中图分类号:R965;R739.41　　文献标志码:A　　文章编号:1006－4931(2024)18－0026－08
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.18.007

miRNA－4465靶向Wnt5A调控对胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响*

陈硕硕,孙玉玺,余　德,束汉生△

(蚌埠医学院第二附属医院,安徽 蚌埠　233000)

摘要:目的　探讨miRNA－4465(miR－4465)对胶质瘤细胞增殖、侵袭及迁移的影响及其作用机制。**方法**　采用miR－4465模拟物(mimic)处理U118和U87细胞,检测细胞生物活性。双荧光素酶报告基因实验评价miR－4465和Wnt5A的结合情况。采用siRNA和miR－4465抑制剂(inhibitor)分别抑制Wnt5A和miR－4465的表达,采用CCK－8法、细胞克隆实验、伤口愈合实验和Transwell实验,检测细胞的增殖、迁移、侵袭能力。复制移植瘤裸鼠模型,评价miR－4465过表达和抑制对其肿瘤生长的影响。**结果**　miR－4465 mimic显著抑制了U118和U87细胞增殖能力。双荧光素酶报告基因实验结果显示miR－4465与Wnt5A存在靶向调节作用。沉默Wnt5A可降低细胞的增殖、迁移、侵袭能力,miR－4465被抑制后,细胞的增殖、迁移、侵袭能力均显著增强($P<0.05$)。此外,沉默Wnt5A可逆转miR－4465抑制导致的细胞增殖、迁移、侵袭能力增强。体内实验结果显示,miR－4465过表达抑制肿瘤生长和ki67的表达,而miR－4465被抑制后,肿瘤生长和ki67的表达显著增强($P<0.05$)。**结论**　miR－4465在胶质瘤中呈低表达,其过表达可抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力,其下游作用机制与Wnt5A通路有关。

关键词:胶质瘤;miR－4465;双荧光素酶报告基因;细胞;增殖;迁移;侵袭;Wnt5A

Effects of Regulation of miRNA－4465 Targeting Wnt5A on the Proliferation, Migration and Invasion of Glioma Cells

CHEN Shuoshuo, SUN Yuxi, YU De, SHU Hansheng

(The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China　233000)

Abstract: Objective　To investigate the effects of miRNA－4465 (miR－4465) on the proliferation, invasion, and migration of glioma cells and relevant mechanism. **Methods**　The U118 and U87 cells were treated by the miR－4465 mimic to detect the cell biological activity. The binding of miR－4465 and Wnt5A was evaluated by the dual－luciferase reporter gene test. The expression of Wnt5A and miR－4465 was inhibited by the siRNA and miR－4465 inhibitors, respectively. The proliferation, migration and invasion abilities of cells were detected by the CCK－8 method, clone formation assay, wound healing assay and Transwell assay. The effects of overexpression and inhibition of miR－4465 on tumor growth were evaluated by constructing transplanted－tumor nude mice model. **Results**　The miR－4465 mimic significantly inhibited the proliferation ability of U118 and U87 cells. The dual－luciferase reporter gene test showed a targeted regulatory effect between miR－4465 and Wnt5A. Wnt5A silence could decrease the proliferation, migration and invasion abilities of cells, the above abilities of cells significantly increased after miR－4465 inhibition ($P<0.05$). In addition, Wnt5A silence could reversed the increased cell proliferation, migration and invasion abilities induced by miR－4465 inhibition. The *in vivo* tests showed that overexpression of miR－4465 inhibited the tumor growth and ki67 expression, while the inhibition of miR－4465 promoted tumor growth and ki67 expression ($P<0.05$). **Conclusion**　The expression of miR－4465 is low in gliomas, and its overexpression can inhibit the proliferation,

*基金项目:安徽省高校自然科学研究项目[KJ2021A0786]。

第一作者:陈硕硕,男,硕士研究生,住院医师,研究方向为神经胶质瘤的诊治,(电子信箱)css572525287@icloud.com。

△通信作者:束汉生,男,硕士研究生,主任医师,研究方向为神经胶质瘤的诊治,(电子信箱)shuhansheng168@163.com。

pharmaceutical care in the improvement of medication adherence and quality of life for COPD patients in Vietnam[J]. Respir Med, 2019, 153: 31－37.

[13] JIA XN, ZHOU S, LUO DH, et al. Effect of pharmacist－led interventions on medication adherence and inhalation technique in adult patients with asthma or COPD: A systematic review and meta analysis[J]. J Clin Pharm Ther, 2020, 45(5): 904－917.

[14] 赵晓红,朱立勤,蒋　萍,等. 吸入药物使用方法、剂量与发生不良反应的关系及药学服务效果[J]. 中国药房, 2009, 20(26): 2076－2077.

[15] LIN GH, ZHENG JQ, TANG PK, et al. Effectiveness of Hospital Pharmacist Interventions for COPD Patients: A Systematic Literature Review and Logic Model[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2022, 17: 2757－2788.

(收稿日期:2023－09－23;修回日期:2024－03－19)

migration and invasion abilities of glioma cells. Its downstream mechanism is related to the Wnt5A pathway.
Key words: glioma; miR - 4465; dual - luciferase reporter gene; cell; proliferation; migration; invasion; Wnt5A

胶质瘤是颅内最常见的原发性肿瘤，恶性程度高，进展快，预后差[1]。手术是其主要临床治疗手段，但高级别胶质瘤表现出高度侵袭性，手术多无法完全切除[2]。因此，寻找新的治疗靶点来对抗神经胶质瘤的生长和浸润至关重要。微小 RNA（microRNA / miRNA）为内源性非编码单链小 RNA，长度约为 22 个核苷酸[3]。miRNA 通过与其他 RNA 的 3′ - 非翻译区（3′ - UTR）结合来调节大部分的人类基因。研究表明，miRNA 通过调节致癌基因或抗癌基因的表达来影响肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等生物学行为[4]，但临床用于疾病诊断和治疗的 miRNA 很少[5]。大量研究证实，miRNA 可在胶质瘤中发挥作用[6-8]，MOROKOFF 等[9]发现了一种用于神经胶质瘤纵向监测的 miRNA 血清生物标志物。同时，部分治疗策略也解释了 miRNA 在癌症中的生物学功能，如使用 miRNA 抑制剂（inhibitor）治疗肿瘤过表达的癌症，或使用 miRNA 模拟物（mimic）治疗肿瘤抑制 miRNA 水平低的癌症[10]。miRNA - 4465（miR - 4465）已被证实与多种肿瘤的进展有关[11-13]。目前 miR - 4465 在胶质瘤中的作用尚未明晰。为此，本研究中拟通过使用 miRNA mimic 和 miRNAinhibitor 探讨 miR - 4465 在胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭中的作用，并分析 miR - 4465 下游作用因子。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器：MCO - 175 型 CO_2 培养箱（日本 Sanyo 公司），BioTek SynergyHT 型多功能酶标仪（美国 Agilent 公司）；1300 - A2 型生物安全柜（上海振样创空气净化设备公司）；MF53 型荧光显微镜（日本 Olympus 公司）；DU - 700 型紫外分光光度计（美国 Beckman 公司），HT - 600C 型通用电泳仪（北京鸿涛基业科技发展有限公司）；StepOnePlus Real - Time PCR System（美国 ABI 公司）；TGL - 16K 型高速冷冻离心机（湖南湘仪股份有限公司）。

试药：MEM、DMEM 培养基 / 胎牛血清（美国 Gibco 公司）；RIPA 裂解液（北京索莱宝科技有限公司）；miR - 4465 mimic / inhibitor、siRNA（上海生工生物工程有限公司）；免疫组化试剂盒、Luciferase 双报告系统检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；PVDF 转印膜（美国 Millipore 公司）；灵敏 ECL 化学发光检测试剂盒（美国 Proteintech 公司）；CCK - 8 试剂盒、nanotrans 转染试剂（安徽佰欧晶医学科技有限公司）；Wnt5A 抗体、GAPDH（武汉三鹰生物有限公司）；羊抗兔二抗（上海爱必信生物科技公司）；ki67 抗体（福州迈新生物技术开发有限公司）；AG RNAex Pro RNA 提取试剂、Evo M - MLV 试剂盒（湖南艾科瑞生物工程有限公司）；Trans-Script 第一链 cDNA 合成试剂盒（日本 Takara 公司）；其余化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

动物：BALB / c 裸鼠 18 只，雄性，5 ~ 6 周龄，购于斯莱克（上海）实验动物有限责任公司［实验动物生产许可证号 SCXK（沪）2017 - 0005］，恒温（22 ~ 26℃）、恒湿（相对湿度 40% ~ 60%）环境，饲养于蚌埠医学院动物房。动物实验经蚌埠医学院实验动物福利与伦理委员会批准，所有实验操作均遵守《实验动物使用规范》。

细胞：胶质瘤细胞 U87、U118，均购自中国科学院上海细胞库。

1.2 方法

细胞培养：U87 和 U118 细胞于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基（37 ℃、5%CO_2）中培养 24 h，更换培养基，细胞覆盖率达 80% 时在培养皿中加入胰蛋白酶进行细胞传代。

细胞分组、转染和双荧光素酶报告基因检测：实验分为 miR - 4465 mimic 组、miR - 4465 inhibitor 组、siWnt5A 组、miR - 4465 inhibitor + siWnt5A 组；各组设相应的阴性对照（NC），miR - 4465 mimic 的 NC 是一段与 miR - 4465 序列无相似性、无生物学功能的随机核苷酸序列转染细胞；siCtrl 是 siWnt5A 的空载体对照，分别采用 siCtrl 和 siWnt5A 转染细胞转染了空载体和 miR - 4465 inhibitor NC 的细胞。培养至 90% 汇合后，以每孔 2×10^5 个细胞的密度，添加 miR mimic / miR NC mimic（50 nmol / L）或 miR inhibitor / miRNA NC inhibitor（20 nmol / L）至转染细胞中。孵育 48 h，反转录聚合酶链反应使用（RT - qPCR）法检测内源性 miR - 4465 的表达。siRNA 转染，设计 3 个 siRNA 和 siRNA 的 NC，以 nanotrans 转染剂转染细胞。用于敲低 Wnt5A 和 NC。转染 72 h 后，通过 RT - qPCR 法和 Western blot 法评估 Wnt5A 的表达水平。双荧光素酶报告基因检测，细胞转染 48 h 后用双萤光素酶检测试剂分析 miR - 4465 和 Wnt5A 野生型 / 突变型（WT / Mut）荧光素酶活性。

mRNA 表达检测：采用 RT - qPCR 法。1）mRNA 检测，提取总 RNA，逆转录制备 cDNA。定量测量 RNA 丰度。引物序列如下，GAPDH 的 5′ - AGAAGGCTGGGGCT-CATTTG - 3′和 5′ - AGGGGCCATCCACAGTCTTC - 3′，Wnt5A 的 5′ - TCGACTATGGCTACCGCTTTG3 - ′和 5′ - CACTCTCGTAGGAGCCCTTG - 3′。2）miRNA 检测，提取总 RNA，逆转录并扩增总 RNA。引物序列如下，

miR－4465的5′－CGCTCAAGTAGTCTGACCAGGG－3′和5′－ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG－3′，U6的5′－GGAACGATACAGAGAAGATTAGC－3′和5′－TGGAACGCTTCACGAATTTGCG－3′。反应条件，95 ℃，30 s初始变性，95 ℃，5 s，60 ℃，30 s，40个循环。采用$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算Wnt5A、miR－4465的表达水平。

细胞凋亡检测：采用CCK－8法。取对数生长期的U87和U118细胞适量，按每孔2×10^3个的细胞密度接种到96孔板中，孵育12 h，分组给药，培养1～5 d，弃去培养液，加入10 μL CCK－8溶液和100 μL新鲜培养液继续培养2 h。以酶联免疫吸附试验法，采用酶标仪在450 nm波长处检测光密度（OD）值，重复3次，取平均值。

克隆形成实验：取对数生长期U87和U118细胞适量，加1 mL胰蛋白酶轻微吹打2 min，得单细胞悬液并以每孔1×10^3个细胞的密度铺于6孔板中。分组、给药，每3 d更换1次培养基，14 d后用0.1%结晶紫/40%甲醇固定、染色细胞，显微镜下计数细胞克隆数量。

划痕愈合实验：取对数生长期U87和U118细胞适量，以每孔2×10^5个细胞的密度接种于6孔板内，分组、给药，培养48 h。以200 μL移液管尖端垂直孔壁划痕，加入无血清培养基，继续培养48 h。在显微镜下于指定时间（0 h、6 h、24 h）拍照，观察细胞迁移情况并计算相对迁移率。

Transwell实验：将Matrigel基质胶和Transwell小室于4 ℃下过夜。分组、给药，每个孔加入100 μL无血清培养基。孵育30 min后，将500 μL含10%胎牛血清的DMEM培养基加入下室。加胰蛋白酶，获得单细胞悬液，重悬于无血清培养基（密度为2×10^6个细胞/mL）中，然后向上室中加入100 μL细胞悬液。细胞在37 ℃、5%CO_2条件下培养48 h。取出小室，固定于4%多聚甲醛中，并用0.1%结晶紫染色。随机选择3个视野，在显微镜下进行细胞计数，取平均值。

蛋白表达水平检测：采用Western blot法。采用RIPA裂解液提取细胞总蛋白，以BCA测定蛋白含量。上样，10% SDS－PAGE分离电泳后电转，转膜，封闭，加入一抗Wnt5A（1∶1 000，V/V）和GAPDH（1∶10 000，V/V）抗体，4 ℃孵育过夜，TBST漂洗3次，每次10 min，加入羊抗兔二抗（1∶10 000，V/V）37℃孵育1 h。系统成像，拍照，采用Fusion软件分析条带的OD值。

移植瘤模型裸鼠增殖实验：将18只裸鼠随机分为miR－4465 NC组，miR－4465敲除（miR－4465 KD）组、miR－4465过表达（miR－4465 UP）组，各6只。用miR－4465 mimic或miR－4465 inhibitor和NC转染U87细胞。将5.0×10^5个细胞注射到BALB/c裸鼠左侧腋下，以复制移植瘤裸鼠模型。待肿瘤体积达100 mm^3时每隔3 d记录肿瘤长径（L）和短径（W）。37 d时处死小鼠，提取、固定肿瘤组织，计算并称定质量，石蜡包埋，切片5 μm染色[14－15]。肿瘤体积$=L\times W^2/2$，于光学显微镜下观察阳性表达水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计学软件分析。符合正态分布的计量资料以$\overline{X}\pm s$表示，两组间比较采用Students′－t检验，多组间比较采用单因素方差分析，并采用LSD－t法进行多重比较。$P<0.05$为差异有统计学意义。

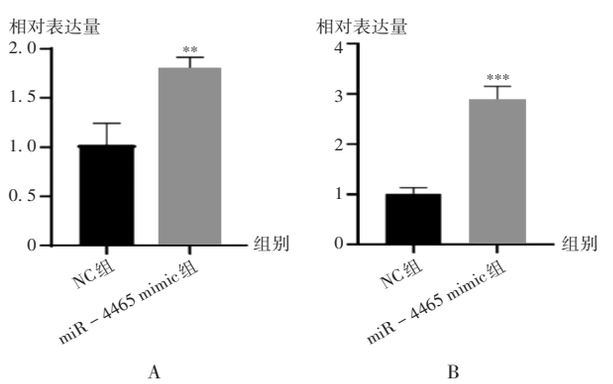
2 结果

2.1 细胞中miR－4465的表达及细胞活力

与NC组比较，miR－4465 mimic组U87、U118细胞中miR－4465的表达显著增强。详见图1。CCK－8法结果显示，miR－4465 mimic显著抑制了U87及U118细胞的活力（$P<0.01$）。详见图2。

2.2 miR－4465过表达条件下胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力

细胞克隆形成实验结果显示，miR－4465 mimic显



A. U87细胞　B. U118细胞

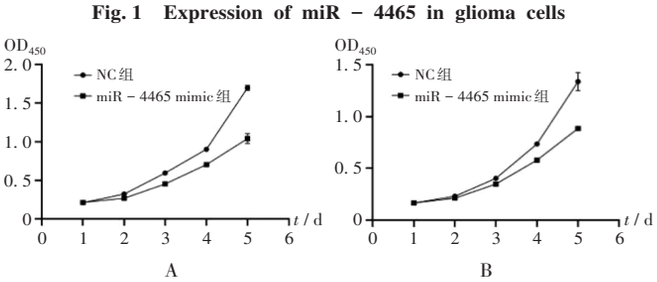
注：与NC组比较，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。图3至图6，图8至图10同。

图1 miR－4465在胶质瘤细胞中的表达

A. U87 cells　B. U118 cells

Note: Compared with those in the NC group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ (for Fig. 1, Fig. 3 – 6 and Fig. 8 – 10).

Fig. 1 Expression of miR－4465 in glioma cells



A. U87细胞　B. U118细胞

图2 细胞活力

A. U87 cells　B. U118 cells

Fig. 2 Cell viability

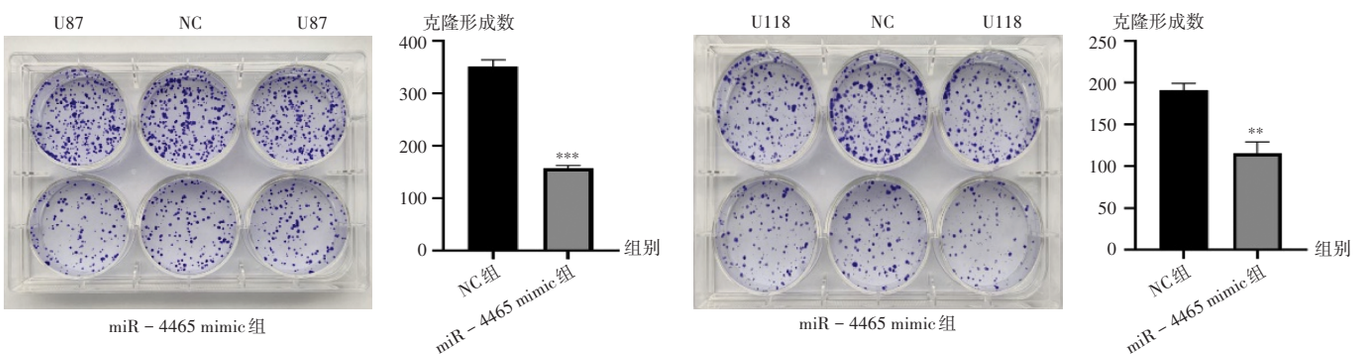
著抑制了 U87 及 U118 细胞的增殖。划痕愈合实验和 Transwell 实验结果显示，miR－4465 mimic 显著抑制了 U87 细胞及 U118 细胞的迁移和侵袭能力（$P < 0.01$）。详见图 3 至图 5。

2.3 miR－4465 与 Wnt5A 的结合情况

Wnt5A－3′UTR－WT 组细胞中荧光素酶活性较 NC 组降低 30%（$P < 0.05$）。将 Wnt5A－3′UTR 区进行突变后，Wnt5A－3′UTR－Mut 组细胞中的荧光素酶活性较突变前升高 40%（$P < 0.05$）。RT－qPCR 和 Western blot 结果显示，siRNA－2 抑制 Wnt5A mRNA 和蛋白表达的作用最好。与 NC 组比较，miR－4465 inhibitor 可显著抑制 miR－4465 的表达。结果表明 Wnt5A 是 miR－4465 作用的一个靶基因，后续实验可通过抑制 Wnt5A 和 miR－4465 进行验证。详见图 6。

2.4 miR－4465 通过 Wnt5A 抑制胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭

与 NC 组比较，siWnt5A 组细胞的增殖、迁移、侵袭能力均显著减弱（$P < 0.01$），而 miR－4465 inhibitor 组细胞的增殖、迁移、侵袭能力均显著增强（$P < 0.01$）。其中，miR－4465 inhibitor + siWnt5A 组胶质瘤细胞的增



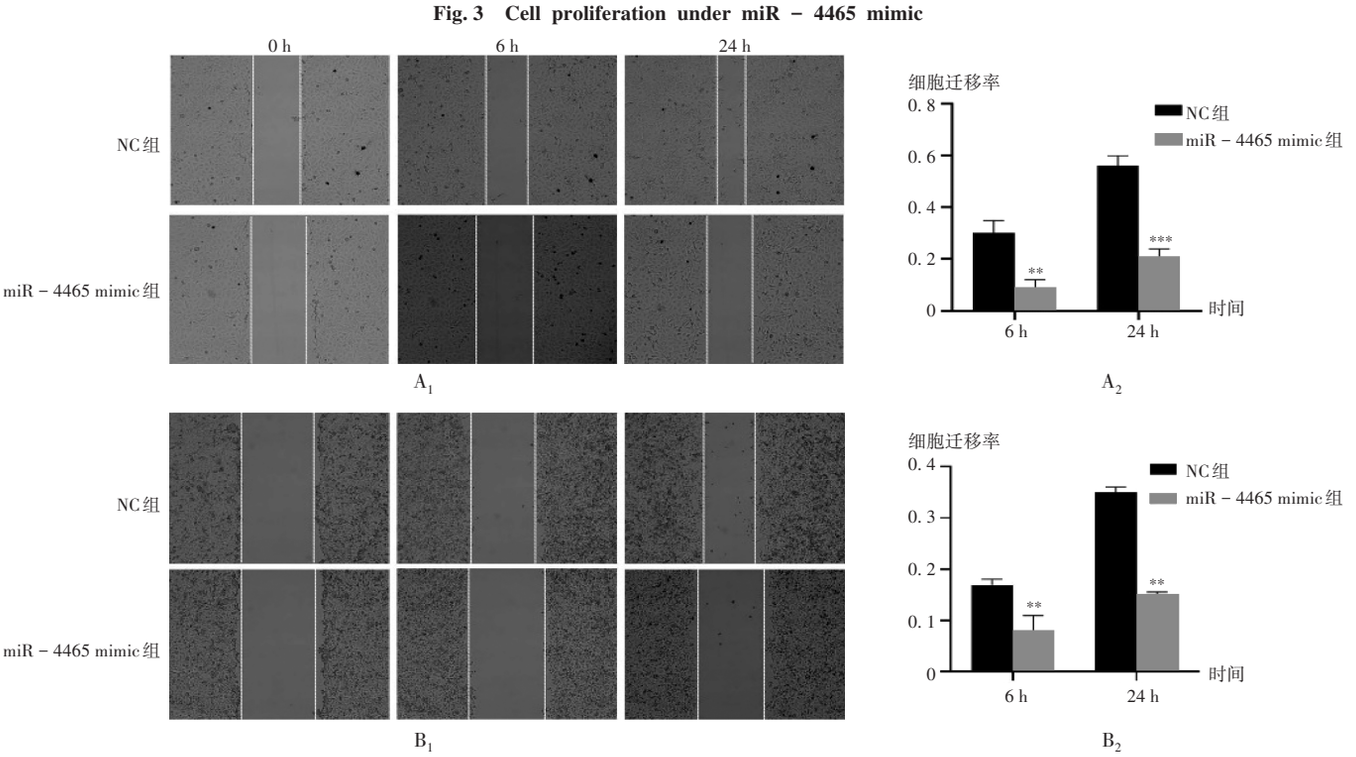
A_1　A_2　B_1　B_2

A_1. U87 细胞增殖图片　A_2. U87 细胞增殖数据统计　B_1. U118 细胞增殖图片　B_2. U118 细胞增殖数据统计

图 3　miR－4465 mimic 条件下细胞增殖情况

A_1. Photo of U87 cell proliferation　A_2. Data statistics of U87 cell proliferation　B_1. Photo of U118 cell proliferation　B_2. Data statistics of U118 cell proliferation

Fig. 3　Cell proliferation under miR－4465 mimic



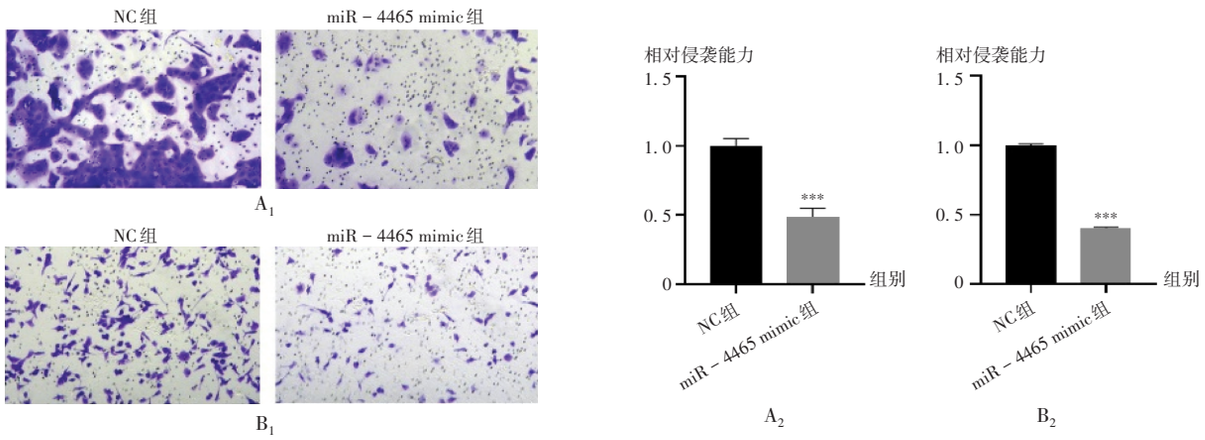
A_1　A_2　B_1　B_2

A_1. U87 细胞迁移图片　A_2. U87 细胞迁移数据统计　B_1. U118 细胞迁移图片　B_2. U118 细胞迁移数据统计

图 4　miR－4465 mimic 条件下细胞迁移情况

A_1. Photo of U87 cell migration　A_2. Data statistics of U87 cell migration　B_1. Photo of U118 cell migration　B_2. Data statistics of U118 cell proliferation

Fig. 4　Cell migration under miR－4465 mimic

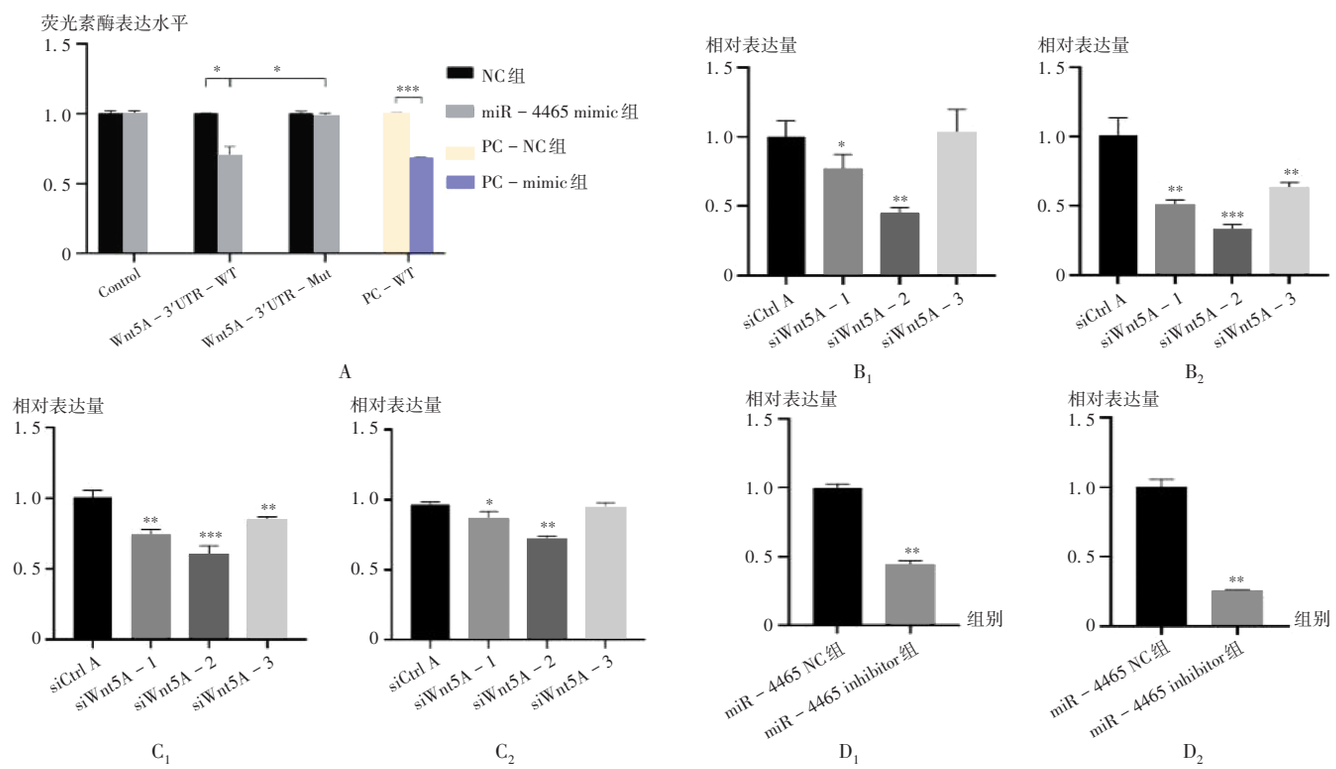


A_1. U87细胞侵袭图片　A_2. U87细胞侵袭数据统计　B_1. U118细胞侵袭图片　B_2. U118细胞侵袭数据统计

图5　miR－4465mimic条件下细胞侵袭情况

A_1. Photo of U87 cell invasion　A_2. Data statistics of U87 cell invasion　B_1. Photo of U118 cell invasion　B_2. Data statistics of U118 cell invasion

Fig. 5　Cell invasion under miR－4465 mimic



A. 双荧光素酶报告基因检测结果　B. Wnt5A siRNA转染后Wnt5A mRNA表达水平（B_1. U87细胞，B_2. U118细胞）　C. Wnt5A siRNA转染后Wnt5A蛋白表达水平（C_1. U87细胞，C_2. U118细胞）　D. miR－4465 inhibitor处理后miR－4465 mRNA表达水平（D_1. U87细胞，D_2. U118细胞）

图6　miR－4465与Wnt5A的结合及Wnt5A与miR－4465敲除检测

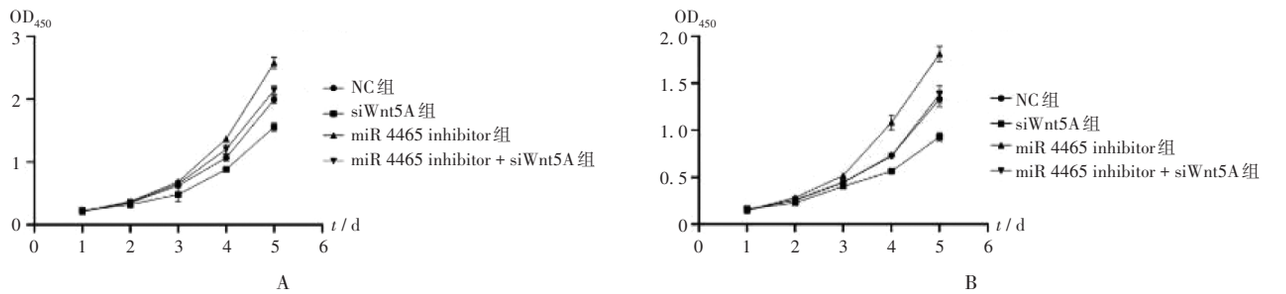
A. Results of dual－luciferase reporter gene test　B. Expression level of Wnt5A mRNA after transfection of Wnt5A siRNA (B_1. U87 cells, B_2. U118 cells)　C. Expression level of Wnt5A protein after transfection of Wnt5A siRNA (C_1. U87 cells, C_2. U118 cells)　D. Expression level of miR－4465 mRNA after treatment with miR－4465 inhibitor (D_1. U87 cells, D_2. U118 cells)

Fig. 6　Detection of binding of miR－4465 with Wnt5A and knockout of Wnt5A and miR－4465

殖、迁移和侵袭能力较siWnt5A组增强，但低于miR－4465 inhibitor组（$P < 0.05$）。表明抑制Wnt5A可部分逆转miR－4465 inhibitor的作用。详见图7至图9。

2.5　模型裸鼠胶质瘤增殖情况

与NC组比较，miR－4465 KD组miR－4465表达水平显著降低，miR－4465 UP组miR－4465表达水平显著升高（$P < 0.01$）。与NC组比较，miR－4465 KD组肿瘤体积和质量显著增加，miR－4465 UP组肿瘤体积和质量显著减少（$P < 0.01$）。免疫组化检测结果显示，miR－4465 KD组的肿瘤组织ki67阳性表达水平升高，

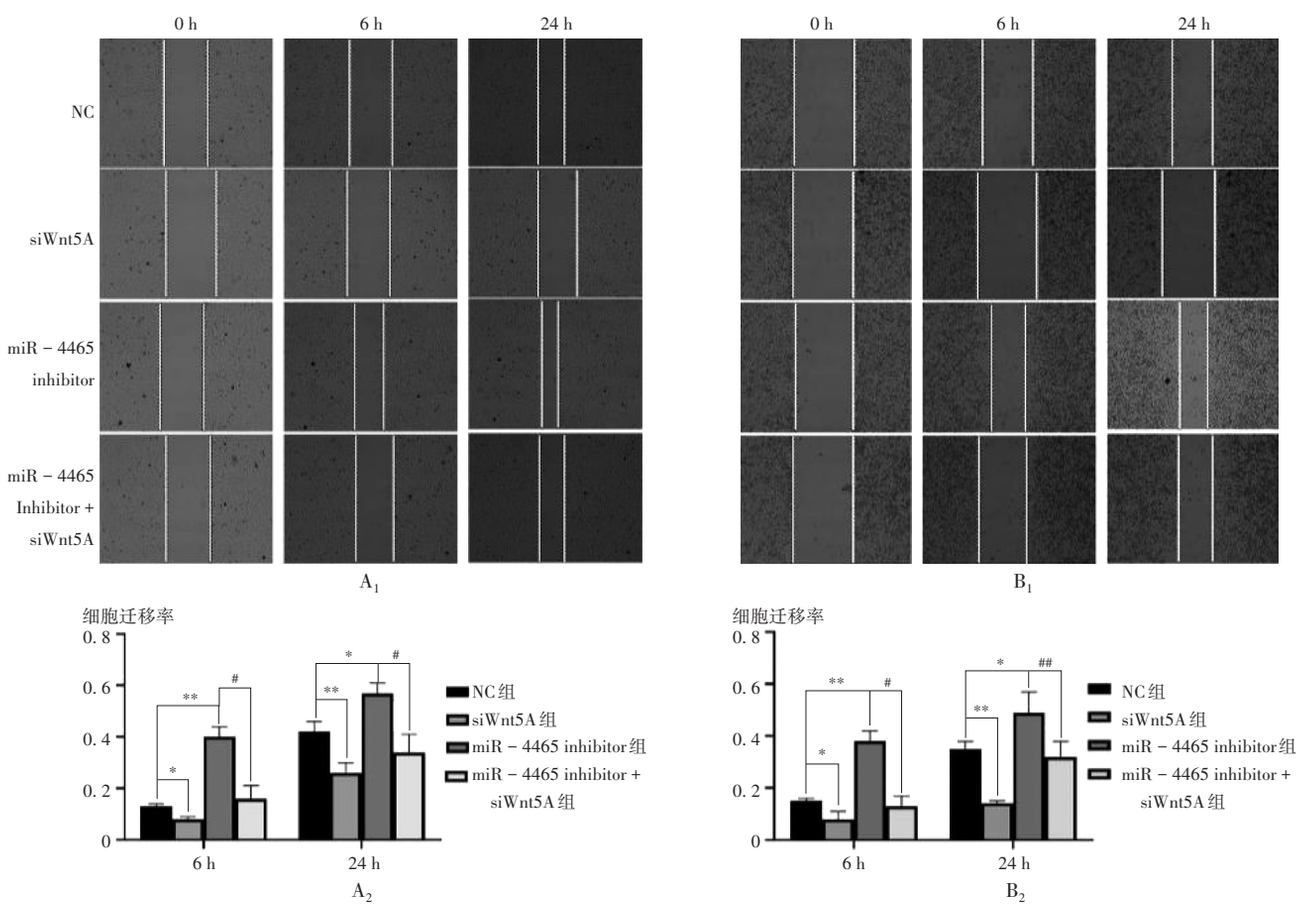


A. U87细胞 B. U118细胞

图7 miR－4465与Wnt5A结合条件下细胞增殖情况

A. U87 cells B. U118 cells

Fig. 7 Cell proliferation under the binding of miR－4465 and Wnt5A



A_1. U87细胞迁移图片 A_2. U87细胞迁移数据统计 B_1. U118细胞迁移图片 B_2. U118细胞迁移数据统计

注：与miR－4465 inhibitor组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

图8 miR－4465与Wnt5A结合条件下细胞迁移情况

A_1. Photo of U87 cell migration A_2. Data statistics of U87 cell migration B_1. Photo of U118 cell migration B_2. Data statistics of U118 cell migration

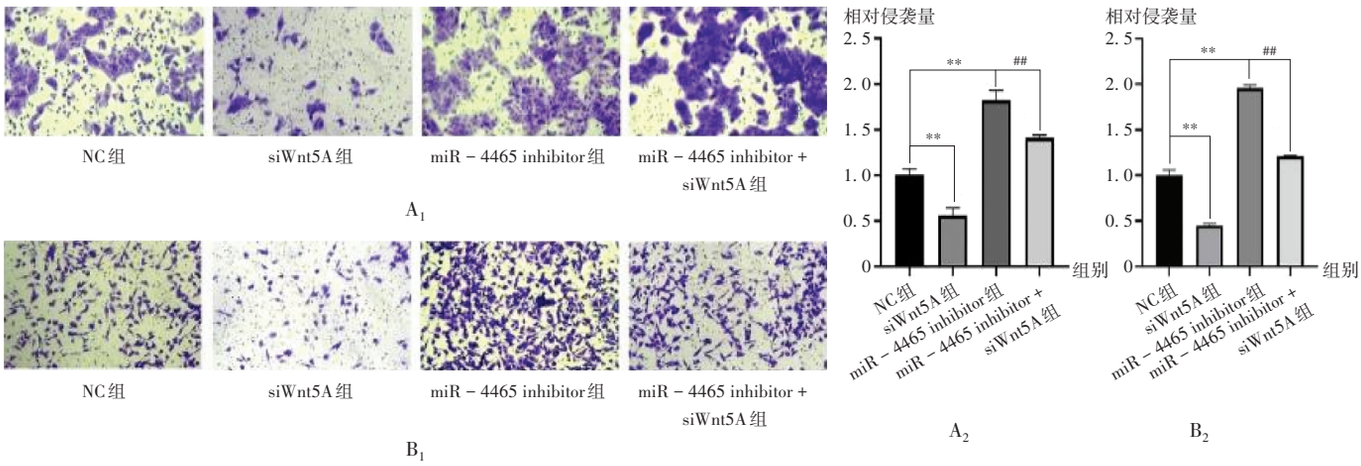
Note: Compared with those in the miR－4465 inhibitor group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

Fig. 8 Cell migration under the binding of miR－4465 and Wnt5A

表明miR－4465高表达可抑制胶质瘤生长。详见图10。

3 讨论

胶质瘤是最常见的中枢神经系统肿瘤，预后不良。识别神经胶质瘤的有效诊断生物标志物对于指导优化治疗尤为重要。miR－4465已被证实在多种肿瘤中表达下调。郑华山等[16]的研究显示miR－4465在胃癌组织和细胞中的表达水平降低，miR－4465过表达能显著抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化。于利等[17]的研究显示，miR－4465在宫颈癌组织中表达水平降低，miR－4465过表达可与抑制宫颈癌细胞增殖活力。孙峰等[18]的研究显示，携带miR－4465 mimic的外泌体可显著抑制食管癌细胞EC109的迁移和侵袭能力。预试验中，首先检测了miR－4465在人小胶质细胞和胶质瘤细胞中的表达。与人小胶质细胞HMC3相比，

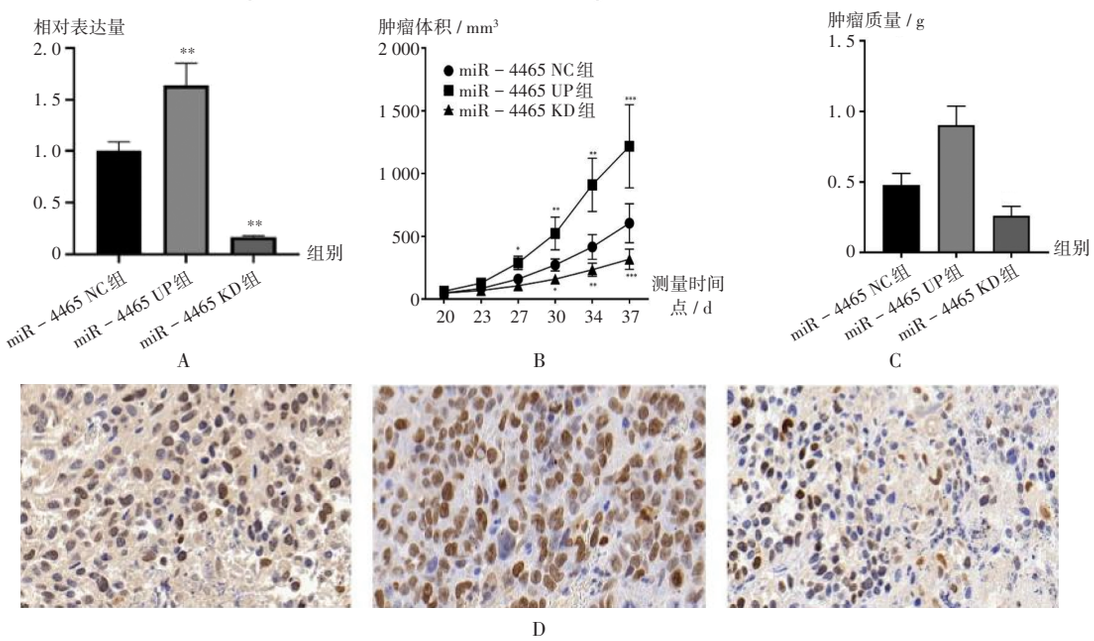


A_1. U87细胞侵袭图片　A_2. U87细胞侵袭数据统计　B_1. U118细胞侵袭图片　B_2. U118细胞侵袭数据统计

图9　miR－4465与Wnt5A结合条件下细胞侵袭情况

A_1. Photo of U87 cell invasion　A_2. Data statistics of U87 cell invasion　B_1. Photo of U118 cell invasion　B_2. Data statistics of U118 cell invasion

Fig. 9　Cell invasion under the binding of miR－4465 and Wnt5A



A. miR－4465表达水平　B. 肿瘤体积　C. 肿瘤质量　D. 肿瘤组织ki67的阳性表达水平

图10　miR－4465条件下小鼠体内胶质瘤细胞增殖情况

A. Expression level of miR－4465　B. Tumor volume　C. Tumor mass　D. Positive expression level of ki67 in tumor tissue

Fig. 10　Proliferation of glioma cells in mice under miR－4465

miR－4465在胶质瘤U118、U87和A172细胞中的表达丰度显著降低。本研究中，选取miR－4465表达水平相对较低的U118细胞和U87细胞，以miR－4465 mimic转染后，miR－4465的表达水平显著升高。CCK－8、克隆形成、划痕愈合和Transwell实验结果显示，miR－4465过表达显著抑制了U118细胞和U87细胞的增殖、迁移、侵袭能力。

miRNA主要通过调节靶基因来影响肿瘤的发生、增殖和侵袭等生物学行为[2]。SONG等[2]的研究表明，miR－4744直接与RIOK2的3′－非翻译区结合负调控RIOK2的表达。上调miR－4744的表达可抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭[2]。YU等[19]的研究表明，miR－338－3p的过表达在体外抑制了胶质瘤的细胞增殖、迁移、侵袭并促进了细胞凋亡。此外，髓鞘转录因子1样（MYT1L）是miR－383－3p在神经胶质瘤细胞中的直接靶点。孙峰等[18]的研究显示，miR－4465可能通过下调TGF－β/Smad1/2通路抑制食管癌细胞EC109的侵袭和迁移。这些研究表明用合成的miR－4465 mimic可能为肿瘤的治疗提供新的途径。本研究中通过双荧光素酶报告基因检测发现，miR－4465 mimic可抑制Wnt5A－3′－UTR区荧光素酶的活性，表明Wnt5A可能是miR－4465在胶质瘤中的靶基因。

Wnt蛋白是一大家族分泌的糖蛋白信号分子，富含半胱氨酸，在肿瘤进展中发挥重要作用，包括增殖、分化、凋亡和迁移。Wnt家族根据其不同的生物学功能分为2种类型：经典的Wnt/β-连环蛋白信号分子和非经典的信号分子。Wnt5A基因属于与不同受体复合物结合的非经典信号分子。ZENG等[20]的研究表明，Wnt5A表达的增强与胶质瘤患者的总生存率降低有关，且miR-129-5p对胶质瘤生长有抑制作用。本研究中对U118和U87细胞中的Wnt5A表达进行抑制，同时进一步抑制miR-4465的表达，结果显示，siWnt5A可显著抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。抑制miR-4465的表达后，胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显增强。同时，Wnt5A沉默逆转了miR-4465抑制的作用，表现在miR-4465 inhibitor + siWnt5A组的胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力较miR-4465 inhibitor组降低。体外研究证实了miR-4465可通过靶向Wnt5A抑制胶质瘤的生物活性。本研究结果证实了miR-4465过表达可在体内抑制胶质瘤的增殖，抑制miR-4465可促进肿瘤的增殖。与上述结论[20]一致。

综上所述，miR-4465在胶质瘤中呈低表达，miR-4465过表达可抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。体外实验证实Wnt5A是miR-4465的作用靶点，体内实验同样证实了miR-4465抑制胶质瘤的增殖作用。miR-4465可能是胶质瘤治疗的有效靶点，应用针对miR-4465为靶点的基因治疗可能为胶质瘤的临床治疗开辟新的思路。本研究存在一定的局限性，如未在体内实验中证实miR-4465对Wnt5A的靶向作用，亦无临床证据的支持。因此后续将通过体内实验明确miR-4465对Wnt5A的靶向作用，收集肿瘤组织，验证miR-4465的表达，为miR-4465作为胶质瘤的治疗靶点提供更确切的证据。

参考文献

[1] PAN T, WU F, LI L, et al. The role m6A RNA methylation is CNS development and glioma pathogenesis [J]. Mol Brain, 2021, 14(1): 119.
[2] SONG Y, LI C, JIN L, et al. RIOK2 is negatively regulated by miR-4744 and promotes glioma cell migration/invasion through epithelial-mesenchymal transition [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(8): 4494-4509.
[3] BAI H, GUO J, CHANG C, et al. Comprehensive analysis of lncRNA-miRNA-mRNA during proliferative phase of rat liver regeneration [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 18897-18905.
[4] ANDRESEN MS, STAVIK B, SLETTEN M, et al. Indirect regulation of TFPI-2 expression by miR-494 in breast cancer cells [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 4036.
[5] 郭毅刚，宋 斌，胡 平，等. LncRNA PVT1调控miR-1207-5p/FMNL2对HL-60细胞凋亡及化疗敏感性的影响[J]. 中国药业，2023，32(3)：44-49.
[6] LI X, GUAN J, JIANG Z, et al. Microglial Exosome miR-7239-3p Promotes Glioma Progression by Regulating Circadian Genes [J]. Neurosci Bull, 2021, 37(4): 497-510.
[7] TU J, FANG Y, HAN D, et al. MicroRNA-22 represses glioma development via activation of macrophage-mediated innate and adaptive immune responses [J]. Oncogene, 2022, 41(17): 2444-2457.
[8] WU X, HU C, LONG C, et al. MicroRNA-351 Promotes the Proliferation and Invasion of Glioma Cells through Downregulation of NAIF1 [J]. J Mol Neurosci, 2020, 70(10): 1493-1499.
[9] MOROKOFF A, JONES J, NGUTEN H, et al. Serum microRNA is a biomarker for post-operative monitoring in glioma [J]. J Neurooncol, 2020, 149(3): 391-400.
[10] RUPAOMOOLE R, SLACK FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203-222.
[11] LI QG, XIAO T, ZHU W, et al. HDAC7 promotes the oncogenicity of nasopharyngeal carcinoma cells by miR-4465-EphA2 signaling axis [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5): 322.
[12] LINDHOLM EM, RAGLE AURE M, HAUGEN MH, et al. miRNA expression changes during the course of neoadjuvant bevacizumab and chemotherapy treatment in breast cancer [J]. Mol Oncol, 2019, 13(10): 2278-2296.
[13] WU Y, DENG Y, GUO Q, et al. Long non-coding RNA SNHG6 promotes cell proliferation and migration through sponging miR-4465 in ovarian clear cell carcinoma [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(8): 5025-5036.
[14] BUNDA S, HEIR P, METCALF J, et al. CIC protein instability contributes to tumorigenesis in glioblastoma [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 661.
[15] 李进冬，高 一，李智勤，等. 基于转化生长因子β_1/哨乳动物雷帕霉素靶蛋白探讨黄芩苷对糖尿病模型大鼠的肾功能保护作用及机制[J]. 中国药业，2023，32(13)：46-50.
[16] 郑华山，陈成辉，蔡亲平，等. miR-4465调控EZH2的表达抑制胃癌细胞增殖、侵袭和迁移的机制探讨[J]. 现代肿瘤医学，2022，30(1)：22-27.
[17] 于 利，张 明，王 迪. miR-4465靶向KPNA2调控宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭的机制研究[J]. 中国实验诊断学，2021，25(5)：744-749.
[18] 孙 峰，谢 玮. 脐带间充质干细胞外泌体携载miR-4465抑制食管癌细胞的侵袭及迁移[J]. 医学研究生学报，2021，34(12)：1252-1258.
[19] YU Z, LIU Y, LI Y, et al. miRNA-338-3p inhibits glioma cell proliferation and progression by targeting MYT1L [J]. Brain Res Bull, 2022, 179: 1-12.
[20] ZENG A, YIN J, LI Y, et al. miR-129-5p targets Wnt5a to block PKC/ERK/NF-κB and JNK pathways in glioblastoma [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 394.

（收稿日期：2023-08-28；修回日期：2024-03-09）