

FGD5-AS1调控miR-3163/*CNPY2*轴对脑胶质瘤 细胞增殖和凋亡的影响

杨娇¹ 扈玉华^{2*} 徐跃峤³ 卢文鹏² 周川¹ 玉壮¹

(¹雄安宣武医院神经外科, 雄安新区 070001; ²河北医科大学第二医院神经外科, 石家庄 050000;

³首都医科大学宣武医院神经外科, 北京 100053)

摘要 该文旨在探究长链非编码RNA(LncRNA) FGD5反义RNA1(FGD5-AS1)调控微小RNA-3163(miR-3163)/冠层成纤维细胞生长因子信号调节因子2(*CNPY2*)轴对脑胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响。qRT-PCR检测正常星形胶质细胞和胶质瘤细胞U87、LN229、U251中LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、*CNPY2* mRNA表达量;将U87细胞分为对照(NC)组、sh-NC组、sh-FGD5-AS1组、sh-FGD5-AS1+anti-NC组、sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163组、miR-NC组、miR-3163 mimic组、miR-3163 mimic+OE-NC组、miR-3163 mimic+OE-*CNPY2*组。通过克隆形成实验和流式细胞术分别检测细胞增殖和凋亡情况;Western blot检测细胞中*CNPY2*、细胞周期蛋白D1(CCND1)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达量;RNA免疫共沉淀(RIP)和双荧光素酶实验检测LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、*CNPY2*的靶向关系。与正常星形胶质细胞相比,LncRNA FGD5-AS1、*CNPY2* mRNA表达量在U87、LN229、U251细胞中显著升高,miR-3163表达量在U87、LN229、U251细胞中显著降低($P<0.05$),其中U87细胞的三指标变化趋势最为明显;与sh-NC组或miR-NC组相比,sh-FGD5-AS1组或miR-3163 mimic组集落形成数量以及*CNPY2*和CCND1蛋白表达量显著降低,细胞凋亡率、Bax蛋白表达量显著升高($P<0.05$);与sh-FGD5-AS1+anti-NC组或miR-3163 mimic+OE-NC组相比,sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163组或miR-3163 mimic+OE-*CNPY2*组集落形成数量以及*CNPY2*、CCND1蛋白表达量显著升高,细胞凋亡率、Bax蛋白表达量显著降低($P<0.05$);RIP实验和双荧光素酶实验均表明miR-3163与LncRNA FGD5-AS1、*CNPY2*存在靶向关系($P<0.05$)。敲降LncRNA FGD5-AS1可通过上调miR-3163表达,进而靶向下调*CNPY2*表达,从而抑制脑胶质瘤细胞增殖并促进其凋亡。

关键词 脑胶质瘤; LncRNA FGD5-AS1; miR-3163/*CNPY2*轴; 增殖; 凋亡

The Effects of FGD5-AS1 on the Proliferation and Apoptosis of Glioma Cells by Regulating the miR-3163/*CNPY2* Axis

YANG Jiao¹, HU Yuhua^{2*}, XU Yueqiao³, LU Wenpeng², ZHOU Chuan¹, YU Zhuang¹

(¹Department of Neurosurgery, Xiong'an Xuanwu Hospital, Xiong'an New Area 070001, China;

²Department of Neurosurgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

³Department of Neurosurgery, Xuanwu Hospital Capital Medical University, Beijing 100053, China)

Abstract This study aims to investigate the effects of the LncRNA (long non-coding RNA) FGD5-AS1 (FGD5 antisense RNA 1) on the proliferation and apoptosis of glioma cells by regulating the miR-3163 (microRNA-3163)/*CNPY2* (canopy FGF signaling regulator 2) axis. The expression levels of LncRNA FGD5-AS1, miR-

收稿日期: 2025-12-18

接受日期: 2026-02-09

河北省自然科学基金(批准号: H2023206260)资助的课题

*通信作者。Tel: 0311-66003921, E-mail: huyuhua2000@163.com

Received: December 18, 2025

Accepted: February 9, 2026

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (Grant No.H2023206260)

*Corresponding author. Tel: +86-311-66003921, E-mail: huyuhua2000@163.com

3163, and *CNPY2* mRNA in normal human astrocytes and glioma cells (U87, LN229, U251) were detected by qRT-PCR. U87 cells were divided into the following groups: control (NC) group, sh-NC group, sh-FGD5-AS1 group, sh-FGD5-AS1+anti-NC group, sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163 group, miR-NC group, miR-3163 mimic group, miR-3163 mimic+OE-NC group, and miR-3163 mimic+OE-*CNPY2* group. Cell proliferation and apoptosis were assessed by colony formation assay and flow cytometry, respectively. The protein expression levels of *CNPY2*, *CCND1*, and Bax were measured by Western blot. The targeting relationships among LncRNA FGD5-AS1, miR-3163, and *CNPY2* were verified by RIP (RNA immunoprecipitation) and dual-luciferase reporter assays. Compared with normal human astrocytes, the expression levels of LncRNA FGD5-AS1 and *CNPY2* mRNA were significantly increased in U87, LN229, and U251 cells, while miR-3163 expression was significantly decreased ($P<0.05$). Among these, U87 cells showed the most pronounced changes in all three indicators. Compared with the sh-NC group or miR-NC group, the sh-FGD5-AS1 group or miR-3163 mimic group exhibited significantly reduced colony formation numbers and *CNPY2* and *CCND1* protein expression levels, along with significantly increased apoptosis rates and Bax protein expression levels ($P<0.05$). Compared with the sh-FGD5-AS1+anti-NC group or miR-3163 mimic+OE-NC group, the sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163 group or miR-3163 mimic+OE-*CNPY2* group showed significantly increased colony formation numbers and *CNPY2* and *CCND1* protein expression levels, as well as significantly decreased apoptosis rates and Bax protein expression levels ($P<0.05$). RIP and dual-luciferase reporter assays confirmed the targeting relationships between miR-3163 and LncRNA FGD5-AS1, as well as between miR-3163 and *CNPY2* ($P<0.05$). Knockdown of LncRNA FGD5-AS1 can inhibit glioma cell proliferation and promote apoptosis by upregulating miR-3163 and downregulating *CNPY2*.

Keywords glioma; LncRNA FGD5-AS1; miR-3163/*CNPY2* axis; proliferation; apoptosis

脑胶质瘤作为成人中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,其发病率显著高于其他类型的原发性中枢神经系统恶性肿瘤,约占全部恶性病例的80%^[1]。其中,高级别胶质母细胞瘤因其显著的化疗耐药性和高复发率等特征,导致患者预后极差,生存质量严重受损^[2]。临床数据显示,即使采用手术切除联合化疗等综合治疗手段,患者的中位生存期仍难以突破15个月^[3]。这一现状凸显了开发新型分子标志物与精准靶向治疗策略的迫切性,同时也彰显了其在改善患者生存预后方面的重要意义。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)作为一类重要的表观遗传调控分子,已被广泛证实参与恶性肿瘤发生发展的多环节调控过程^[4]。近年来研究进一步指出, LncRNA通过其精确的时空表达调控,在肿瘤的发生与发展中扮演着关键的顺式或反式调控角色,而这一过程与染色质层面的功能增强子连接组的异常重构密切相关,这为非编码RNA在胶质瘤等复杂疾病中的作用提供了新的视角^[5]。FGD5反义RNA1(FGD5 antisense RNA 1, FGD5-AS1)转录自*FGD5*基因的反义链,有研究指出其在癌症发生过程中发挥重要调控作用。在脑胶质瘤组织中, LncRNA

FGD5-AS1显著高表达,然而沉默其表达后,癌细胞增殖、迁移和侵袭均受到显著抑制^[6]。近期研究揭示,肿瘤微环境存在动态变化,如神经元与胶质瘤细胞间形成的异常突触活动可作为驱动肿瘤增殖的关键外在因素^[7],提示FGD5-AS1等分子可能参与肿瘤细胞内在信号通路与外部微环境间的复杂交互网络。微小RNA-3163(microRNA-3163, miR-3163)是具有调控功能的非编码小RNA,通过靶向特定mRNA参与多种疾病的发生发展过程^[8]。有研究指出,与正常细胞相比,在结直肠癌细胞中miR-3163表达量显著降低,敲除序列相似性家族201成员A(family with sequence similarity 201 member A, *FAM201A*)可通过上调miR-3163表达靶向调控结肠癌转移相关基因1(metastasis-associated in colon cancer 1, *MACC1*)表达,从而抑制癌细胞的生长与干性,并增强其化疗敏感性^[9]。冠层成纤维细胞生长因子信号调节因子2(canopy FGF signaling regulator 2, *CNPY2*)是冠层家族的一员,在多种组织中广泛表达,参与调节多发性恶性肿瘤的恶性生物学行为^[10]。在神经胶质瘤研究中,上调miR-30e-3p可通过靶向下调*CNPY2*抑制细胞增殖,并促进其凋亡^[11]。本研究前期经starBase数据库预测发现, miR-

3163与LncRNA FGD5-AS1和CNPY2均存在结合位点,同时基于以上研究现状,推测LncRNA FGD5-AS1可能通过调控miR-3163/CNPY2轴在脑胶质瘤发展过程中发挥调控作用。因此,本研究旨在探究LncRNA FGD5-AS1在脑胶质瘤中的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

人胶质瘤细胞U87(货号:HT-X1726)、LN229(货号:HTX2762)、U251(货号:HT-X1725)以及正常人星形胶质细胞(normal human astrocyte, NHA)(货号:HT-X2408)均购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

LncRNA FGD5-AS1干扰质粒(sh-FGD5-AS1)及对照(sh-NC)、LncRNA FGD5-AS1野生/突变型(FGD5-AS1-WT/MUT)质粒、miR-3163模拟物(miR-3163 mimic)及对照(miR-NC)、反义miR-3163(anti-miR-3163)及对照(anti-NC)、CNPY2过表达质粒(OE-CNPY2)及对照(OE-NC)、CNPY2野生/突变型(CNPY2-WT/MUT)质粒均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;RNA提取试剂盒(货号:XY0232)购自上海信裕生物科技有限公司;miRNA反转录试剂盒(货号:11148ES10)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;通用性反转录试剂盒(货号:RR092A)购自TaKaRa公司;荧光定量PCR试剂盒(货号:QP078)购自艾美捷科技有限公司;Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(货号:KGA1102)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;CNPY2、细胞周期蛋白D1(cyclin D1, CCND1)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、GAPDH一抗及HRP标记的二抗(货号:66173-1-Ig、60186-1-Ig、60267-1-Ig、60004-1-Ig、SA00001-1)购自武汉三鹰生物技术有限公司;双荧光素酶活性检测试剂盒(货号:BTN130595-NFO)购自北京百奥莱博科技有限公司;

RNA免疫沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)试剂盒(货号:Bes5101)购自广州伯信生物科技有限公司。

1.3 qRT-PCR实验

使用试剂盒从培养的细胞中提取总RNA,经NanoDrop分光光度计测定 D_{260}/D_{280} 值,确认RNA纯度后,采用试剂盒进行反转录合成cDNA。随后,使用荧光定量PCR试剂盒在ABI 7500型实时荧光定量PCR系统上进行qRT-PCR扩增(反应体系:10 μ L SYBR Green Master Mix、2 μ L cDNA模板及上下游引物各0.4 μ L,加ddH₂O至20 μ L。扩增程序:95 $^{\circ}$ C预变性2 min;随后95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火/延伸30 s, 40个循环)。实验采用表1所列的特异性引物,以U6或GAPDH作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达水平。

1.4 细胞培养及分组处理

取U87细胞以 2×10^5 /皿的密度接种于培养皿中,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的恒温培养箱中常规培养。培养期间每2~3天更换1次新鲜培养基,密切观察细胞生长状态。待细胞生长至80%汇合度时,弃去培养液,加入0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液,于37 $^{\circ}$ C消化约1~2 min,在显微镜下观察到细胞变圆脱落时立即加入含10%胎牛血清的完全培养液终止消化,吹打制成单细胞悬液后按1:3比例传代。取3代内生长状态稳定的细胞用于后续实验研究。将生长状态良好的U87细胞分为对照(NC)组、sh-NC组、sh-FGD5-AS1组、sh-FGD5-AS1+anti-NC组、sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163组、miR-NC组、miR-3163 mimic组、miR-3163 mimic+OE-NC组、miR-3163 mimic+OE-CNPY2组。转染前24 h,将U87细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于6孔板中,使转染当天细胞汇合度达到70%~80%。按照Lipofectamine 3000转染试剂说明书制备转染复合物:将上述1.2中质粒与P3000试剂共同加入Opti-MEM培养基中,同时将Lipofectamine 3000试剂稀释于Opti-MEM培养基中。将上述两种稀释液轻轻混合,

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因 Gene	正向引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
LncRNA FGD5-AS1	TCA TGC CTG TAA TCC CAG CA	TCT GCC TCC CGA GTT CAA AT
miR-3163	GCC GAG TAT AAA ATG AGG GCA	CTC AAC TGG TGT CGT GGA
CNPY2	CAA ACT ACA GGT CCC AGG ATA G	CAC AGG AAA CTA CAT CTC CCA
U6	CTC GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT	ACG CTT CAC GAA TTT GCG TGT C
GAPDH	CTG GGC TAC ACT GAG CAC C	AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG

室温孵育15 min,以形成转染复合物。将复合物逐滴加入细胞孔中,轻轻摇匀,转染6 h后更换为新鲜完全培养液。除NC组外,其余各组均转染相应质粒48 h后收集细胞以进行后续检测。

1.5 克隆形成实验检测细胞增殖情况

各组U87细胞以相同密度(1×10^3 /孔)接种于6孔板,在37℃、5% CO₂条件下持续培养14天,期间每48~72 h更换1次新鲜培养基以维持营养供应。培养终止后,采用1 mL 4%多聚甲醛于室温固定20~30 min,固定完成后,弃去固定液,用PBS洗涤2次,每次2 min。随后每孔加入500 μL 0.1%结晶紫染色液,于室温避光染色20~30 min。染色完成后,弃去染色液,用流水缓慢冲洗多余染料,直至背景清晰。将培养板倒置于吸水纸上自然晾干,最后通过倒置显微镜观察细胞并计数。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况

各组U87细胞经胰酶于37℃消化后,收集细胞悬液,于4℃、1 000 r/min离心5 min,弃上清。用预冷的PBS洗涤细胞1次,再次于4℃、1 000 r/min离心5 min。弃上清后,用1× Annexin V结合缓冲液重悬细胞,调整细胞密度至 1×10^6 /mL。避光条件下依次加入5 μL Annexin V-FITC,室温下孵育15 min;之后加入5 μL PI染液,于室温避光孵育5 min,反应终止后立即上机检测。通过流式细胞术分析,以Annexin V-FITC⁺/PI⁻为早期凋亡细胞,Annexin V-FITC⁺/PI⁺为晚期凋亡/坏死细胞,计算总凋亡率(早期+晚期)。

1.7 Western blot实验检测CNPY2、CCND1、Bax蛋白表达量

将收集的各组U87细胞加入RIPA裂解缓冲液裂解获取总蛋白,并在SDS-PAGE上分离蛋白。之后,将它们转移到PVDF膜上,将PVDF膜置于含5%脱脂牛奶的TBST封闭液中,于室温摇床上封闭1~2 h。洗涤后,在4℃下与CNPY2、CCND1、Bax一抗(1:1 000稀释)孵育过夜。之后,用HRP标记的二抗(1:2 000稀释)室温孵育膜2 h。最后,通过ECL系统观察蛋白条带,并使用ImageJ软件量化条带灰度值。

1.8 LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、CNPY2靶向关系验证

RIP实验:首先在RIP裂解缓冲液中处理细胞,然后按照试剂盒步骤操作。最后处理与AGO2抗体或对照IgG抗体结合的磁珠以收集免疫沉淀物,并进行qRT-PCR分析。

双荧光素酶实验:将存在与miR-3163互补结合位点的FGD5-AS1/CNPY2野生型(WT)及其对应突变型(MUT)序列,分别克隆至pmirGLO报告载体中。随后,按照Lipofectamine 3000转染试剂说明书进行共转染:每孔加入500 ng报告质粒(FGD5-AS1-WT/MUT或CNPY2-WT/MUT)及50 nmol/L miR-3163 mimic或miR-NC,将其分别稀释于50 μL Opti-MEM培养基中;另取1.5 μL Lipofectamine 3000稀释于50 μL Opti-MEM中。将二者混匀静置后,室温孵育15~20 min形成转染复合物,将其逐滴加入细胞孔中,轻轻摇匀。转染6 h后更换为新鲜完全培养液。继续培养48 h后,弃去培养液,用PBS洗涤细胞1次。每孔加入100 μL裂解缓冲液,于室温摇床上裂解15 min。收集裂解液,按照双荧光素酶检测试剂盒说明书,在多功能酶标仪或化学发光检测仪上依次测定萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性。以海肾荧光素酶活性为内参。

1.9 统计分析

采用GraphPad Prism 9.0软件对数据进行分析,采用Shapiro-Wilk检验对数据进行正态分布检验,服从正态分布的计量资料表示为平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)。通过t检验进行两组间比较;通过单因素方差分析进行多组间比较,采用Levene检验对数据方差齐性进行检验,方差齐的数据进一步两两比较采用SNK-*q*法。当 $P < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

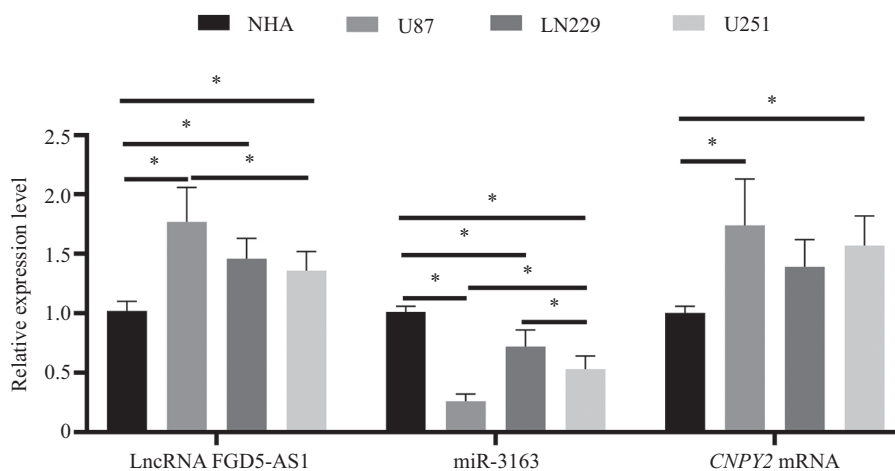
2 结果

2.1 胶质瘤细胞中LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、CNPY2 mRNA表达量

与NHA相比,LncRNA FGD5-AS1、CNPY2 mRNA表达量在U87、LN229、U251中显著升高,miR-3163表达量在U87、LN229、U251中显著降低($P < 0.05$),其中U87细胞三指标变化趋势最为明显。具体结果见图1。

2.2 敲降LncRNA FGD5-AS1对miR-3163的影响

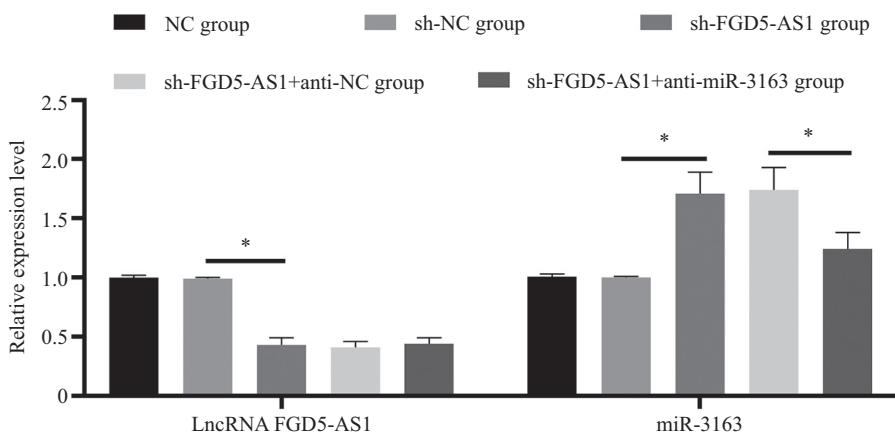
sh-NC组与NC组相比,细胞中LncRNA FGD5-AS1、miR-3163表达量无明显变化($P > 0.05$);与sh-NC组相比,sh-FGD5-AS1组细胞中LncRNA FGD5-AS1表达量显著降低,miR-3163表达量显著升高($P < 0.05$);sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163组与sh-FGD5-AS1+anti-NC组相比,细胞中LncRNA FGD5-AS1表达量无明显变化($P > 0.05$),miR-3163表达量显



$n=6$, * $P<0.05$.

图1 各胶质瘤细胞中LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、*CNPY2* mRNA表达量

Fig.1 Expression levels of LncRNA FGD5-AS1, miR-3163, and *CNPY2* mRNA in various glioma cells



$n=6$, * $P<0.05$.

图2 各组U87细胞中LncRNA FGD5-AS1、miR-3163表达量

Fig.2 Expression levels of LncRNA FGD5-AS1 and miR-3163 in U87 cells of each group

著降低($P<0.05$), 具体结果见图2。

2.3 敲降LncRNA FGD5-AS1对U87细胞增殖、凋亡的影响

与NC组相比, sh-NC组集落形成数量、细胞凋亡率均无明显差异($P>0.05$); 与sh-NC组相比, sh-FGD5-AS1组集落形成数量明显降低, 细胞凋亡率显著升高($P<0.05$); 与sh-FGD5-AS1+anti-NC组相比, sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163组集落形成数量显著升高, 细胞凋亡率显著降低($P<0.05$), 具体结果见图3和图4。

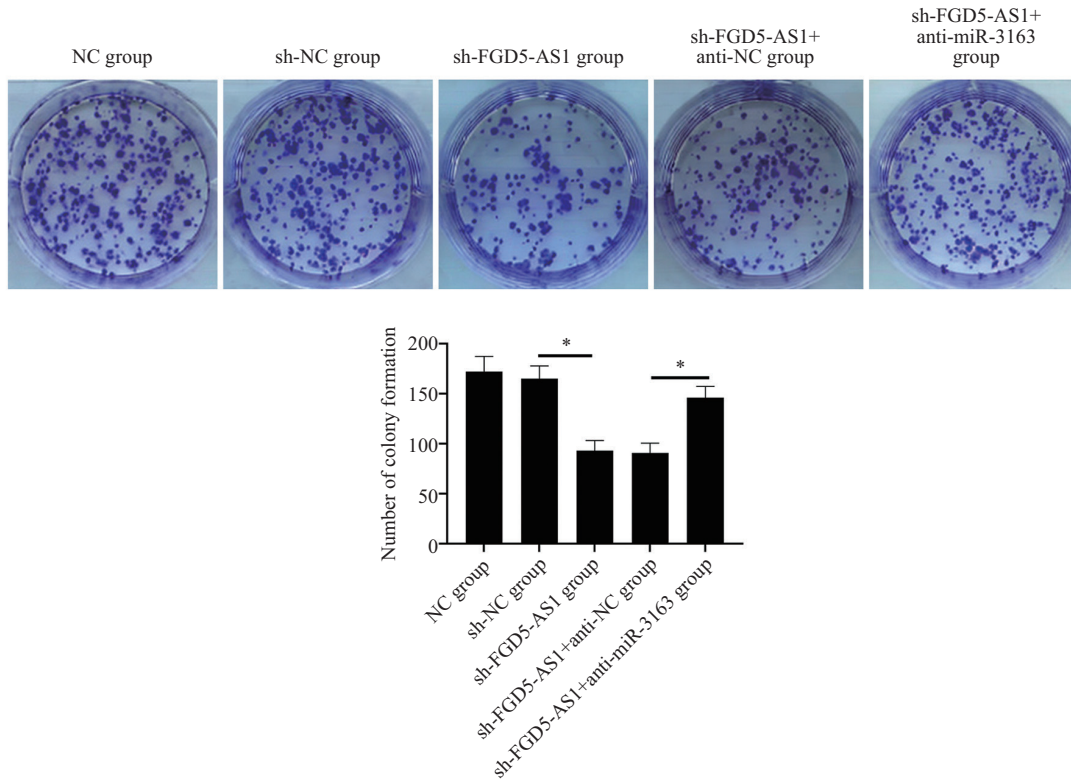
2.4 敲降LncRNA FGD5-AS1对U87细胞中*CNPY2*、*CCND1*、Bax蛋白表达量的影响

sh-NC组与NC组相比, 细胞中*CNPY2*、*CCND1*、Bax蛋白表达量无明显差异($P>0.05$); sh-FGD5-AS1组与sh-NC组相比, 细胞中*CNPY2*、*CCND1*蛋白表

达量显著降低, Bax蛋白表达量显著升高($P<0.05$); sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163组与sh-FGD5-AS1+anti-NC组相比, 细胞中*CNPY2*、*CCND1*蛋白表达量显著升高, Bax蛋白表达量显著降低($P<0.05$), 具体结果见图5。

2.5 过表达miR-3163对*CNPY2*的影响

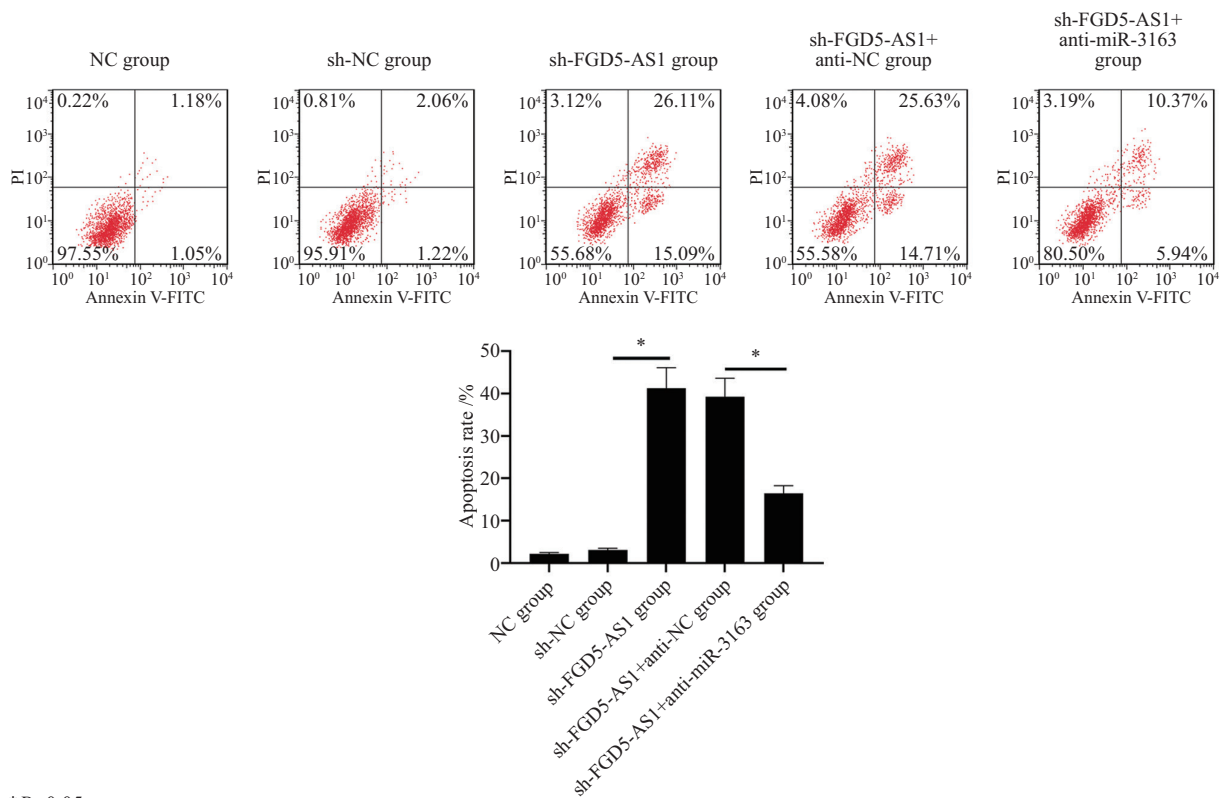
与NC组相比, miR-NC组细胞中miR-3163、*CNPY2* mRNA表达量无明显差异($P>0.05$); 与miR-NC组相比, miR-3163 mimic组细胞中miR-3163表达量显著升高, *CNPY2* mRNA表达量显著降低($P<0.05$); 与miR-3163 mimic+OE-NC组相比, miR-3163 mimic+OE-*CNPY2*组细胞中miR-3163表达量无明显变化($P>0.05$), *CNPY2* mRNA表达量显著升高($P<0.05$), 具体结果见图6。



n=6, *P<0.05.

图3 克隆形成实验检测各组U87细胞增殖能力

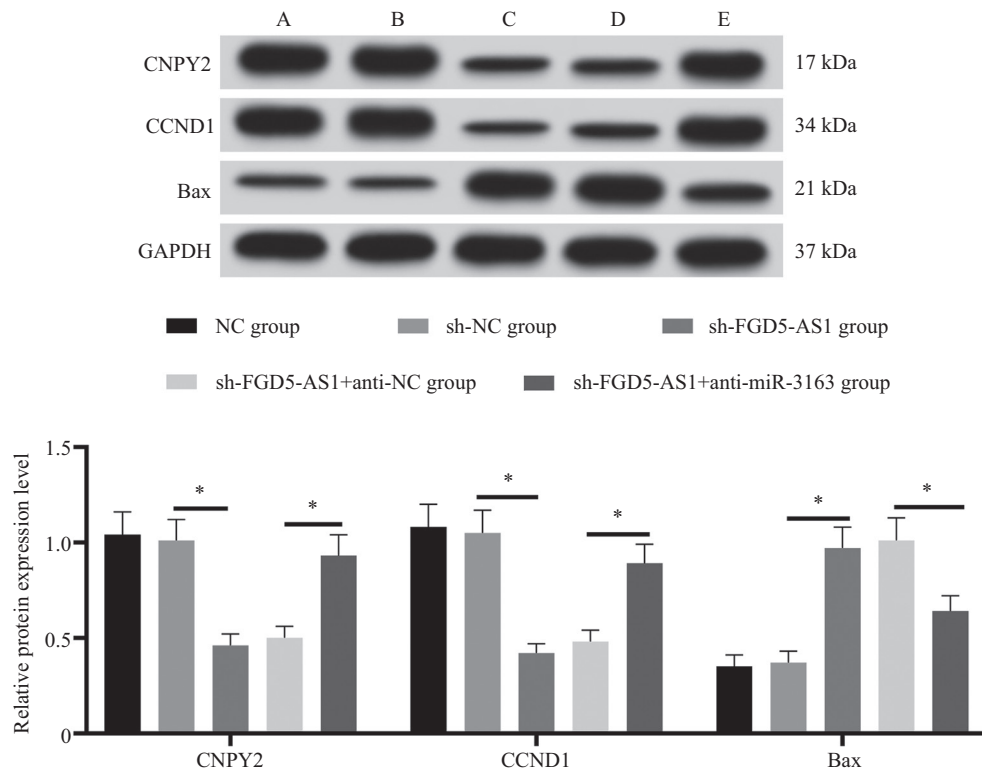
Fig.3 Clone formation assay for detecting the proliferation ability of U87 cells in each group



n=6, *P<0.05.

图4 流式细胞术检测各组U87细胞凋亡情况

Fig.4 Flow cytometry detection of U87 cell apoptosis in each group

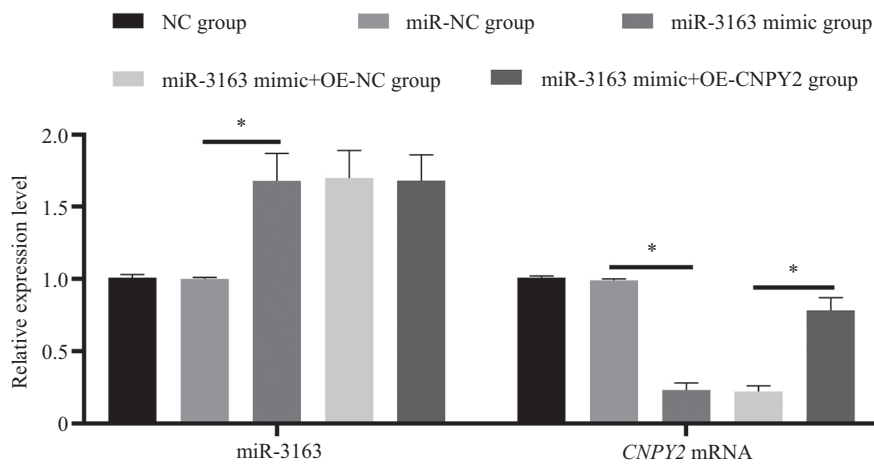


A: NC组; B: sh-NC组; C: sh-FGD5-AS1组; D: sh-FGD5-AS1+anti-NC组; E: sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163组。n=6, *P<0.05。

A: NC group; B: sh-NC group; C: sh-FGD5-AS1 group; D: sh-FGD5-AS1+anti-NC group; E: sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163 group. n=6, *P<0.05.

图5 Western blot实验检测各组U87细胞中CNPY2、CCND1、Bax蛋白表达情况

Fig.5 Western blot assay was used to detect the expression of CNPY2, CCND1, and Bax proteins in U87 cells of each group



n=6, *P<0.05.

图6 各组U87细胞中miR-3163、CNPY2 mRNA表达量

Fig.6 Expression levels of miR-3163 and CNPY2 mRNA in U87 cells of each group

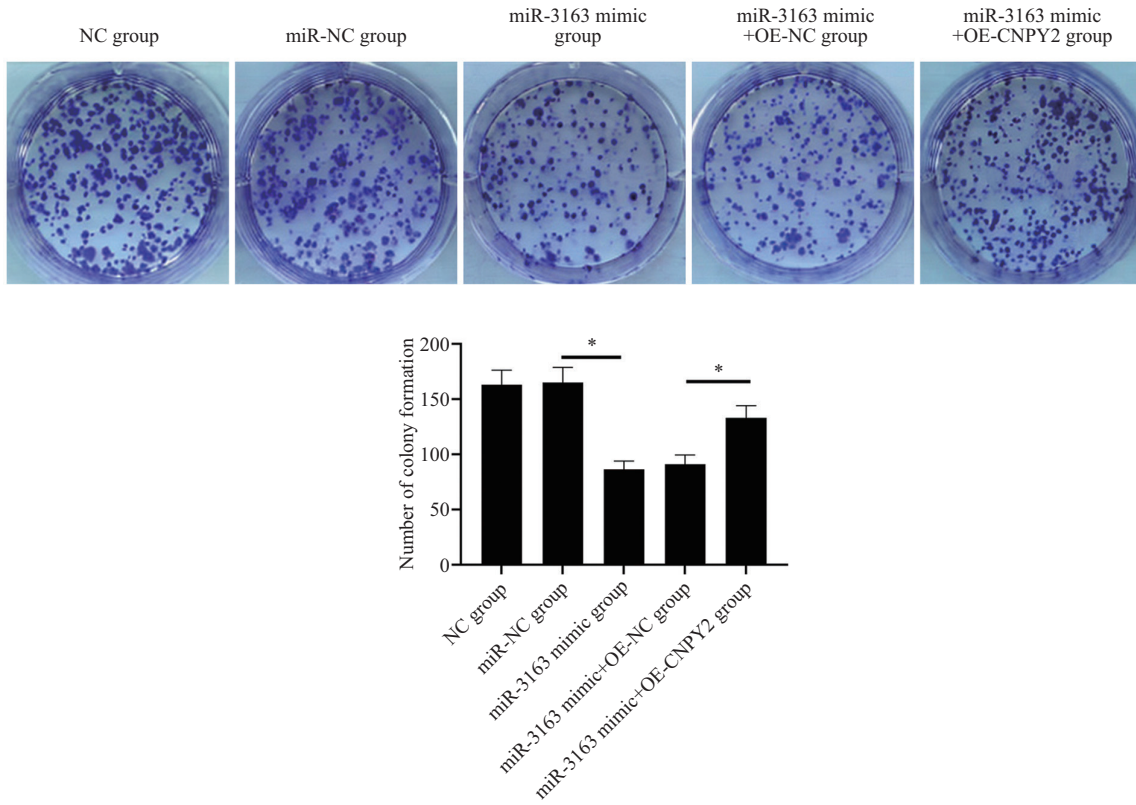
2.6 过表达miR-3163对U87细胞增殖、凋亡的影响

miR-NC组与NC组相比, 集落形成数量和细胞凋亡率均无显著差异(P>0.05); miR-3163 mimic组与miR-NC组相比, 集落形成数量显著降低, 细胞凋亡率显著升高(P<0.05); miR-3163 mimic+OE-CNPY2组与miR-3163 mimic+OE-NC组相比, 集落形成数量显著升高,

细胞凋亡率显著降低(P<0.05), 具体结果见图7和图8。

2.7 过表达miR-3163对U87细胞中CNPY2、CCND1、Bax蛋白表达量的影响

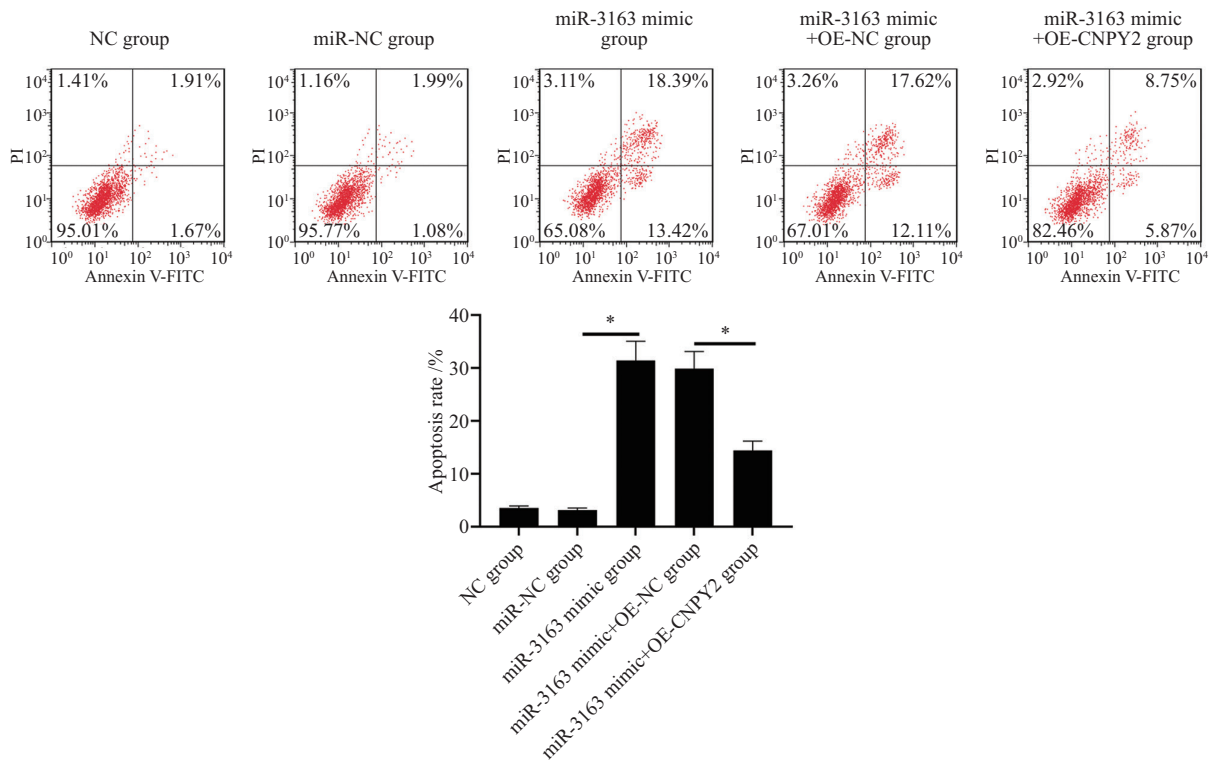
与NC组相比, miR-NC组细胞中CNPY2、CCND1、Bax蛋白表达量无显著变化(P>0.05); 与miR-NC组相比, miR-3163 mimic组细胞中CNPY2、



n=6, *P<0.05.

图7 克隆形成实验检测各组U87细胞增殖能力

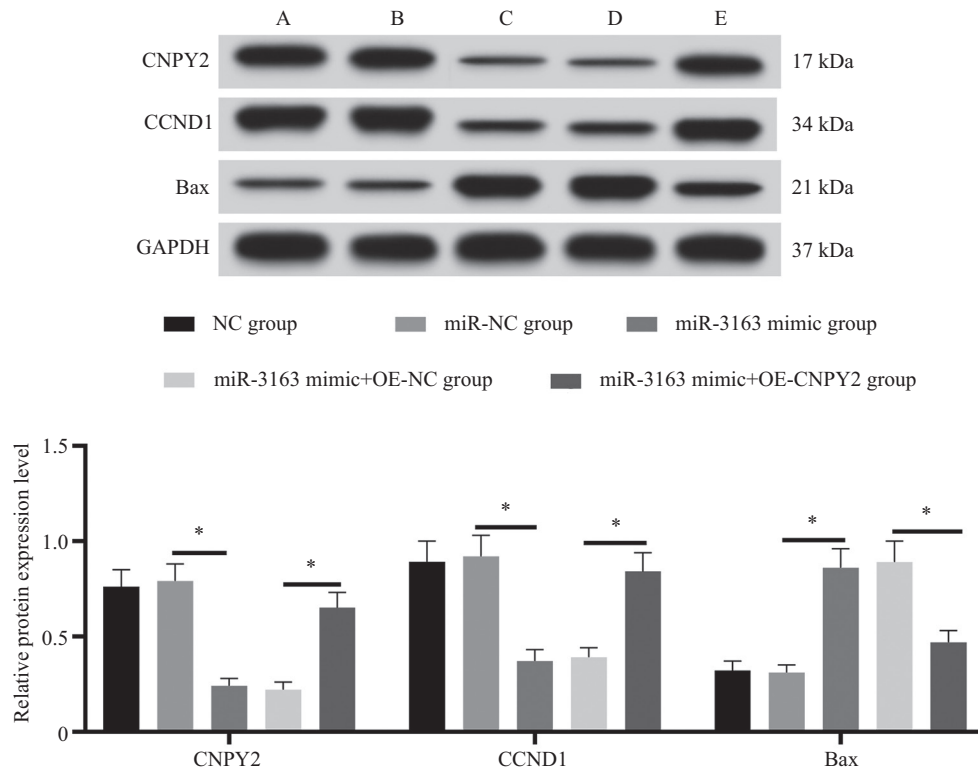
Fig.7 Clone formation experiment detected the proliferation ability of U87 cells in each group



n=6, *P<0.05.

图8 流式细胞术检测各组U87细胞凋亡情况

Fig.8 Flow cytometry detection of U87 cell apoptosis in each group



A: NC组; B: miR-NC组; C: miR-3163 mimic组; D: miR-3163 mimic+OE-NC组; E: miR-3163 mimic+OE-CNPNY2组。n=6, *P<0.05。

A: NC group; B: miR-NC group; C: miR-3163 mimic group; D: miR-3163 mimic+OE-NC group; E: miR-3163 mimic+OE-CNPNY2 group. n=6, *P<0.05.

图9 Western blot实验检测各组U87细胞中CNPNY2、CCND1、Bax蛋白表达情况

Fig.9 Western blot detected the expression of CNPNY2, CCND1 and Bax proteins in U87 cells of each group

CCND1蛋白表达量显著降低, Bax蛋白表达量显著升高($P<0.05$); 与miR-3163 mimic+OE-NC组相比, miR-3163 mimic+OE-CNPNY2组细胞中CNPNY2、CCND1蛋白表达量显著升高, Bax蛋白表达量显著降低($P<0.05$), 具体结果见图9。

2.8 LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、CNPNY2靶向关系验证

生信预测结果显示, miR-3163与LncRNA FGD5-AS1、CNPNY2存在结合位点, 见图10。RIP实验结果显示: 与anti-IgG组相比, anti-AGO2组富集物中LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、CNPNY2表达量均显著升高($P<0.05$), 具体结果见图11A。双荧光素酶实验结果显示: 与miR-NC+FGD5-AS1-WT组相比, miR-3163 mimic+FGD5-AS1-WT组双荧光素酶活性显著降低($P<0.05$), 与miR-NC+FGD5-AS1-MUT组相比, miR-3163 mimic+FGD5-AS1-MUT组双荧光素酶活性无显著差异($P>0.05$); 与miR-NC+CNPNY2-WT组相比, miR-3163 mimic+CNPNY2-WT组双荧光素酶活性显著降低($P<0.05$), 与miR-NC+CNPNY2-MUT组相比, miR-3163 mimic+CNPNY2-

MUT组双荧光素酶活性无显著变化($P>0.05$), 具体结果见图11B和图11C。

2.9 普适性验证

在LN229细胞中, 与NC组比较, sh-NC组集落形成数量及细胞凋亡率无显著变化($P>0.05$); 与sh-NC组比较, sh-FGD5-AS1组集落形成数量显著降低, 细胞凋亡率显著升高($P<0.05$); 与sh-FGD5-AS1+anti-NC组比较, sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163组集落形成数量显著升高, 细胞凋亡率显著降低($P<0.05$), 具体结果见图12和图13。

Western blot结果显示: 与NC组比较, sh-NC组LN229细胞中CNPNY2蛋白表达量无明显变化($P>0.05$); 与sh-NC组比较, sh-FGD5-AS1组LN229细胞中CNPNY2蛋白表达量显著降低($P<0.05$); 与sh-FGD5-AS1+anti-NC组比较, sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163组LN229细胞中CNPNY2蛋白表达量显著升高($P<0.05$), 具体结果见图14。

3 讨论

脑胶质瘤是一种生长迅速, 具有高侵袭性和致

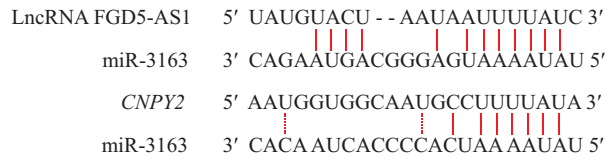
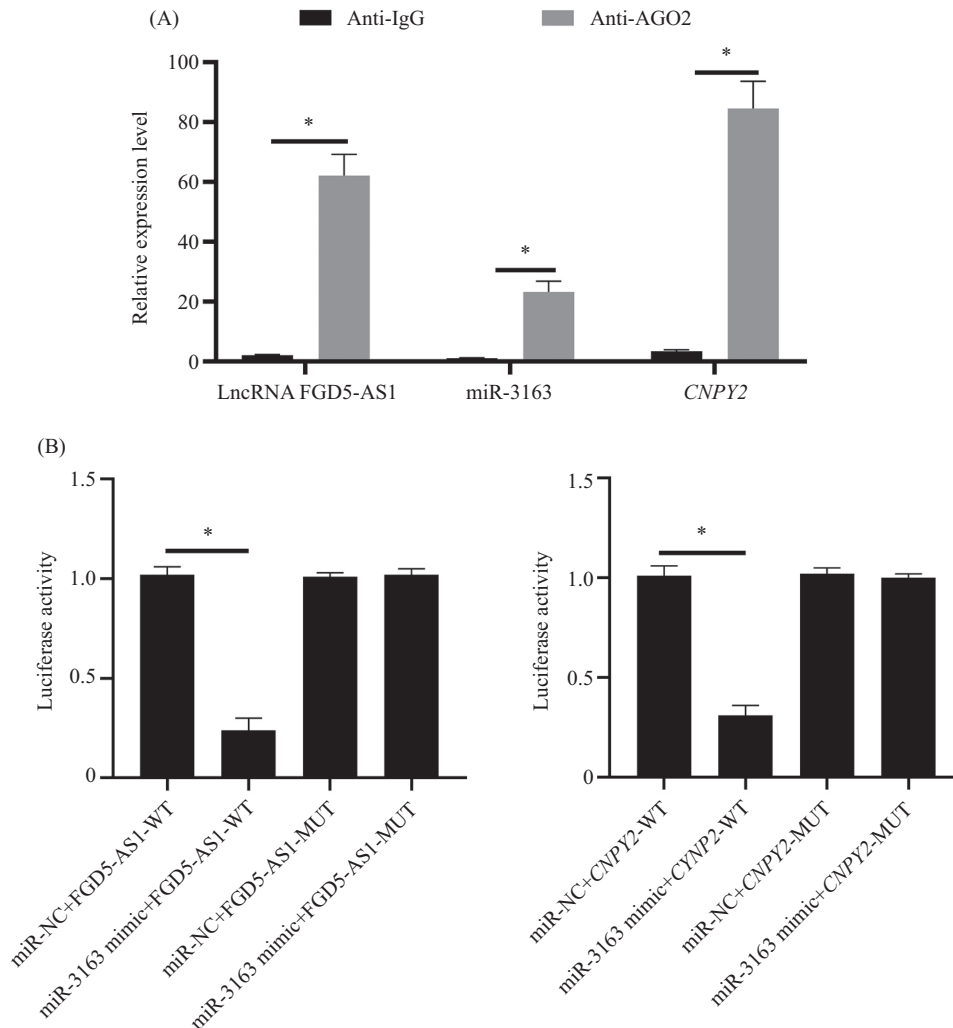


图10 miR-3163与LncRNA FGD5-AS1、CNPY2的具体结合位点

Fig.10 Specific binding sites of miR-3163 with LncRNA FGD5-AS1 and CNPY2



A: RIP实验检测富集物中LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、CNPY2表达量; B: 双荧光素酶实验验证LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、CNPY2靶向关系。n=6, *P<0.05。

A: RIP experiment was used to detect the expression levels of LncRNA FGD5-AS1, miR-3163, and CNPY2 in the enriched materials; B: dual luciferase assay was used to verify the targeting relationship between LncRNA FGD5-AS1, miR-3163, and CNPY2. n=6, *P<0.05.

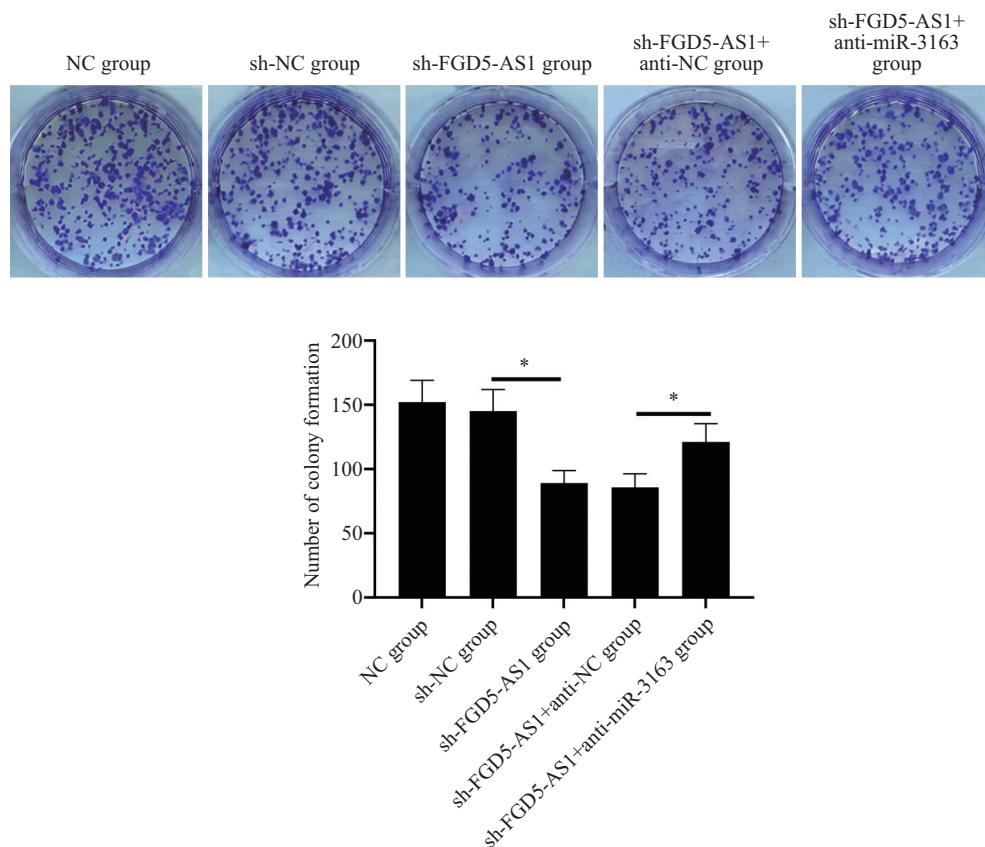
图11 LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、CNPY2靶向关系验证

Fig.11 Validation of the targeting relationships among LncRNA FGD5-AS1, miR-3163, and CNPY2

死性的脑部恶性肿瘤^[12]。目前,脑胶质瘤的临床标准治疗方案主要采用手术切除联合放化疗的综合治疗模式。然而,该治疗策略面临多重挑战:首先,肿瘤浸润性生长的特性导致手术难以完全清除病灶;其次,血脑屏障的存在严重降低了化疗药物的递送效率;再次,肿瘤的高度异质性和易复发性进一步削

弱了治疗效果^[13]。基于此,开发具有广谱抗肿瘤活性、高效递送特性和良好安全性的新型治疗策略,已成为当前胶质瘤研究领域的重点攻关方向。

LncRNA不仅调节基因表达并参与信号转导途径,还调节表观遗传、转录和转录后修饰,其表达水平与多种生物学功能(包括细胞存活、癌症进展和转



$n=6$, $*P<0.05$.

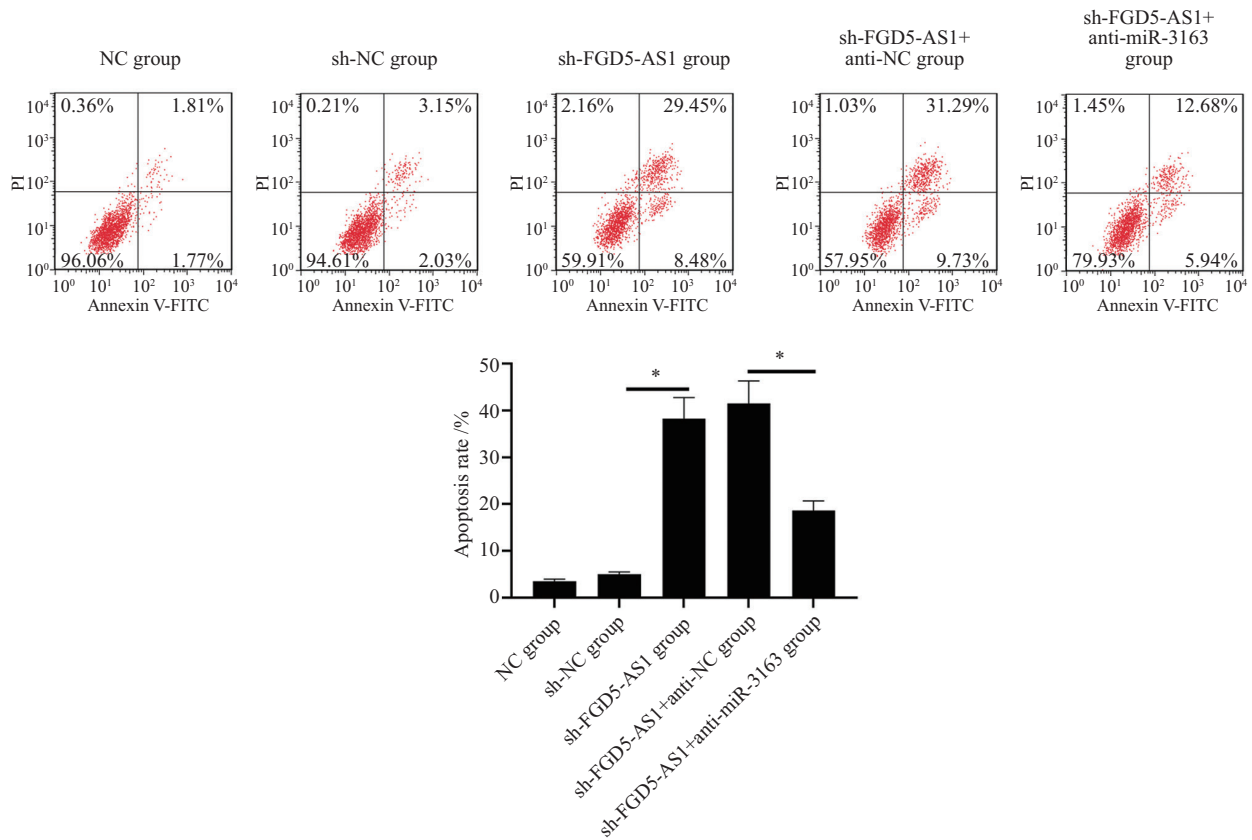
图12 克隆形成实验检测各组LN229细胞增殖能力

Fig.12 Clone formation assay for detecting the proliferation ability of LN229 cells in each group

移)密切相关^[14]。近年来研究表明, LncRNA表达水平异常与胶质瘤的病理和预后密切相关^[15]。LncRNA LPP-AS2可通过调控 miR-7-5p/EGFR/PI3K/AKT/c-MYC反馈回路促进脑胶质瘤细胞增殖、侵袭, 促进肿瘤增长^[14]。LncRNA KB-1460A1.5可通过调控 miR-130a-3p/TSC1/mTOR/YY1反馈回路抑制癌细胞增殖、迁移和侵袭, 从而延缓脑胶质瘤进程^[16]。同时, 也有研究已指出 LncRNA FGD5-AS1作为促癌基因调控脑胶质瘤进展^[6]。以上结论与本研究结果一致, 本研究结果显示, 在脑胶质瘤细胞中 LncRNA FGD5-AS1表达量显著上调, 当其被敲降后, 脑胶质瘤细胞增殖能力及增殖相关蛋白 CCND1表达量显著降低, 细胞凋亡率及促凋亡蛋白 Bax表达量显著升高, 提示敲降 LncRNA FGD5-AS1可通过抑制脑胶质瘤细胞增殖, 并促进其凋亡, 延缓脑胶质瘤发展进程。

有研究强调, miRNA通过充当癌基因或肿瘤抑制因子, 已成为多种恶性肿瘤发生发展的核心调控介质^[18]。已有研究表明, miR-3163在多种疾病中发挥调控作用, 影响疾病发展。在宫颈癌中, miR-3163

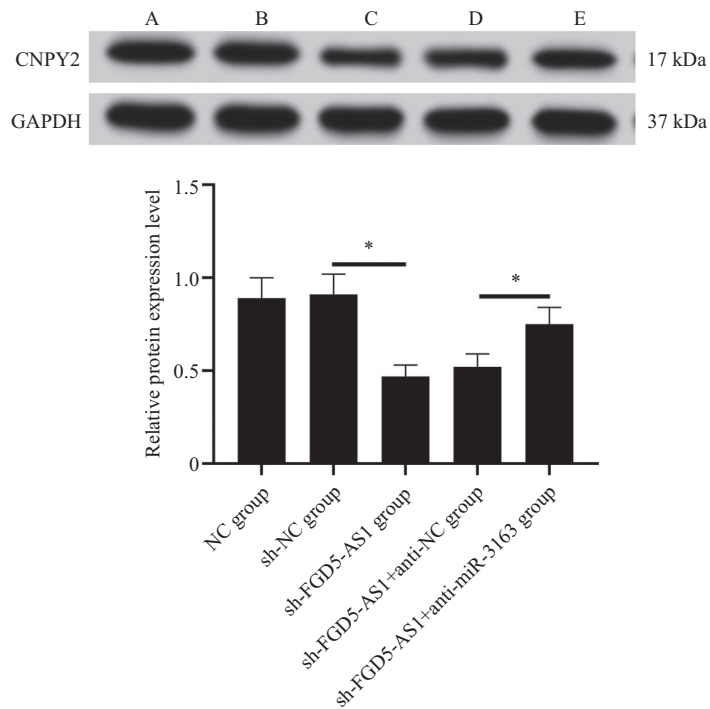
表达水平显著降低, 其过表达可通过靶向调控 LIM和SH3结构域蛋白1(LIM and SH3 domain protein 1, *LASPI*)表达, 显著抑制癌细胞增殖^[19]。过表达 miR-3163还可通过靶向 *SOX-2*抑制卵巢癌细胞增殖和干性^[8]。此外, miR-3163在肝癌中显著下调表达, 其可通过调控血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, *VEGFA*)抑制癌细胞增殖、转移和血管形成, 延缓肝癌发展^[20]。在本研究中, miR-3163在脑胶质瘤细胞中显著下调表达, 其过表达后, 脑胶质瘤细胞增殖能力、CCND1蛋白表达量明显降低, 细胞凋亡率、Bax蛋白表达量明显升高, 以上结果表明 miR-3163可抑制脑胶质瘤发展。另外, 在 LncRNA FGD5-AS1被敲降时, miR-3163表达量显著升高; 而在敲降 LncRNA FGD5-AS1基础上抑制 miR-3163时, 癌细胞恶性行为再次被激发。同时, 双荧光素酶实验结果证实 LncRNA FGD5-AS1与 miR-3163存在靶向关系。以上研究结果证明, 敲降 LncRNA FGD5-AS1对脑胶质瘤的抑制作用是通过调控 miR-3163实现的。



n=6, *P<0.05.

图13 流式细胞术检测各组LN229细胞凋亡情况

Fig.13 Flow cytometry detection of apoptosis in LN229 cells in each group



A: NC组; B: sh-NC组; C: sh-FGD5-AS1组; D: sh-FGD5-AS1+anti-NC组; E: sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163组. n=6, *P<0.05.

A: NC group; B: sh-NC group; C: sh-FGD5-AS1 group; D: sh-FGD5-AS1+anti-NC group; E: sh-FGD5-AS1+anti-miR-3163 group. n=6, *P<0.05.

图14 Western blot实验检测各组LN229细胞中CNPY2蛋白表达情况

Fig.14 Western blot assay for detecting CNPY2 protein expression in LN229 cells of each group

CNPY2作为一种新型血管生成调节因子,在多种病理生理过程中发挥重要作用。在肿瘤微环境中,CNPY2通过促进血管新生,为肿瘤组织提供充足的营养供应,从而支持肿瘤的生长和转移^[21]。CNPY2在胃癌细胞中显著高表达,其过表达可增强癌细胞增殖、迁移和侵袭能力^[22]。在肺腺癌中,过表达miR-30a-3p可通过下调CNPY2抑制癌细胞的增殖和迁移^[10]。在宫颈癌中,CNPY2显著上调表达,而对癌细胞进行缺氧诱导后,CNPY2可通过激活AKT通路促进糖酵解,从而推动疾病进展^[23]。本研究结果显示,与正常星形胶质细胞相比,在胶质瘤细胞中CNPY2 mRNA表达量显著升高,而LncRNA FGD5-AS1被敲降或miR-3163过表达后,脑胶质瘤细胞中CNPY2蛋白表达量显著降低。而在过表达miR-3163后进一步过表达CNPY2时,细胞增殖能力加强,凋亡率明显降低。同时,RIP实验结果显示与anti-IgG组相比,anti-AGO2组富集物中LncRNA FGD5-AS1、miR-3163、CNPY2表达量显著升高,表明三者共存于富集物中;且双荧光素酶实验结果显示miR-3163与CNPY2存在靶向关系。以上提示敲降LncRNA FGD5-AS1可通过调控miR-3163/CNPY2轴抑制脑胶质瘤进展。

本研究首次在胶质瘤中揭示了FGD5-AS1/miR-3163/CNPY2这一全新调控轴。除了核心靶点CNPY2外,生物信息学预测及初步实验提示,miR-3163还可能直接靶向细胞周期关键因子CCND1,从而协同抑制肿瘤增殖。这些靶点与CNPY2下游的PI3K/AKT等胶质瘤核心促生存通路存在广泛交叉对话,表明miR-3163通过一个多靶点调控网络发挥全局性抑癌效应,这为其作为潜在治疗靶标提供了更广阔的作用机制视角。

综上所述,敲降LncRNA FGD5-AS1可通过上调miR-3163表达,靶向下调CNPY2,进而抑制脑胶质瘤细胞增殖,并促进其凋亡,从而延缓脑胶质瘤发展进程。本研究首次系统阐明了LncRNA FGD5-AS1在脑胶质瘤中通过吸附miR-3163上调CNPY2表达的新机制(FGD5-AS1/miR-3163/CNPY2轴)。与现有文献相比,本研究的创新性主要体现在以下两方面。第一,发现了FGD5-AS1的一个全新下游靶点miR-3163,并率先在胶质瘤中证实了miR-3163的肿瘤抑制作用;第二,鉴定出了促癌因子CNPY2是该轴的关键终末效应分子,并利用RIP等实验验证了其竞争性

内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)调控环路。这一新轴的发现,不仅加深了人们对胶质瘤发生发展中非编码RNA网络复杂性的理解,更揭示了潜在的临床干预靶点:针对此轴开发FGD5-AS1抑制剂或miR-3163模拟物,可能为克服胶质瘤的增殖失控与治疗抵抗提供新策略。未来,进一步开展体内动物实验验证该轴的靶向治疗效果,并探索其表达谱与患者预后的关联,将推动该发现向临床转化迈进。

参考文献 (References)

- [1] ZHANG M Y, HUANG Y M, ZHANG Q, et al. The role of abnormal epigenetic regulation of small GTPases in glioma (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2025, 67(2): 63.
- [2] SU X D, XIE Y, ZHANG J W, et al. HIF- α activation by the prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat suppresses chemoresistant glioblastoma growth by inducing ferroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(10): 861.
- [3] QI D, LI J, QUARLES C C, et al. Assessment and prediction of glioblastoma therapy response: challenges and opportunities [J]. *Brain*, 2023, 146(4): 1281-98.
- [4] QIN S S, LIU Y, ZHANG X G, et al. LncRNA FGD5-AS1 is required for gastric cancer proliferation by inhibiting cell senescence and ROS production via stabilizing YBX1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 188.
- [5] BI J F, MO W P, LIU M, et al. Systematic decoding of functional enhancer connectomes and risk variants in human glioma [J]. *Nat Cell Biol*, 2025, 27(10): 1838-47.
- [6] SU D Q, JI Z G, XUE P F, et al. Long-noncoding RNA FGD5-AS1 enhances the viability, migration, and invasion of glioblastoma cells by regulating the miR-103a-3p/TPD52 axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 6317-29.
- [7] ZHANG X P, WANG W, ZHU W D, et al. Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5573.
- [8] CHATTERJEE B, BOSE S, SINGH R, et al. MiRNA-3163 limits ovarian cancer stem-like cells via targeting SOX-2 transcription factor [J]. *Noncoding RNA Res*, 2024, 9(4): 1308-14.
- [9] ZENG L F, LUO X J, ZHANG Z Y, et al. Long non-coding FAM201A accelerates the tumorigenesis and progression of colorectal cancer through miR-3163/MACCC1 axis [J]. *Transl Oncol*, 2022, 25: 101490.
- [10] WANG H T, KANMANGNE D, LI R, et al. miR-30a-3p suppresses the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells by downregulating CNPY2 [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(2): 646-54.
- [11] GAO K, WANG T, QIAO Y, et al. MicroRNA-30e-3p inhibits glioma development and promotes drug sensitivity to temozolomide treatment via targeting canopy FGF signaling regulator 2 [J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(22): 2361-71.
- [12] CHEN W H, LI Q Y, ZHANG G L, et al. LncRNA HOXA-AS3 promotes the malignancy of glioblastoma through regulating miR-455-5p/USP3 axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(20):

- 11755-67.
- [13] SADOWSKI K, JAŹDŹEWSKA A, KOZŁOWSKI J, et al. Revolutionizing glioblastoma treatment: a comprehensive overview of modern therapeutic approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 5774.
- [14] YANG Q R, WANG M Y, XU J, et al. LINC02159 promotes non-small cell lung cancer progression via ALYREF/YAP1 signaling [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 122.
- [15] PAN J C, FANG S, TIAN H H, et al. lncRNA JPX/miR-33a-5p/Twist1 axis regulates tumorigenesis and metastasis of lung cancer by activating Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 9.
- [16] ZHANG X M, NIU W X, MU M L, et al. Long non-coding RNA LPP-AS2 promotes glioma tumorigenesis via miR-7-5p/EGFR/PI3K/AKT/c-MYC feedback loop [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 196.
- [17] XU L X, WU Q L, YAN H, et al. Long noncoding RNA KB-1460A1.5 inhibits glioma tumorigenesis via miR-130a-3p/TSC1/mTOR/YY1 feedback loop [J]. *Cancer Lett*, 2022, 525: 33-45.
- [18] DELGIR S, ILKHANI K, SAFI A, et al. The expression of miR-513c and miR-3163 was downregulated in tumor tissues compared with normal adjacent tissue of patients with breast cancer [J]. *BMC Med Genomics*, 2021, 14(1): 180.
- [19] CAI Y P, HUANG Y, ZHANG J, et al. LncRNA CBR3-AS1 predicts a poor prognosis and promotes cervical cancer progression through the miR-3163/LASP1 pathway [J]. *Neoplasma*, 2022, 69(6): 1406-17.
- [20] SHI C S, YANG Q, PAN S S, et al. LncRNA OIP5-AS1 promotes cell proliferation and migration and induces angiogenesis via regulating miR-3163/VEGFA in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(7): 604-14.
- [21] CHEN K Q, ZHANG Y Q, WANG Z B, et al. Progress in research on CNPY2 in diseases [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2024, 24(4): 391-402.
- [22] LIU R, YANG X W. LncRNA LINC00342 promotes gastric cancer progression by targeting the miR-545-5p/CNPY2 axis [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1163.
- [23] TIAN T, DONG Y, ZHU Y, et al. Hypoxia-induced CNPY2 up-regulation promotes glycolysis in cervical cancer through activation of AKT pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 551: 63-70.