

lncRNA TLX1NB Targeting miR-328-3p Regulates the Proliferation and Apoptotic Function and Mechanism of Glioma Cells

Jiaode Jiang¹ Heran Wang²

1. Department of Neurology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410013, China
2. Hunan Cancer Hospital, Changsha, Hunan, 410013, China

Abstract

Objective: To study the effects of long-chain noncoding RNA TLX1NB on proliferation and apoptosis of glioma cells, and to explore the mechanism. **Methods:** The expression level of TLX1NB in Pan cancer in TCGA database was analyzed by bioinformatics, and the expression differences between glioma and normal tissues were compared. The effects of tlx1nb on proliferation, cycle and apoptosis of glioma cells U251 and U87 were analyzed by Cck8, clone formation assay and flow cytometry. The targeting relationship between TLX1NB and miR-328-3p, ABCG2 and miR-328-3p was verified by Pita, MIRanda, TargetScan prediction and double luciferase reporting experiment. To detect whether TLX1NB affects the proliferation and apoptosis of glioma cells through miR-328-3p. **Results:** Bioinformatics analysis showed that compared with other tumor tissues, TLX1NB was highly expressed in low-grade glioma tissues. Compared with normal tissues, TLX1NB was up-regulated in glioma tissues ($P < 0.05$). Interfering with TLX1NB significantly inhibited the proliferation, clone formation, arrested cell cycle and promoted cell apoptosis of glioma cells U251 and U87. Double luciferase report experiment showed that TLX1NB could specifically bind miR-328-3p, inhibit the expression level of miR-328-3p, interfere with TLX1NB and restore the expression of miR-328-3p, which could reverse the effect of TLX1NB on glioma cell proliferation and apoptosis. The results of double Luciferase Report showed that miR-328-3p directly combined with ABCG2 3'UTR and inhibited the expression of target gene ABCG2. **Conclusion:** lncRNA TLX1NB affects the proliferation and apoptosis of glioma cells by targeting miR-328-3p / ABCG2, which is a potential molecular marker in glioma.

Keywords

TLX1NB; miR-328-3p; glioma; apoptosis

lncRNA TLX1NB 靶向 miR-328-3p 调控胶质瘤细胞的增殖和凋亡功能与机制

姜交德¹ 王贺冉²

1. 中南大学湘雅三医院神经内科, 中国·湖南长沙 410013
2. 湖南省肿瘤医院, 中国·湖南长沙 410013

摘要

目的: 研究长链非编码RNA TLX1NB对胶质瘤细胞增殖、凋亡的影响, 并对作用机制进行探索。**方法:** 通过生物信息学分析TCGA数据库中TLX1NB在泛癌中的表达水平以及比较胶质瘤和正常组织中的表达差异。通过Cck8、克隆形成实验以及流式细胞实验分析TLX1NB对胶质瘤细胞U251和U87增殖、周期、凋亡的影响。通过Pita、MIRanda、TargetScan预测和双荧光素酶报告实验验证TLX1NB与miR-328-3p、ABCG2与miR-328-3p的靶向关系。检测TLX1NB是否通过miR-328-3p影响胶质瘤细胞的增殖和凋亡。**结果:** 生物信息学分析发现相较于其他肿瘤组织, TLX1NB在低级别胶质瘤组织中高表达, 与正常组织相比, 在胶质瘤组织中表达上调($P < 0.05$), 干扰TLX1NB显著抑制胶质瘤细胞U251和U87的增殖、克隆形成、阻滞细胞周期同时促进细胞的凋亡。双荧光素酶报告实验证明TLX1NB能特异性结合miR-328-3p, 并抑制miR-328-3p表达水平, 干扰TLX1NB的同时恢复miR-328-3p表达可以逆转TLX1NB对胶质瘤细胞增殖、凋亡的作用。双荧光素酶报告实验结果显示miR-328-3p直接结合ABCG2 3' UTR, 抑制靶基因ABCG2的表达。**结论:** lncRNA TLX1NB通过靶向miR-328-3p/ABCG2影响胶质瘤细胞的增殖和凋亡, 是胶质瘤中潜在的分子标志物。

关键词

TLX1NB; miR-328-3p; 胶质瘤; 细胞凋亡

1 引言

胶质瘤是一种浸润性强、致死率高、易于复发术后的脑神经恶性肿瘤, 研究胶质瘤发生发展的分子机制, 对于胶

质瘤的预防和治疗起着非常重要的作用。

长非编码RNA (lncRNAs) 是一类不编码蛋白的RNA, 其数量远大于编码蛋白的RNA, 长度一般超过200

个核苷酸。lncRNA 参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭等过程。例如，H19 是最早被证实与肿瘤发生发展相关的 lncRNA，H19 异常表达可以作为肿瘤的发生、发展、侵袭、转移和耐药过程中的标记物，在胃癌、前列腺癌、肝癌中发挥致癌作用。此外，随着 ceRNA 理论的发现，进一步揭示了 lncRNA 参与肿瘤发生发展的机制，即 ceRNA 与 miRNA 竞争结合，从而抑制了 miRNA 与靶基因 mRNA 的抑制作用，促进靶基因的表达。这一过程称为“ceRNA-miRNA-mRNA”的基因调控模式，这一调控模式在多种肿瘤中被报道，其中包括胶质瘤。

本研究中，我们发现了一个在胶质瘤组织中特异性高表达的长链非编码 RNA TLX1NB，高表达 TLX1NB 与胶质瘤不良预后正相关，敲低 TLX1NB 能显著抑制胶质瘤细胞的增殖和迁移能力。TLX1NB 通过竞争结合 miR-328-3p，导致 miR-328-3p 靶基因 ABCG2 表达升高，进而促进胶质瘤细胞的恶性表型。

2 材料与方法

2.1 主要试剂

胶质瘤细胞系 U251 和 U87 购自中科院细胞库；DMEM 培养基（货号：12800017）、胎牛血清（货号：10099141C）购自 Gibco 公司；miR-328-3p mimics、miR-328-3p inhibitor 购自广州锐博生物公司。

2.2 方法

2.2.1 细胞培养与转染

U251 和 U87 细胞用在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，并置于 37℃、5% 二氧化碳的条件下孵育。

2.2.2 细胞增殖实验

将 1×10^5 ABCG2 个/mL 密度的转染后的待检测细胞接种到 96 孔板中，每孔加入 $10 \mu\text{L}$ LCCCK-8 工作液，在培养箱中孵育 3h，置于多功能酶标仪读取每孔 450nm 的吸光值 (OD)。

2.2.3 细胞周期、凋亡实验

收集转染后的 U251 和 U87 细胞，加入 $500 \mu\text{L}$ Binding Buffer 重悬，用流式细胞仪检测前加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 和 $5 \mu\text{L}$ PI 染色。对于细胞周期实验，使用 Cell cycle staining Kit (70-CCS012)。

2.2.4 双荧光素酶报告基因活性检测

利用 Pita、MiRanda、TargetScan 分别预测出 TLX1NB 与

miR-328-5p 的结合位点，PCR 扩增带有 miR-328-5p 结合位点的 3'UTR 片段，构建含有报告基因 luc-3'-UTR-WT 载体和 luc-3'-UTR-mut 载体，将其与海肾载体及 miR-328-5p mimics 共转染 293T 细胞，转染 48h 后使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒（翊圣产品货号：11402ES）检测细胞的荧光素酶活性。

2.2.5 实时荧光定量 PCR

将反转录好的 cDNA 按照如下程序进行 PCR：92℃，5min（预处理）；92℃ 5sec，60℃ 15sec，70℃ 10sec（40 个循环）。获得的 Ct 值采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

2.2.6 Western blot

蛋白样本经 BCA 测定浓度后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，先后按照程序一 80V30min，程序二 120V90min 进行，转膜（100V90min）、封闭（1h）、孵育一抗和二抗，TBST 洗涤后加入 ECL 发光液置于发光仪显影^[1]。

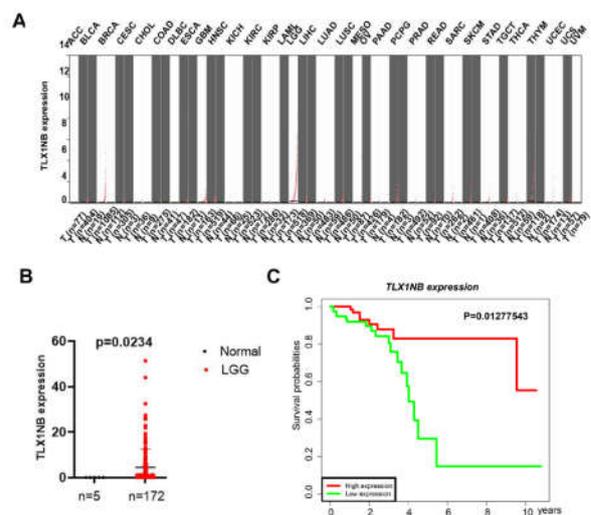
2.3 统计学分析

采用 SPSS25.0 统计分析软件，两组样本计量资料采用独立样本 *t* 检验，多组之间采用单因素方差分析，*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TLX1NB 在泛癌中的表达

利用 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 发现 TLX1NB 在胶质瘤中相对高表达（图 1A），进一步与正常组织比较发现癌组织中 TLX1NB 表达更高（图 1B），差异有统计学意义 (*P* < 0.05)，高表达 TLX1NB 与患者的不良预后相关（图 1C）。



A. 在线数据分析 TCGA 中 TLX1NB 在泛癌中的表达水平 (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php?gene=TLX1NB>)。B. 相比正常脑组织，低级别胶质瘤组织中 TLX1NB 的表达。C. 胶质瘤患者 (TLX1NB 高 vs 低) 的 OS 比较。

图 1

【基金项目】湖南省自然科学基金（项目编号：2018JJ2601）。

【作者简介】姜交德（1976-），男，中国湖南长沙人，博士，副主任医师，从事神经内科研究。

3.2 敲低 TLX1NB 对细胞增殖的影响

转染 si-TLX1NB 干扰 RNA 后, TLX1NB 的表达明显降低(图 2A, $P < 0.05$), 敲低 TLX1NB 明显抑制 U251 和 U87 细胞的增殖和克隆形成能力(图 2B、C), 且细胞阻滞于 G1 期同时下调 cyclinD1、cyclinE1 的表达(图 2D、E)。

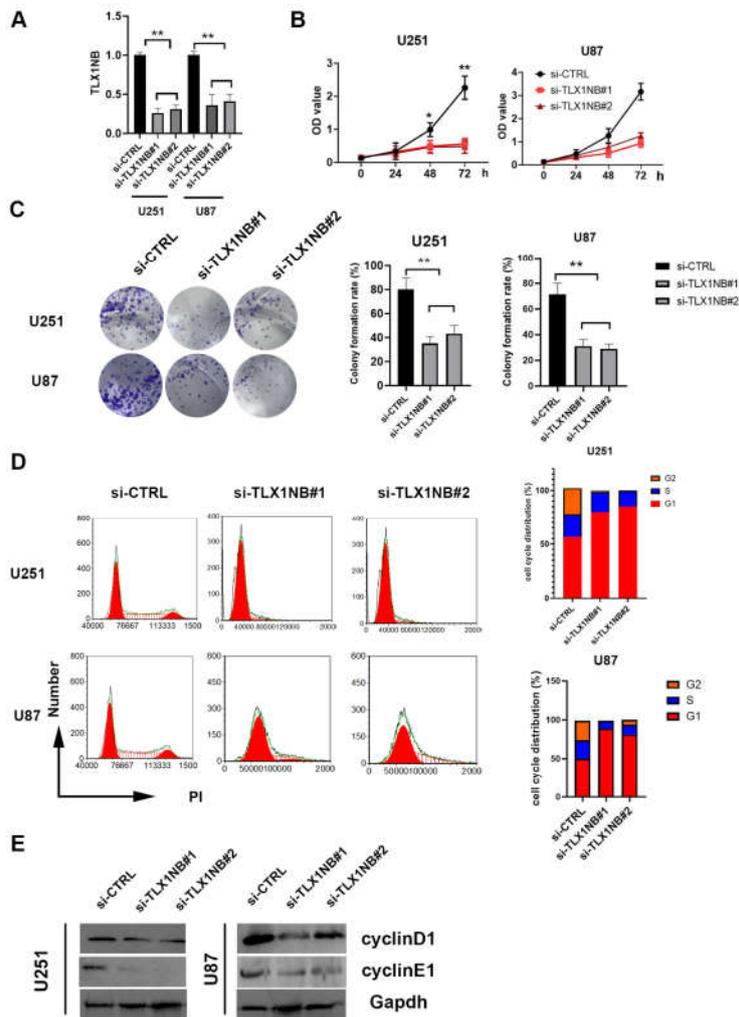
3.3 TLX1NB 靶向 miR-328-5p 调控胶质瘤细胞的增殖和凋亡

我们利用 Pita、MiRnada、TargetScan 预测出 TLX1NB 与 miR-328-3p 的结合位点(图 3A)。构建含有 TLX1NB 3'UTR 野生型和突变型的荧光素酶报告质粒, 结果显示 miR-328-3p mimics 在野生型 TLX1NB 3'UTR 显著抑制荧光

素酶活性, 而在突变的 TLX1NB 3'UTR 中荧光素酶活性无明显变化(图 3B)。敲低 TLX1NB 的同时加入 miR-328-3p 的 inhibitor 抑制 miRNA 的表达, 胶质瘤细胞的增殖能力、凋亡水平出现恢复(图 3C-E)。说明 TLX1NB 通过抑制 miR-328-3p 的表达, 调控胶质瘤细胞的增殖和凋亡^[2]。

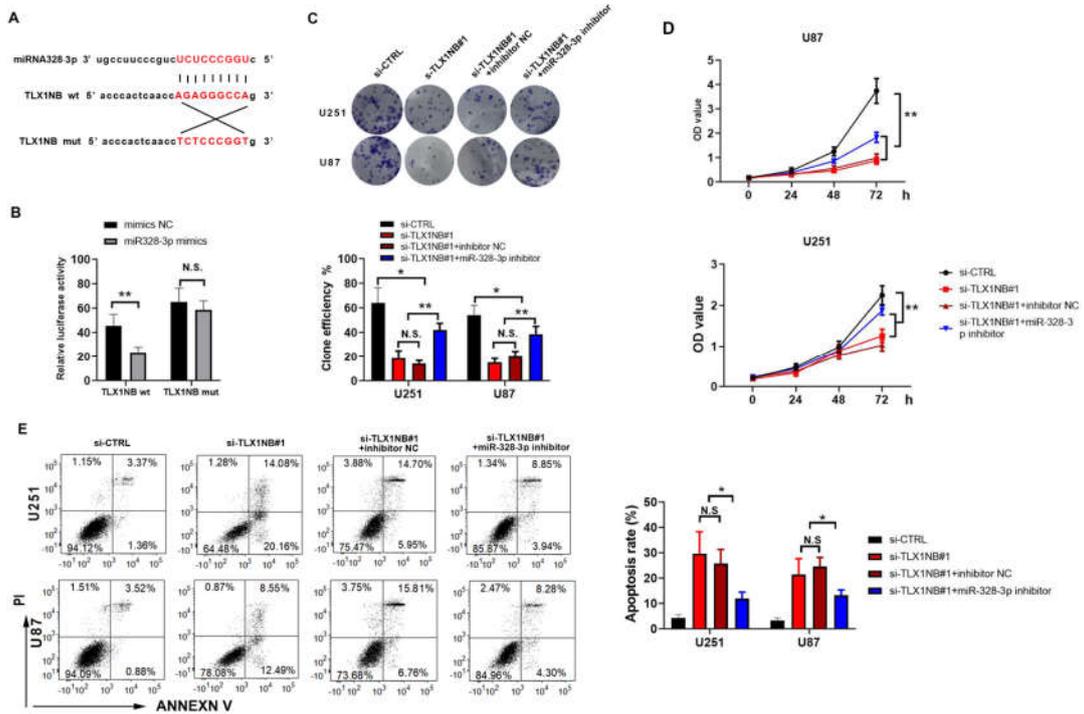
3.4 ABCG2 是 miR-328-3p 靶基因

双荧光素酶报告实验发现 miR-328-3p mimics 能够结合 ABCG2 启动子 3' UTR 抑制荧光酶活性, 而不能与突变型的 ABCG2 启动子 3' UTR 结合(图 4A、B), miR-328-3p 调控 ABCG2 的表达水平(图 4C)。



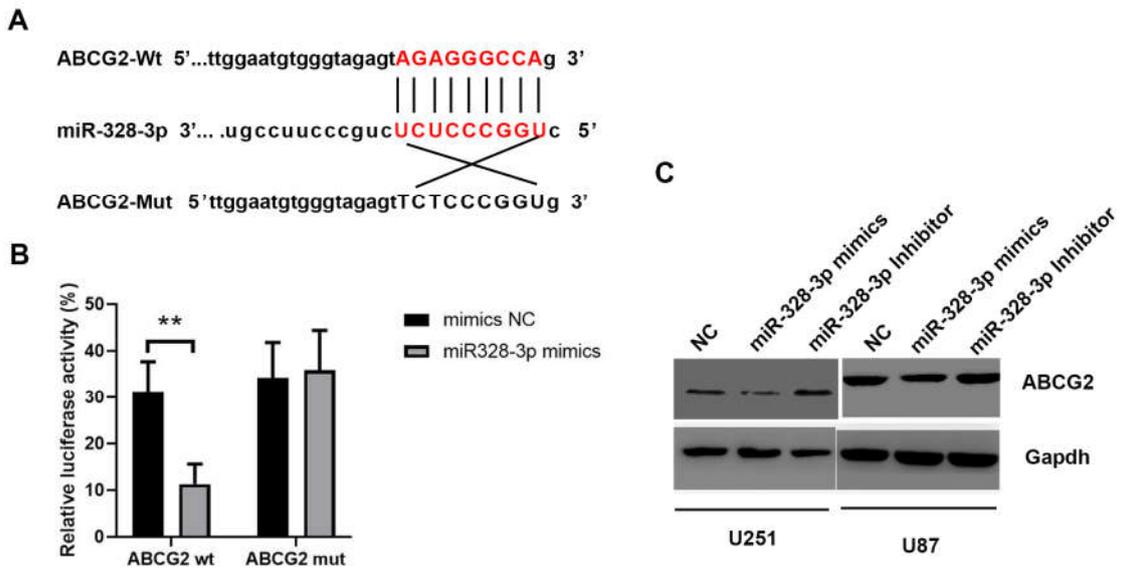
A.qPCR 检测 TLX1NB 的表达
 B.Cck-8 检测细胞增殖
 C. 克隆形成实验
 D.PI 染色结合细胞流式检测细胞的周期
 E. western-bolt 检测 cyclinD1 和 cyclinE1 的表达水平。* $P < 0.01$

图 2 在胶质瘤细胞系 U251 和 U87 中利用 siRNA 敲低 TLX1NB 表达水平, 进一步功能试验检测



A. 生物信息学预测 TLX1NB 与 miR-328-3p 的结合位点，将带有 TLX1NB 结合位点的区域 (Wt 和 Mut) 构建到 PGL3 荧光素酶报告质粒中
 B. 双荧光素酶报告实验检测 TLX1NB 与 miR-328-3p 的结合
 C-E. 在 U251 和 U87 细胞系中敲低 TLX1NB 的同时使用 miR-328-3p 的 Inhibitor，检测细胞的克隆形成、细胞增殖、凋亡。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 3



A. 利用生物信息学 (<https://starbase.sysu.edu.cn/>) 在线预测 miR-328-3p 与 ABCG2 的结合位点
 B. 在 293T 细胞转染 PGL3-ABCG2-Wt 以及 miR-328-3p 的 mimics，双荧光素酶报告实验检测 miR-328-3p 与 ABCG2 的结合
 C. western-blot 检测 miR-328-3p 对 ABCG2 表达的影响， ** $P < 0.001$

图 4

(下转第 29 页)

- [9] Shahi A, Deirmengian C, Higuera C, et al. Premature Therapeutic Antimicrobial Treatments Can Compromise the Diagnosis of Late Periprosthetic Joint Infection [J]. Clin Orthop Relat Res, 2015, 473(7):2244-2249.
- [10] Sukhonthamarn K, Tan T L, Xu C, et al. Determining Diagnostic Thresholds for Acute Postoperative Periprosthetic Joint Infection [J]. J Bone Joint Surg Am, 2020, 102(23):2043-2048.
- [11] Dinarello C A. Proinflammatory cytokines [J]. Chest, 2000, 118(2):503-508.
- [12] Gollwitzer H, Dombrowski Y, Prodinger P M, et al. Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection [J]. Bone Joint Surg Am, 2013, 95(7):644-651.
- [13] Berbari E, Mabry T, Tsaras G, et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis [J]. Bone Joint Surg Am, 2010, 92(11):2102-2109.
- [14] Ettinger M, Callies T, Kielstein J T, et al. Circulating biomarkers for discrimination between aseptic joint failure, low-grade infection, and high-grade septic failure [J]. Clin Infect Dis, 2015, 61(3):332-341.
- [15] Qin L, Li X, Wang J, et al. Improved diagnosis of chronic hip and knee prosthetic joint infection using combined serum and synovial IL-6 tests [J]. Bone Joint Res, 2020, 9(9):587-592.
- [16] HO I C, MIAW S C. Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 941(7):31-77.
- [17] Pesanti E L, LORENZO J A. Osteoclasts and effects of interleukin 4 in development of chronic osteomyelitis [J]. Clin Orthop Relat Res, 1998(355):290-299.
- [18] Prabhakara R, Harro J M, LEID J G, et al. Suppression of the inflammatory immune response prevents the development of chronic biofilm infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Infect Immun, 2011, 79(12):5010-5018.
- [19] Fröschen F S, Schell S, Schildberg F A, et al. Analysis of synovial biomarkers with a multiplex protein microarray in patients with PJI undergoing revision arthroplasty of the hip or knee joint [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2020, 140(12):1883-1890.

(上接第 16 页)

4 讨论

本研究通过对 TCGA 数据的分析发现长链非编码 RNA TLX1NB 在低分化胶质瘤 (LGG) 组织中特异性高表达, 具有一定的组织特异性, 同时我们发现干扰 TLX1NB 能抑制胶质瘤细胞的增殖、阻止细胞周期并且促进胶质瘤细胞的凋亡说明 TLX1NB 在胶质瘤中可以作为潜在的生物标记物^[3]。

lncRNA 作为 ceRNA 与 miRNA 结合从而影响 miRNA 对靶基因的调控, 本研究中我们发现 TLX1NB 能直接与 miR-325-3p 结合, 过表达 TLX1NB 能抑制 miR328-3p 的表达水平, 影响 miR-328-3p 靶基因 ABCG2 的表达水平, 我们在 TCGA 低级别胶质瘤组织中发现 TLX1NB 与 ABCG2 的表达正相关, 也在组织层面验证了 ceRNA 机制。has-miR-328-3p 在胃癌、肉瘤、乳腺癌、结直肠癌等多种肿瘤组织中具有抑癌作用。miR-328-3p 通过调节葡萄糖代谢调节肿瘤细胞的能量代谢, 在胃癌中, 下调 has-miR-328-3p 表达可上调 STAT3 及下游增殖相关靶基因 COX2、MMP2、CCDN1 的表达水平。ABCG2 蛋白的活性在肿瘤耐药以及药物诱导细胞凋亡过程中发挥重要作用。高表达 ABCG2 蛋白的胶质瘤患者生存率明显低于低表达患者, 使用小分子抑制剂抑制 ABCG2 的表达能明显抑制胶质瘤干细胞的自我更

新, 这也提示有效干预 ABCG2 表达可以控制胶质瘤的恶性表型, 本研究发现 TLX1NB 通过 ceRNA 机制调控 ABCG2 的表达, 干扰 TLX1NB 诱导 miR-328-3p 的表达, 最终降低了 ABCG2 的表达, 诱导细胞凋亡^[4]。

综上, TLX1NB 在胶质瘤组织中呈高表达, 影响胶质瘤细胞的增殖和凋亡其作用机制是竞争性结合 miR-328-3p, 进而抑制 miR-328-3p 与靶基因 ABCG2 的结合影响胶质瘤细胞的凋亡, 本研究为胶质瘤的治疗和预后提供新的作用靶点。

参考文献

- [1] 李筱雨, 范晓庆, 申伟, 等. 长链非编码 RNA H19 在甲状腺癌组织的表达及其对细胞增殖能力的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(11):3.
- [2] 张静, 黄守国, 夏鹰. CeRNA 网络介导恶性肿瘤表型调控的机制研究 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2021, 48(9):544-548.
- [3] 李元幸. 基于 miRNA-mRNA 调控关系对与 Cox 回归模型的宫颈鳞状细胞癌预后生物标志物综合分析 [J]. 国际妇产科学杂志, 2021, 48(5):553-559.
- [4] Emery I F, Gopalan A, Wood S, et al. Expression and function of ABCG2 and XIAP in glioblastomas [J]. J Neurooncol, 2017, 133(1):47-57.