

miR-425-5p靶向RAB2B对胶质瘤细胞活性和凋亡的影响研究

范祥云¹ 张强^{1,2*}

(¹滨州市人民医院老年医学科, 滨州 256600; ²滨州市人民医院神经外科, 滨州 256600)

摘要 该文探讨miR-425-5p靶向RAB2B对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡调控作用。该研究将胶质瘤SHG44细胞分为正常对照组(NC)、阴性转染组(miR-425-5p control)和miR-425-5p转染组(miR-425-5p mimic), 分别转染DMEM培养液、miR-425-5p control和miR-425-5p mimic。采用qRT-PCR法测定胶质瘤SHG44细胞转染后RAB2B和miR-425-5p的相对表达量, 检测SHG44细胞转染后细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡情况, 采用Western blot法测定胶质瘤SHG44细胞转染后CDK2、Cyclin E1、P21、MMP-2、MMP-9和RAB2B蛋白表达情况, 采用双荧光素酶报告基因检测miR-425-5p和RAB2B的靶向关系。研究显示: (1) 胶质瘤SHG44细胞中miR-425-5p水平较正常胶质细胞HA显著降低($P<0.05$), RAB2B mRNA水平显著升高($P<0.05$); (2) 胶质瘤SHG44细胞转染miR-425-5p mimic后miR-425-5p水平显著升高, RAB2B mRNA水平显著降低($P<0.05$); (3) 胶质瘤SHG44细胞转染miR-425-5p mimic后培养48 h和72 h时细胞增殖水平显著降低($P<0.05$); (4) 胶质瘤SHG44细胞转染miR-425-5p mimic后细胞划痕的愈合率显著降低($P<0.05$); (5) 胶质瘤SHG44细胞转染miR-425-5p mimic后侵袭细胞数量显著降低($P<0.05$); (6) 胶质瘤SHG44细胞转染miR-425-5p mimic后细胞凋亡率显著升高($P<0.05$); (7) 胶质瘤SHG44细胞转染miR-425-5p mimic后细胞中CDK2、Cyclin E1、MMP-2和MMP-9蛋白水平显著升高($P<0.05$), P21蛋白水平显著降低($P<0.05$); (8) 双荧光素酶报告实验检测表明miR-425-5p可靶向调控RAB2B的表达。该研究证明miR-425-5p可能通过靶向下调RAB2B来抑制胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移, 并促进胶质瘤细胞的凋亡。

关键词 miR-425-5p; 胶质瘤细胞; RAB2B; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭; 细胞凋亡

Effects of miR-425-5p on Viability and Apoptosis in Glioma Cells via Targeting RAB2B

FAN Xiangyun¹, ZHANG Qiang^{1,2*}

(¹Department of Geriatrics, Binzhou People's Hospital, Binzhou 256600, China;

²Department of Neurosurgery, Binzhou People's Hospital, Binzhou 256600, China)

Abstract This study was to investigate the effects of miR-425-5p on proliferation, migration, invasion and apoptosis in glioma cells via targeting RAB2B. Glioma SHG44 cells were divided into Normal control group (NC), Negative transfection group (miR-425-5p control) and miR-425-5p transfection group (miR-425-5p mimic), and transfected with DMEM culture medium, miR-425-5p control and miR-425-5p mimic, respectively. The relative expression of RAB2B and miR-425-5p after transfection in glioma SHG44 cells was determined by qRT-PCR. The

收稿日期: 2024-11-18

接受日期: 2025-04-17

山东省医药卫生科技发展计划(批准号: 2019WS002)资助的课题

*通信作者。Tel: 15169951929, E-mail: bzsrmyyzq@126.com

Received: November 18, 2024

Accepted: April 17, 2025

This work was supported by the Shandong Provincial Medical and Health Science and Technology Development Plan (Grant No.2019WS002)

*Corresponding author. Tel: +86-15169951929, E-mail: bzsrmyyzq@126.com

proliferation, migration, invasion and apoptosis of SHG44 cells after transfection were determined. The expression of CDK2, Cyclin E1, P21, MMP-2, MMP-9 and RAB2B protein of glioma SHG44 cells after transfection was determined by Western blot method. This study showed: (1) the level of miR-425-5p in glioma SHG44 cells decreased significantly than that in Normal human astrocytes (HA) ($P<0.05$), and the mRNA level of *RAB2B* increased significantly ($P<0.05$); (2) the level of miR-425-5p in glioma SHG44 cells transfected with miR-425-5p mimic increased significantly ($P<0.05$), and the mRNA level of *RAB2B* decreased significantly ($P<0.05$); (3) The proliferation of glioma SHG44 cells increased significantly at 48 h and 72 h after transfected with miR-425-5p mimic ($P<0.05$); (4) the healing rate of SHG44 cells transfected with miR-425-5p mimic decreased significantly ($P<0.05$); (5) the number of invasive cells SHG44 cells transfected with miR-425-5p mimic significantly decreased ($P<0.05$); (6) the apoptosis rate of glioma SHG44 cells transfected with miR-425-5p mimic increased significantly ($P<0.05$); (7) the level of CDK2, Cyclin E1, MMP-2 and MMP-9 in glioma SHG44 cells transfected with miR-425-5p mimic increased significantly ($P<0.05$), and the levels of P21 decreased significantly ($P<0.05$); (8) detection of dual luciferase report assay showed that miR-425-5p could target the expression of RAB2B. This study proved that MiR-425-5p may inhibit the proliferation, invasion and migration of glioma cells and promote the apoptosis of glioma cells by targeting down-regulation of RAB2B.

Keywords miR-425-5p; glioma cells; RAB2B; cell proliferation; cell migration; cell invasion; cell apoptosis

神经胶质瘤是临床上最常见的颅内原发性恶性肿瘤,由大脑和脊髓胶质细胞癌变产生,其发病率、复发率和病死率均居高不下,中位生存期只有12~15个月,两年生存率不足25%^[1]。尽管神经胶质瘤的手术、放疗、化疗等治疗手段均取得了一些进展,但患者的临床预后仍然很差^[2]。肿瘤的靶向治疗正越来越引起注意,胶质瘤的分子研究也可能提供有效的治疗靶点^[3]。微小核糖核酸(micro ribonucleic acid, miRNA)是一类非编码RNA小分子,可被整合到RNA诱导的沉默复合物中,并结合到靶信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA)的3'端非翻译区,以介导RNA的降解或抑制RNA的蛋白质的翻译^[4]。研究表明,胶质瘤的发生常伴随着miRNA的表达异常,并且miRNA水平与胶质瘤的恶性程度以及恶性进展有关^[5-6]。miR-425-5p在多种肿瘤细胞的迁移、增殖和凋亡中起着重要调节作用。miR-425-5p在肾细胞癌、前列腺癌中表达上调,并促进肿瘤细胞侵袭和迁移^[7-8]; miR-425在乳腺癌中表达水平显著降低,通过靶向调控TGF-1抑制TNBC型乳腺癌的进展^[9]。但是miR-425-5p及其靶向基因在胶质瘤细胞中的作用尚不明确,胶质瘤组织中miR-425-5p调控机制的研究可能为胶质瘤的生物学治疗探索一种新的有效方法。RAB2B是一种属于Ras超家族的小G蛋白,参与细胞内囊泡运输和胞内膜流动等过程,负责将蛋白质从内质网转运至高尔基球体。

已发现RAB蛋白具有组织特异性和细胞特异性^[10]。RAB2B在癌症发展过程中起着关键作用^[11]。本研究探讨miR-425-5p介导RAB2B对胶质瘤细胞增殖的调控作用,进一步分析miR-425-5p对胶质瘤细胞的生物学效应,从而揭示miR-425-5p在胶质瘤发生过程中的分子机制,有助于在分子水平上建立一种更有效更精准的胶质瘤治疗方法,抑制胶质瘤的增殖及复发。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 人胶质瘤细胞系SHG44和正常人星形胶质细胞HA购自美国ATCC。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清购自美国Gibco公司; TRIzol试剂、Lipofectamin 2000试剂、TaqMan Universal PCR试剂盒、BCA蛋白检测试剂盒购自美国ThermoFisher Scientific公司; miR-425-5p模拟物(miR-425-5p mimic)和miR-425-5p模拟物对照(miR-425-5p control)购自瑞博(广州)生物科技有限公司; SYBR PrimeScript RT-PCR Kit购自日本TaKaRa生物公司; PrimeScript逆转录试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司; ProteoPrep蛋白提取试剂盒、总蛋白提取试剂、Annexin-V-FITC凋亡检测试剂盒购自美国Sigma-Aldrich公司; CDK2一抗、Cyclin E1一抗、p21一抗、MMP2一抗、MMP9一抗、RAB2B一抗、GAPDH

一抗和辣根过氧化物酶结合 IgG 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 增强化学发光检测试剂盒购自美国 GE Healthcare 公司; CCK-8 试剂盒购自日本 Dogin 公司; Transwell 迁移小室购自美国 Corning 公司; pGL3-BMP2 荧光素酶报告基因载体购自美国 Promega 公司。miR-425-5p、*RAB2B*、*U6* 和 *GAPDH* 的 PCR 引物, 由瑞博(广州)生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

1.1.3 主要仪器 PYC-16 型 CO₂ 恒温培养箱购自德国 Hereaus 公司; ND-100 型 Nanodrop 分光光度计购自美国 ThermoFisher Scientific 公司; X-15R 型低温离心机购自美国 Allerga 公司; GDZD-601 型全自动多功能振荡仪购自国电西高科技公司; 9700 型 PCR 仪购自美国 ABI 公司; Western blot 电泳仪和电转仪、Quantity One 系统 Version 4.6.2 购自美国 Bio-Red 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将液氮中冻存的人胶质瘤细胞系 SHG44 和正常人星形胶质细胞 HA 取出后迅速放入 37 °C 水浴中快速复苏, 用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行后续实验。将细胞分为正常对照组 (NC)、阴性转染组 (miR-425-5p control) 和 miR-425-5p 转染组 (miR-425-5p mimic)。

1.2.2 miR-425-5p 和 *RAB2B* mRNA 表达的测定 将对数生长期的 SHG44 和 HA 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔培养板中, 置于 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 并将其逆转录为 cDNA 后进行定量 qRT-PCR 扩增。qRT-PCR 扩增的条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s,

60 °C 退火 60 s, 60 °C 延伸 5 min, 42 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因的相对表达量, 以 *GAPDH* 和 *U6* 为内参计算 *RAB2B* 和 miR-425-5p 的相对表达量。

1.2.3 细胞转染 将对数生长期的 SHG44 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔培养板中, 各组细胞分别转染 miR-425-5p mimic、miR-425-5p control 和 DMEM 培养液, 于无血清 DMEM 培养液转染 6 h, 然后转为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 培养 48 h 后收集各组细胞, 检测 miR-425-5p 和 *RAB2B* mRNA 表达。

1.2.4 CCK-8 实验 将对数生长期的 SHG44 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔培养板, 各组细胞转染 6 h, 然后转为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下分别培养于接种后 24、48 或 72 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液继续在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 2 h, 用分光光度计检测每孔在 450 nm 波长处的吸光度 (*D*) 值, 以各组细胞培养 $T_{24\text{ h}}$ 、 $T_{48\text{ h}}$ 和 $T_{72\text{ h}}$ 时吸光度与 $T_{0\text{ h}}$ 吸光度差值相对于 $T_{0\text{ h}}$ 吸光度的百分率表示相对细胞活力。

1.2.5 细胞迁移实验 将对数生长期的 SHG44 细胞以 2×10^3 个/孔接种于 6 孔培养板, 各组细胞转染 6 h, 然后转为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下分别培养至细胞融合, 用 1 000 μ L 移液枪头垂直划痕, PBS 冲洗, 然后用无 FBS 的 DMEM 培养液培养 24 h, 拍照, 测量划痕间距, 以各组细胞 $T_{0\text{ h}}$ 时划痕间距与 $T_{24\text{ h}}$ 时划痕间距的差值相对于 $T_{0\text{ h}}$ 时划痕间距的百分率表示各组细胞的愈合率。

1.2.6 细胞侵袭实验 细胞侵袭实验采用由上下两个小室 (孔径为 8 μ m) 组成的 Transwell 迁移小室测定。Matrigel 基质胶经 DMEM 培养液稀释后加入上室, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 3 h。将对数生长期的 SHG44 细胞接种于 6 孔培养板中, 各组细胞转染

表1 RT-PCR引物序列
Table 1 RT-PCR primer sequences

引物 Primer	序列 Sequences
miR-425-5p	Forward: 5'-GGG GAG TTA GGA TTA GGT-3' Reverse: 5'-TGC GTG TCG TGG AG TC-3'
RAB2B	Forward: 5'-GGT CCG GGA AGT CCA TAT CTC-3' Reverse: 5'-GGC TGG AAC CGC TTA TCT GT-3'
U6	Forward: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3' Reverse: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'
GAPDH	Forward: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AG TC-3' Reverse: 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'

6 h, 然后于37 °C加入胰酶消化液, 显微镜下观察待细胞大部分变圆、少数细胞开始脱落时, 立即加入含血清的培养基, 终止胰酶活性。将细胞悬液转移至离心管中于4 °C条件下1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 获得细胞沉淀, 用新鲜培养基重悬细胞。将各组细胞接种于Transwell小室上室, 然后将小室上室放入含有DMEM培养液(含10% FBS)的下室, 培养48 h后, 去培养液, 4%多聚甲醛于25 °C固定30 min, 0.5%结晶紫染色15 min, 双蒸水冲洗上室, 倒置显微镜下每孔随机选取5个视野计数, 取平均细胞数。

1.2.7 流式细胞仪检测 将对数生长期的SHG44细胞以 1×10^5 个/孔接种于6孔培养板中, 各组细胞转染6 h, 然后转为含10%胎牛血清的DMEM培养液, 在37 °C、5% CO₂条件下分别培养24 h, 于37 °C加入胰酶消化液, 显微镜下观察, 待细胞大部分变圆、少数细胞开始脱落时, 立即加入含血清的培养基, 终止胰酶活性。将细胞悬液转移至离心管中, 于4 °C条件下1 000 r/min离心5 min, 弃上清, PBS洗涤2次, 加入Annexin V-FITC和PI各3 μ L, 混匀, 加入300 μ L结合缓冲液, 室温下避光孵育15 min。用流式细胞仪在488 nm下测定细胞凋亡情况, 利用Novo Express软件分析。

1.2.8 Western-blot实验 将对数生长期的SHG44细胞以 1×10^5 个/孔接种于6孔培养板中, 各组细胞转染6 h, 然后转为含10%胎牛血清的DMEM培养液, 继续在37 °C、5% CO₂条件下培养48 h, 0.25%胰酶消化并收集细胞, 提取总蛋白, 煮沸变性, 在12% SDS-PAGE凝胶上分离电泳, 然后将每种蛋白转移至PVDF膜上, 在室温下用5%脱脂牛奶在TBST中于25 °C下封闭2 h, TBST溶液洗膜(10 min/次 $\times$ 3次), 分别加入CDK2、Cyclin E1、P21、MMP2、MMP9、RAB2B和

GAPDH一抗(1:2 000), 于4 °C过夜, TBST溶液洗膜(10 min/次 $\times$ 3次), 然后将膜与辣根过氧化物酶结合IgG抗体在室温下培养2 h。用增强化学发光检测试剂盒显色, 用Quantity One系统Version 4.6.2分析各组蛋白的灰度, 以目标蛋白与GAPDH蛋白的比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.2.9 双荧光素酶实验 TargetScan软件预测RAB2B是否是miR-425-5p的潜在靶点, 应用双荧光素酶法分析证实。将含有结合位点序列插入荧光素酶报告基因载体构建野生型载体WT-RAB2B, 利用基因突变技术将含有结合位点进行突变, 将含有突变位点序列插入荧光素酶报告基因载体构建突变型载体MUT-RAB2B。取对数期生长期的SHG44细胞, 分别将WT-RAB2B、MUT-RAB2B、miR-425-5p-mimics和miR-425-5p-NC共转染, 继续培养24 h后收集细胞, 检测各组相对荧光素酶活性。

1.2.10 统计分析 数据分析采用SPSS 22.0和Graph Pad Prism 6.0软件进行统计分析。多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

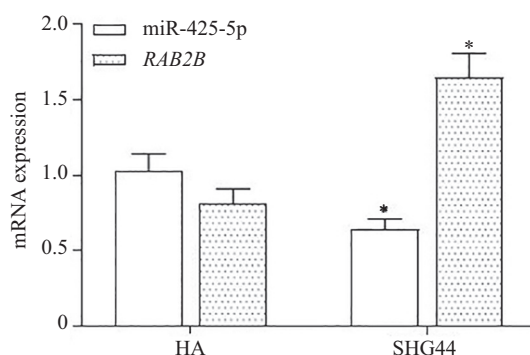
2 结果

2.1 SHG44和HA细胞中miR-425-5p和RAB2B mRNA水平

胶质瘤SHG44细胞中miR-425-5p水平较正常胶质细胞HA显著降低($P < 0.05$), 而RAB2B mRNA水平较正常胶质细胞HA显著升高($P < 0.05$)。见图1。

2.2 miR-425-5p过表达SHG44细胞的建立

胶质瘤SHG44细胞转染miR-425-5p mimic后miR-425-5p水平较miR-425-5p control组显著升高



* $P < 0.05$, 与HA细胞比较。n=6。

* $P < 0.05$ compared with HA cells. n=6.

图1 SHG44和HA细胞中miR-425-5p和RAB2B mRNA水平

Fig.1 The levels of miR-425-5p and RAB2B mRNA in SHG44 and HA cells

($P < 0.05$), 而 *RAB2B* mRNA 水平较 miR-425-5p control 组显著降低 ($P < 0.05$); NC 组和 miR-425-5p control 组转染后 miR-425-5p 和 *RAB2B* mRNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图2。

2.3 miR-425-5p 过表达对 SHG44 细胞增殖的影响

胶质瘤 SHG44 细胞转染 miR-425-5p mimic 后培养 48 h 和 72 h 时细胞增殖水平较 miR-425-5p control 组显著降低 ($P < 0.05$); NC 组和 miR-425-5p control 组转染后培养 48 h 和 72 h 时细胞增殖水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图3。

2.4 miR-425-5p 过表达对 SHG44 细胞迁移的影响

胶质瘤 SHG44 细胞转染 miR-425-5p mimic 后细胞划痕的愈合率较 miR-425-5p control 组和 NC 组显著降低 ($P < 0.05$)。见图4。

2.5 miR-425-5p 过表达对 SHG44 细胞侵袭的影响

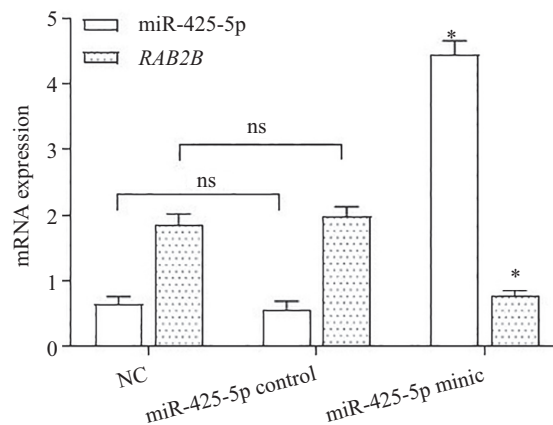
胶质瘤 SHG44 细胞转染 miR-425-5p mimic 后侵袭细胞数量较 miR-425-5p control 组和 NC 组显著降低 ($P < 0.05$)。见图5。

2.6 miR-425-5p 过表达对 SHG44 细胞凋亡的影响

胶质瘤 SHG44 细胞转染 miR-425-5p mimic 后细胞凋亡率较 miR-425-5p control 组显著升高 ($P < 0.05$); NC 组和 miR-425-5p control 组转染后细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图6。

2.7 miR-425-5p 过表达对 SHG44 细胞中 CDK2、Cyclin E1、p21、MMP-2、MMP-9 和 RAB2B 蛋白水平的影响

胶质瘤 SHG44 细胞转染 miR-425-5p mimic 后细胞中 CDK2、Cyclin E1、MMP-2、MMP-9 和

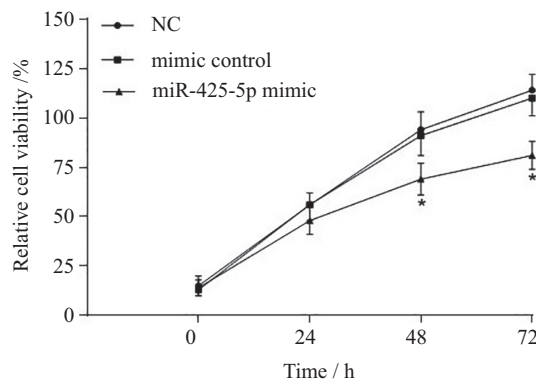


^{ns} $P > 0.05$; * $P < 0.05$, 与 miR-425-5p control 组比较。 $n = 6$ 。

^{ns} $P > 0.05$; * $P < 0.05$ compared with the miR-425-5p control group. $n = 6$ 。

图2 SHG44 细胞转染后 miR-425-5p 和 *RAB2B* mRNA 水平

Fig.2 The levels of miR-425-5p and *RAB2B* mRNA in SHG44 cells after transfection

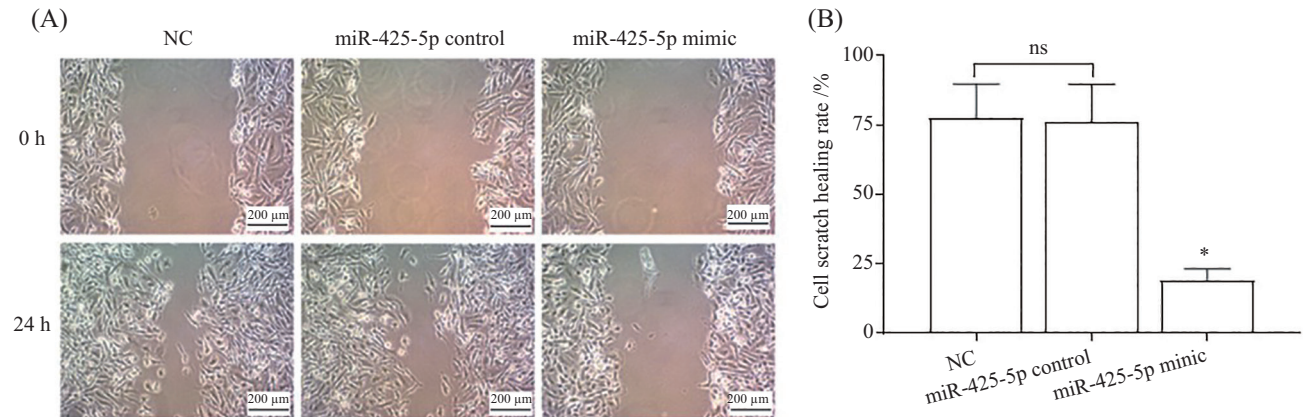


* $P < 0.05$, 与 mimic control 组比较。 $n = 6$ 。

* $P < 0.05$ compared with the mimic control group. $n = 6$ 。

图3 SHG44 细胞转染后培养 24 h、48 h 和 72 h 时的细胞活力

Fig.3 Cell viability of SHG44 cells at 24 h, 48 h, and 72 h after transfection

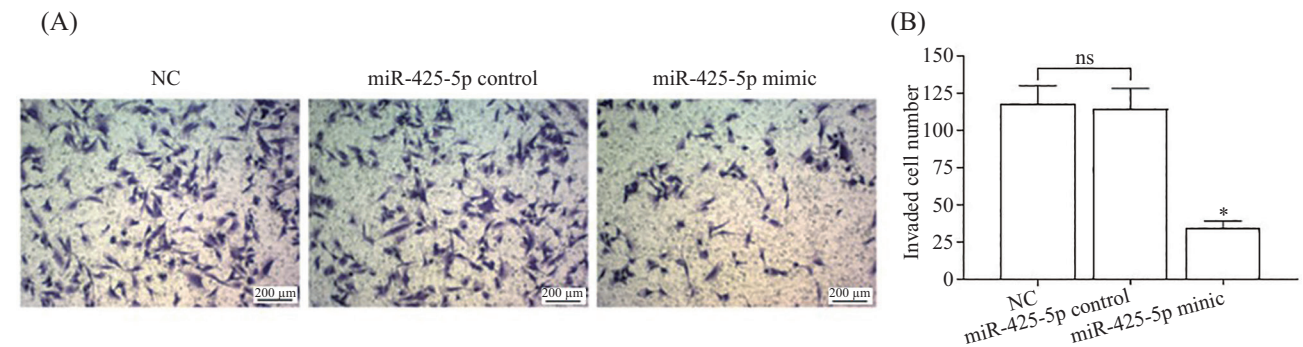


A: 各组细胞划痕照片; B: 各组细胞划痕统计学结果。^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$, 与miR-425-5p control组比较。n=6。

A: the images of each group; B: the statistical results of each group. ^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$ compared with the miR-425-5p control group. n=6.

图4 SHG44细胞转染后细胞划痕愈合情况

Fig.4 Wound healing assay of SHG44 cells after transfection

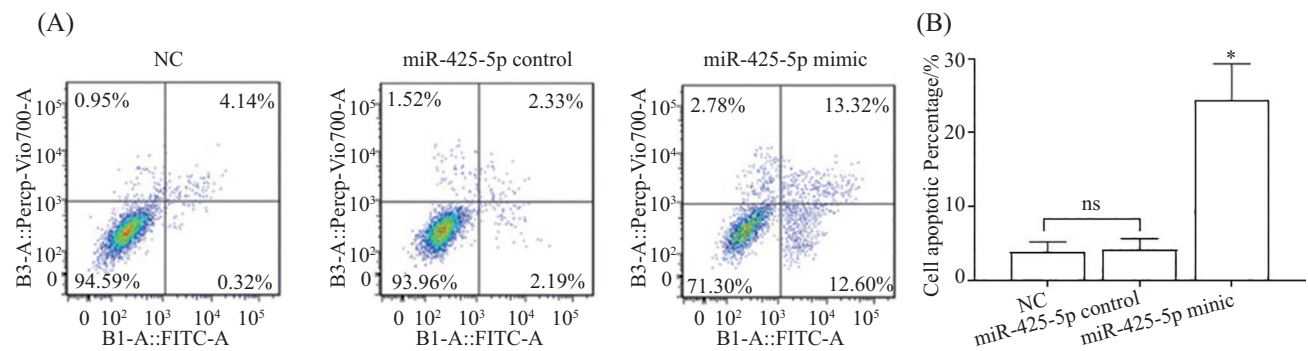


A: 各组细胞侵袭照片; B: 各组细胞侵袭统计学结果。^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$, 与miR-425-5p control组比较。n=6。

A: the images of each group; B: the statistical results of each group. ^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$ compared with the miR-425-5p control group. n=6.

图5 SHG44细胞转染后细胞侵袭情况

Fig.5 Cell invasion in SHG44 cells after transfection



A: 各组细胞凋亡照片; B: 各组细胞凋亡统计学结果。^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$, 与miR-425-5p control组比较。n=6。

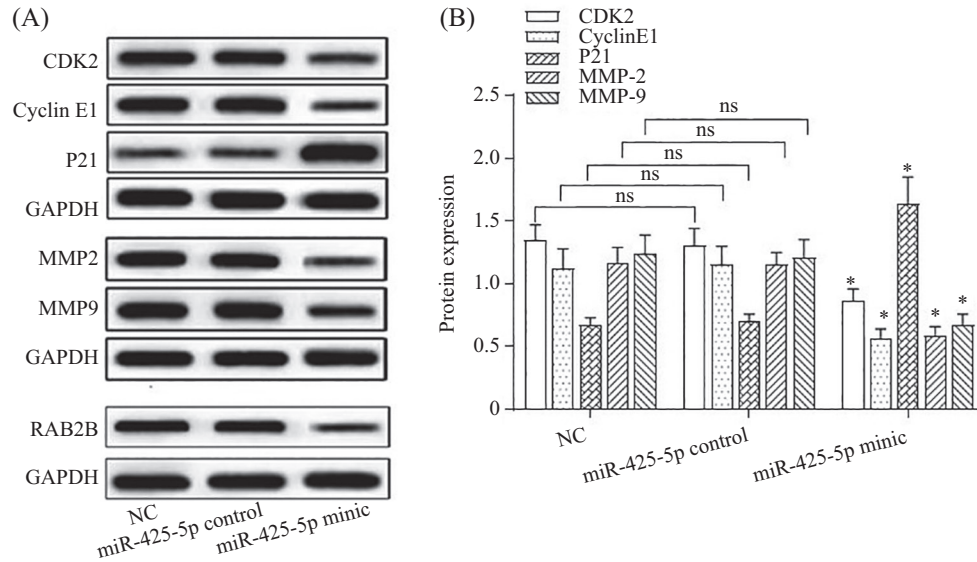
A: the images of each group; B: the statistical results of each group. ^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$ compared with the miR-425-5p control group. n=6.

图6 SHG44细胞转染后细胞凋亡情况

Fig.6 Cell apoptosis in SHG44 cells after transfection

RAB2B蛋白水平较miR-425-5p control组显著升高($P<0.05$), P21蛋白水平较miR-425-5p control组显著降低($P<0.05$); NC组和miR-425-5p control组转染后

细胞中CDK2、Cyclin E1、P21、MMP-2、MMP-9和RAB2B蛋白水平凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$)。见图7。



A: 各组蛋白电泳照片; B: 各组细胞蛋白表达统计学结果。^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$, 与miR-425-5p control组比较。 $n=6$ 。

A: the images of each group; B: the statistical results of each group. ^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$ compared with the miR-425-5p control group. $n=6$.

图7 SHG44细胞转染后CDK2、cyclinE1、p21、MMP-2、MMP-9和RAB2B蛋白表达测定情况

Fig.7 Protein levels of CDK2, cyclinE1, p21, MMP-2, MMP-9 and RAB2B in SHG44 cells after transfection

2.8 双荧光素酶实验结果

TargetScan预测显示RAB2B的序列中含有与miR-425-5p互补的核苷酸序列(图8)。双荧光素酶报告实验结果显示,转染野生型载体WT-RAB2B的细胞实验中,miR-425-5p mimic组荧光素酶活性显著低于miR-425-5p control组($P<0.05$),转染突变型载体MUT-RAB2B的细胞实验中,miR-425-5p mimic组荧光素酶活性与miR-425-5p control组差异无统计学意义($P>0.05$)。具体见图8。

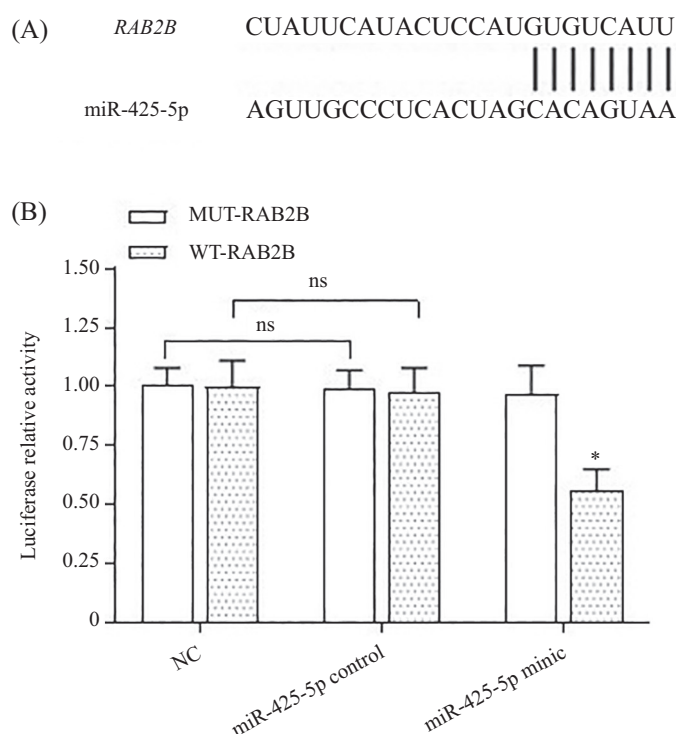
3 讨论

miRNA是一系列小分子非编码RNAs,占人类基因组1%左右,可调控30%以上的基因表达^[12]。超过50%的miRNA定位于癌相关基因突变点附近^[13],复杂的基因调控机制影响机体的分子调节过程,miRNA水平与肿瘤的分型、分级和预后相关^[14]。miRNA在胶质瘤中广泛存在,并且作为癌基因或肿瘤抑制物在胶质瘤的进展和发展中发挥作用,越来越多的miRNA对胶质瘤的作用及恶性程度的影响正被研究。KOSHKIN等^[15]研究显示,随着胶质瘤恶性程度的增加,miR-21表达量明显增加,而miR-137表达量则明显下降;胶质瘤miR-9、miR-17、miR-20a、miR-23a、miR-26a表达量较高,而miR-7则较低。DONG等^[16]研究显示,miR-374a是肿瘤预后的标记

物,能筛查高风险的胶质瘤。另外ZHANG等^[17]研究显示,miR-520e通过下调FGF19能抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭。

miR-425-5p是近年来的研究热点之一,在多种肿瘤细胞的迁移、增殖和凋亡中起着重要调节作用。miR-425在乳腺癌中表达水平显著降低,通过靶向调控TGF-1抑制三阴性乳腺癌的发生和进展^[18]。miR-425-5p在肾细胞癌中过度表达,抑制miR-425-5p表达可阻止肾癌细胞的增殖、侵袭和转移^[19]。而在非吸烟者早期非小细胞肺癌组织中miR-425-5p异常低表达,并且miR-425-5p异常低表达与肿瘤高复发风险及PTEN蛋白表达密切相关^[20]。因此,靶向性调节miR-425-5p表达可能对胶质瘤的生物学治疗提供一种新思路,但是miR-425-5p及其靶向基因在胶质瘤细胞中的作用尚不明确。在本研究中,胶质瘤SHG44细胞中miR-425-5p水平较正常胶质细胞HA显著降低,RAB2B mRNA水平较正常胶质细胞HA显著升高,表明miR-425-5p的表达具有一定肿瘤组织学特征,胶质瘤SHG44细胞转染miR-425-5p mimic后miR-425-5p水平升高,细胞的增殖、侵袭和迁移能力降低,并且细胞凋亡增多,表明miR-425-5p可作为胶质瘤中的肿瘤抑制因子,并抑制肿瘤生长和转移。

RAB2B是一种属于Ras超家族的小G蛋白,参与细胞内囊泡运输和胞内膜流动等过程,负责将蛋白



A: *RAB2B*的序列中含有与miR-425-5p互补的核苷酸序列; B: 各组细胞荧光素酶活性统计结果。^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$, 与MUT-RAB2B比较。 $n=6$ 。
A: the sequence of *RAB2B* contains nucleotide sequences complementary to miR-425-5p; B: the statistical results of luciferase activity in each group of cells. ^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$ compared with MUT-RAB2B. $n=6$.

图8 双荧光素酶报告基因结果

Fig.8 Results of dual-luciferase reporter gene assay

质从内质网转运至高尔基球体。已发现RAB蛋白具有组织特异性和细胞特异性^[10]。RAB2B在癌症发展过程中起着关键作用^[11]。RAB2B能够促进非小细胞肺癌细胞的增殖和侵袭^[21]。RAB2B的过表达可以促进宫颈癌细胞的增殖,进一步证实了RAB2B在宫颈癌中的致癌作用^[22]。JIN等研究^[23]表明, miR-448可以通过靶向RAB2B降低其表达水平,从而抑制胰腺癌细胞的增殖。在本研究中,胶质瘤 SHG44 细胞中 *RAB2B* mRNA 水平较正常胶质细胞 HA 显著升高,胶质瘤 SHG44 细胞转染 miR-425-5p mimic 后 *RAB2B* mRNA 水平显著降低,提示 miR-425-5p 可能通过靶向下调 *RAB2B* 蛋白的表达而发挥作用,双荧光素酶报告实验检测进一步表明 miR-425-5p 可靶向调控 *RAB2B* 的表达。TIAN 等^[24]研究显示, miR-425 可直接靶向 *RAB2B*,使其表达水平降低,从而阻断 *RAB2B* 介导的信号通路。

细胞通过多种周期相关蛋白调控细胞周期进展,保证细胞周期的顺利交替。CDK2、Cyclin E1 和 P21 是三个细胞周期调控蛋白,共同决定细胞是否从 G₁ 期顺利进入 S 期进行 DNA 复制,它们在细胞

周期进程尤其是 G₁/S 期转换中发挥关键作用^[25]。其中,CDK2 和 Cyclin E1 复合体作为正向驱动力推动细胞周期进程,而 p21 作为负向调控因素确保细胞周期在适当条件下进行^[26]。基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 在胶质瘤的发生发展过程中扮演重要角色, MMP-2 和 MMP-9 的异常表达和活性增强与肿瘤的发生、侵袭、血管生成以及治疗抵抗等多方面密切相关,对胶质瘤的恶性行为产生深远影响^[27]。目前未有 *RAB2B* 与细胞周期因子和基质金属蛋白酶的相互作用研究的报道。在本研究中,胶质瘤 SHG44 细胞转染 miR-425-5p mimic 后细胞中 CDK2、Cyclin E1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平显著升高,而 P21 蛋白水平显著降低,因此 miR-425-5p 也可能通过下调 *RAB2B* 表达而调节周期相关蛋白(CDK2、Cyclin E1 和 P21)和基质金属蛋白酶(MMP-2 和 MMP-9)蛋白的表达发挥作用。

总之,我们实验结果表明, miR-425-5p 可抑制胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移,并促进胶质瘤细胞凋亡,该作用可能与下调 *RAB2B* 表达而进一步调节细胞周期蛋白(CDK2、Cyclin E1 和 P21)及

基质金属蛋白酶(MMP-2和MMP-9)蛋白的表达有关。

参考文献 (References)

- [1] 朱磊, 李育平, 张恒柱. YKL-40表达与脑胶质瘤诊断和预后相关性的Meta分析[J]. 中华神经外科杂志(ZHU L, LI Y P, ZHANG H Z. YKL-40 expression and its correlation with the diagnosis and prognosis of glioma: a Meta-analysis [J]. Chin J Neurosurg), 2019, 35(8): 844-9.
- [2] LI K, LU D, GUO Y, et al. Trends and patterns of incidence of diffuse glioma in adults in the United States [J]. Cancer Med, 2018, 1757(7): 1973-2014.
- [3] JIN Y, ZHANG B, LI J, et al. Bioengineered protein nanocarrier facilitating siRNA escape from lysosomes for targeted RNAi therapy in glioblastoma [J]. Sci Adv, 2025, 11(8): eadr9266.
- [4] ZARE M, BASTAMI M, SOLALI S, et al. Aberrant miRNA promoter methylation and EMT-involving miRNAs in breast cancer metastasis: diagnosis and therapeutic implications [J]. J Cell Physiol, 2017, 233(5): 3729-44.
- [5] 安占森, 郑翠红, 刘京, 等. microRNA-143-3p在脑胶质瘤中的表达及其作用[J]. 广东医学(AN Z S, ZHENG C H, LIU J, et al. Expression and role of microRNA-143-3p in glioma [J]. Guangdong Medical Journal), 2024, 45(11): 1464-72.
- [6] 申法政, 崔士娟, 梁甲宁, 等. 微小RNA-490-3p靶向高迁移率族蛋白A2/Wnt5a轴抑制脑胶质瘤细胞增殖、迁移机制[J]. 中华实验外科杂志(SHEN F Z, CUI S J, LIANG J N, et al. microRNA-490-3p targets the hmg2a/wnt5a axis to inhibit proliferation and migration in glioma cells: mechanism [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery), 2024, 41(6): 1225-8.
- [7] QUAN J, LI Y, PAN X, et al. Oncogenic miR-425-5p is associated with cellular migration, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma [J]. Oncol Lett, 2018, 16(2): 2175-84.
- [8] ZHANG J Y, SU X P, LI Y N. MicroRNA-425-5p promotes the development of prostate cancer via targeting for forkhead box J3 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(2): 547-54.
- [9] LIU Y P, CHEN J L. miR-425 suppresses EMT and the development of TNBC (triple-negative breast cancer) by targeting the TGF-beta 1/SMAD 3 signaling pathway4 [J]. Rsc Advances, 2019, 9(1): 151-65.
- [10] 马民英, 晁晓芹, 赵扬, 等. LncRNA SNHG20靶向调控miR-520c-3p/RAB22A通路对人口腔鳞状细胞癌细胞上皮间质转化及微管形成的影响[J]. 北京大学学报(医学版)(MA M Y, CHAO X Q, ZHAO Y, et al. LncRNA SNHG20 targets and regulates the miR-520c-3p/RAB22A pathway to affect epithelial-mesenchymal transition and microtube formation in human oral squamous cell carcinoma cells [J]. Journal of Peking University Health Sciences), 2025, 57(1): 26-32.
- [11] QIN X, WANG J, WANG X, et al. Targeting Rabs as a novel therapeutic strategy for cancer therapy. [J]. Drug Discov Today, 2017, 22(8): 1139-47.
- [12] MEISTER G, TUSCHL T. Mechanisms of gene silencing by double stranded RNA [J]. Nature, 2004, 431(7006): 343-9.
- [13] CALIN G A, SEVIGNANI C, DUMITRU C D, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [14] 段晓伟, 张宁, 王晶, 等. 胶质瘤组织lncRNA SNHG25、miR-497-5p表达与临床特征及预后的关系研究[J]. 国际检验医学杂志(DUAN X W, ZHANG N, WANG J, et al. Study on the relationship between the expression of lncRNA SNHG25 and miR-497-5p in glioma tissues and clinical characteristics and prognosis [J]. International Journal of Laboratory Medicine), 2024, 45(12): 1463-68.
- [15] KOSHKIN F A, CHISTYAKOV D A, NIKITIN A G, et al. Profile of microRNA expression in brain tumors of different malignancy [J]. Bull Exp Biol Med, 2014, 157(6): 794-7.
- [16] DONG Q, YUAN G Q, LIU M, et al. Downregulation of microRNA-374a predicts poor prognosis in human glioma [J]. Exp Ther Med, 2019, 17 (3): 2077-84.
- [17] ZHANG L, CAO Y D, JIA D, et al. MicroRNA-520e restricts the proliferation and invasion of glioma cells through the down-regulation of Wnt/beta-catenin signaling by targeting fibroblast growth factor 19 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 511(3): 619-25.
- [18] LIU Y P, CHEN J L. miR-425 suppresses EMT and the development of TNBC (triple-negative breast cancer) by targeting the TGF-beta 1/SMAD 3 signaling pathway4 [J]. Rsc Advances, 2019, 9(1): 151-65.
- [19] QUAN J, LI Y W, PAN X, et al. Oncogenic miR-425-5p is associated with cellular migration, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma [J]. Oncol Lett, 2018, 16(2): 2175-84.
- [20] 章辉, 孙宇, 吕晓东, 等. miR-425-5p及PTEN、TGF-β1在非吸烟者早期非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 浙江临床医学(ZHANG H, SUN Y, LÜ X D, et al. Expression and clinical significance of miR-425-5p, PTEN, and TGF-β1 in early-stage non-small cell lung cancer tissues of non-smokers [J]. Zhejiang Clinical Medicine), 2024, 26(10): 1446-50.
- [21] DONG Q, FU L, ZHAO Y, et al. Rab11a promotes proliferation and invasion through regulation of YAP in non-small cell lung cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 27800-11.
- [22] HU Y, LI Y, HUANG Y, et al. METTL3 regulates the malignancy of cervical cancer via post-transcriptional regulation of RAB2B [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 879: 173134.
- [23] JIN J, WU Y, ZHOU D, et al. miR 448 targets Rab2B and is pivotal in the suppression of pancreatic cancer [J]. Oncol Rep, 2018, 40(3): 1379-89.
- [24] TIAN Y, LUO Y, WANG J. MicroRNA-425 induces apoptosis and suppresses migration and invasion of human cervical cancer cells by targeting RAB2B [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2021, doi: 10.1177/20587384211016131.
- [25] SUN C, CHANG X, MACISAAC H J, et al. Phytosphingosine inhibits cell proliferation by damaging DNA in human cell lines [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 256: 114840.
- [26] KIM EM, JUNG CH, KIM J, et al. The p53/p21 complex regulates cancer cell invasion and apoptosis by targeting Bcl-2 family proteins [J]. Cancer Res, 2017, 77(11): 3092-100.
- [27] DAS S, AMIN S A, JHA T. Inhibitors of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) for the management of hematological malignancies [J]. Eur J Med Chem, 2021, 223: 113623.