上调 miR-584-5p 表达,抑制 MAPK1 表达,从而抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移侵袭,促进细胞凋亡。

【参考文献】

[1] TSITLAKIDIS A, AIFANTIS EC, KRITIS A, *et al*. Mechanical properties of human glioma [J]. *Neurol Res*, 2020, 42(12): 1018-1026.

[2] XU XP, JI J, LIU N, *et al*. Effect of HOXA5 konockdown on proliferation and cell cycle of human glioma cells [J]. *Chin J Clin Neurosurg*, 2021, 26(11): 857-861.

[3] WANG ZZ, LIU YT, GONG W, *et al*. Effect of silencing lncRNA MALAT1 expression on proliferation and apoptosis of glioma cells [J]. *Chin J Clin Neurosurg*, 2023, 28(6): 390-394.

徐修鹏,季晶,刘宁,等.下调 HOXA5 表达对胶质瘤细胞增殖能力和细胞周期的影响[J].中国临床神经外科杂志,2021,26(11):57-861.

王壮壮,刘彦廷,龚伟,等.沉默 lncRNA MALAT1 表达对胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响[J].中国临床神经外科杂志,2023,28(6):390-394.

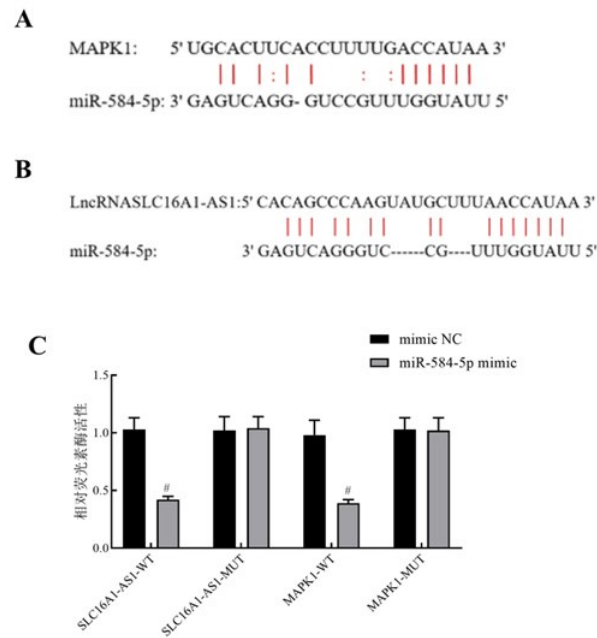


图 9 lncRNA SLC16A1-AS1 调节 miR-584-5p/MAPK1 轴
A. miR-584-5p 与 MAPK1 结合位点;B. miR-584-5p 与 lncRNA SLC16A1-AS1 结合位点;C. 荧光素酶活性比较,与 mimic NC 比较, # $P<0.05$
Figure 9 LncRNA SLC16A1- AS1 regulates the miR-584-5p/MAPK1 axis
A: The binding site of miR-584-5p to MAPK1. B: The binding site of miR-584-5p to lncRNA SLC16A1-AS1. C: The luciferase activity, # showing $P<0.05$ vs. mimic NC group.

traumatic brain injury [J]. Korean J Neurotrauma, 2016, 12(2): 84–88.

[14] TANRIKULU L, OEZ-TANRIKULU A, WEISS C, *et al.* The bigger, the better: about the size of decompressive hemicraniectomies [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2015, 135: 15–21.

[15] MARTIN AG, ABDULLAH JY, JAAFAR A, *et al.* Addition of zygomatic arch resection in decompressive craniectomy [J]. J Clin Neurosci, 2015, 22(4): 735–739.

[16] VELDEMAN M, GEIGER M, CLUSMANN H. How I do it the posterior question mark incision for decompressive hemicraniectomy [J]. Acta Neurochir (Wien), 2021, 163(5): 1447–1450.

[17] BEEZ T, MUNOZ-BENDIX C, STEIGER HJ, *et al.* Decompressive craniectomy for acute ischemic stroke [J]. Crit Care, 2019, 23(1): 209.

[18] HINDUJA A, SAMANT R, FENG D, *et al.* Herniation despite decompressive hemicraniectomy in large hemispherical ischemic strokes [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(2): 418–424.

[19] VELDEMAN M, DALEIDEN L, HAMOU H, *et al.* An altered posterior question-mark incision is associated with a reduced infection rate of cranioplasty after decompressive hemicraniectomy [J]. J Neurosurg, 2020, 134(3): 1262–1270.

(2022-03-18 收稿, 2023-01-18 修回)

(上接第 41 页)

[4] JIN Z, LI H, LONG Y, *et al.* MicroRNA-1269 is downregulated in glioblastoma and its maturation is regulated by long non-coding RNA SLC16A1 Antisense RNA 1 [J]. Bioengineered, 2022, 13(5): 12749–12759.

[5] LONG Y, LI H, JIN Z, *et al.* LncRNA SLC16A1-AS1 is upregulated in glioblastoma and promotes cancer cell proliferation by regulating miR-149 methylation [J]. Cancer Manag Res, 2021, 13: 1215–1223.

[6] WANG W, LOU W, DING BY, *et al.* A novel mRNA-miRNA-lncRNA competing endogenous RNA triple subnetwork associated with prognosis of pancreatic cancer [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(9): 2610–2627.

[7] CAO Y, WANG F, CHEN Y, *et al.* CircPITX1 regulates proliferation, angiogenesis, migration, invasion, and cell cycle of human glioblastoma cells by targeting miR-584-5p/KPNB1 axis [J]. J Mol Neurosci, 2021, 71(8): 1683–1695.

[8] LI M, XU H, QI Y, *et al.* Tumor-derived exosomes deliver the tumor suppressor miR-3591-3p to induce M2 macrophage polarization and promote glioma progression [J]. Oncogene, 2022, 41(41): 4618–4632.

[9] SHI W, WANG Z, CHEN J, *et al.* Isolation, culture, cryopreservation and resuscitation of human glioma cells [J]. Jiangsu Med J, 2010, 36(13): 1541–1543.

施 炜, 王 中, 陈 娟, 等. 人脑胶质瘤细胞的分离、培养、冻存与复苏[J]. 江苏医药, 2010, 36(13): 1541–1543.

[10] LI JQ, DUAN FL, WU JL, *et al.* Effect of down-regulation of BAG3 on proliferation and apoptosis of glioma U87 cells [J]. Chin J Clin Neurosurg, 2022, 27(11): 913–916.

李继强, 段发亮, 吴京雷, 等. 下调 BAG3 表达对胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床神经外科杂志, 2022, 27(11): 913–916.

[11] LOGOTHETI S, MARQUARDT S, GUPTA SK, *et al.* lncRNA-SLC16A1-AS1 induces metabolic reprogramming during bladder cancer progression as target and co-activator of E2F1 [J]. Theranostics, 2020, 10(21): 9620–9643.

[12] JIANG B, LIU Q, GAI J, *et al.* LncRNA SLC16A1-AS1 regulates the miR-182/PDCD4 axis and inhibits the triple-negative breast cancer cell cycle [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022, 44(4): 534–540.

[13] LIU HY, LU SR, GUO ZH, *et al.* lncRNA SLC16A1-AS1 as a novel prognostic biomarker in non-small cell lung cancer [J]. J Investig Med, 2020, 68(1): 52–59.

[14] GUO T, ZHENG C, WANG Z, *et al.* miR5845p regulates migration and invasion in nonsmall cell lung cancer cell lines through regulation of MMP14 [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(3): 1747–1752.

[15] SHI HZ, WANG DN, MA LN, *et al.* MicroRNA-362 inhibits cell growth and metastasis in glioblastoma by targeting MAPK1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(17): 8931–8939.

[16] TAO X, ZHANG WF, JI BW, *et al.* Effect of inhibition of SSRP1 on glioma cells proliferation and chemosensitivity to temozolomide [J]. Chin J Clin Neurosurg, 2022, 27(9): 760–764.

陶 祥, 张文斐, 冀保卫, 等. 抑制 SSRP1 对胶质瘤细胞增殖、化疗敏感性的影响[J]. 中国临床神经外科杂志, 2022, 27(9): 760–764.

[17] XIONG H, YU H, JIA G, *et al.* circZFR regulates thyroid cancer progression by the miR-16/MAPK1 axis [J]. Environ Toxicol, 2021, 36(11): 2236–2244.

(2023-04-24 收稿, 2023-07-31 修回)