

miR-382-5p过表达介导PTEN的表达下调对人脑胶质瘤U251细胞恶性生物学行为的影响*

赵树鹏¹, 姬颖华², 关庆凯¹, 马继伟¹, 靳彩玲², 王向阳¹, 赵新利¹

1. 新乡医学院第一附属医院 神经外科(新乡 453000); 2. 新乡医学院第一附属医院 肿瘤科(新乡 453000)

【摘要】目的 探究miR-382-5p过表达对人脑胶质瘤U251细胞恶性生物学行为的影响。**方法** 将miR-382-5p mimic转染入U251细胞, 逆转录-聚合酶链反应检测miR-382-5p、磷酸酶-张力蛋白同源物(*PTEN*) mRNA水平; 生物信息学预测miR-382-5p与*PTEN*存在碱基结合位点, 构建*PTEN* pcDNA载体过表达, 荧光素酶报告实验检测miR-382-5p与*PTEN*靶向关系, 将细胞随机分为4组: Control组、mimics组、pc-*PTEN*组和mimics+pc-*PTEN*组进行后续实验, 逆转录-聚合酶链反应检测各组细胞*PTEN*水平; 克隆形成法检测细胞增殖; 逆转录-聚合酶链反应检测*Ki67*、*Survivin*、*c-Myc* mRNA水平; Transwell检测细胞侵袭能力; 蛋白免疫印迹检测E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平。**结果** miR-382-5p和*PTEN*存在直接靶向作用关系, 与Control组相比较, mimics组miR-382-5p mRNA水平升高($P<0.05$), *PTEN* mRNA水平降低($P<0.05$), 细胞克隆形成率降低($P<0.05$), *Ki67*、*Survivin* mRNA水平降低($P<0.05$), *c-Myc* mRNA水平升高($P<0.05$), 细胞侵袭数降低($P<0.05$), E-cadherin蛋白水平升高($P<0.05$), N-cadherin、Vimentin蛋白水平降低($P<0.05$)。pc-*PTEN*组miR-382-5p mRNA水平降低($P<0.05$), *PTEN* mRNA水平升高($P<0.05$), 细胞克隆形成率升高($P<0.05$), *Ki67*、*Survivin* mRNA水平升高($P<0.05$), *c-Myc* mRNA水平降低($P<0.05$), 细胞侵袭数升高($P<0.05$), E-cadherin蛋白水平降低($P<0.05$), N-cadherin、Vimentin蛋白水平升高($P<0.05$); 与pc-*PTEN*组相比较, mimics+pc-*PTEN*组miR-382-5p mRNA水平升高($P<0.05$), *PTEN* mRNA水平降低($P<0.05$), 细胞克隆形成率降低($P<0.05$), *Ki67*、*Survivin* mRNA水平降低($P<0.05$), *c-Myc* mRNA水平升高($P<0.05$), 细胞侵袭数降低($P<0.05$), E-cadherin蛋白水平升高($P<0.05$), N-cadherin、Vimentin蛋白水平降低($P<0.05$)。**结论** miR-382-5p过表达介导PTEN的表达下调可抑制胶质瘤U251细胞增殖、侵袭、生长和上皮细胞-间充质转化。

【关键词】 胶质瘤 miR-382-5p PTEN 上皮细胞-间充质转化

Overexpression of miR-382-5p Overexpression Mediated Downregulation of PTEN on Malignant Biological Behavior of Human Glioma U251 Cells ZHAO Shu-peng¹, JI Ying-hua², GUAN Qing-kai¹, MA Ji-wei¹, JIN Cai-ling², WANG Xiang-yang¹, ZHAO Xin-li¹. 1. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453000, China; 2. Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of overexpression of miR-382-5p overexpression on malignant biological behavior of human glioma U251 cells. **Methods** U251 cells were transfected with miR-382-5p mimic. Then miR-382-5p and *PTEN* mRNA levels were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) after transfection. Used bioinformatics to predicted the presence of base binding sites between miR-382-5p and *PTEN*, and constructed *PTEN* pcDNA vector overexpression plasmid was constructed. Luciferase reporting experiment was used to detect the targeting relationship between miR-382-5p and *PTEN*. Cells were randomly divided into four groups: control group, mimics group, pc-*PTEN* group and mimics+pc-*PTEN* group for follow-up experiments. RT-PCR was carried out to detect the level of *PTEN* mRNA in each group. Cell proliferation was detected by clone formation method. The mRNA levels of *Ki67*, *Survivin* and *c-Myc* were detected by RT-PCR. Transwell experiment was used to assayed cell invasion ability. The expression levels of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin were determined by Western blot. **Results** Results showed that miR-382-5p directly targeted *PTEN*. Compared with the control group, miR-382-5p and *c-Myc* mRNA levels and E-cadherin protein level were increased ($P<0.05$), *PTEN*, *Ki67* and *Survivin* mRNA levels were decreased ($P<0.05$), cell clonal formation rate and cell invasion number were decreased ($P<0.05$), N-cadherin and Vimentin protein levels were decreased ($P<0.05$) in the mimics group; In pc-*PTEN* group, miR-382-5p mRNA and *c-Myc* mRNA levels and E-cadherin protein level were decreased ($P<0.05$), *PTEN*, *Ki67* and *Survivin* mRNA levels were increased ($P<0.05$), cell clonal formation rate and cell invasion number were increased ($P<0.05$), N-cadherin and Vimentin protein levels were increased ($P<0.05$). Compared with pc-*PTEN* group, *PTEN*, *Ki67* and *Survivin* mRNA levels, the cell clone formation

* 河南省医学科技攻关计划项目(No. 201203068)资助

rate, the number of invasion cells and the N-cadherin and Vimentin levels of mimics+PC-PTEN group decreased significantly ($P<0.05$), while the *c-Myc* mRNA level and E-cadherin protein level increased significantly ($P<0.05$).

Conclusion Overexpression of miR-382-5p mediates the downregulation of PTEN expression, causing the inhibition of the proliferation, invasion, growth and EMT of U251 glioma cells.

【Key words】 Glioma miR-382-5p PTEN EMT

胶质瘤是中枢神经系统中最常见的恶性肿瘤,胶质瘤的高转移性和侵袭性导致其复发率高,预后较差,其五年生存率低于10%^[1]。胶质瘤治疗方式包括手术切除、放射疗法和化学疗法,虽然目前胶质瘤的诊断和适当的全身治疗已取得了进展,但其中位生存期仍然较短,约为14.6个月^[2]。其主要原因是胶质瘤发生机制尚未完全阐明。因此,有必要深入研究胶质瘤发生的分子机制。磷酸酶-张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)是一种抑癌基因,在多种肿瘤中发生高频率突变、缺失或启动子区域的甲基化。PTEN主要功能表现在调控细胞周期和细胞凋亡两个方面。miRNA在胶质瘤的发生发展中起关键作用,miR-382-5p在多种类型的肿瘤中表达失调,已有研究表明miR-382-5p在胶质瘤组织中表达与正常组织相比明显降低^[3],因此本研究将miR-382-5p过表达,联合其靶基因PTEN,检测其对胶质瘤U251细胞恶性生物学行为的影响。

1 材料和方法

1.1 试验试剂

Roswell Park Memorial Institute 1640(RPMI1640)培养基(61870-127)、胎牛血清(26400-036)、青-链霉素(15140-122)、胰蛋白酶(25200-056)购自美国Gibco公司;pcDNA3.0载体购自优宝生物技术有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0012S)购自上海碧云天生物技术研究;荧光素酶(L7840)检测试剂盒购自solarbio公司;Transwell(3374)购自美国Corning公司;E-cadherin(ab233611)、N-cadherin(ab254512)、Vimentin(ab137321)(ab39688)等抗体购自美国Abcam公司。

1.2 细胞培养

人脑胶质瘤U251细胞来源于美国典型培养物保藏中心,将细胞培养于RPMI1640培养基中,添加10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素,置于37℃、体积分数为5%CO₂的培养箱中,每24h更换新鲜培养基,1:2传代。选用对数生长期细胞为实验用细胞,通过pcDNA3.0载体构建PTEN过表达质粒(pcDNA3.0-PTEN)。将细胞随机分为4组:对照组、mimics组、pc-PTEN组、mimics+pc-PTEN组。mimics组转染miR-382-5p mimic, pc-PTEN组转染pcDNA3.0-PTEN, mimics+pc-PTEN组同时转染miR-

382-5p mimic及pcDNA3.0-PTEN。根据Lipofectamine 2000说明书,将100 μL质粒终浓度为100 nmol/L的Lipofectamine 2000混合溶液分别或者联合加入各组U251细胞。对照组加入无质粒的Lipofectamine 2000溶液。转染4h后更换培养基,24h后通过RT-PCR检测确定转染是否成功。

1.3 双荧光素酶报告基因实验

选用双荧光素酶报告基因检测试剂盒验证PTEN是否为miR-382-5p的直接下游靶基因。用生物信息学方法分析并预测miR-382-5p与PTEN存在的碱基结合位点,设计并构建野生型和突变型PTEN 3' UTR荧光素酶报告基因质粒,收集对数生长期的U251细胞,将细胞分为4组,分别转染PTEN野生型质粒(PTEN wt组)、PTEN野生型+miR-382-5p mimics(PTEN wt+mimics组)、PTEN突变型质粒(PTEN mut组)、PTEN突变型+miR-382-5p mimics(PTEN mut+mimics组)。转染48h后,用PBS清洗,倒去洗涤液,加入1×ULB,在微型振荡器中混匀5 min,按照试剂盒说明取20 μL样品加入测量管底部,Fluor Assay Reagent I 100 μL加入管底部,轻轻敲击管壁3~5次混匀,放入仪器中立即测定,记录发光值为萤火虫荧光素酶的发光单位(RLU),然后取Fluor Assay Reagent II 100 μL立即加入管底部,轻轻敲击管壁3~5次混匀,放入仪器中立即测定,记录发光值为内参照海肾荧光素酶的发光单位(RLU)。用萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性比值表示荧光素酶的相对活性。

1.4 生物信息学预测和RT-PCR

先通过Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) 在线分析并预测miR-382-5p与PTEN存在的碱基结合位点;然后通过RT-PCR进行检测。用Trizol法从各组胶质瘤细胞U251中提取总RNA,用Nanodrop 分光光度计测定吸光度(A_{260}/A_{280}),以GAPDH为内参,按照试剂盒说明书进行cDNA的合成和PCR的扩增。引物序列如下:

miR-382-5p: F 5'-GGGAAGTTGTTTCGTGGTGG-3', R 5'-CAGTGCGTGTCGTGGAGT-3'; PTEN: F 5'-GCGTACCATGACAGCCATCATCAAAGAG-3', R 5'-CGAAGGTTTCAGACTTTGTAATTTGTGT-3'; Ki67: F 5'-GTGAGGGAATACCTTTGA-3', R 5'-CCTGATG

GTTGAGGCTGT-3'; Survivin: F 5'-GGACCACC GCATCTCTACAT-3', R 5'-GCACTTTCTCCGCA GTTTCC-3'; *c-Myc*: F 5'-AACGUUAGCUUCACCA ACAUU-3', R 5'-AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-3'; *GAPDH*: F 5'-TGTGGGCATCAATGGATTTGG-3', R 5'-ACACCATGTATTCCGGGTCA AT-3'。miR-382-5p mimic和各引物序列由上海生物工程有限公司设计合成。

反应条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 扩增35个循环, 72 °C延长10 min; 存储在4 °C条件下。反应产物用2%琼脂糖凝胶电泳分离。根据荧光定量, 计算所有样品和标准品的Ct值。基于该标准的Ct值, 绘制标准曲线, 然后使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行定量计算, 并以对照组的表达为1, 计算其他组相对于对照组的表达量。

1.5 克隆形成法检测细胞增殖

在培养皿中培养细胞至大约30%融合度, 继续培养4 d, 吹散为单个细胞, 用6孔板培养, 约500个细胞每孔, 培养14 d, 弃掉培养基, 用乙醇固定30 min, 接着用0.5%结晶紫染色, 用去离子水漂洗晾干, 进行拍照观察克隆形成数目, 计算克隆形成率。克隆形成率= 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 Transwell检测细胞侵袭

取300 μ L无血清培养基, 4 °C下加入60 μ L Matrigel混匀, 平均加入Transwell小室, 置于37 °C培养箱中孵育5 h, 将100 μ L细胞用无血清培养基清洗3次, 配成细胞悬液加入Transwell小室, 下室中加入600 μ L含有20%胎牛血清的培养基, 置于37 °C培养箱中孵育24 h, 取出小室用PBS洗2遍, 5%戊二醛固定, 0.1%结晶紫染色0.5 h后于荧光显微镜下观测, 随机选择5个视野对细胞进行计数, 侵入细胞

数表示为每视野的平均细胞数。

1.7 Western blot

收集各组细胞在冰上溶解25 min。以12 000 r/min离心10 min, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行总蛋白提取, 用BCA试剂盒测定蛋白质含量。提取等量的蛋白质样品(20 mg), 在100 °C条件下变性5 min。然后使用SDS-PAGE凝胶电泳法分离并转移至PVDF膜, 在4 °C条件下加入相应一抗并孵育过夜, 清洗, 然后在4 °C下加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 孵育2 h, 最后加入发光液, 曝光处理。ImageJ软件统计灰度值。以目的条带灰度值/*GAPDH*灰度值表示蛋白表达水平。

1.8 统计学方法

上述试验均重复3次, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采取 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-382-5p与PTEN靶向关系

如图1所示, 与对照组相比较, mimics组miR-382-5p mRNA水平升高($P < 0.05$), *PTEN* mRNA水平降低($P < 0.05$); pc-*PTEN*组miR-382-5p mRNA水平降低($P < 0.05$), *PTEN* mRNA水平升高($P < 0.05$)。与pc-*PTEN*组相比较, mimics+pc-*PTEN*组miR-382-5p mRNA水平升高($P < 0.05$), *PTEN* mRNA水平降低($P < 0.05$)。为验证miR-382-5p对*PTEN*的靶向关系, 采用荧光素酶实验检测, *PTEN* wt加入miR-382-5p mimic转染后的细胞荧光素酶活性明显降低($P < 0.05$), 结果证明miR-382-5p和*PTEN*存在直接靶向作用关系。

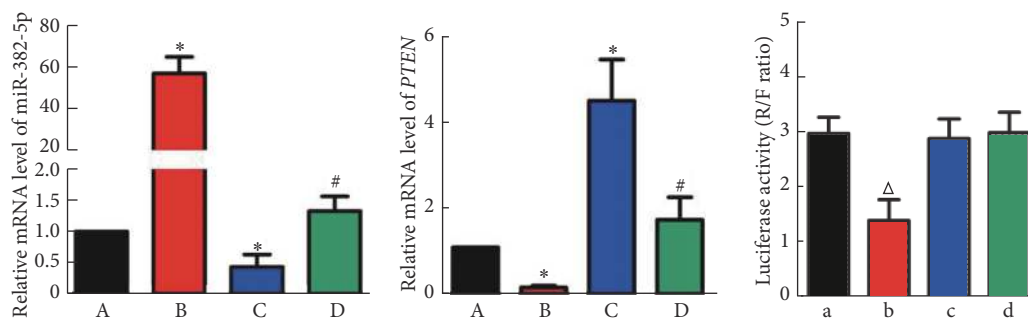


图1 miR-382-5p与*PTEN*靶向关系 ($n=3$)

Fig 1 The targeting relationship between miR-382-5p and *PTEN* ($n=3$)

A: Control group; B: Mimics group; C: pc-*PTEN* group; D: Mimics+pc-*PTEN* group; a: *PTEN* wt group; b: *PTEN* wt+mimics group; c: *PTEN* mut group; d: *PTEN* mut+mimics group. * $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. pc-*PTEN* group; Δ $P < 0.05$, vs. *PTEN* wt group.

2.2 miR-382-5p过表达介导PTEN的表达下调细胞增殖抑制

各组细胞增殖情况如图2所示。与对照组相比较,

mimics组细胞克隆形成率降低($P < 0.05$), pc-*PTEN*组细胞克隆形成率升高($P < 0.05$); mimics+pc-*PTEN*组细胞克隆形成率低于pc-*PTEN*组($P < 0.05$)。

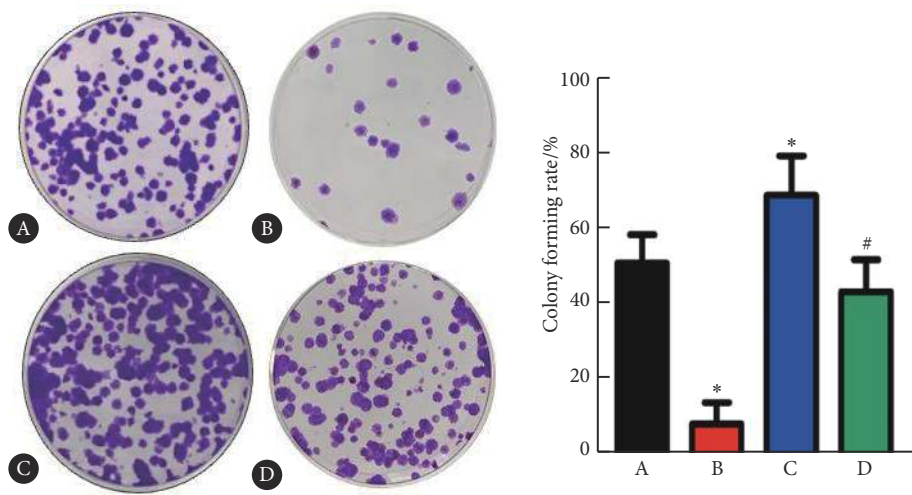


图 2 miR-382-5p过表达介导PTEN的表达对细胞增殖的影响 (×200, n=3)

Fig 2 Effect of miR-382-5p overexpression on cell proliferation mediated by PTEN expression (×200, n=3)

A: Control group; B: Mimics group; C: pc-PTEN group; D: Mimics+pc-PTEN group. * $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. pc-PTEN group.

2.3 miR-382-5p过表达介导PTEN的表达降低*Ki67*、*Survivin* mRNA水平, 升高*c-Myc* mRNA水平

结果如表1所示。与对照组比较, mimics组*Ki67*、*Survivin* mRNA水平降低 ($P<0.05$), *c-Myc* mRNA水平升高 ($P<0.05$); 与对照组比较, pc-PTEN组*Ki67*、*Survivin* mRNA水平升高 ($P<0.05$), *c-Myc* mRNA水平降低 ($P<0.05$); mimics+pc-PTEN组*Ki67*、*Survivin* mRNA水平低于pc-PTEN组 ($P<0.05$), *c-Myc* mRNA水平高于pc-PTEN组 ($P<0.05$).

表 1 miR-382-5p过表达介导PTEN的表达下调对*Ki67*、*Survivin*、*c-Myc* mRNA水平的影响 (n=3)

Table 1 Effects of miR-382-5p overexpression on mRNA levels of *Ki67*, *Survivin* and *c-Myc* mediated by downregulation of PTEN expression (n=3)

Group	<i>Ki67</i> mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	<i>Survivin</i> mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	<i>c-Myc</i> mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Control	1	1	1
Mimics	0.24±0.06*	0.16±0.07*	2.12±0.38*
pc-PTEN	2.43±0.33*	1.88±0.46*	0.38±0.06*
Mimics+pc-PTEN	1.27±0.24*	0.97±0.07*	1.43±0.42*

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. pc-PTEN group.

PTEN组 ($P<0.05$).

2.4 miR-382-5p过表达介导PTEN的表达抑制细胞侵袭
Transwell检测各组细胞侵袭能力结果如图3所示。

与对照组相比较, mimics组细胞侵袭数降低 ($P<0.05$), pc-PTEN组细胞侵袭数升高 ($P<0.05$), mimics+pc-PTEN组细胞侵袭数低于pc-PTEN组 ($P<0.05$).

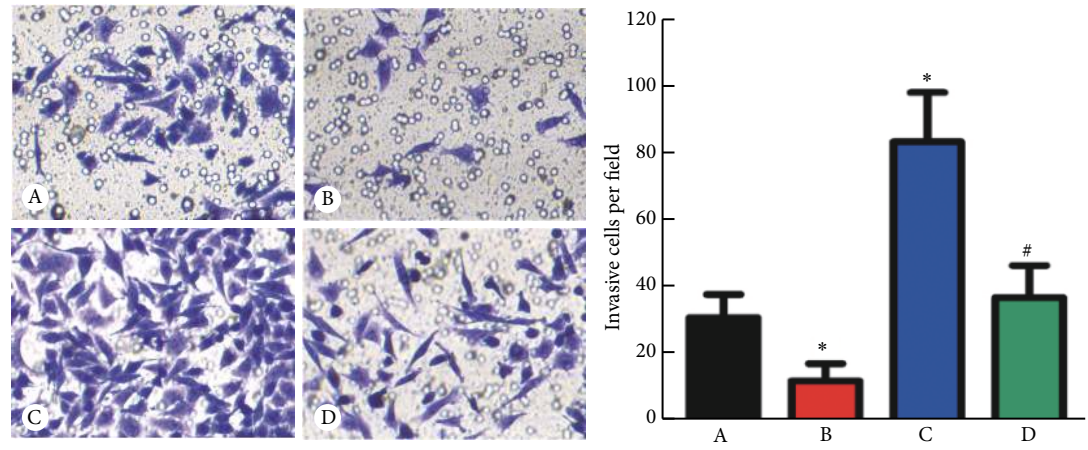


图 3 miR-382-5p过表达介导PTEN的表达对细胞侵袭的影响 (×200, n=3)

Fig 3 Effects of miR-382-5p overexpression on cell invasion mediated by PTEN expression (×200, n=3)

A: Control group; B: mimics group; C: pc-PTEN group; D: mimics+pc-PTEN group. * $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. pc-PTEN group.

2.5 miR-382-5p过表达介导PTEN的表达升高E-cadherin蛋白水平,降低N-cadherin、Vimentin蛋白水平

Western blot检测E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平结果如图4所示。与对照组比较, mimics组E-cadherin蛋白水平升高($P < 0.05$), N-

cadherin、Vimentin蛋白水平降低($P < 0.05$);与对照组比较, pc-PTEN组E-cadherin蛋白水平降低($P < 0.05$), N-cadherin、Vimentin蛋白水平升高($P < 0.05$); mimics+pc-PTEN组E-cadherin蛋白水平高于pc-PTEN组($P < 0.05$), N-cadherin、Vimentin蛋白水平低于pc-PTEN组($P < 0.05$)。

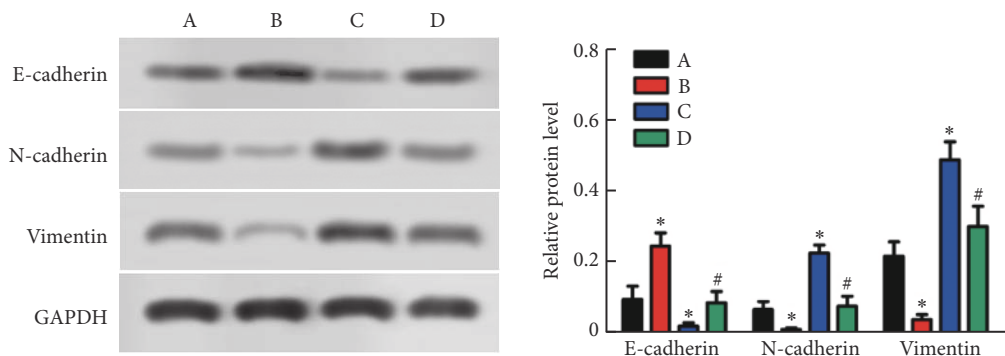


图4 miR-382-5p过表达介导PTEN的表达下调E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平的影响 ($n=3$)

Fig 4 The effect of miR-382-5p overexpression on the expression levels of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin by down-regulating PTEN expression ($n=3$)

A: Control group; B: Mimics group; C: pc-PTEN group; D: Mimics+pc-PTEN group. * $P < 0.05$, vs. A; # $P < 0.05$, vs. C.

3 讨论

全世界与癌症相关的死亡病例中有2.3%为中枢神经系统癌症患者^[4],而神经胶质瘤在成人的恶性脑肿瘤中占将近一半^[5]。虽然医疗科技在不断进步,但神经胶质瘤的预后仍然不容乐观,5年存活率极低。因此,了解预后相关影响因素对于临床决定正确的治疗方式和改善患者长期预后至关重要。microRNA是一组短且非编码的RNA分子,已被鉴定为基因表达的调节剂,它们可以作为肿瘤的抑制基因以及致癌基因,从而介导肿瘤的进展^[6]。PTEN是目前已知的唯一具有双磷酸酶活性的抑癌基因,其表达改变影响着胶质瘤的发生发展^[7],但关于调节PTEN基因表达的上游机制尚未明确,本研究发现miR-382-5p与PTEN存在直接靶向作用关系。且miR-382-5p高表达引起PTEN表达缺失,说明miR-382-5p可能通过介导PTEN对胶质瘤的发生发展起到重要作用。

无限增殖和抗凋亡是胶质瘤的两种重要恶性表型,包括神经胶质瘤在内的几种癌症可以产生对细胞凋亡的抵抗力,因此主要的抗癌疗法是抑制细胞生长和诱导细胞死亡^[8]。Ki67是存在于增殖细胞核中的一种非组蛋白性核蛋白,可识别处于细胞周期的细胞核抗原,其表达水平的高低可以指示癌症增殖的变化^[9]。Survivin是细胞抗凋亡基因家族的最小成员,也是目前已知唯一抗凋亡蛋白,可通过调控Caspase-3和Caspase-9抑制细胞调

亡^[10]。在胶质瘤中, Survivin水平升高与增殖标志物、组织学恶性程度相关,并且与预后呈负相关^[11]。c-Myc基因是常见的原癌基因,可控制多种细胞功能,包括细胞周期、细胞生长、存活、细胞代谢、生物合成、黏附和线粒体功能^[12]。DING等^[13]研究发现c-Myc高表达与胶质瘤恶性程度呈正相关,在I级和II级星形细胞瘤中低表达,而在III~IV级星形细胞瘤中表达较高。本研究发现, miR-382-5p+PTEN过表达具有下调Ki67、Survivin mRNA水平,升高c-Myc mRNA水平的作用。说明miR-382-5p过表达下调PTEN过表达抑制胶质瘤细胞U251增殖和生长。

肿瘤判定是否为恶性与肿瘤细胞的侵袭有关,因此研究胶质瘤细胞的侵袭能力对提供治疗方向具有重要作用。尽管过去几十年我们对胶质瘤的治疗手段不断提高,但却无法阻止胶质瘤的复发,原因就在于胶质瘤独特的侵袭性^[14]。目前研究发现许多对胶质瘤侵袭具有调节作用的micro-RNA, MEHRAN等^[15]研究发现miR-152通过作用于转录因子KLF4而抑制胶质瘤的侵袭。LI等^[16]研究发现miR-491-5p通过下调MMP-9的表达降低细胞的增殖和侵袭性。本研究发现, miR-382-5p+PTEN过表达具有抑制胶质瘤细胞U251侵袭的作用。说明miR-382-5p过表达下调PTEN过表达抑制细胞侵袭从而对胶质瘤具有抑制作用。

上皮细胞-间充质转化(EMT)是一种发生在伤口愈合和致癌过程中的生物学过程,在伤口愈合中,受损的上

皮促进角质形成细胞和成纤维细胞^[17]。EMT的主要特点是上皮细胞标志蛋白E-cadherin的丧失和间充质细胞标志蛋白N-cadherin及Vimentin的过表达^[18]。本研究发现miR-382-5p+PTEN过表达具有升高胶质瘤细胞U251 E-cadherin,降低N-cadherin、Vimentin表达水平的作用,说明miR-382-5p过表达下调PTEN过表达可抑制胶质瘤细胞U251 EMT。

综上,本研究揭示了miR-382-5p过表达介导PTEN的表达下调对人脑胶质瘤U251细胞恶性生物学行为的影响:抑制细胞增殖、侵袭,降低Ki67、Survivin mRNA水平、升高c-Myc mRNA水平,升高E-cadherin蛋白水平,降低N-cadherin、Vimentin蛋白水平。表明miR-382-5p在胶质瘤的恶性进展过程中具有重要的调控作用。

参 考 文 献

- [1] OSTROM Q T, GITTLEMAN H, FULOP J, *et al.* Cbtrus statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2008–2012. *Neuro Oncol*, 2015, 17(Suppl 4): iv1–iv62.
- [2] OSTROM Q T, GITTLEMAN H, STETSON L, *et al.* Epidemiology of gliomas. *Cancer Treat Res*, 2015, 163: 1–14.
- [3] WANG J, CHEN C, YAN X, *et al.* The role of miR-382-5p in glioma cell proliferation, migration and invasion. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 4993–5002.
- [4] ZHANG Y, CHEN J, XUE Q, *et al.* Prognostic significance of micrornas in glioma: a systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int*, 2019, 2019:4015969[2020-02-24]. <https://doi.org/10.1155/2019/4015969>.
- [5] VERHAAS R G, HOADLEY K A, PURDOM E, *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 2010, 17(1): 98–110.
- [6] SCHWARZENBACH H, NISHIDA N, CALIN G A, *et al.* Clinical relevance of circulating cell-free micrornas in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(3): 145–156.
- [7] PANNER A, CRANE C A, WENG C, *et al.* A novel PTEN-dependent link to ubiquitination controls flaps stability and trail sensitivity in glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, 2009, 69(20): 7911–7916.
- [8] FILIPPI-CHIELA E C, VILLODRE E S, ZAMIN L L, *et al.* Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS One*, 2011, 6(6):e20849[2019-08-07]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020849>.
- [9] NIIKURA N, IWAMOTO T, MASUDA S, *et al.* Immunohistochemical Ki67 labeling index has similar proliferation predictive power to various gene signatures in breast cancer. *Cancer Sci*, 2012, 103(8): 1508–1512.
- [10] KIM W, RYU J, KIM J E. CCAR2/DBC1 and Hsp60 positively regulate expression of Survivin in neuroblastoma cells. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1): 131.
- [11] VARUGHESE R K, TORP S H. Survivin and gliomas: a literature review. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1679–1686.
- [12] DANG C V, O'DONNELL K A, ZELLER K I, *et al.* The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16(4): 253–264.
- [13] DING Z, LIU X, LIU Y, *et al.* Expression of far upstream element (fuse) binding protein 1 in human glioma is correlated with c-Myc and cell proliferation. *Mol Carcinog*, 2015, 54(5): 405–415.
- [14] CUDDAPAH V A, ROBEL S, WATKINS S, *et al.* A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(7): 455–465.
- [15] MEHRAN R, NILSSON M, KHAJAVI M, *et al.* Tumor endothelial markers define novel subsets of cancer-specific circulating endothelial cells associated with antitumor efficacy. *Cancer Res*, 2014, 74(10): 2731–2741.
- [16] LI X, LIU Y, GRANBERG K J, *et al.* Two mature products of miR-491 coordinate to suppress key cancer hallmarks in glioblastoma. *Oncogene*, 2015, 34(13): 1619–1628.
- [17] THIERY J P, SLEEMAN J P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2): 131–142.
- [18] SCANLON C S, VAN TUBERGEN E A, INGLEHART R C, *et al.* Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J Dent Res*, 2013, 92(2): 114–121.

(2019-10-09收稿, 2020-06-09修回)

编辑 汤 洁