

miR-944靶向*RAB1A*对神经胶质瘤细胞增殖和迁移的影响

朱颖婷 王远 罗明 陈洁 罗志华*
(武汉市第一医院神经外科, 武汉 430030)

摘要 该文旨在探讨微小RNA-944(miR-944)通过靶向Rab家族蛋白1A(*RAB1A*)对神经胶质瘤细胞增殖和迁移的影响。收集神经胶质瘤患者的癌组织及癌旁组织, 体外培养正常对照细胞NHA和神经胶质瘤细胞系(A172、LN229、SHG-44、U251、U-87 MG), qRT-PCR实验检测组织和细胞中miR-944和*RAB1A* mRNA表达水平; 通过TCGA数据库分析miR-944、*RAB1A*与神经胶质瘤临床预后的关系; 将U251细胞分为对照组(Control)、miR-mimic-NC组、miR-944-mimic组、miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组、miR-944-mimic+pcDNA3.1-*RAB1A*组; qRT-PCR实验检测各组U251细胞中miR-944和*RAB1A* mRNA表达水平; 采用CCK-8法检测细胞存活率; 采用克隆形成实验检测各组细胞克隆数; 采用Transwell实验检测各组细胞的迁移能力; Western blot检测各组U251细胞中*RAB1A*和上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白的表达水平; 双荧光素酶实验测定miR-944与*RAB1A*的靶向关系。通过异种移植瘤实验分析miR-944对神经胶质瘤细胞体内生长的影响。与癌旁组织相比, 神经胶质瘤组织中miR-944表达水平显著降低($P<0.05$), *RAB1A* mRNA表达水平显著升高($P<0.05$); 与正常对照细胞NHA相比, 神经胶质瘤细胞系(A172、LN229、SHG-44、U251、U-87 MG)中miR-944水平显著降低($P<0.05$), *RAB1A* mRNA表达水平显著升高($P<0.05$); TCGA数据库中, miR-944、*RAB1A*均与神经胶质瘤患者预后相关($P<0.05$)。与miR-mimic-NC组相比, miR-944-mimic组U251细胞中*RAB1A* mRNA及蛋白表达水平、细胞存活率、克隆数、迁移率以及N-cadherin、MMP-9、Vimentin、Fibronectin、Snail、Slug水平显著降低($P<0.05$), miR-944和E-cadherin、ZO-1水平显著升高($P<0.05$); 与miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组相比, miR-944-mimic+pcDNA3.1-*RAB1A*组*RAB1A* mRNA及蛋白表达水平、细胞存活率、克隆数、迁移率以及N-cadherin、MMP-9、Vimentin、Fibronectin、Snail、Slug水平显著升高($P<0.05$), E-cadherin、ZO-1水平显著降低($P<0.05$); 与*RAB1A*-WT和miR-mimic-NC共转染组相比, *RAB1A*-WT和miR-944-mimic共转染组细胞中相对荧光素酶活性显著降低($P<0.05$)。体内实验结果显示, 与miR-mimic-NC组相比, miR-944-mimic组肿瘤体积和质量及肿瘤组织中*RAB1A* mRNA及蛋白表达水平显著降低($P<0.05$), miR-944水平显著升高($P<0.05$); 与miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组相比, miR-944-mimic+pcDNA3.1-*RAB1A*组肿瘤体积和质量及肿瘤组织中*RAB1A* mRNA及蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。miR-944可能通过靶向调控*RAB1A*表达, 阻碍EMT过程, 进而抑制神经胶质瘤细胞增殖和迁移。

关键词 微小RNA-944; Rab家族蛋白1A; 胶质瘤细胞; 增殖; 迁移

Effects of miR-944 on the Proliferation and Migration of Glioma Cells by Targeting *RAB1A*

收稿日期: 2025-06-13

接受日期: 2025-09-10

湖北省科学技术厅自然科学基金(批准号: 2023AFB1051)资助的课题

*通信作者。Tel: 027-85332787, E-mail: vdtvj@163.com

Received: June 13, 2025

Accepted: September 10, 2025

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hubei Provincial Department of Science and Technology (Grant No.2023AFB1051)

*Corresponding author. Tel: +86-27-85332787, E-mail: vdtvj@163.com

ZHU Yingting, WANG Yuan, LUO Ming, CHEN Jie, LUO Zhihua*

(Department of Neurosurgery, Wuhan First Hospital, Wuhan 430030, China)

Abstract This study aims to discuss the effects of miR-944 on proliferation and migration of glioma cells by targeting *RAB1A* (Rab family protein 1A). Cancer tissues and adjacent tissues of glioma patients were collected, normal control cells NHA and glioma cell lines (A172, LN229, SHG-44, U251, U-87 MG) *in vitro* were cultured, and qRT-PCR experiments were used to test miR-944 and *RAB1A* mRNA expression in tissues and cells. The relationship between miR-944, *RAB1A* and the clinical prognosis of glioma was analyzed through the TCGA database. U251 cells were grouped into Control group, miR-mimic-NC group, miR-944-mimic group, miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group, and miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A group. qRT-PCR experiments were used to test miR-944 and *RAB1A* mRNA in U251 cells. Cell viability was assessed using the CCK-8 assay; the number of colonies formed by each group of cells was measured via the colony formation assay; and the migratory capacity of each group of cells was evaluated using the Transwell assay. Western blot was performed to detect the expression of RAB1A and EMT (epithelial mesenchymal transition) related proteins in U251 cells. Dual luciferase assay was used to determine the targeting relationship between miR-944 and *RAB1A*. The effect of miR-944 on the *in vivo* growth of glioma cells was analyzed through xenograft tumor experiments. For adjacent cancer tissues, the miR-944 in glioma tissues was clearly lower ($P<0.05$), while *RAB1A* mRNA was clearly higher ($P<0.05$). Compared with the normal control cells NHA, the levels of miR-944 in the glioma cell lines (A172, LN229, SHG-44, U251, U-87 MG) were significantly decreased ($P<0.05$), and the expression level of *RAB1A* mRNA was significantly increased ($P<0.05$); in the TCGA database, both miR-944 and *RAB1A* were related to the prognosis of glioma patients ($P<0.05$). For the miR-mimic-NC group, the miR-944-mimic group showed clearly decreased RAB1A mRNA and protein, cell survival rate, number of colonies, migration rate, N-cadherin, MMP-9, Vimentin, Fibronectin, Snail, and Slug in U251 cells ($P<0.05$), and clearly increased miR-944, E-cadherin and ZO-1 ($P<0.05$). For the miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group, the miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A group showed clearly increased RAB1A mRNA and protein, cell survival rate, number of colonies, migration rate, N-cadherin, MMP-9, Vimentin, Fibronectin, Snail, and Slug in U251 cells ($P<0.05$), and clearly reduced E-cadherin and ZO-1 ($P<0.05$). For the co-transfection group of *RAB1A*-WT and miR-mimic-NC, the relative luciferase activity in the co-transfection group of *RAB1A*-WT and miR-944-mimic was significantly reduce ($P<0.05$). The results of the *in vivo* experiments showed that compared with the miR-mimic-NC group, the tumor volume and mass, as well as the expression levels of *RAB1A* mRNA and protein in the tumor tissue in the miR-944-mimic group were significantly reduced ($P<0.05$), and the level of miR-944 was significantly increased ($P<0.05$); compared with the miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group, the tumor volume and mass, as well as the expression levels of RAB1A mRNA and protein in the tumor tissue in the miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A group were significantly increased ($P<0.05$). miR-944 may inhibit the proliferation and migration of glioma cells by targeting *RAB1A* and hindering the EMT process.

Keywords miR-944; Rab family protein 1A; glioma cells; proliferation; migration

神经胶质瘤是中枢神经系统中最常见的肿瘤类型, 约占所有原发性恶性脑肿瘤的80%, 该肿瘤多具有扩张或浸润性, 与正常脑组织无明显界限^[1]。神经胶质瘤主要通过手术治疗、放疗、化疗以及靶向治疗等方式进行临床治疗, 但治疗后患者存在复发现象, 预后较差^[2]。目前, 神经胶质瘤相关的新兴靶

向疗法具有较大进展, 有望通过靶向治疗改善治疗效果以及患者的预后状态^[3]。因此, 研究神经胶质瘤的发病机制, 增加对治疗靶点和新的生物标志物的研究具有重要意义。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一种小的非编码RNA类型, 通过与其靶标的3'-非翻译区(untrans-

lated regions, UTRs)结合调节各种生理过程,在多种癌症的发生和发展过程中发挥重要作用^[4]。miRNA种类繁多,部分可作为致癌基因,促进癌细胞增殖,另一部分可作为抑癌基因,靶向癌细胞生命活动的关键蛋白,抑制癌细胞的恶性生物学行为^[5]。据报道,肝癌细胞和组织中miR-944表达水平降低,上调miR-944表达可调控癌细胞相关代谢蛋白NOX4表达,抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭^[6];miR-944高表达的结直肠癌患者存活率较高,且有研究表明上调癌细胞中miR-944表达可以调节上皮-间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)进程,抑制癌细胞迁移^[7];而宫颈癌组织中miR-944表达水平高于正常组织,并且与肿瘤大小、淋巴结转移和生存率有关,抑制miR-944表达可下调EMT相关蛋白表达,降低癌细胞活力和迁移能力^[8]。同时,miR-944在高级别神经胶质瘤中的表达水平低于低级别神经胶质瘤,且已被证实能够调控胶质瘤生长和血管生成^[9]。不过,miR-944对神经胶质瘤细胞生物学行为的具体影响及其潜在机制目前尚未明确。有相关研究表明,Rab家族蛋白1A(Rab family protein 1A, *RAB1A*)在多种癌症中作为致癌基因,可促进肝细胞癌、结直肠癌、乳腺癌等癌细胞的恶性生物学行为^[10]。本研究前期发现,miR-944与*RAB1A*存在靶向关系,但miR-944能否通过调控*RAB1A*影响神经胶质瘤细胞增殖和迁移,尚不明确。本研究检测神经胶质瘤及癌旁组织中miR-944与*RAB1A*的水平,并探究miR-944对神经胶质瘤细胞的影响,从而为治疗神经胶质瘤增加潜在的治疗靶点,并提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织和细胞获取

利用SPSS 15软件,进行双侧检验,设显著性水平 $\alpha=0.05$,检验效力power=80%,效应量 $d=0.55$,计算所需例数至少为28例,设置脱落率为10%,至少需纳入30例,因此本研究纳入33例神经胶质瘤患者进行研究。本研究纳入2023年6月—2024年7月武汉市第一医院神经外科收治的33例神经胶质瘤患者,于术中收集患者的癌组织及其癌旁组织(距肿瘤边缘超过3 cm),使用液氮快速冷冻,并放置于-80℃保存。其中,男性18例,女性15例;中位年龄为56岁(范围:28~72岁),≥50岁20例,<50岁13例;肿瘤最大径:≥3 cm 24例,<3 cm 9例;WHO分级:I~II级13例,III~IV级20例;分型:胶质

母细胞瘤(IDH野生型)20例,间变性星形细胞瘤(IDH突变型)8例,弥漫性星形细胞瘤(IDH突变型)3例,少突胶质细胞瘤(IDH突变型且1p/19q共缺失)2例。本研究在获取组织时获得所有患者的知情同意,且经武汉市第一医院神经外科医学伦理委员会批准(科伦(2023)33号);人神经胶质瘤细胞U251细胞系购自中国科学院上海细胞库;人神经星形胶质细胞NHA及人神经胶质瘤细胞系A172、LN229、U-87 MG购自武汉普诺赛生命科技有限公司;人神经胶质瘤细胞系SHG-44购自合肥万物生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

*RAB1A*过表达(pcDNA3.1-*RAB1A*)及其对照(pcDNA3.1-NC)质粒由上海吉玛制药技术有限公司构建合成;miR-944模拟物(miR-944 mimic)及其对照(miR-mimic-NC)、*RAB1A*-野生型(*RAB1A*-WT)及其突变型(*RAB1A*-WUT)质粒由上海汉恒生物科技有限公司构建合成;TRIzol试剂(货号:15596026)购自北京索莱宝科技有限公司;Lipo6000™转染试剂(货号:C0526)和结晶紫溶液(货号:C0121)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;Prime Script RT试剂盒(货号:RR036A)和TB Green定量酶(货号:CN830A)购自宝日医生物技术(北京)有限公司;细胞计数试剂盒(CCK-8,货号:HY-K0301)、兔源一抗E-cadherin(货号:HY-P80113)、GAPDH(货号:HY-P80137)和双荧光素酶检测试剂盒(货号:HY-K1013)购自美国MedChem-Express公司;N-cadherin(货号:22018-1-AP)、MMP-9(货号:10375-2-AP)、Vimentin(货号:10366-1-AP)、Fibronectin(货号:15613-1-AP)、ZO-1(货号:21773-1-AP)、Snail(货号:26183-1-AP)、Slug(货号:12129-1-AP)一抗购自武汉三鹰生物科技有限公司;羊抗兔二抗(货号:ab6721)购自英国Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR检测组织和细胞中miR-944和*RAB1A* mRNA水平 分别取冷冻的胶质瘤组织、癌旁组织进行研磨,收集正常对照细胞NHA以及神经胶质瘤A172、LN229、SHG-44、U-87 MG、U251细胞,经胰酶消化(37℃、1 min)后PBS重悬,4℃下离心(3 000 r/min、5 min)收集;使用TRIzol试剂提取总RNA;使用Prime Script RT试剂盒将总RNA逆转录合成cDNA。逆转录反应条件为:25℃变性5 min,42℃退火30 min,85℃延伸5 min。以合成的cDNA为模板,使用上海生工生物工程技术服务

有限公司设计并合成的特异性引物(所有引物序列均跨外显子-外显子接头,表1),在定量PCR仪上进行扩增。PCR反应程序为:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火/延伸30 s,40个循环。每次PCR反应结束后均进行了熔解曲线分析(程序:95℃变性15 s,60℃退火60 s,95℃延伸15 s)以确认扩增产物的特异性,结果均显示为单一尖锐峰。以*U6*和*GAPDH*为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算miR-944和*RAB1A* mRNA水平。

1.3.2 细胞培养及分组 U251细胞培养于DMEM培养基,需额外添加10%胎牛血清和1%青-链霉素,细胞培养皿置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中。将U251细胞分为对照组(Control)、miR-mimic-NC组、miR-944-mimic组、miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组、miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A组;Control组不进行任何处理,其余按照分组转染相应质粒,转染24 h后进行后续测定。采用qRT-PCR检测各组细胞中miR-944和*RAB1A* mRNA水平,Western blot检测RAB1A蛋白表达水平,以此评估转染是否成功。

1.3.3 CCK-8法检测细胞增殖情况 按照1.3.2中分组将U251细胞分别接种至96孔板(4×10⁴/孔)并培养2天,然后加入10 μL CCK-8溶液继续培养2 h。采用酶标仪测定培养液在450 nm波长处的吸光度,记录吸光度(*D*)值。

1.3.4 细胞克隆形成实验评估细胞增殖情况 将U251细胞接种于6孔板(1×10³/孔)中,分组处理培养2周后,室温下使用4%多聚甲醛固定15 min;室温下结晶紫溶液染色20 min,充分清洗后进行拍照。采用ImageJ软件分析图像,计算各组克隆数。

1.3.5 Transwell实验检测细胞迁移情况 将U251细胞接种于不含血清的Transwell小室上层(1×10⁴/孔)

中,下层加入完全培养基,按1.3.3分组处理24 h;去除上室未迁移细胞,其余细胞于室温下用结晶紫染色20 min后,在光学显微镜下观察,并计算细胞迁移数。

1.3.6 Western blot检测蛋白表达水平 取各组细胞进行研磨;使用RIPA裂解缓冲液提取总蛋白,并测定蛋白浓度;使用蛋白上样缓冲液稀释蛋白后,通过SDS-PAGE电泳分离蛋白并将其转移到PVDF膜上;使用5%脱脂牛奶室温封闭1 h后,RAB1A(1:1 000)、E-cadherin(1:2 000)、N-cadherin(1:5 000)、MMP-9(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)、Fibronectin(1:1 000)、ZO-1(1:1 000)、Snail(1:1 000)、Slug(1:1 000)和GAPDH(1:2 500)一抗于4℃孵育过夜;PBST洗涤膜后,于室温孵育HRP标记的山羊抗兔二抗(1:5 000)1 h;洗涤膜后,使用ECL化学发光试剂在Tanon 5200化学发光成像系统上显影并采集图像。

1.3.7 双荧光素酶实验检测靶向关系 通过Targetscan网站预测miR-944与*RAB1A*之间的靶向结合位点,构建*RAB1A*突变型序列(*RAB1A*-WUT);向接种于96孔板的U251细胞中分别共转染miR-944-mimic或miR-NC与*RAB1A*-WT或*RAB1A*-WUT;37℃培养48 h后,裂解细胞,并按照双荧光素酶检测试剂盒说明书进行处理,测定450 nm波长处的吸光度值,并计算双荧光素酶活性。

1.3.8 异种移植瘤实验 本实验在武汉珞宾生命科技有限公司完成,经武汉珞宾生命科技有限公司动物伦理委员会的批准(批准号:2024100819)。4周龄BALB/c裸鼠购自武汉珞宾生命科技有限公司[SCXK(鄂)2024-0036]。动物被置于室温环境中饲养,并自由获取食物和水。将转染miR-mimic-NC、miR-944-mimic、miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC、miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A的U251细胞(2×10⁷个)通

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
miR-944	F: GCA CTC CTA AAA TTA TTG TAC ATC G
	R: TAT GG TTG TTC ACG ACT CCT TCA C
<i>U6</i>	F: CTC GCT TCG GCA GCA CA
	R: AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
<i>RAB1A</i>	F: TTG CCT TCT TCT TAG GTT TGC
	R: GCT TGA TTG TTT TCC CGT CT
<i>GAPDH</i>	F: GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC
	R: TGG TGA AGA CGC CAG TGG A

过皮下注射至小鼠体内,将其分别作为miR-mimic-NC组、miR-944-mimic组、miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组、miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A组;将未转染的U251细胞(2×10^7 个)皮下注射至小鼠体内,作为Control组,每组6只。每7天测量并计算肿瘤体积(体积=最长径 $\times$ 次长径 $\times$ 1/2)。28天后,通过腹腔注射50 mg/kg戊巴比妥钠处死小鼠。实验结束时,对肿瘤进行拍照并称重。然后,通过1.3.1和1.3.6的方法检测miR-944及RAB1A mRNA和蛋白表达水平。

1.4 统计学分析

使用SPSS 20.0和GraphPad Prism 7.0软件进行数据分析,数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析和Tukey's检验比较多组数据间差异;采用t检验比较两组数据间差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经胶质瘤组织和细胞中miR-944和RAB1A mRNA表达水平的比较

与癌旁组织相比,神经胶质瘤组织中miR-944

水平显著降低($P < 0.05$), RAB1A mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$);见表2。TCGA数据库中,miR-944、RAB1A均与神经胶质瘤患者预后相关($P < 0.05$);见图1。与正常对照细胞NHA相比,神经胶质瘤细胞系(A172、LN229、SHG-44、U251、U-87 MG)中miR-944水平显著降低($P < 0.05$), RAB1A mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$),其中,U251细胞中miR-944和RAB1A mRNA表达水平差异最显著,故选择该细胞系进行后续实验;见表3。

2.2 各组U251细胞中miR-944以及RAB1A mRNA和蛋白表达水平的比较

与miR-mimic-NC组相比,miR-944-mimic组U251细胞中RAB1A mRNA及蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),miR-944水平显著升高($P < 0.05$);与miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组相比,miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A组RAB1A mRNA及蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),miR-944水平差异不显著($P > 0.05$);见图2和表4。

2.3 各组U251细胞增殖能力的比较

与miR-mimic-NC组相比,miR-944-mimic

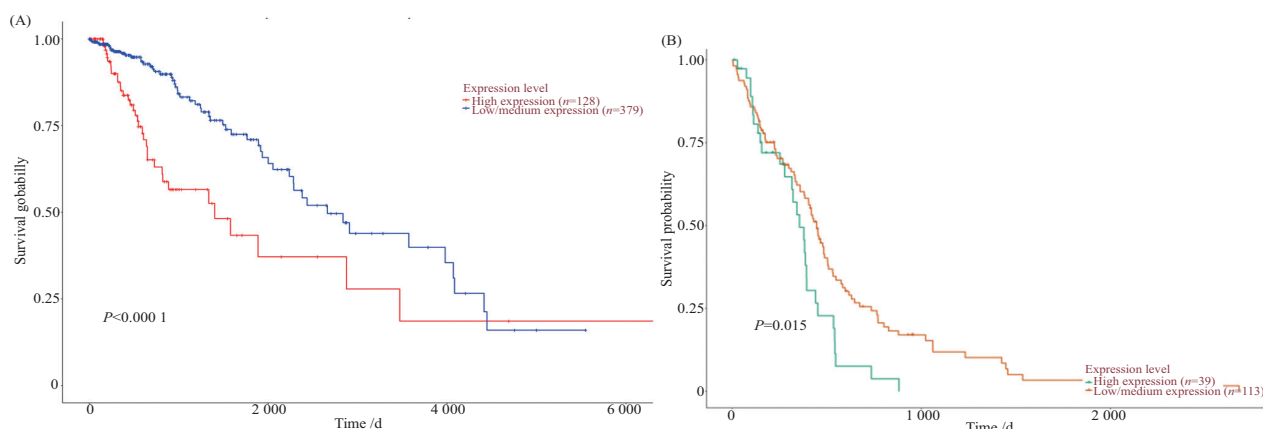
表2 神经胶质瘤及癌旁组织中miR-944、RAB1A mRNA表达水平比较

Table 2 Comparison of miR-944 and RAB1A mRNA expression levels in glioma and adjacent tissues

组织 Tissue	miR-944	RAB1A mRNA
Adjacent tissue	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
Glioma tissue	0.39 $\pm$ 0.06*	4.17 $\pm$ 0.53*

* $P < 0.05$, 与癌旁组织比较。

* $P < 0.05$ compared with the adjacent tissue.



A: TCGA数据库中miR-944与神经胶质瘤患者预后的关系; B: TCGA数据库中RAB1A与神经胶质瘤患者预后的关系。

A: the relationship between miR-944 and the prognosis of glioma patients in the TCGA database; B: the relationship between RAB1A and prognosis of glioma patients in TCGA database.

图1 TCGA数据库中miR-944(A)、RAB1A(B)与神经胶质瘤患者预后的关系

Fig.1 Relationship between miR-944 (A), RAB1A (B) and prognosis of glioma patients in TCGA database

组细胞存活率和集落生成数显著降低 ($P<0.05$); 与 miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组相比, miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A组细胞存活率和集落生成数显著升高 ($P<0.05$), 见图3和表5。

2.4 各组U251细胞迁移能力的比较

与 miR-mimic-NC组相比, miR-944-mimic组 U251细胞迁移率显著降低 ($P<0.05$); 与 miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组相比, miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A组细胞迁移率显著升高 ($P<0.05$); 见图4和表6。

2.5 各组U251细胞中EMT相关蛋白表达的比较

与 miR-mimic-NC组相比, miR-944-mimic

组 U251细胞中 N-cadherin、MMP-9、Vimentin、Fibronectin、Snail、Slug蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), E-cadherin、ZO-1水平显著升高 ($P<0.05$); 与 miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组相比, miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A组 N-cadherin、MMP-9、Vimentin、Fibronectin、Snail、Slug蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), E-cadherin、ZO-1水平显著降低 ($P<0.05$); 见图5和表7。

2.6 miR-944与*RAB1A*之间的靶向联系

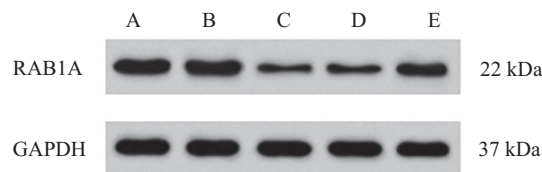
miR-944与 *RAB1A* 3'-UTR之间的结合位点预测结果如图6; 与 *RAB1A*-WT和miR-mimic-NC共转

表3 神经胶质瘤细胞系中miR-944、*RAB1A* mRNA表达水平比较
Table 3 Comparison of miR-944 and *RAB1A* mRNA expression levels in glioma cell lines

细胞系 Cell line	miR-944	<i>RAB1A</i> mRNA
NHA	1.00±0.00	1.00±0.00
A172	0.51±0.05*	3.25±0.35*
LN229	0.68±0.07*	1.93±0.23*
SHG-44	0.44±0.04*	2.64±0.28*
U251	0.35±0.03*	4.21±0.49*
U-87 MG	0.66±0.06*	1.96±0.25*

* $P<0.05$, 与NHA比较。

* $P<0.05$ compared with NHA.



A: Control组; B: miR-mimic-NC组; C: miR-944-mimic组; D: miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组; E: miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A组。

A: Control group; B: miR-mimic-NC group; C: miR-944-mimic group; D: miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group; E: miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A group.

图2 各组U251细胞中RAB1A蛋白表达情况

Fig.2 Expression of RAB1A protein in U251 cells of each group

表4 各组U251细胞中miR-944、*RAB1A* mRNA及蛋白表达水平比较

Table 4 Comparison of miR-944, *RAB1A* mRNA and protein expression levels in U251 cells of each group

组别 Group	miR-944	<i>RAB1A</i> mRNA	RAB1A
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	0.93±0.11
miR-mimic-NC	0.97±0.12	1.02±0.15	0.90±0.14
miR-944-mimic	3.75±0.41* ^{&}	0.27±0.04* ^{&}	0.31±0.05* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC	3.68±0.40* ^{&}	0.30±0.04* ^{&}	0.33±0.06* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A	3.70±0.42	0.96±0.15 [#]	0.85±0.13 [#]

* $P<0.05$, 与Control组比较; [&] $P<0.05$, 与miR-mimic-NC组比较; [#] $P<0.05$, 与miR-944 mimic+pcDNA3.1-NC组比较。

* $P<0.05$ compared with the Control group; [&] $P<0.05$ compared with the miR-mimic-NC group; [#] $P<0.05$ compared with the miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group.

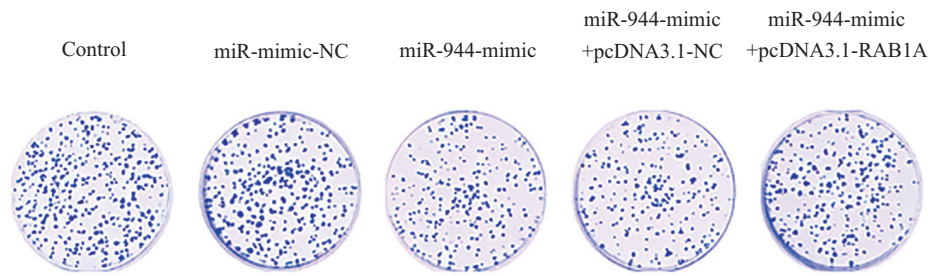


图3 各组U251细胞克隆形成图
Fig.3 Cloning formation of U251 cells in each group

表5 各组U251细胞增殖能力比较
Table 5 Comparison of U251 cell proliferation ability among different groups

组别 Group	细胞存活率/% Cell survival rate /%	克隆数 Number of colonies
Control	99.35±10.82	109.67±15.33
miR-mimic-NC	98.29±9.96	99.50±15.50
miR-944-mimic	50.73±5.28* ^{&}	45.83±6.17* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC	52.31±5.52* ^{&}	47.33±5.67* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A	85.27±8.81 [#]	92.17±10.83 [#]

* $P<0.05$, 与Control组比较; [&] $P<0.05$, 与miR-mimic-NC组比较; [#] $P<0.05$, 与miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组比较。
* $P<0.05$ compared with the Control group; [&] $P<0.05$ compared with the miR-mimic-NC group; [#] $P<0.05$ compared with the miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group.

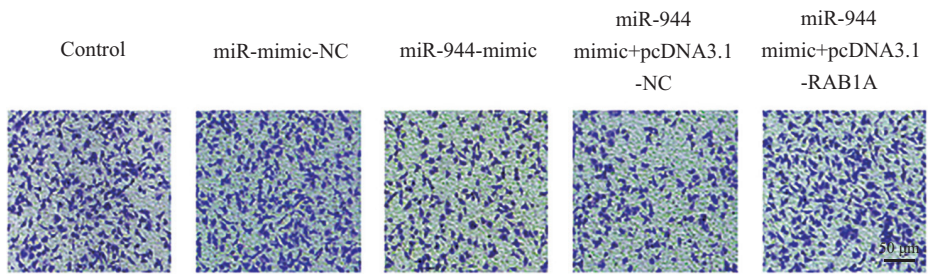


图4 Transwell实验评估U251细胞迁移能力
Fig.4 Transwell experiment evaluation of U251 cell migration ability

表6 各组U251细胞迁移率比较
Table 6 Comparison of migration rates of U251 cells in different groups

组别 Group	细胞迁移率/% Cell migration rate /%
Control	56.73±7.15
miR-mimic-NC	53.91±6.83
miR-944-mimic	23.16±3.27* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC	21.35±3.41* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A	50.26±7.09 [#]

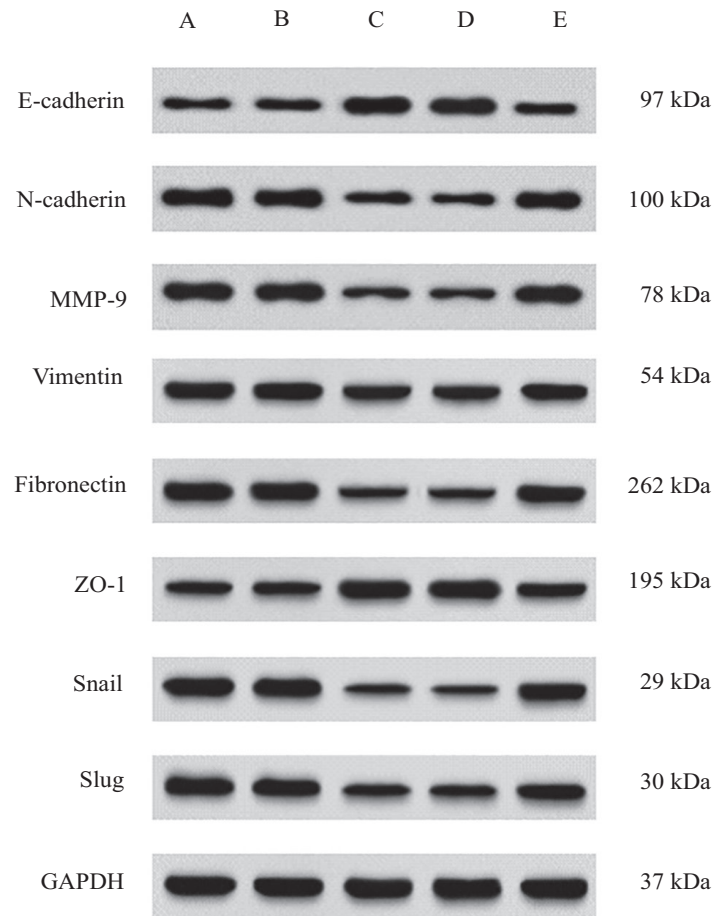
* $P<0.05$, 与Control组比较; [&] $P<0.05$, 与miR-mimic-NC组比较; [#] $P<0.05$, 与miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组比较。
* $P<0.05$ compared with the Control group; [&] $P<0.05$ compared with the miR-mimic-NC group; [#] $P<0.05$ compared with the miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group.

染组相比, *RAB1A*-WT和miR-944-mimic共转染组细胞中相对荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$), 如表8。

2.7 miR-944通过RAB1A对U251细胞体内生长的影响
与miR-mimic-NC组相比, miR-944-mimic组肿

瘤体积和质量及肿瘤组织中RAB1A mRNA及蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), miR-944水平显著升高 ($P<0.05$); 与 miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组相比,

miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A组肿瘤体积和质量及肿瘤组织中RAB1A mRNA及蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), miR-944水平差异不显著 ($P>0.05$);



A: Control组; B: miR-mimic-NC组; C: miR-944-mimic组; D: miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组; E: miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A组。
A: Control group; B: miR-mimic-NC group; C: miR-944-mimic group; D: miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group; E: miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A group.

图5 各组U251细胞中EMT相关蛋白表达情况

Fig.5 Expression of EMT related proteins in U251 cells of each group

表7 U251细胞中E-cadherin、N-cadherin、MMP-9、Vimentin、Fibronectin、ZO-1水平比较

Table 7 Comparison of E-cadherin, N-cadherin, MMP-9, Vimentin, Fibronectin, and ZO-1 levels in U251 cells

组别 Group	E-cadherin	N-cadherin	MMP-9	Vimentin	Fibronectin	ZO-1	Snail	Slug
Control	0.36±0.04	0.91±0.11	0.84±0.12	0.93±0.12	0.98±0.09	0.33±0.04	0.95±0.09	0.89±0.10
miR-mimic-NC	0.39±0.05	0.93±0.12	0.86±0.13	0.95±0.15	1.01±0.13	0.35±0.05	0.97±0.11	0.91±0.09
miR-944-mimic	0.85±0.11* ^{&}	0.42±0.05* ^{&}	0.45±0.06* ^{&}	0.44±0.04* ^{&}	0.25±0.03* ^{&}	0.96±0.11* ^{&}	0.26±0.02* ^{&}	0.33±0.03* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC	0.82±0.05* ^{&}	0.39±0.05* ^{&}	0.43±0.07* ^{&}	0.41±0.05* ^{&}	0.23±0.04* ^{&}	0.94±0.10* ^{&}	0.24±0.02* ^{&}	0.31±0.02* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A	0.43±0.07 [#]	0.84±0.13 [#]	0.81±0.14 [#]	0.89±0.08 [#]	0.90±0.08 [#]	0.41±0.04 [#]	0.83±0.09 [#]	0.78±0.08 [#]

* $P<0.05$, 与Control组比较; [&] $P<0.05$, 与miR-mimic-NC组比较; [#] $P<0.05$, 与miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组比较。

* $P<0.05$ compared with the Control group; [&] $P<0.05$ compared with the miR-mimic-NC group; [#] $P<0.05$ compared with the miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group.

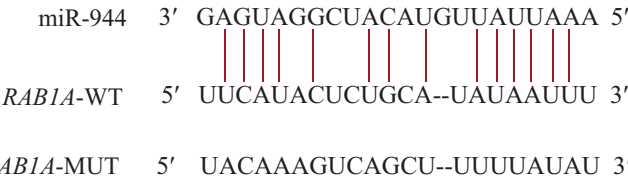


图6 预测miR-944和RAB1A 3'-UTR间的靶向结合位点

Fig.6 Predicts the targeted binding site between miR-944 and RAB1A 3'-UTR

表8 U251细胞中相对荧光素酶活性比较
Table 8 Comparison of relative luciferase activity in U251 cells

转染质粒 Transfection plasmid	miR-mimic-NC	miR-944-mimic
RAB1A-WT	1.02±0.14	0.46±0.09*
RAB1A-MUT	0.98±0.13	1.01±0.15

*P<0.05, 与miR-mimic-NC相比。
*P<0.05 compared with miR-mimic-NC.

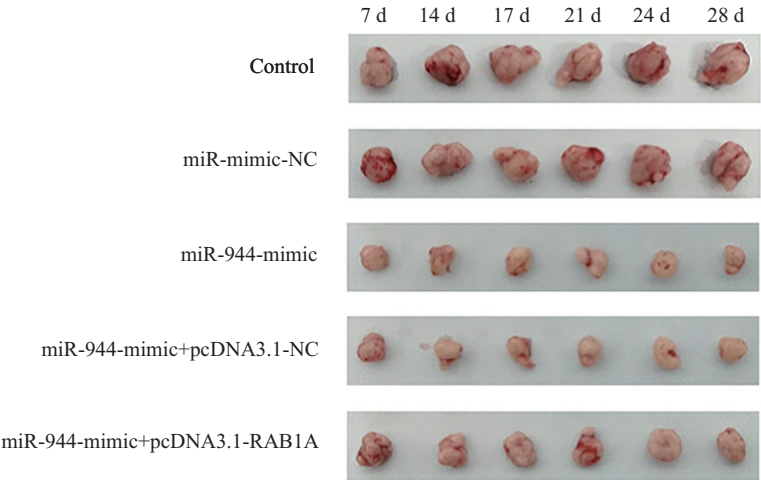


图7 各组小鼠离体肿瘤图

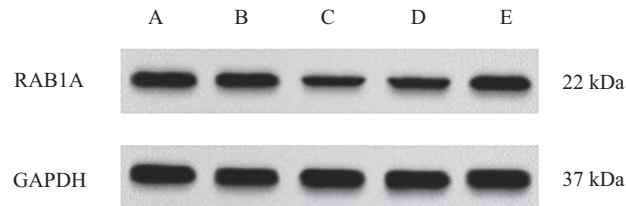
Fig.7 In vitro tumor images of mice in each group

见图7、图8、表9和表10。

3 讨论

神经胶质瘤属于中枢神经系统中的原发性脑肿瘤,由携带癌症相关基因突变的神经干细胞或祖细胞发展而来,世界卫生组织根据肿瘤恶性程度将其分为1~4级,成人和儿童中均存在相关病例^[11]。尽管当前在神经胶质瘤相关手术、化疗和放疗方面取得了显著进展,但胶质瘤患者的平均生存时间并没有显著延长,生存率仍较低^[2,12]。越来越多研究证明,miRNA等多种基因的变化与神经胶质瘤的发生和进展有关,其可被用作预后生物标志物和新的治疗靶点^[13]。因此,对miRNA等基因变化相关的分子机制进行研究,可能推进临床治疗神经胶质瘤的发展,改善患者预后。

miRNA作为细胞中具有调控作用的RNA分子,可以调节超过70%的人类基因,且可以靶向多个基因,控制癌细胞表观行为^[14]。目前,研究证明miRNA在神经胶质瘤组织或细胞中异常表达,可促进或抑制神经胶质瘤发展过程中与细胞生长、迁移、分化、凋亡和侵袭相关的关键基因表达^[13]。据报道,miR-146a-5p在神经胶质瘤干细胞中表达下调,导致其靶基因异质核糖核蛋白D过表达,促进癌细胞EMT、增殖及迁移^[15]; miR-517a在神经胶质瘤中上调表达,而敲低miR-517a后神经胶质瘤细胞在体外和体内的生长、迁移和侵袭受到抑制^[16]; miR-182在神经胶质瘤细胞中下调表达,可以使其靶向结合基因转移抑制蛋白1在细胞中过表达,促进转化生长因子-β1诱导的EMT,使用miR-182抑制剂后癌细胞增殖、迁移和侵袭过程均受到抑制^[17]。在本研究中,



A: Control组; B: miR-mimic-NC组; C: miR-944-mimic组; D: miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组; E: miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A组。

A: Control group; B: miR-mimic-NC group; C: miR-944-mimic group; D: miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group; E: miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A group.

图8 各组肿瘤组织中RAB1A蛋白表达情况

Fig.8 Expression of RAB1A protein in tumor tissues of each group

表9 各组小鼠肿瘤体积与质量比较

Table 9 Comparison of tumor volume and mass among different groups of mice

组别 Group	肿瘤体积/mm ³ Tumor volume /mm ³				肿瘤质量/g Tumor mass /g
	7 d	14 d	21 d	28 d	
Control	121.35±12.96	236.78±24.13	452.61±44.79	839.46±82.34	1.05±0.11
miR-mimic-NC	123.43±11.89	238.69±23.95	454.14±43.52	841.35±83.05	1.07±0.14
miR-944-mimic	115.68±12.02* ^{&}	151.74±12.96* ^{&}	260.72±26.16* ^{&}	413.26±40.28* ^{&}	0.56±0.06* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC	119.59±12.24* ^{&}	150.37±13.65* ^{&}	258.31±25.79* ^{&}	411.78±41.05* ^{&}	0.54±0.05* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A	122.63±12.51 [#]	201.23±20.38 [#]	381.52±36.17 [#]	687.53±65.44 [#]	0.83±0.08 [#]

P*<0.05, 与Control组比较; [&]*P*<0.05, 与miR-mimic-NC组比较; [#]*P*<0.05, 与miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组比较。P*<0.05 compared with the Control group; [&]*P*<0.05 compared with the miR-mimic-NC group; [#]*P*<0.05 compared with the miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group.

表10 各组U251细胞中miR-944、RAB1A mRNA及蛋白表达水平比较

Table 10 Comparison of miR-944, RAB1A mRNA and protein expression levels in U251 cells of each group

组别 Group	miR-944	RAB1A mRNA	RAB1A
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	0.89±0.09
miR-mimic-NC	0.98±0.11	1.03±0.14	0.87±0.08
miR-944-mimic	3.52±0.38* ^{&}	0.32±0.03* ^{&}	0.34±0.04* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC	3.45±0.36* ^{&}	0.35±0.04* ^{&}	0.36±0.05* ^{&}
miR-944-mimic+pcDNA3.1-RAB1A	3.49±0.37	0.93±0.11 [#]	0.81±0.10 [#]

P*<0.05, 与Control组比较; [&]*P*<0.05, 与miR-mimic-NC组比较; [#]*P*<0.05, 与miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC组比较。P*<0.05 compared with the Control group; [&]*P*<0.05 compared with the miR-mimic-NC group; [#]*P*<0.05 compared with the miR-944-mimic+pcDNA3.1-NC group.

与癌旁组织相比,神经胶质瘤组织中miR-944水平降低;在U251细胞中转染miR-944-mimic后,细胞存活率、集落生成数、迁移率以及N-cadherin、MMP-9、Vimentin、Fibronectin、Snail、Slug表达水平降低,miR-944、E-cadherin、ZO-1表达水平升高,说明miR-944表达上调可以抑制神经胶质瘤细胞存活和迁移,阻碍癌细胞EMT过程。此外,将转染miR-944-mimic的U251细胞移植至小鼠体内,观察到小鼠肿瘤体积和质量均下降,表明miR-944表达上调能够抑制体内神经胶质瘤细胞生长。该体内实验结果为miR-944的抑瘤功能提供了直接证据,并与我们的体外研究结论相互印证。

RAB1A是一种高度保守的鸟苷三磷酸酶,主要调节细胞内从内质网到高尔基体的囊泡转移过程,是细胞生命活动中重要的蛋白之一^[18]。有多个研究表明,RAB1A可被视为多种癌症的致癌基因,在胃癌、鼻咽癌、乳腺癌、肺癌和肝细胞癌等癌症的发展过程中RAB1A表达上调,促进癌细胞恶性生物学行为^[10,19-20]。此外,据报道,RAB1A在神经胶质瘤组织中高表达,可以调节细胞中肌动蛋白聚合和细胞形态,RAB1A表达下调可以抑制细胞EMT、增殖和侵袭进程^[21];RAB1A在结直肠癌组织中表达显著上调,与结直肠癌患者的肿瘤大小、淋巴结转移和肿瘤转移分期相关,可促进癌细胞增殖和迁移^[22]。在

本研究中,与癌旁组织相比,神经胶质瘤组织中 *RAB1A* mRNA表达水平升高,在U251细胞中转染miR-944-mimic后,*RAB1A* mRNA及蛋白表达水平降低,而在miR-944上调的细胞中过表达*RAB1A*后,miR-944对U251细胞体外增殖、迁移、EMT及体内生长的影响被逆转,说明miR-944表达上调可能通过抑制*RAB1A*表达而发挥抑制神经胶质瘤细胞增殖和迁移的作用。此外,双荧光素酶实验结果表明,*RAB1A*-WT和miR-944-mimic共转染组细胞中相对荧光素酶活性降低,说明miR-944通过靶向调控*RAB1A*表达发挥抑癌作用。

尽管本研究通过体内外实验证明了miR-944作为治疗靶点的潜力,但将其真正应用于临床仍面临诸多挑战,其中最关键的是高效、安全的递送系统问题。未来的研究需要探索如何将miR-944模拟物或激动剂特异性地递送至脑肿瘤部位,并克服血脑屏障的阻碍。目前,病毒载体、脂质纳米颗粒、外泌体等新兴技术为解决这一难题提供了可能的方向^[23-25]。此外,优化寡核苷酸的化学修饰以提高其稳定性和降低免疫原性,也是临床转化前必须深入研究的问题。综上所述,我们的工作奠定了miR-944作为胶质瘤治疗新靶点的理论基础,而后续的开发工作将集中于解决这些递送和转化医学方面的挑战。

综上所述,miR-944可能通过靶向下调*RAB1A*,阻碍U251细胞EMT过程,抑制神经胶质瘤细胞增殖和迁移。miR-944具有作为治疗神经胶质瘤的新型分子靶标的潜力。但本研究存在一些局限性。首先,所有的体外实验均使用U251细胞系完成。尽管U251是研究胶质瘤生物学的一个常见模型,但未能其他胶质瘤细胞系(如U87、SHG-44)中重复实验结果,因此无法完全排除细胞系特异性偏差。未来研究需要在更广泛的细胞模型和体内环境中验证我们的发现,以评估其普遍适用性和转化潜力。

参考文献 (References)

- [1] LI Y, CHEN X, XUE W, et al. MiR-874 inhibits cell proliferation, migration, and invasion of glioma cells and correlates with prognosis of glioma patients [J]. *Neuromolecular Med*, 2021, 23(2): 247-55.
- [2] XU S, TANG L, LI X, et al. Immunotherapy for glioma: current management and future application [J]. *Cancer Lett*, 2020, 476: 1-12.
- [3] BAEK C, LAURENCE A, TOUAT M. Advances in the treatment of IDH-mutant gliomas [J]. *Curr Opin Neurol*, 2024, 37(6): 708-16.
- [4] SUSZYNSKA M, MACHOWSKA M, FRASZCZYK E, et al. CMC: Cancer miRNA Census-a list of cancer-related miRNA genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(4): 1628-44.
- [5] PAGONI M, CAVA C, SIDERIS D C, et al. MiRNA-based technologies in cancer therapy [J]. *J Pers Med*, 2023, 13(11): 1586-92.
- [6] MAO C, WEN H, ZHANG Y, et al. ciRS-7 enhances the progression of hepatocellular carcinoma through miR-944/NOX4 pathway [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2022, 32(7): 11-24.
- [7] TANG J, GAO W, LIU G, et al. miR-944 suppresses EGF-induced EMT in colorectal cancer cells by directly targeting GATA6 [J]. *Oncotargets Ther*, 2021, 14: 2311-25.
- [8] KIM J, PARK S, CHANG Y, et al. Synergetic effects of intronic mature mir-944 and Δnp63 isoforms on tumorigenesis in a cervical cancer cell line [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5612-3.
- [9] JIANG J, LU J, WANG X, et al. Glioma stem cell-derived exosomal miR-944 reduces glioma growth and angiogenesis by inhibiting AKT/ERK signaling [J]. *Aging*, 2021, 13(15): 19243-59.
- [10] XU H, QIAN M, ZHAO B, et al. Inhibition of *RAB1A* suppresses epithelial-mesenchymal transition and proliferation of triple-negative breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(3): 1619-26.
- [11] WELLER M, WEN P Y, CHANG S M, et al. Glioma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2024, 10(1): 33-5.
- [12] WANG J, CHEN C, YAN X, et al. The role of miR-382-5p in glioma cell proliferation, migration and invasion [J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 4993-5002.
- [13] KCIUK M, YAHYA E B, MOHAMED M M I, et al. Insights into the role of lncRNAs and miRNAs in glioma progression and their potential as novel therapeutic targets [J]. *Cancers*, 2023, 15(13): 3298-301.
- [14] TÜRK O, DEMIREL N, YALTIRIK C K, et al. Unraveling the impact of miRNA-17 in glial tumors and cerebral metastases: a step towards enhanced diagnosis and prognosis [J]. *In Vivo*, 2024, 38(2): 652-6.
- [15] DAI X, WANG Y, DONG X, et al. Downregulation of miRNA-146a-5p promotes malignant transformation of mesenchymal stromal/stem cells by glioma stem-like cells [J]. *Aging*, 2020, 12(10): 9151-72.
- [16] DU CL, PENG F, LIU K Q. miR-517a is up-regulated in glioma and promotes glioma tumorigenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): 196-8.
- [17] LI Z, ZHANG L, LIU Z, et al. miRNA-182 regulated MTSS1 inhibits proliferation and invasion in glioma cells [J]. *J Cancer*, 2020, 11(19): 5840-51.
- [18] LI Z, LI Y, JIA Y, et al. *Rab1A* knockdown represses proliferation and promotes apoptosis in gastric cancer cells by inhibition of mTOR/p70S6K pathway [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 685: 52-3.
- [19] YANG X Z, CHEN X M, ZENG L S, et al. *Rab1A* promotes cancer metastasis and radioresistance through activating GSK-3β/Wnt/β-catenin signaling in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Aging*, 2020, 12(20): 20380-95.
- [20] CHENG Z, SHAO X, XU M, et al. *Rab1A* promotes proliferation and migration abilities via regulation of the HER2/AKT-independent mTOR/S6K1 pathway in colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*,

- 2019, 41(5): 2717-28.
- [21] REN B, WANG L, NAN Y, et al. RAB1A regulates glioma cellular proliferation and invasion via the mTOR signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Future Oncol*, 2021, 17(24): 3203-16.
- [22] PENG C, LI X, YE Z, et al. Rab1A promotes cell proliferation and migration by upregulating Gli1 in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 243-51.
- [23] NIELAND L, VRIJMOET A B, JETTEN I W, et al. CRISPR targeting of mmu-miR-21a through a single adeno-associated virus vector prolongs survival of glioblastoma-bearing mice [J]. *Mol Ther*, 2025, 33(1): 133-51.
- [24] PASSOS GIBSON V, TAHIRI H, YANG C, et al. Hyaluronan decorated layer-by-layer assembled lipid nanoparticles for miR-181a delivery in glioblastoma treatment [J]. *Biomaterials*, 2023, 302: 341-3.
- [25] ZHANG Y, LÜ P, ZHANG Q, et al. Exosomal miR-21-5p from glioma associated mesenchymal stem cells promotes the progression and glycolysis of glioblastoma via PDHA1 [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 232-4.