

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.15.005

miR-613 通过靶向 VEGFA 抑制神经胶质瘤细胞的增殖、侵袭和血管生成*

刘华锋¹ 王超^{1Δ} 张伟¹ 张明² 夏毅¹

(1 空军军医大学唐都医院神经外科 陕西 西安 710038; 2 陕西省康复医院病理科 陕西 西安 710000)

摘要 目的:旨在探究 miR-613 在胶质瘤中的表达及对细胞增殖、侵袭和血管生成的影响。**方法:**根据细胞转染将实验分组为对照 miRNA 组(Control 组)、miR-613 模拟物组(mimics 组)和 miR-613 mimics+VEGFA 组(VEGFA 组)。采用逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测胶质瘤细胞和组织中 miR-613 和 VEGFA mRNA 的表达水平;采用荧光素酶报告基因分析 miR-613 与血管内皮生长因子(VEGF)的关系;采用 Western blotting 检测 VEGFA 蛋白的表达水平;通过体外实验检测转染细胞的增殖能力、侵袭能力和管状形成能力。**结果:**与正常组织样本相比,胶质瘤 I-II 期组样本的肿瘤细胞呈现异形,具有深核染色,并且肿瘤细胞密度适度较低,而胶质瘤 III-IV 期组样本的肿瘤细胞的核分裂活跃,具有明显的微血管增殖和明显的细胞异型性;miR-613 在胶质瘤 I-IV 期组织样本中显著降低($P<0.05$)。在 U87 和 U251 细胞系的 VEGFA-WT 组中,与 Control 组相比,mimics 组的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$)。与 Control 组相比,U87 和 U251 细胞系中 mimics 组 VEGFA 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。克隆形成实验、血管生成实验和细胞侵袭实验结果表明,与 Control 组相比,mimics 组的克隆形成数量、细胞侵袭数、内皮细胞 HUVEC 的管状形成数和 Ang-2 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$);与 mimics 组相比,VEGFA 组克隆形成数量、细胞侵袭数、内皮细胞 HUVEC 的管状形成数和 Ang-2 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。**结论:**miR-613 通过靶向 VEGFA 抑制了神经胶质瘤细胞的侵袭、增殖和血管生成,提示 miR-613 可能成为未来治疗胶质瘤的潜在靶点。

关键词: VEGFA;神经胶质瘤细胞;miR-613

中图分类号: R-33;R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)15-2823-07

MiR-613 Inhibits Proliferation, Invasion and Angiogenesis of Glioma Cells by Targeting VEGFA*

LIU Hua-feng¹, WANG Chao^{1Δ}, ZHANG Wei¹, ZHANG Ming², XIA Yi¹

(1 Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, Airforce Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Pathology, Shaanxi Provincial Rehabilitation Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710000, China)

ABSTRACT Objective: The aim of this study was to investigate the expression of mir-613 in glioma and its effect on cell proliferation, invasion and angiogenesis. **Methods:** According to cell transfection, the experiment was divided into control miRNA group (Control), miR-613 mimics group (miR-613) and miR-613 mimics + VEGFA group (miR-613+VEGFA). The expression of miR-613 in glioma cells and tissues was detected by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the relationship between miR-613 and vascular endothelial growth factor(VEGF) was analyzed by luciferase reporter gene. Then, the expression of VEGFA protein was detected by Western blotting, and the proliferation, invasion and tubular formation of transfected cells were detected in vitro. **Results:** Compared with normal tissue samples, the tumor cells of glioma stage I-II group showed heteromorphism, deep nuclear staining and moderately low density of tumor cells, while the tumor cells of glioma stage III-IV group had active mitosis, obvious microvascular proliferation and obvious cell atypia; miR-613 was significantly reduced in glioma stage I-IV tissue samples ($P<0.05$). In the VEGFA-WT group of U87 and U251 cell lines, compared with the Control group, the luciferase activity of the mimics group was significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the Control group, the mRNA and protein expression levels of VEGFA in the mimics group in U87 and U251 cell lines were significantly lower ($P<0.05$). The results of clone formation experiment, angiogenesis experiment and cell invasion experiment showed that compared with the Control group, the number of clone formation, the number of cell invasion, the number of tube formation of endothelial cells HUVEC and the expression level of Ang-2 protein in the mimics group were significantly reduced ($P<0.05$); Compared with the mimics group, the number of clone formation, the number of cell invasion, the number of tube formation of endothelial cells HUVEC and the expression of Ang-2 protein in the VEGFA group were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** miR-613 inhibits the invasion, proliferation and angiogenesis of glioma cells by targeting VEGFA, suggesting that miR-613 may become a potential target for the treatment of glioma in the future.

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81501115)

作者简介:刘华锋(1976-),男,主治医师,主要研究方向:颅内肿瘤研究

Δ 通讯作者:王超(1980-),男,博士,主治医师,主要研究方向:小儿颅内肿瘤和癫痫病,电话:13384959242,E-mail:hzchenjin1971@163.com

(收稿日期:2020-12-27 接受日期:2021-01-23)

Key words: VEGFA; Glioma cells; miR-613

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R739.41 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)15-2823-07

前言

胶质瘤是最常见的高度恶性原发性脑肿瘤,约占儿童和成人中枢神经系统肿瘤的三分之一^[1,2]。尽管放疗和化疗等手段在控制恶性胶质瘤方面已经取得了重大进展,但此类肿瘤的预后和存活率仍然较低^[3,4]。胶质母细胞瘤之间存在很强异质性,同时还有一部分具有自我更新的能力及分化潜能^[5]。多形性胶质细胞瘤是一种血管化肿瘤^[6],肿瘤干细胞可通过分泌血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)来诱导内皮细胞迁移和血管生成,并以此促进肿瘤形成^[6]。多病灶的坏死和低氧是胶质细胞瘤的标志性特征,在此条件下可使肿瘤细胞在没有供血的情况下发生不受调节的增殖^[7]。因此,进一步了解胶质瘤发生发展的分子机制,对开发新的治疗方法具有重要意义。

microRNAs(miRNAs/miRs)含 21~23 个核苷酸,属于编码单链 RNA 的非蛋白小分子,是动植物基因表达的重要转录后调控因子^[8]。在动物中,miRNAs 的调节作用是通过与其同源信使 RNA 靶标的 3'-非翻译区(3'-untranslated region, UTR)结合而实现。miRNAs 参与多种致癌过程,包括血管生成、增殖、侵袭和转移^[9]。有研究表明,许多 miRNAs 的表达水平与胶质瘤有关,如 miR-128、miR-181a、miR-181b 和 miR-181c 等^[10,11]。miR-613 已被确定在肿瘤发生和癌症进展中发挥关键作用,如抑制卵巢癌的增殖和侵袭^[12]以及诱导肺癌细胞周期阻滞^[13];然而,miR-613 在胶质瘤中的作用尚不清楚。已有文献报道,miRNA 可以调节血管生成的各个阶段,并具有靶向信号通路内多个基因的能力,这使其成为开发第二代抗血管生成药物的有希望的靶标^[14]。故本研究旨在探究 miR-613 在胶质瘤中的表达及对细胞增殖、侵袭和血管生成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

NHA、H4、U87、U251、SWO-38 人脑胶质瘤细胞系和 HUVEC 人内皮细胞系购自 ATCC 菌株保存库。所有细胞均在青霉素(80 mg/mL)和链霉素(80 mg/mL)和 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。LV-miR-613 模拟物和模拟对照物均购自上海基因化学有限公司;Lipofectamine 2000 试剂、脂质体 2000 试剂、Trizol 试剂盒、TaqMan microRNA 分析试剂盒、Revert Aid First Strand cDNA 合成试剂盒、BCA 分析试剂盒、胎牛血清、真核表达载体 pcDNA3.1(+) 购买于 Thermo Fisher 公司;pGL3-Basic 对照质粒载体购买于 Madiso 公司;定点突变试剂盒购买于 Agilent Technologies 公司;SYBR-Green 购买于 Takara 公司;增强化学发光剂购买于 GE 公司;各种一抗及二抗购于 Santa Cruz Biotechnology 及 abcam 公司。

在本研究中,基于 2016 年 WHO 的中枢神经分类标准^[15];于 2017 年 3 月至 2019 年 10 月在本院收集和分离了 30 例 I-II 期胶质瘤患者(WHO I-II,低等级组)和 25 例 III-IV 期胶质瘤

患者(WHO III-IV,高等级组)的组织样本,同时收集了 35 例正常组织样本并遵从纳入标准和排除标准。纳入标准为:(1)所有对象均为手术治疗并有明确病理诊断;(2)所有胶质瘤患者皆为首次治疗并未曾接受任何放疗和化疗;(3)所有入选病例均填写知情书,并完成标本留取;排除标准:(1)患有糖尿病、脂代谢紊乱和甲状腺功能等代谢性疾病;(2)机体其他部位曾患恶性肿瘤或转移性肿瘤;(3)在课题研究开展中要求退出的病人。本研究共入选男性患者 33 例,女性患者 22 例,平均年龄 68±5.23 岁。本研究已获本院伦理委员会审查批准。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒(Lentivirus, LV)转染及分组 所有细胞系均以 1.5×10⁵ 个/孔的密度培养于 6 孔板中,并用 Lipofectamine 2000 试剂转染 100 nM miR-613 模拟物或模拟对照物。根据使用说明书,转染细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中,并在 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 48 h。所用序列如下:miR-613-mi-F,5'-AGGAAUGUCCUUCUUCUUU-3' 和 miR-613-mi-R,5'-UGGCAAAGAAGGAACAUCUCC-3';对照组 Con-F,5'-ACUACUGAGUGACAGU-3' 和 Con-R,5'-AUCUACUGUCACUCAGUAG-3'。

实验分组:对照组 miRNA 组(Control 组,即空质粒转染组),转染细胞时,未进行任何处理;miR-613 mimics 组(miR-613 组):转染细胞时,加入 miR-613 模拟物;miR-613 mimics+VEGFA 组(miR-613+VEGFA 组):转染细胞时,加入 miR-613 模拟物和 VEGFA。

1.2.2 质粒构建及双荧光素酶活性测定 采用 TargetScan (<http://targetscan.org/>) 和 Miranda (<http://www.micrororna.org/>) 软件预测 miR-613 的潜在靶基因,确定 VEGFA 为可能的靶基因。真核表达载体 pcDNA3.1(+)与全长 VEGFA cDNA 进行克隆。通过聚合酶链反应(PCR)扩增 miR-613 的 VEGFA 3'-UTR 靶位点,并将其克隆到 pGL3-Basic 对照载体的 Xba I 位点,该载体命名为 VEGFA-WT。使用定点突变试剂盒对 VEGFA 3'-UTR 中的 miR-613 靶位点进行定点突变,并命名为 VEGFA-Mut。在荧光素酶活性测定中,U87 细胞以 5.5×10⁴ 个/孔的密度接种于 24 孔板中,与 VEGFA-WT/Mut 载体和编码荧光素酶的对照载体 PRL-CMV 使用脂质体 2000 试剂进行共转染,转染 36 h 后检测荧光素酶活性。

1.2.3 RNA 提取和 RT-qPCR 用 Trizol 试剂盒提取所收集的胶质瘤患者和正常组织样本的总 RNA。根据使用说明书,使用 ABI PRISM 7500 序列检测系统(ABI)及 TaqMan microRNA 分析试剂盒检测 miR-613 的 mRNA 表达水平。PCR 程序:95℃预变性 10 min,95℃变性 15 s,60℃延伸 60 s,循环 40 次。U6 作为内参基因,并检测 VEGFA 基因的表达。用 Revert Aid First Strand cDNA 合成试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。根据使用说明书,温度条件:25℃、5 min,42℃、60 min,70℃、10 min。用 SYBR-Green 进行定量 PCR,并将 β-肌动蛋白作为内参基因;PCR 程序:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃延伸 35 s,循环

40 次。使用的引物序列: VEGFA-F, 5'-ATCCAATCGAGACC-CTG-3' 和 VEGFA-R, 5'-ATCTCTCCTATGTGCTG-3'; β -actin-F, 5'-TGAGAGGGAAATCGTGCGT-3' 和 β -actin-R, 5'-GCTCGTCGTTGCCAATAGTGATG-3'; miR-613-F 和 U6-F, 5'-CTCGCTTCGGCAGCA-3' 和 miR-613-R 和 U6-R, 5'-AACGCTTCACGAATT TGCCT-3'。用 ITS 解离曲线检测引物序列的特异性, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算相对基因表达量。

1.2.4 胶质瘤组织病理学分析 使用苏木精-曙红(HE)染色来评估胶质瘤患者和正常组织样本的等级, 从不同患者收集胶质瘤组织, 并先用 5% 中性甲醛固定剂固定, 然后包埋在石蜡中。根据常规方法, 将 5 mm 厚的切片用于 HE 染色。最后, 使用光学显微镜(Olympus)观察组织切片的形态变化。

1.2.5 Western blotting 分析 收集各组细胞培养液, 离心收集沉淀(4℃, 4000 r/min, 5 min), 超声裂解细胞(150 W, 3 min), 然后低温高速离心(4℃, 10000 r/min, 5 min), 分离上清液, 使用 BCA 分析试剂盒检测蛋白浓度。8% SDS-PAGE 分离蛋白, 然后转移到 PDVF 膜上, 于室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; 将膜与一抗 VEGFA (1:1000)、抗血管生成素-2(Ang-2, 1:50)、CD31(1:200)和 GAPDH(1:5000)分别在 4℃ 下孵育过夜。然后将它们与二抗抗鼠免疫球蛋白 IgG(1:2000)和抗兔 IgG(1:2000)在室温下孵育 1 h。采用增强化学发光剂检测目的蛋白的表达水平。使用 Image Lab 软件(Bio-Rad Laboratory)对斑点进行半定量。

1.2.6 细胞增殖和小管形成实验 在克隆形成实验中, 用 miRNA 对照组、miR-613 mimic 组和 miR-613 mimic+VEGFA 组的质粒分别转染 U87 和 U251 细胞(1000 个/孔), 并接种于 6 孔板中培养 14 d。菌落(>60 个细胞, 直径 60~100 μ m)在室温下用 0.1% 亚甲蓝染色 5 min, 在光学显微镜观察成像情况。

1.2.7 内皮细胞小管形成实验 参考文献所述^[10], 选择 U87 和 U251 细胞作为转染对象, 以 pcDNA3.1 质粒作为载体分别进行转染, 按以下分组进行转染, miRNA 对照组、miR-613 mimic 组和 miR-613 mimic+VEGFA 组。将细胞外基质胶充分溶解, 并在 24 孔板中使用含 5 μ g/mL 生长因子的 Matrigel 进行管形成试验。当转染 48 h 后, 分别收集各实验组的细胞上清液。收集方式为: 1500 rpm, 离心 5 min。将细胞上清液重悬于 HUVECs (2 $\times$ 10⁴ 个/孔), 按每孔加入 150 μ L 上述细胞悬液于 Matrigel 包被的平板上, 在 37℃ 孵育过夜后, 在光学显微镜下观察每孔的情况; 并对每个视野内的小管进行成像, 并计数 3~5 个随机视野/孔的平均小管数目。

1.2.8 细胞侵袭试验 参考文献所述^[17], 使用 Matrigel 包被的 Transwell 进行细胞侵袭试验。将 50 μ L 的 Matrigel (2 mg/mL) 加入 Transwell 的上室, 在 37℃ 下孵育 30 min。随后, 将 3 $\times$ 10³ 细胞接种在无血清的 RPMI1640 培养基中; 在下室加入含 10% FBS 的 600 μ L 培养基作为化学诱导剂, 孵育 24 h 后, 用棉签清除未侵入的细胞。将侵入下膜的细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 并用 0.1% 结晶紫在室温下染色 20 min, 在相差显微镜下拍摄, 共选择 5 个随机视野进行细胞计数, 并计算平均值。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 18.0 (SPSS) 和 GraphPad Prism6.0 (GraphPad Software Inc) 软件进行数据分析。所有数据均以 3 个独立实验

的平均值 $\pm$ 标准差表示。组间差异分析采用单因素方差分析或双尾 Student's t-test 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-613 在多形性胶质母细胞瘤细胞系中表达下调

HE 染色结果显示, 与正常临近组织样本相比, 胶质瘤 I-II 期组样本的肿瘤细胞呈现异形, 具有深核染色, 并且肿瘤细胞密度适度较低, 而胶质瘤 III-IV 期组样本的肿瘤细胞的核分裂活跃, 具有明显的微血管增殖和明显的细胞异型性。RT-qPCR 检测结果表明, 高级别胶质瘤细胞系 U87、U251 和 SWO-38 中 miR-613 的 mRNA 表达水平低于低级别胶质瘤细胞系 NHA 和 H4 ($P<0.05$)。由于 U87 和 U251 细胞 miR-613 的表达最低, 因此选择这两种细胞系进行后续实验。为进一步证实 miR-613 在不同级别胶质瘤中的表达水平, 采用 RT-qPCR 方法检测 miR-613 在不同级别胶质瘤组织样本中的 mRNA 表达水平。结果表明, 与正常邻近组织样本相比, miR-613 在胶质瘤 I-IV 组样本中表达水平显著降低, 其中在胶质瘤 III-IV 组样本中表达水平最低 ($P<0.05$)。见图 1。

2.2 miR-613 连接 VEGFA 3'-UTR 并调节 VEGFA

在 U87 和 U251 细胞系的 VEGFA-WT 组中, 与 Control 组相比, miR-613 组的荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$); 但在 U87 和 U251 细胞系的 VEGFA-Mut 组中, 与 Control 组相比, miR-613 mimics 组的荧光素酶活性无显著差异 ($P>0.05$)。与 Control 组相比, U87 和 U251 细胞系中 miR-613 组 VEGFA 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$)。这些结果表明 VEGFA 是 GBM 细胞 miR-613 的直接下游靶点。见图 2。

2.3 miR-613 过表达抑制 GBM 细胞的增殖、侵袭

克隆形成实验结果显示, 与 Control 组相比, miR-613 组的克隆形成数量显著减少 ($P<0.05$); 而与 miR-613 组相比, miR-613+VEGFA 组的克隆形成数量显著增加 ($P<0.05$)。侵袭实验结果显示, 与 Control 对照组相比, miR-613 组的细胞侵袭受到显著抑制 ($P<0.05$); 而与 miR-613 组相比, miR-613+VEGFA 组的细胞侵袭数量显著增加 ($P<0.05$)。见图 3。

2.4 miR-613 通过靶向 VEGFA 抑制 GBM 细胞的血管生成

血管生成实验结果显示, 与 Control 组相比, miR-613 组的内皮细胞 HUVEC 的管状形成显著减少 ($P<0.05$); 而与 miR-613 组相比, miR-613+VEGFA 组的管状形成数量显著增加 ($P<0.05$)。Western blotting 分析显示, 与 Control 组相比, miR-613 组 Ang-2 蛋白表达水平显著降低; 而与 miR-613 组相比, miR-613+VEGFA 组的 Ang-2 蛋白表达水平显著增加 ($P<0.05$)。这些结果表明 miR-613 通过靶向 VEGFA 抑制肿瘤的侵袭、增殖和血管生成。见图 4。

3 讨论

miRNAs 在许多生物学过程中发挥关键作用, 包括增殖、分化、发育和凋亡^[18]。研究表明, miRNAs 可能是多种疾病的潜在治疗靶点^[19,20]。开发基于 miRNA 的治疗药物有两种方式: miRNA 模拟物和 miRNA 拮抗剂。miRNA 拮抗剂在疾病组织中表现出功能增益的内源性 miRNA^[21]。miRNA 模拟物用于恢复丧失的功能, 这种方法也被称为 "miRNA 替代疗法"。这些

基于 miRNA 的治疗方法在肿瘤治疗中可能是有效办法。虽然已经在人类中检测到数千个 miRNAs^[22],但目前只有少数 miR-

NAs 的功能特征得到了鉴定。

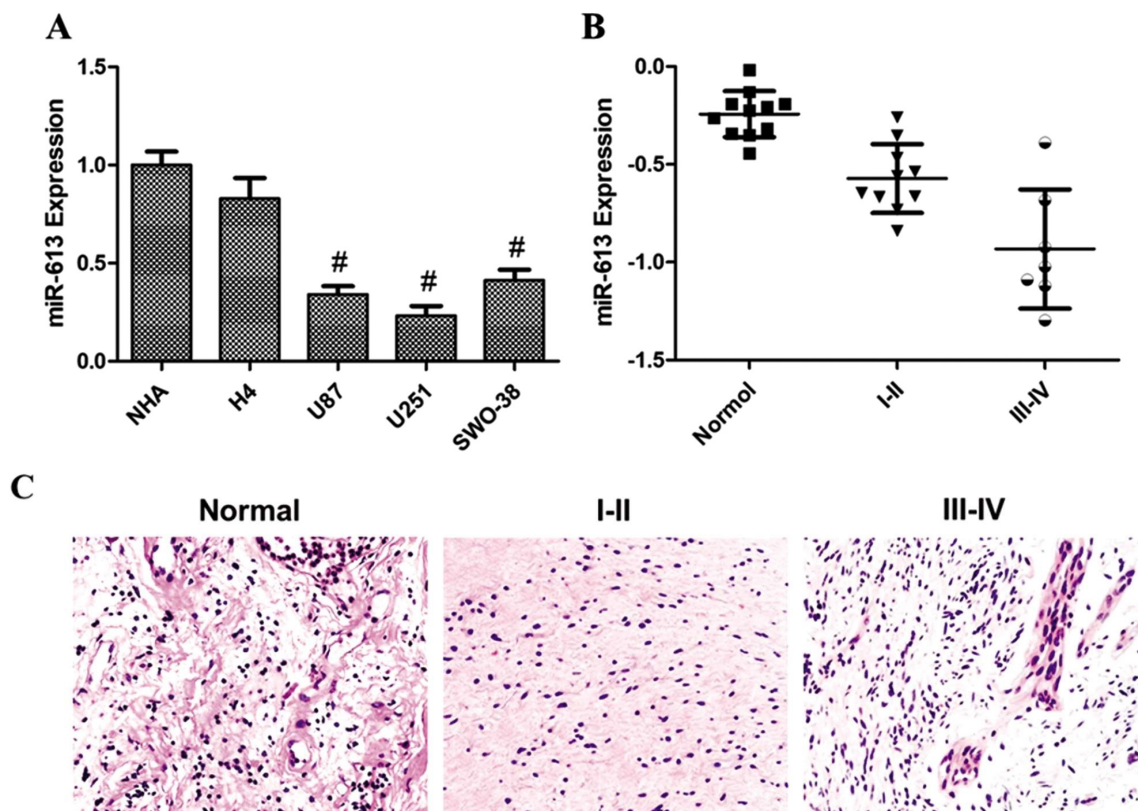


图 1 miR-613 在胶质瘤细胞和高级别胶质瘤中表达下调

Fig. 1 Down regulation of miR-613 expression in glioma cells and high-grade gliomas

Note: A: expression of miR-613 mRNA in high-grade glioma cell lines U87, U251, SWO-38 and low-grade glioma cell lines H4 and NHA; B: The expression levels of miR-613 mRNA in patients and normal tissues were measured; C: HE staining of different grade gliomas ($\times 100$); Normol: normal tissue sample; I-II: tissue sample of I-II glioma patient; III-IV: tissue sample of III-IV glioma patient; Compared with NHA or H4, $\#P<0.05$

文献报道 miR-613 参与巨噬细胞和 HepG2 细胞的脂质代谢^[23],同时 miR-613 和肿瘤发生之间存在联系^[22]。本研究通过 RT-qPCR 检测 miR-613 的表达水平,结果表明,高级别胶质瘤细胞系 U87、U251 和 SWO-38 中 miR-613 的 mRNA 表达水平均低于低级别胶质瘤细胞系 NHA 和 H4。此外,miR-613 的表达水平与胶质瘤的分级显著相关,并且 miR-613 的 mRNA 表达水平在胶质瘤的发育不良时明显降低。

文献表明,miR-613 的上调减少了肿瘤血管生成和体外侵袭^[24]。miR-613 还可以逆转前列腺癌细胞中 Fzd7 表达的增加,从而导致细胞增殖和侵袭的减少;miR-613 过表达对细胞增殖和侵袭的抑制作用与 Fzd7 耗竭诱导的 Wnt 信号转导降低有关^[25]。miR-613 在大肠癌组织和细胞系中被下调,而低水平的 miR-613 与晚期 TNM 分期和淋巴结转移显著相关^[26]。另外,细胞功能研究表明,miR-613 显著降低大肠癌细胞的增殖,迁移和侵袭,并诱导 G1 期细胞周期停滞^[26]。这些结果也表明了 miR-613 表达水平在肿瘤治疗中的治疗价值,并有可能作为新型生物标志物或治疗靶标。

血管生成在肿瘤生长和进展中起着重要作用。大量研究表明血管内皮生长因子 A (Vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 是肿瘤诱导胶质瘤血管生成的最有潜力的调节剂^[27]。VEGFA 表达增高与胶质瘤复发风险加重、预后不良、肿瘤微血

管密度增加有关^[28]。另外,文献表明,miR-155 过度表达对黑色素瘤血管生成的影响,其原因是由于 miR-155 的表达抑制 JAK2 / STAT3 信号通路的激活并下调 MMP-9,FGF2 和 VEGFA 的表达,从而诱导癌症相关的成纤维细胞(CAFs)的促血管生成转换。减轻 CAFs 对黑色素瘤细胞增殖,迁移和管形成的促进作用^[29]。本研究结果表明,miR-613 能够负调控 VEGFA 的表达,而 VEGFA 通过与 VEGFA 3'-UTR 中的一个位点连接而发挥重要作用。VEGFA 可提高 miR-613 过表达后的 U87 和 U251 细胞的 VEGFA 表达水平。Ang-2 是另一种调节肿瘤血管生成的重要蛋白^[30]。本研究表明,Ang-2 和 VEGFA 在肿瘤血管生成中起协同作用。另外,多个实验结果都表明 miR-613 与 VEGFA 之间存在相互作用。这些发现有助于理解 VEGFA 在调节胶质瘤细胞中的作用。

综上所述,本研究结果提示 miR-613 与胶质瘤有关,并提示 miR-613 通过抑制 VEGFA 的表达在胶质瘤细胞的恶性转化过程中发挥重要作用,这些结果提示 miR-613 可能成为未来治疗胶质瘤的潜在靶点。

参考文献(References)

- [1] 张水仙, 刘丹, 李飞, 等. 脑胶质瘤的循环生物标志物研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2018, 23(12): 61-63
- [2] 李小煜. 胶质母细胞瘤非手术治疗研究进展[J]. 国际神经病学神经

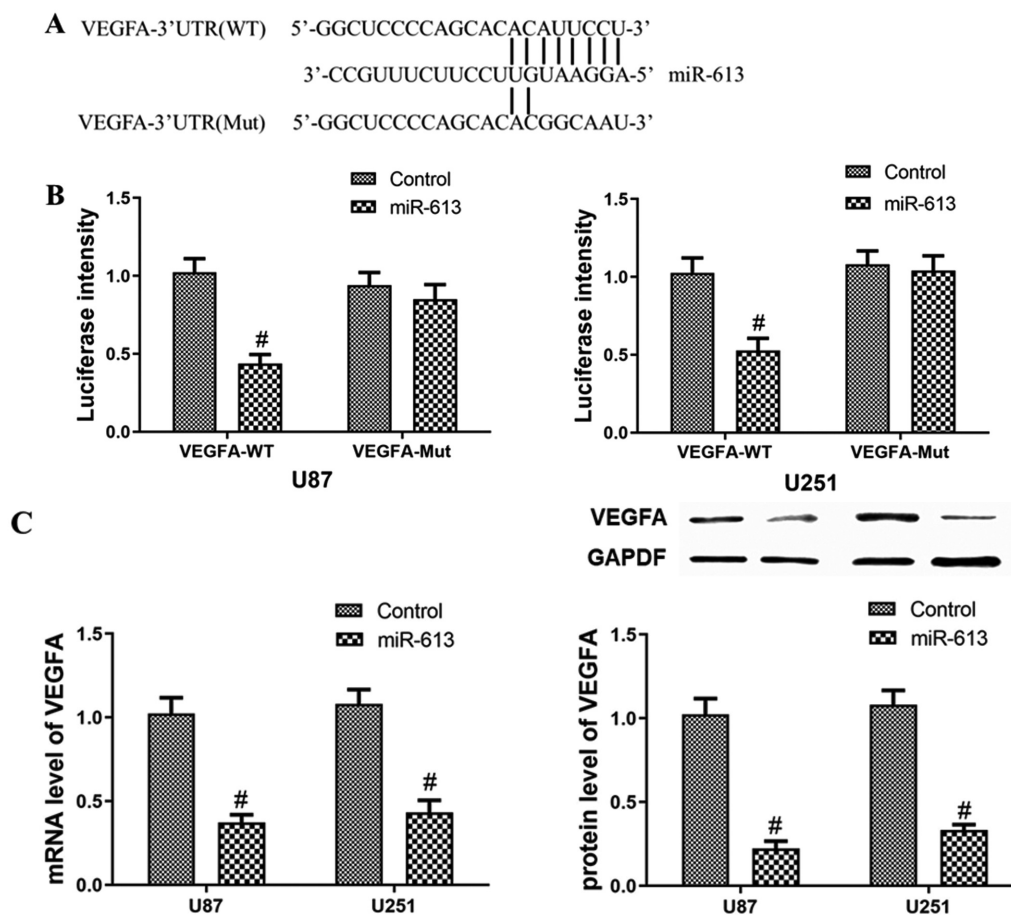


图2 VEGFA 是 miR-613 的直接靶标
Fig. 2 VEGFA is a direct target of mir-613

Note: A: sequence ratio of miR-613 and VEGFA 3'-UTR and prediction of miR-613 binding site; B: luciferase determination of miR-613 and luciferase reporter gene containing VEGFA-WT/Mut co-transfected with U87 and U251 Cell Lines; C: mRNA and protein expression levels of VEGFA after miR-613 transfection; Compared with Control group, $^{\#}P<0.05$.

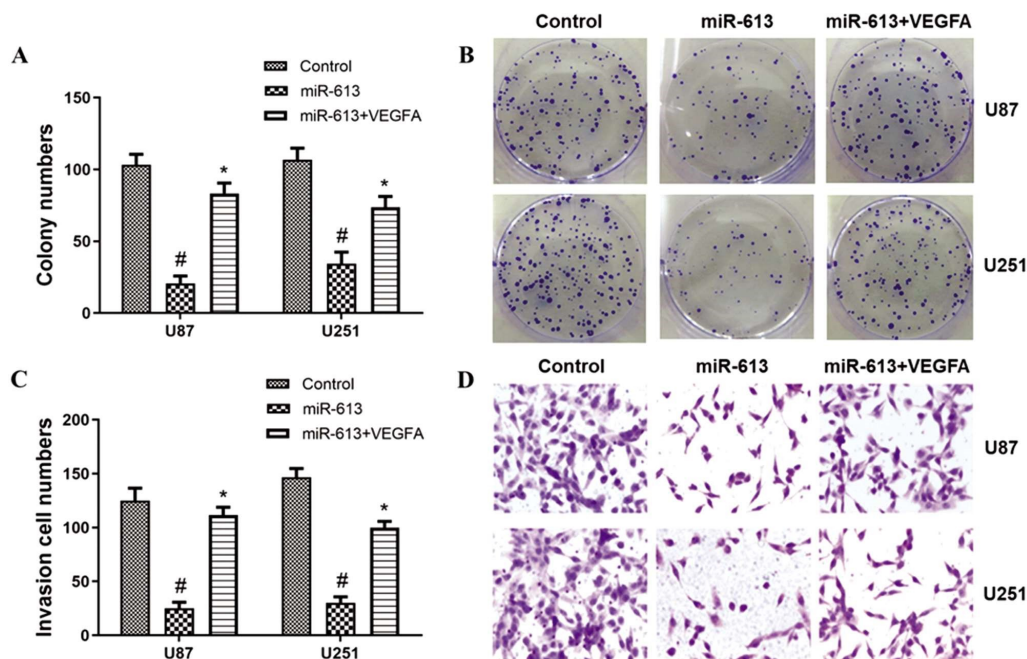


图3 miR-613 过表达抑制细胞增殖

Fig. 3 Overexpression of miR-613 inhibited cell proliferation

Note: A: quantitative detection of colony number of U251 and U87 cells after transfection of miR-613 or VEGFA; B: The results showed that the typical images of U251 and U87 cell clone formation experiment of mimics or miR-613+VEGFA of transfection of control miRNA and miR-613; C: quantitative determination of invasion ability of U87 and U251 cells; D: representative images of invasion test with U87 and U251 cells ($\times 100$); Compared with control group, $^{\#}P<0.05$; Compared with mir-613mimics group, $^*P<0.05$.

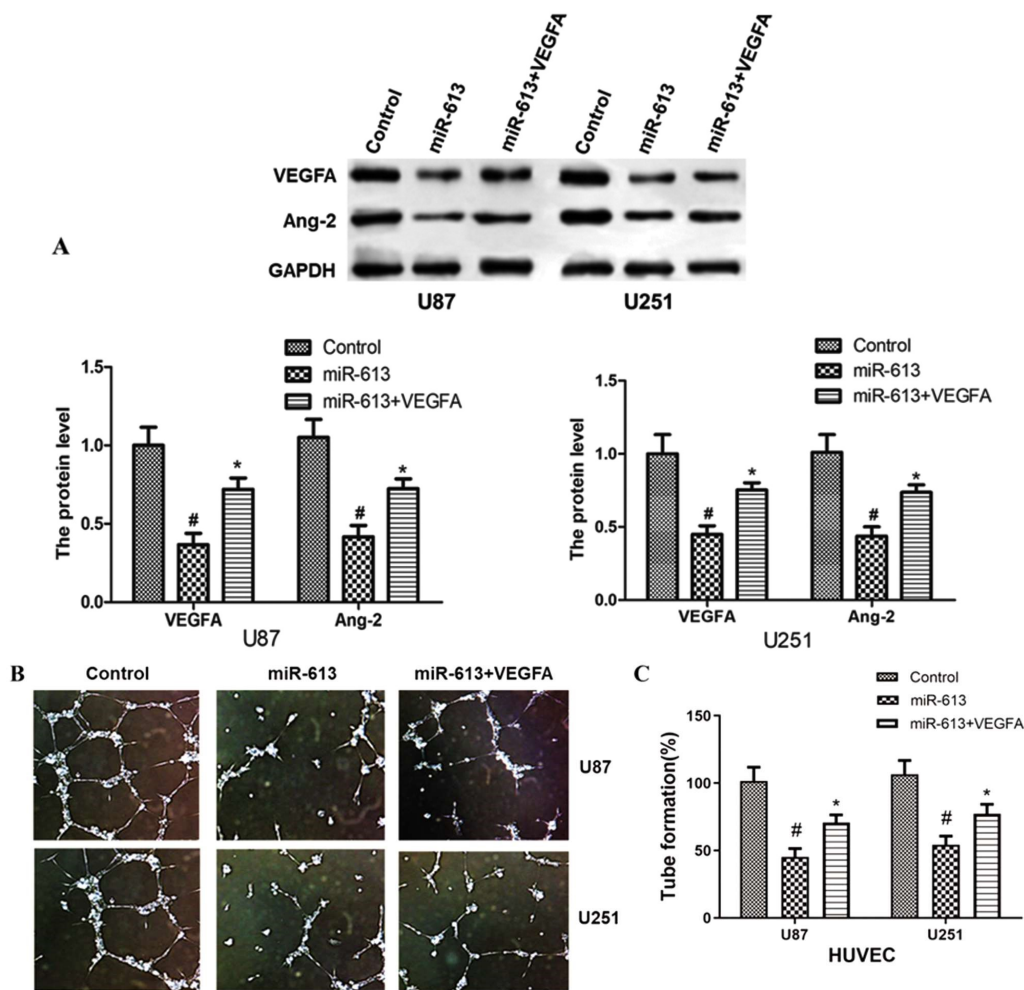


图4 miR-613 过表达抑制细胞的血管生成

Fig.4 miR-613 overexpression inhibits angiogenesis

Note: A: Expression of VEGFA and Ang-2 protein in U87 and U251 cells transfected with miR-613 or miR-613+VEGFA; B: Representative images of U251 and U87 angiogenic experiments with miRNA, miR-613 or miR-613+VEGFA ($\times 200$); C: Tubular formation in HUVEC induced by overexpression of miR-613 in U87 and U251 cells; Compared with control group, $^{\#}P<0.05$; Compared with miR-613 group, $^{*}P<0.05$.

外科学杂志, 2018, 45(5): 515-519

- [3] 李靖远, 许在华, 孙靖驰, 等. 脑胶质瘤 EGFR 基因及对放疗预后的影响[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2018, 17(1): 32-34
- [4] 张旭, 田召辉, 郭琳. 脑恶性胶质瘤手术及放化疗后肿瘤复发的影响因素分析[J]. 临床研究, 2018, 26(11): 1-2
- [5] Kratzsch T, Kuhn S A, Joedicke A, et al. Treatment with 5-azacitidine delay growth of glioblastoma xenografts: a potential new treatment approach for glioblastomas [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2018, 144 (5): 809-819
- [6] Ponert J M, Schwarz S, Haschemi R, et al. The mechanisms how heparin affects the tumor cell induced VEGF and chemokine release from platelets to attenuate the early metastatic niche formation [J]. Plos One, 2018, 13(1): e0191303
- [7] Rosa P, Catacuzzeno L, Sforza L, et al. BK channels blockage inhibits hypoxia-induced migration and chemoresistance to cisplatin in human glioblastoma cells[J]. J Cell Physiol. 2018, 233(9): 6866-6877
- [8] 彭妍, 李国利, 张艳青. MicroRNAs 对肿瘤相关巨噬细胞的趋化及表型的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(2): 119-122
- [9] Chen S, Wang Y, Su Y, et al. miR2055p/PTK7 axis is involved in the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 6253-6260
- [10] 黄绍崧, 林伟. 微小 RNA-532-5p 在胶质瘤组织的表达及其调控机制[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(12): 2276-2278
- [11] An T, Fan T, Zhang X Q, et al. Comparison of alterations in miRNA expression in matched tissue and blood samples during spinal cord glioma progression[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 9169-9171
- [12] Fu X, Cui Y, Yang S, et al. MicroRNA-613 inhibited ovarian cancer cell proliferation and invasion by regulating KRAS [J]. Tumour Biol, 2016, 37(5): 6477-6483
- [13] Ding D, Hou R, Gao Y, et al. miR-613 inhibits gastric cancer progression through repressing brain derived neurotrophic factor [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2): 1735-1741
- [14] Tiwari A, Mukherjee B, Dixit M. MicroRNA key to angiogenesis regulation: MiRNA biology and therapy [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2018, 18(3): 266-277
- [15] 陈思. 脑胶质瘤标本库的初步建立及 EphB4、CD105 在人脑胶质瘤中的表达及意义[D]. 河北医科大学, 2008
- [16] Zhang H, Qi M, Li S, et al. microRNA-9 targets matrix metalloproteinase 14 to inhibit invasion, metastasis, and angiogenesis of neuroblastoma cells[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(7): 1454-1466

- [17] Yue X, Wang P, Xu J, et al. MicroRNA-205 functions as a tumor suppressor in human glioblastoma cells by targeting VEGF-A[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 1200-1206
- [18] Zhang D, Liu Z, Zheng N, et al. MiR-30b-5p modulates glioma cell proliferation by direct targeting MTDH [J]. *Saudi J Bio Sci*, 2018, 25(5): 947-952
- [19] 马小军, 刘尚禹. miRNAs 在儿童中枢神经系统常见恶性肿瘤中的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2019, 46(2): 234-236
- [20] Fang B, Li G, Xu C, et al. MicroRNA miR-1249 downregulates adenomatous polyposis coli 2 expression and promotes glioma cells proliferation[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(5): 1324-1336
- [21] 张蓓蕾, 吴涛, 肖西锋, 等. 氧化石墨烯递送 miRNA-21 拮抗剂抑制卵巢癌细胞迁移和侵袭的研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2019, 28(7): 501-505
- [22] 姜鹏玲, 张思浩, 徐织, 等. Exosomal miRNAs 在肿瘤治疗中的研究进展[J]. *临床普外科电子杂志*, 2019, 7(2): 35-39
- [23] 韩婕. 体外实验探讨 miR-638 对脂质代谢的影响[D]. 中国人民解放军医学院, 2017
- [24] Yu H, Duan P, Zhu H, et al. miR-613 inhibits bladder cancer proliferation and migration through targeting SphK1 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 1213-1221
- [25] Ren W, Li C, Duan W, et al. MicroRNA-613 represses prostate cancer cell proliferation and invasion through targeting Frizzled7 [J]. *BBRC*, 2016, 469(3): 633-638
- [26] Li B, Xie Z, Li Z, et al. MicroRNA-613 targets FMNL2 and suppresses progression of colorectal cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 18(12): 5475-5484
- [27] 黄学涛. VEGFA 单克隆抗体对血管内皮细胞调节胶质瘤细胞侵袭迁移作用的影响[D]. 华中科技大学, 2017
- [28] 潘继明, 胡佳, 薛昆, 等. 上皮细胞膜蛋白 2 与血管内皮生长因子 A 表达与神经胶质瘤患者预后的相关性 [J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(2): 327-329
- [29] Zhou X, Yan T, Huang C, et al. Melanoma cell-secreted exosomal miR-155-5p induce proangiogenic switch of cancer-associated fibroblasts via SOCS1/JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 242
- [30] 马吉玲, 马臻棋. Ang-2 在常见消化道肿瘤中的研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 6(59): 103-104+106

(上接第 2833 页)

- [21] Xiao-qing Ye, Jing Liu. Effects of pyrethroid insecticides on hypothalamic-pituitary-gonadal axis: A reproductive health perspective [J]. *Environ Pollut*, 2019, 245: 590-599
- [22] 李彬, 阳盛洪, 高亮, 等. 高原低氧环境下男性性功能研究进展[J]. *中国性科学*, 2016, 25(07): 5-7
- [23] 胡海翔, 孙梯业, 方红, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征与勃起功能障碍的相关性研究[J]. *中国性科学*, 2016, 25(8): 19-23
- [24] 马子龙, 张玉沛, 周瑾, 等. 模拟高原缺氧环境对大鼠生殖细胞凋亡的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2016, 24(10): 108-110+140
- [25] 朱登祥, 孟昭影, 魏会平, 等. 男性不育与精子凋亡关系的研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2009, 1: 89-90
- [26] Xu Ya-wei, Ou Ning-jing, Song Yu-xuan, et al. Seminal plasma miR-210-3p induces spermatogenic cell apoptosis by activating caspase-3 in patients with varicocele [J]. *Asian journal of andrology*, 2020, 22(5): 513-518
- [27] 王建枝, 钱睿哲. 病理生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 146-147
- [28] 孙晓润, 陈革革, 林悦, 等. 天然黄酮类化合物抗肿瘤作用靶点研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(06): 218-228
- [29] 丁良梅, 马红, 汪亮, 等. 冷诱导对猪睾丸支持细胞凋亡和基因表达的影响[J]. *吉林农业大学学报*, 2020[Epub ahead of print]
- [30] 朱慧玲. 蛋白偶联受体激酶与的相互作用及其对功能影响的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2009
- [31] Xiao Ping-ping, Huang Xi-shi, Huang Lan-zhen, et al. G protein-coupled receptor kinase 4-induced cellular senescence and its senescence-associated gene expression profiling [J]. *Experimental cell research*, 2017, 360(2): 273-280
- [32] 李瑞瑞, 蒋晓山. 非视紫质 G 蛋白偶联受体激酶对肿瘤的调控作用[J]. *肿瘤防治研究*, 2019, 46(04): 367-370