

miRNA-182 调控 PER 基因对胶质瘤干细胞的影响机制

李丹

广州医科大学附属肿瘤医院

DOI:10.12238/bmtr.v7i2.13396

[摘要] 目的: 本项目拟通过改变miR-182与PER基因的表达水平,分析GSCs生物学行为及相关信号通路蛋白的活性,旨在探讨miR-182与PER基因在GSCs生物学行为中的调控作用明确其可能的分子作用机制,为胶质母细胞瘤的治疗带来新的靶点。方法: 本项目拟首先采用qRT-PCR检测miRNA-182及PER基因在胶质瘤干细胞(GSCs)中的内源性表达,并通过沉默或过表达miR-182/PER基因的表达水平,验证其对GSCs生物学行为的影响;然后通过生物信息软件预测PER基因为miRNA-182靶基因,并通过双荧光素酶报告分析证实,进而采用共转染技术进一步证实miRNA-182对PER基因的调控,并阐明对GSCs的生物学行为的影响。最后基于GBM患者癌组织和癌旁组织分析miRNA-182、PER基因等与GSM恶性程度、生存时间之间的关联,验证体外实验结论。结果: 试验研究结果显示,随着GBM分级水平的升高,miRNA-182表达水平逐渐上升,PER表达水平逐渐下降。沉默组miRNA-182零表达,PER表达水平最高;过表达组miRNA-182表达水平最高,PER表达最低;阴性对照(空载体)组,miRNA-182表达水平中等,PER表达水平中等。结论: 证实miRNA-182在脑胶质瘤干细胞中的表达水平显著上升,PER基因在脑胶质瘤干细胞中的表达水平下降,miRNA-182沉默可促进PER蛋白的表达水平。证实miRNA-182沉默可抑制脑胶质瘤干细胞的增殖、迁移、侵袭,促进其细胞凋亡;miRNA-182过表达可促进脑胶质瘤干细胞的增殖、迁移、侵袭,抑制其细胞凋亡;证实miRNA-182过表达同时PER基因沉默可显著促进胶质瘤干细胞的增殖、迁移、侵袭,抑制其细胞凋亡,miR-182沉默同时PER过表达可抑制胶质瘤干细胞的增殖、迁移、侵袭,促进其细胞凋亡;证实PER基因是miRNA-182的靶基因;证实miRNA-182靶向调控生物钟核心基因PER,进而影响胶质瘤干细胞生物学行为,应用于临床价值很大。

[关键词] miRNA-182; PER基因; 胶质瘤干细胞; 增殖影响; 机制研究

中图分类号: R596.3 文献标识码: A

Effect and mechanism of miRNA-182 on proliferation of glioma stem cells by regulating PER gene

Dan Li

Guangzhou Institute of Cancer Research, the Affiliated Cancer Hospital, Guangzhou Medical University
[Abstract] Objective: This project intends to analyze the biological behavior of GSCs and the activity of related signaling pathway proteins by changing the expression levels of miR-182 and PER gene, so as to explore the regulatory role of miR-182 and PER gene in the biological behavior of GSCs and identify the possible molecular mechanism of action. It brings a new target for the treatment of glioblastoma. Methods: In this project, qRT-PCR was used to detect the endogenous expression of miRNA-182 and PER gene in glioma stem cells (GSCs), and the expression level of miR-182/PER gene was silenced or overexpressed to verify its influence on the biological behavior of GSCs. Then, the PER gene was predicted as the target gene of miRNA-182 by biological information software, and confirmed by double luciferase report analysis, and then co-transfection technology was used to further confirm the regulation of miRNA-182 on PER gene, and elucidate the influence on the biological behavior of GSCs. Finally, the correlation between miRNA-182 and PER gene and the degree of malignancy and survival time of GSM was analyzed based on cancer tissue and para-cancer tissue of GBM patients, and the conclusions of in vitro experiments were verified. Results: The results showed that

with the increase of GBM classification level, the expression level of miRNA-182 increased gradually, and the expression level of PER decreased gradually. In the silent group, there was no miRNA-182 expression, and the PER expression level was the highest. The expression level of miRNA-182 was the highest in overexpression group, and the expression level of PER was the lowest. In the negative control group (empty carrier), the expression level of miRNA-182 was moderate, and the expression level of PER was moderate. Conclusion: The expression level of miRNA-182 in brain glioma stem cells was significantly increased, the expression level of PER gene was decreased, and the silencing of miRNA-182 could promote the expression level of PER protein. miRNA-182 silencing could inhibit the proliferation, migration and invasion of glioma stem cells and promote their apoptosis. Overexpression of miRNA-182 can promote the proliferation, migration and invasion of glioma stem cells, and inhibit their apoptosis. It was confirmed that miRNA-182 overexpression combined with PER gene silencing could significantly promote the proliferation, migration and invasion of glioma stem cells and inhibit their apoptosis; miRNA-182 silencing combined with PER gene silencing could inhibit the proliferation, migration and invasion of glioma stem cells and promote their apoptosis. It was confirmed that PER gene was the target gene of miRNA-182. It was confirmed that miRNA-182 targeted regulation of the core biological clock gene PER, and then affected the biological behavior of glioma stem cells, which was of great clinical value.

[Key words] miRNA-182; PER Gene; Glioma Stem Cells; Proliferation Effect; Mechanism Study

引言

临床研究发现,很多恶性肿瘤的发生和发展与人体的生物钟息息相关,通过基因工程研究结果显示,PER基因是一种能够对生物钟周期进行调控的基因。若PER基因发生突变,就会引起人体生物钟失调,导致患者的睡眠、情绪以及机体代谢过程均受到影响,继而引发相关疾病的发生^[1]。胶质母细胞瘤(GBM)是颅内最常见的原发性恶性肿瘤,胶质瘤干细胞(GSCs)被认为是胶质母细胞瘤恶性进展的主要原因之一。目前临床上探索更为有效的治疗胶质瘤疾病的方案迫在眉睫^[2]。本文基于PER基因与该疾病之间的关系,以及miRNA-182在胶质瘤群体中的特殊表现,对miRNA-182通过调控PER基因对胶质瘤干细胞增殖的影响及机制展开研究。本研究报道如下。

1 试验对象和方法

1.1 试验对象

本项目拟通过改变miR-182与PER基因的表达水平,分析GSCs生物学行为及相关信号通路蛋白的活性,旨在探讨miR-182与PER基因在GSCs生物学行为中的调控作用,明确其可能的分子作用机制,为胶质母细胞瘤的治疗带来新的靶点。

1.1.1 人群招募

依托本院平台募集胶质母细胞瘤患者50名。

1.1.2 基础资料及生物样本收集

患者基础资料:包括性别、出生日期、出生地、生活习惯(包括吸烟、饮酒状况、每周交通暴露时间、生物燃料暴露和做饭行为等)、职业史、既往疾病史及家族疾病史(分期与病理分型信息)、复发时间等。所有病历均要求有完整临床资料。生物样本收集:所有研究对象均收集GBM组织及瘤旁组织,组织样本经液氮速冻后-80℃保存。

1.2 方法

第一部分:miRNA-182在GSCs生物学行为维持中的作用及功能GSCs是胶质母细胞瘤恶性进展的主要原因之一,故该部分实验主要以GSCs为细胞模型。miRNA-182在GSCs中的内源性表达及功能作用:实验细胞培养:以胶质瘤细胞系U87MG为研究对象,通过细胞培养技术,获得原代GSCs,以37℃、5%CO₂培养条件常规培养。miRNA-182的沉默和过表达细胞株的构建:选定设计好的siRNA,构建shRNA载体包装慢病毒,将miRNA-182沉默载体/过表达载体/空载体包装为病毒并转染GSCs细胞,构建miRNA-182沉默/过表达/阴性对照(空载体)稳定细胞株;采用RT-qPCR检查miRNA-182表达量,验证转染效率。检测指标:主要进行GSCs生物学行为的检测,采用MTT法、Transwell试验、流式细胞仪等方法,检测miRNA-182对GSCs生物学行为的影响。

第二部分:miRNA-182对生物钟核心基因PER的调控。

基于既往研究结果,miR-182在体内发挥类似致癌基因作用,且参与调控昼夜节律,同时DIANA-microT-CDS和Miranda两种方法均预测PER基因为其直接靶基因。

(1)确定PER为miRNA-182的靶基因。采用生信分析预测miRNA-182的靶基因为PER,采用双荧光素酶报告基因实验,确定miRNA-182与靶基因PER;构建miRNA-182功能研究体系探讨miRNA-182对靶基因PER的作用。(2)明确miRNA-182对生物钟核心基因PER的调控作用。构建miRNA-182干扰/过表达和靶基因PERminc/inhibitor共转体系,采用RT-qPCR和Westernblot测定PER的表达水平,分析miRNA-182对GSCs中PER表达的影响。

第三部分:miRNA-182调控生物钟核心基因PER对GSCs生物学行为的影响。

构建PER干扰及过表达模型和miRNA-182mimic/inhibitor共转体系,采用MTT法、Transwell试验、流式细胞仪等方法,探讨miRNA-182调控生物钟核心基因PER对GSCs生物学行为的影响。

1.3测定指标

GBM分级：所有GBM样本均按WHO标准进行分级，并同时经病理证实。miRNA-182、PER水平：采用RT-qPCR和Westernblot等方法测定研究对象组织中miRNA-182、PER水平。

1.4统计学分析

结合临床资料，控制混杂因素(如性别、年龄、身高、体重等)进行如下统计学分析：

比较癌组织与癌旁组上指标之间的关联。明确miRNA-182的异常表达与组织学分级、分子分型和患者预后的关系，进而评估其对肿瘤恶性程度和患者生存期的影响，以及作为分子标记物和分子靶标的可能性。

2 结果

2.1不同GBM分级患者miRNA-182及PER基因在胶质瘤干细胞(GSCs)中的内源性表达情况

试验研究结果显示，随着GBM分级水平的升高，miRNA-182表达水平逐渐上升，PER表达水平逐渐下降。

表1 不同GBM分级患者miRNA-182及PER基因在胶质瘤干细胞(GSCs)中的内源性表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	miRNA-182 (pg/mL)	PER (pg/mL)
I	126.32±23.57	103.62±4.78
II	259.32±54.76	73.48±4.03
III	815.32±62.78	61.48±3.78
IV	956.32±73.78	25.21±1.52
V	1858.32±102.67	6.48±1.52
F	15.782	18.023
P	<0.05	<0.05

2.2沉默/过表达/阴性对照患者miRNA-182、PER的表达情况

沉默组miRNA-182零表达，PER表达水平最高；过表达组miRNA-182表达水平最高，PER表达最低；阴性对照(空载体)组，miRNA-182表达水平中等，PER表达水平中等。

表2 两组患者miR-509-5p的表达情况的研究调查结果($\bar{x} \pm s$)

组别	miRNA-182 (pg/mL)	PER (pg/mL)
沉默	0.00±0.00	90.48±11.07
过表达	1990.32±202.32	3.48±0.79
阴性对照	21.32±4.56	45.48±4.52
t	0.373	9.782
P	>0.05	<0.05

3 讨论

胶质母细胞瘤(GBM)是颅内最常见的原发性恶性肿瘤，其标准疗法包括手术切除+放化疗，但预后极差，中位生存期仅12-15个月，五年生存率只有5%^[3]。胶质瘤干细胞(GSCs)被认为是胶质母细胞瘤恶性进展的主要原因之一，GSCs具有神经干细胞的特征，能够不断的进行自我更新和分化，它们被认为是GBM耐药、复

发和侵袭性生长的根本原因^[4]。过往的大量基因组学研究发现了信号传导通路上的许多关键突变，它们主要集中在RTK/RAS/PI3K/PTEN、RB/CDKN2A和P53/ARF/MDM2通路中。生物钟是维持正常细胞稳态的重要调节系统，同时在与癌症有关的过程如增殖、生长、DNA修复、代谢以及炎症中都发挥了关键性的作用。目前生物钟紊乱与肿瘤的关系已经成为肿瘤研究领域的新热点。流行病学的研究显示生物钟的改变能显著增加恶性肿瘤的发生率，针对不同生物钟基因的动物模型也验证了这一现象^[5]。最新的研究显示，核心生物钟基因PER的表达被抑制，从而促进GSCs的增殖和自我更新。生物钟紊乱在肿瘤的发生发展中发挥了非常关键的作用。然而值得注意的是，目前对导致生物钟紊乱的机制却所知甚少^[6]。PER基因是生物钟核心基因，在GSCs中被抑制。但促使PER抑制的原因却并不清楚。与此同时，相关研究发现，miR-182参与调节昼夜节律，敲低miR-182可缩短生物钟的振幅，对胶质瘤有促癌作用^[7]。由此建立了在GSC中miR-182调控PER基因功能变化进一步调控GSCs的生物学行为的工作假说。本项目拟首先采用qRT-PCR检miRNA-182及PER基因在胶质瘤干细胞(GSCs)中的内源性表达，并通过沉默或过表达miR-182/PER基因的表达水平，验证其对GSCs生物学行为的影响；然后通过生物信息软件预测PER基因为miRNA-182靶基因，并通过双荧光素酶报告分析证实，进而采用共转染技术进一步证实miRNA-182对PER基因的调控，并阐明对GSCs的生物学行为的影响。最后基于GBM患者癌组织和癌旁组织分析miRNA-182、PER基因等与GSM恶性程度、生存时间之间的关联，验证体外实验结论。通过本项目的开展，有望从表观遗传学角度揭示GBM恶性进展的原因，为GBM的治疗提供新靶向，改善GMB患者的预后。

本次试验研究结果显示，随着GBM分级水平的升高，miRNA-182表达水平逐渐上升，PER表达水平逐渐下降。证实miRNA-182在脑胶质瘤干细胞中的表达水平显著上升，PER基因在脑胶质瘤干细胞中的表达水平下降，miRNA-182沉默可促进PER蛋白的表达水平。沉默组miRNA-182零表达，PER表达水平最高；过表达组miRNA-182表达水平最高，PER表达最低；阴性对照(空载体)组，miRNA-182表达水平中等，PER表达水平中等。从结果可知，miRNA-182沉默可抑制脑胶质瘤干细胞的增殖、迁移、侵袭，促进其细胞凋亡；miRNA-182过表达可促进脑胶质瘤干细胞的增殖、迁移、侵袭，抑制其细胞凋亡；证实miRNA-182过表达同时PER基因沉默可显著促进胶质瘤干细胞的增殖、迁移、侵袭，抑制其细胞凋亡，miR-182沉默同时PER过表达可抑制胶质瘤干细胞的增殖、迁移、侵袭，促进其细胞凋亡^[8]。因此，提示PER基因是miRNA-182的靶基因，miRNA-182可通过靶向调控，实现对生物钟核心基因PER的调控，进而影响胶质瘤干细胞生物学行为。

4 结语

综上所述，胶质瘤干细胞增殖是导致患者疾病发生和发展的关键途径，同时PER基因作为生物钟调控基因能够对胶质瘤的发生产生影响，同时，miRNA-182的表达能够影响胶质瘤干细胞的增殖。本次试验研究结果显示，miRNA-182能够通过过PER基因

进行调控,进而实现对胶质瘤干细胞增殖的抑制。本次试验成果为推进医学技术的发展,提高对患者的治愈程度具有重要意义。

[课题]

广州市卫生健康科技项目(20241A011093);广东省医学科研基金项目(B2024011)。

[参考文献]

[1]ZhenD, Guoxin Z, Meng Q, et al. Targeting Glioblastoma Stem Cells through Disruption of the Circadian Clock[J]. Cancer discovery,2020,2019,9(12):1556–1573.

[2]Gsa C,Cwa B. Glioma stem cells and associated molecular mechanisms in Glioblastoma Chemoresistance[J]. Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Innovative Reversal Strategies,2021:135–151.

[3]Ribeiro R,Cavadas C,Silva M.Small-molecule modulators of the circadian clock:Pharmacological potentials in circadian-related diseases[J].Drug discovery today,2021,26(7):1620–1641.

[4]安亚文,刘汉清,袁波,等.生物钟基因在胶质瘤中的作用研究进展[J].中国临床神经外科杂志,2020,25(1):51–53.

[5]彭景,任保印,张荷,等.生物钟紊乱防治策略的研究进展[J].生理学报,2023,75(02):279–290.

[6]陈凯,杨玉帛,韩平.生物钟在恶性肿瘤及时辰疗法中的研究进展[J].现代肿瘤医学,2023,31(10):1936–1939.

[7]Evangelos,Pavlakis,Anton,etal.Interaction between transcription factors PAX6/PAX6-5a and specific members of miR-183-96-182.

[8]Li Z,Zhang L, Liu Z, et al. miRNA-182 regulated MTSS1 inhibits proliferation and invasion in Glioma Cells[J]. Journal of Cancer,2020,11(19):5840–5851.

作者简介:

李丹(1987–),男,汉族,江西上饶人,硕士研究生,主治医师,研究方向:神经外科。