

# miRNA-449b 表达减少是导致胶质瘤细胞增殖和侵袭能力增强的重要因素

饶春 石翠娟 王虔 罗文君 孙翠云 周雪霞 华丹 周俊虎 王润 蒋振东 于士柱

**【摘要】 目的** 探讨胶质瘤 miRNA-449b 表达异常减少对细胞增殖活性和侵袭能力的影响。**方法** 采用锁定寡核苷酸探针原位杂交法检测 60 例不同级别胶质瘤患者和 10 例非肿瘤对照脑组织 miRNA-449b 表达变化, Stem-loop 实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测胶质瘤母细胞瘤细胞系 U251、LN229 和永生化星形胶质细胞 UC2 miRNA-449b 相对表达量, EdU 染色、MTS 法和流式细胞术检测外源性 miRNA-449b 对胶质瘤细胞增殖活性和细胞周期的影响, Transwell 侵袭实验和荧光染色检测 miRNA-449b 对胶质瘤细胞侵袭能力的影响。**结果** 各级别胶质瘤 miRNA-449b 阳性标记指数均低于对照组(均  $P < 0.001$ ), 且随胶质瘤恶性程度的增加, miRNA-449b 阳性标记指数降低(均  $P < 0.001$ )。U251 细胞、LN229 细胞 miRNA-449b 相对表达量低于 UC2 细胞( $P = 0.001, 0.002$ )。U251-miRNA-449b 组 miRNA-449b 相对表达量高于 U251-Scr 组( $P < 0.001$ )、EdU 阳性细胞率( $P = 0.029$ )和细胞增殖活性( $P = 0.004, 0.001, 0.002$ )低于 U251-Scr 组, LN229-miRNA-449b 组 miRNA-449b 相对表达量高于 LN229-Scr 组( $P < 0.001$ )、EdU 阳性细胞率( $P = 0.032$ )和细胞增殖活性( $P = 0.003, 0.001, 0.004$ )低于 LN229-Scr 组。U251-miRNA-449b 组和 LN229-miRNA-449b 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞百分比分别高于 U251-Scr 组( $P < 0.001$ )和 LN229-Scr 组( $P = 0.018$ ), 侵袭细胞数目分别低于 U251-Scr 组( $P = 0.002$ )和 LN229-Scr 组( $P = 0.005$ )。U251-Scr 组和 LN229-Scr 组 F-actin 局部聚集于细胞突起部位以及胞膜内侧, U251-miRNA-449b 组和 LN229-miRNA-449b 组 F-actin 散在分布于肿瘤细胞内。**结论** miRNA-449b 是胶质瘤重要的抑瘤 miRNA, 其表达异常减少可能是导致胶质瘤发生发展的重要因素, 可以作为评价胶质瘤恶性程度的重要参考指标; 补充外源性 miRNA-449b 可以有效抑制胶质瘤细胞的增殖活性和侵袭能力, 在恶性胶质瘤的治疗中具有潜在应用价值。

**【关键词】** 神经胶质瘤; 微 RNAs; 细胞增殖; 细胞侵袭(非 MeSH 词)

## Downregulation of miRNA-449b is an important factor to promote proliferation and invasion of glioma cells

RAO Chun, SHI Cui-juan, WANG Qian, LUO Wen-jun, SUN Cui-yun, ZHOU Xue-xia, HUA Dan, ZHOU Jun-hu, WANG Run, JIANG Zhen-dong, YU Shi-zhu

Department of Neuropathology, Tianjin Medical University General Hospital; Tianjin Key Laboratory of Injuries; Variations and Regeneration of Nervous System; Key Laboratory of Post-trauma Neuro-repair and Regeneration in Central Nervous System, Ministry of Education, Tianjin 300052, China

Corresponding authors: YU Shi-zhu (Email: tjyushizhu@163.com); SHI Cui-juan (Email: scjuan148@163.com)

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of miRNA-449b in gliomas and its effect on cell proliferation and invasion. **Methods** The expression level of miRNA-449b was detected by locked-oligonucleotide-probe in situ hybridization (ISH) in 60 human glioma specimens of different WHO grades

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2019.11.007

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81872061);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81672592);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81972354);天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(项目编号:16JJCQNJC13400);天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(项目编号:17JCYBJC27100);天津市卫生行业重点攻关项目(项目编号:15KJ147);天津医科大学总医院“新世纪”人才培养计划

作者单位:300052 天津医科大学总医院神经病理科 天津市神经病学研究所 天津市神经损伤变异与再生重点实验室 教育部中枢神经创伤修复与再生重点实验室

通讯作者:于士柱, Email: tjyushizhu@163.com; 石翠娟, Email: scjuan148@163.com

and 10 non-tumoral control brain tissues. miRNA-449b was quantified by Stem-loop quantitation real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) with U6 as the internal control in U251, LN229 and UC2 cells. EdU staining, MTS method, flow cytometry assay (FCM), Phalloidin staining and Transwell assays were used to evaluate the effect of miRNA-449b on the proliferation and invasion of U251 and LN229 cells. **Results** The expression of miRNA-449b was decreased in gliomas compared with that in the non-tumoral control brain tissues ( $P < 0.001$ , for all), and was significantly declined with the elevation of glioma grades ( $P < 0.001$ , for all). miRNA-449b level was significantly lower in U251 and LN229 cells than that in UC2 cells ( $P = 0.001, 0.002$ ). The relative expression of miRNA-449b in U251-miRNA-449b group was higher ( $P < 0.001$ ), while EdU-positive rates ( $P = 0.029$ ) and cell proliferation ( $P = 0.004, 0.001, 0.002$ ) was lower than U251-Scr group; the relative expression of miRNA-449b in LN229-miRNA-449b group was higher ( $P < 0.001$ ), while EdU-positive rates ( $P = 0.032$ ) and cell proliferation ( $P = 0.003, 0.001, 0.004$ ) was lower than LN229-Scr group. The percentages of each phase  $G_0/G_1$  in U251-miRNA-449b group and LN229-miRNA-449b group were higher than those in U251-Scr group ( $P < 0.001$ ) and LN229-Scr group ( $P = 0.018$ ) respectively, cell proliferation were lower than U251-Scr group ( $P = 0.002$ ) and LN229-Scr group ( $P = 0.005$ ). F-actin was centralized mostly on cell cortex or lamellae in the groups of U251-Scr and LN229-Scr, whereas diffusely distributed in the groups of U251-miRNA-449b and LN229-miRNA-449b. **Conclusions** miRNA-449b is an important tumor-suppressive miRNA and its downregulation may be an important cause leading to tumorigenesis of glioblastoma, which could be used as a valuable biomarker to assess the malignant degree of gliomas. Furthermore, the exogenous miRNA-449b could effectively inhibit the proliferation and invasion abilities of glioma cells, confirming it has potential value in malignant gliomas therapy.

**【Key words】** Glioma; MicroRNAs; Cell proliferation; Cell invasion (not in *MeSH*)

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872061, 81672592, 81972354), Key Project of Tianjin Application Foundation and Advanced Technology Research Project (No. 16JCQNJC13400, 17JCYBJC27100), Key Projects of Tianjin Health Industry (No. 15KJ147), and the "New Century" Talent Training Project of Tianjin Medical University General Hospital.

**Conflicts of interest:** none declared

胶质瘤是临床最常见的原发性中枢神经系统肿瘤,其中,胶质母细胞瘤有极高的复发率和病死率,是预后最差的恶性肿瘤之一。随着对胶质瘤发生发展分子机制研究的深入,基因干预和分子靶向治疗可能成为恶性胶质瘤治疗的有效方法,而分子标志物和干预靶点的筛选是其应用于临床的关键前提。微小RNA(miRNA)是一类长度为21~23个核苷酸的小分子非编码单链RNA,在胚胎发育、免疫应答等发挥重要作用。业已证实,大量miRNA在包括肿瘤在内的多种病理学过程中发挥关键调控作用<sup>[1-2]</sup>。miRNA-449家族包括miRNA-449a、miRNA-449b和miRNA-449c共3名成员<sup>[3]</sup>,其表达异常与多种颅外恶性肿瘤的发生发展密切相关,通过多种信号转导通路对肿瘤细胞的增殖和凋亡发挥重要调控作用<sup>[4-5]</sup>。研究显示,miRNA-449b在胃癌<sup>[6]</sup>、结肠癌<sup>[7]</sup>、肝癌<sup>[8]</sup>等多种恶性肿瘤中发挥重要抑瘤作用,但其在胶质瘤中的表达变化以及在胶质瘤发生发展中的意义尚未阐明。本研究以不同级别胶质瘤和胶质母细胞瘤细胞系为研究对象,检测miRNA-449b在胶质瘤中的表达变化并探讨其对胶质瘤细胞增殖及侵袭能力的影响。

## 材料与方法

### 一、实验材料

1. 标本来源与分组 (1)胶质瘤组:收集天津医科大学总医院神经外科2001年1月至2012年12月予手术切除的胶质瘤标本共60例,男性38例,女性22例;年龄20~82岁,平均(48.53±14.24)岁;常规HE染色后,按照2016年世界卫生组织(WHO)中枢神经系统肿瘤分类第四版修订版<sup>[9]</sup>重新进行组织学分类和分级,其中,弥漫性星形细胞瘤(WHO II级)20例、间变性星形细胞瘤(WHO III级)20例、胶质母细胞瘤(WHO IV级)20例。(2)对照组:收集同期在我院神经外科行畸形血管切除术时切除的脑组织标本共10例作为对照,男性7例,女性3例;年龄17~55岁,平均(38.90±13.14)岁。本研究经天津医科大学总医院道德伦理委员会审核批准,所有患者及其家属均对实验内容知情。

2. 细胞系来源 人胶质母细胞瘤细胞系U251、LN229购自中国科学院细胞库,永生化星形胶质细胞系UC2由美国德克萨斯大学西南医学中心惠赠。

3. 试剂与仪器 (1)药品与试剂:miRNA-449b

锁定寡核苷酸探针及无义对照探针购自丹麦 Exiqon 公司, miRNA-449b mimics 及其相应无义对照序列 (Scr) 购自广州锐博生物技术有限公司, 罗丹明标记的抗地高辛抗体 (5  $\mu\text{g/ml}$ )、X-treme GENE 小干扰 RNA (siRNA) 转染试剂、4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) 均购自美国 Roche 公司, 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒、GoTaq qPCR Master Mix 试剂盒、CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent 试剂盒均购自美国 Promega 公司, 胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司, 高糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, Trizol 溶液购自美国 Invitrogen 公司, 碘化丙啶 (PI) 购自美国 Sigma 公司, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Phalloidin 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 0.1% 结晶紫购自北京索莱宝科技有限公司。(2) 仪器与设备: Leica DM6000B 型荧光显微镜购自德国 Leica 公司, Olympus IX71 型倒置相差荧光显微镜和 FV-1200 激光扫描共聚焦显微镜均购自日本 Olympus 公司, Image Pro Plus 5.0 软件由德国 Leica 公司提供, 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司, Synergy 2 多功能酶标仪购自美国 Biotek 公司, FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD Bioscience 公司, ModFit LT 3.1 软件由美国 Verity 软件公司提供, Transwell 小室购自美国 Millipore 公司。

## 二、研究方法

1. 脑组织切片制备及锁定寡核苷酸探针原位杂交 将上述标本通过组织微阵列仪制备成为组织微阵列, 制备 5  $\mu\text{m}$  连续切片用于 miRNA-449b 原位杂交检测。锁定由核苷酸修饰、地高辛标记的 miRNA - 449b 特异性探针序列为: 5' - AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGC-3', 无义对照探针序列为: 5' - CGTATAGGCCCAAGAATTAGG-3'。组织微阵列切片脱蜡入水, 常规杂交, 探针浓度为 10  $\mu\text{g/ml}$ , 罗丹明标记的抗地高辛抗体 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) 检测 miRNA-449b, DAPI (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 复染细胞核, 防猝灭封片剂封片。Leica DM6000B 型荧光显微镜采集微阵列中每个阵列点的荧光图像 ( $\times 400$ ), 阳性细胞核经激发后呈红色荧光, DAPI 复染的胞核经激发后呈蓝色荧光, Image Pro Plus 5.0 软件分析结果, 计算每个阵列点 miRNA-449b 阳性标记指数, 公式为阳性标记指数 (%) = 阳性细胞数 / 总细胞数  $\times 100\%$ 。

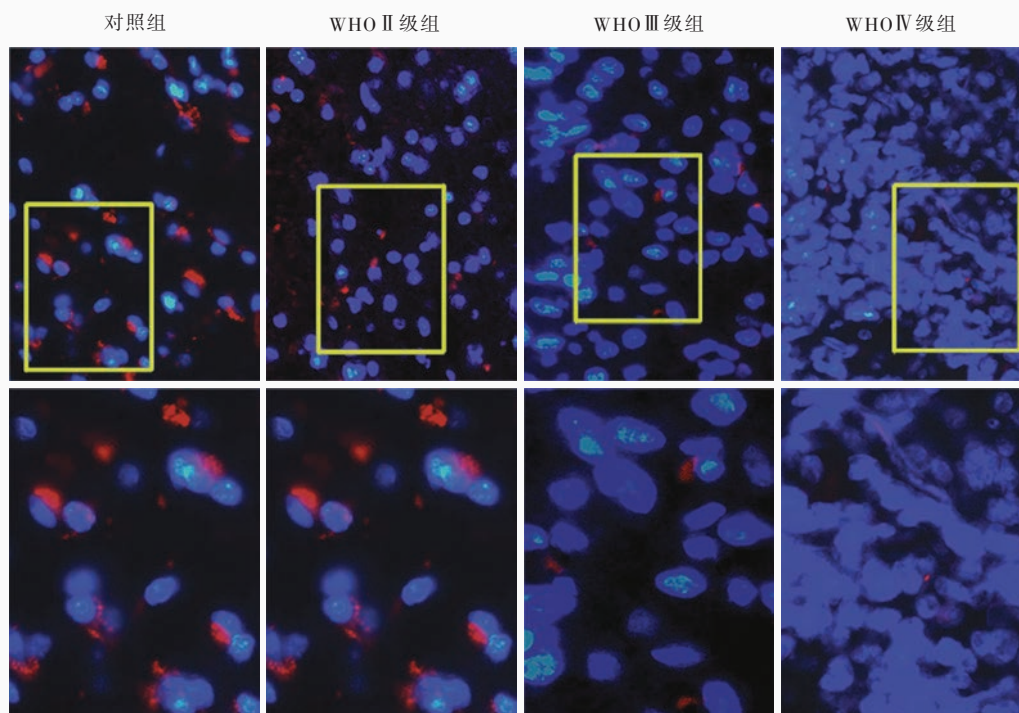
2. 细胞培养及转染 人胶质母细胞瘤细胞系 U251、LN229 和永生化星形胶质细胞系 UC2 置于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二

氧化碳的细胞培养箱培养 48 h, 取细胞融合率为 60% ~ 80% 的呈对数生长期的 U251 和 LN229 细胞, 接种于六孔板, 待细胞生长至占培养皿底面积 40% 时, 将其随机分为无义对照转染组 (U251-Scr 组、LN229-Scr 组) 以及 miRNA-449b mimics 转染组 (U251-miRNA-449b 组、LN229-miRNA-449b 组)。按照 X-treme GENE siRNA 转染试剂说明书转染 miRNA-449b mimics 及其相应无义对照序列, 转染 12 ~ 48 h 后进行下一步实验。

3. Stem-loop qRT-PCR 检测 miRNA-449b 相对表达量及 miRNA-449b mimics 转染率 以 Trizol 法提取各组细胞总 RNA, 每组取总 RNA 1  $\mu\text{g}$ , 操作严格按照 RT-PCR 试剂盒说明书。反应体系包括总 RNA 1  $\mu\text{g}$ 、miRNA-449b-RT 引物 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.20  $\mu\text{l}$ 、U6-RT 引物 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.20  $\mu\text{l}$ , 加入无酶水至 11  $\mu\text{l}$ , 置于 PCR 仪中, 反应条件: 70  $^{\circ}\text{C}$  5 min、4  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 然后加入以下混合体系进行逆转录: 5 $\times$  反应缓冲液 4  $\mu\text{l}$ 、氯化镁 (25 mmol/L) 2  $\mu\text{l}$ 、PCR 核苷酸混合液 (10 mmol/L) 1  $\mu\text{l}$ 、无酶水 1  $\mu\text{l}$ 、逆转录酶 1  $\mu\text{l}$ , 置于微量离心管混匀, 置于 PCR 仪中, 反应条件为 25  $^{\circ}\text{C}$  5 min、42  $^{\circ}\text{C}$  60 min、70  $^{\circ}\text{C}$  15 min、4  $^{\circ}\text{C}$  30 min。转录产物行 qRT-PCR 检测 miRNA-449b 和 U6 的 Ct 值。采用 U6 作为内参照物、UC2 细胞 miRNA-449b 相对表达量为 1,  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 U251、LN229 细胞 miRNA-449b 相对表达量; 以无义序列转染组 miRNA-449b 的相对表达量为 1,  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 miRNA-449b mimics 转染组 miRNA-449b 相对表达量。重复实验 3 次, 取平均值。

4. MTS 法绘制细胞增殖曲线 各组细胞均于转染 12 h 后, 以细胞数为 1500 个/孔接种于 96 孔板, 分别于转染 24、48、72 和 96 h 后行 MTS 检测, 再每孔加入 CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent 溶液 10  $\mu\text{l}$ , 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳条件下孵育 2.50 h, 于 Synergy 2 多功能酶标仪测定 490 nm 波长处光密度值 (OD 值)。每个时间点设置 3 个复孔, 取平均值。

5. EdU 染色检测细胞增殖能力 各组细胞均于转染 24 h 后, 以细胞数为 5000 个/孔接种于 96 孔板, 继续培养 24 h, 按照 EdU 检测试剂盒说明书进行染色, 经 Olympus IX71 型倒置相差荧光显微镜采集图像 ( $\times 200$ ), 阳性细胞核经激发后呈红色荧光、DAPI 复染的胞核经激发呈蓝色荧光, Image Pro Plus 5.0 软件分析结果, 计算 EdU 阳性细胞率, 公式为 EdU 阳性细胞率 (%) = EdU 阳性细胞数 / 总细胞



对照组:非肿瘤对照脑组织;WHO II 级组:弥漫性星形细胞瘤;WHO III 级组:间变性星形细胞瘤;WHO IV 级组:胶质母细胞瘤

图 1 荧光显微镜观察显示,对照组细胞 miRNA-449b 表达水平高于各级别胶质瘤组,且随着胶质瘤恶性程度的增加,miRNA-449b 表达水平降低(下图为上图的局部放大) 原位杂交染色

**Figure 1** Fluorescence microscopy findings The expression of miRNA-449b in non-tumoral control brain tissues was higher than that in different WHO grades of glioma groups. The expression of miRNA-449b was declined with the elevation of glioma grades. In situ hybridization staining

数 $\times 100\%$ 。重复实验 3 次,取平均值。

6. 流式细胞术检测细胞周期 各组细胞转染 48 h 后收集细胞,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 70%的乙醇溶液中固定过夜,次日于 37 $^{\circ}\text{C}$  行 PI 染色 30 min, FACSCalibur 流式细胞仪检测细胞周期,ModFit LT 3.1 软件分析结果。重复实验 3 次,取平均值。

7. Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力 于 Transwell 上室底膜铺一层 Matrigel 胶 40  $\mu\text{l}$ ,凝固后上室加入以无血清 DMEM 培养液重悬的各组细胞,细胞数为  $30 \times 10^3$  个,下室加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 600  $\mu\text{l}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳条件下孵育 24 h,4% 多聚甲醛溶液固定 30 min,湿棉签擦拭未穿过小室膜的细胞,0.1% 结晶紫染色 20 min。经 Olympus IX 71 型倒置相差荧光显微镜采集图像( $\times 200$ ),随机选取 5 个视野,计数侵袭细胞数目。重复实验 3 次,取平均值。

8. 荧光染色检测细胞 F-actin 分布情况 各组细胞转染 24 h 后,以细胞数为  $30 \times 10^3$  个/孔接种于

24 孔板内无菌盖片,继续培养 24 h,4% 多聚甲醛溶液固定,0.2% Triton X-100 溶液通透,羊血清封闭,Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Phalloidin 染色细胞骨架,DAPI 复染胞核。FV-1200 激光扫描共聚焦显微镜采集图像( $\times 1000$ ),观察细胞 F-actin 分布情况。

### 三、统计分析方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用两独立样本的 *t* 检验或单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验。以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

锁定寡核苷酸探针原位杂交显示,miRNA-449b 杂交信号经激发后呈红色荧光,DAPI 复染的胞核经激发后呈蓝色荧光。miRNA-449b 阳性细胞胞核周围可见颗粒状红色杂交信号,阴性细胞胞核周围未见杂交信号(图 1)。对照组和各级别胶质瘤组均不

**表 1** 各级别胶质瘤组与对照组细胞 miRNA-449b 阳性标记指数的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

**Table 1.** Comparison of the miRNA - 449b positive labeling index among non-tumoral control brain tissues and 3 glioma groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	例数	miRNA-449b 阳性标记指数
对照组(1)	10	51.43 ± 10.16
WHO II 级组(2)	20	23.29 ± 5.52
WHO III 级组(3)	20	10.96 ± 4.49
WHO IV 级组(4)	20	5.36 ± 3.95
F 值		159.857
P 值		<0.001

(1) :(2) $t = 9.901, P < 0.001$ ; (1) :(3) $t = 15.263, P < 0.001$ ; (1) :(4) $t = 17.976, P < 0.001$ ; (2) :(3) $t = 7.756, P < 0.001$ ; (2) :(4) $t = 11.817, P < 0.001$ ; (3) :(4) $t = 4.184, P < 0.001$

**表 2** U251 细胞、LN229 细胞与 UC2 细胞 miRNA-449b 相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 2.** Comparison of the miRNA - 449b relative expression among U251, LN229 and UC2 cells ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	miRNA-449b 相对表达量
U251 细胞(1)	3	0.34 ± 0.05
LN229 细胞(2)	3	0.39 ± 0.04
UC2 细胞(3)	3	1.00 ± 0.13
F 值		56.839
P 值		<0.001

(1) :(2) $t = -1.498, P = 0.208$ ; (1) :(3) $t = -8.180, P = 0.001$ ; (2) :(3) $t = -7.608, P = 0.002$

**表 3** U251-Scr 组与 U251-miRNA-449b 组、LN229-Scr 组与 LN229-miRNA-449b 组细胞 miRNA-449b 相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 3.** Comparison of the miRNA - 449b relative expression between U251 - Scr group and U251 - miRNA - 449b group, and between LN229 - Scr group and LN229 - miRNA-449b group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	miRNA-449b 相对表达量	t 值	P 值
U251-Scr 组	3	1.01 ± 0.12		
U251-miRNA-449b 组	3	(4.89 ± 0.40) × 10 <sup>6</sup>	-21.205	<0.001
LN229-Scr 组	3	1.02 ± 0.24		
LN229-miRNA-449b 组	3	(3.20 ± 0.36) × 10 <sup>6</sup>	-15.559	<0.001

miRNA, micro RNA, 微小 RNA。The same for tables below

同程度表达 miRNA-449b ( $P < 0.001$ ), 各级别胶质瘤组 miRNA-449b 阳性标记指数低于对照组 (均  $P < 0.001$ ), 且随胶质瘤恶性程度增加, miRNA-449b 阳性标记指数降低 (均  $P < 0.001$ , 表 1)。

qRT-PCR 法显示, U251 细胞、LN229 细胞和 UC2 细胞 miRNA-449b 相对表达量差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), U251 细胞、LN229 细胞 miRNA-449b 相对表达量低于 UC2 细胞 ( $P = 0.001, 0.002$ ; 表 2)。

qRT-PCR 法显示, 胶质瘤细胞转染 48 h 后, U251-miRNA-449b 组 miRNA-449b 相对表达量高于 U251-Scr 组 ( $P < 0.001$ ), LN229-miRNA-449b 组 miRNA-449b 相对表达量高于 LN229-Scr 组 ( $P < 0.001$ , 表 3)。

EdU 染色结果显示, 经激发后处于增殖状态、DNA 活跃复制的 U251 细胞和 LN229 细胞胞核呈红色荧光, 而经 DAPI 复染的胞核则呈蓝色荧光 (图 2)。U251-miRNA-449b 组的 EdU 阳性细胞率低于 U251-Scr 组 ( $P = 0.029$ ), LN229-miRNA-449b 组 EdU 阳性细胞率低于 LN229-Scr 组 ( $P = 0.032$ , 表 4)。

MTS 法转染后 48、72、96 h, U251-miRNA-449b 组的细胞增殖活性低于 U251-Scr 组 ( $P = 0.004, 0.001, 0.002$ ), LN229-miRNA-449b 组细胞增殖活性亦低于 LN229-Scr 组 ( $P = 0.003, 0.001, 0.004$ ), 而两种细胞系转染后 24 h 细胞增殖活性组间差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ , 表 5), 表明 miRNA-449b 可以明显抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖活性。

经流式细胞术检测显示, U251-miRNA-449b 组 G<sub>0</sub>期/G<sub>1</sub>期细胞百分比高于 U251-Scr 组 ( $P < 0.001$ ), S 期细胞百分比低于 U251-Scr 组 ( $P = 0.002$ ), 然而, G<sub>2</sub>期/M 期细胞百分比组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); LN229-miRNA-449b 组 G<sub>0</sub>期/G<sub>1</sub>期细胞百分比高于 LN229-Scr 组 ( $P = 0.018$ ), G<sub>2</sub>期/M 期细胞百分比低于 LN229-Scr 组 ( $P = 0.001$ ), 而 S 期细胞百分比组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ; 图 3, 表 6), 表明 miRNA-449b 可以通过阻滞胶质母细胞瘤细胞 G<sub>1</sub>期/S 期以抑制肿瘤细胞增殖。

Transwell 侵袭实验显示, U251-miRNA-449b 组的侵袭细胞数目低于 U251-Scr 组 ( $P = 0.002$ ), LN229-miRNA-449b 组亦低于 LN229-Scr 组 ( $P = 0.005$ ; 图 4, 表 7)。提示补充外源性 miRNA-449b 可以有效抑制胶质瘤细胞的侵袭能力。激光共聚焦扫描显微镜显示, U251-Scr 组和 LN229-Scr 组 F-actin 局部聚集于细胞突起部位以及胞膜内侧, 然而, U251-miRNA-449b 组以及 LN229-miRNA-449b 组的 F-actin 散在分布于肿瘤细胞内 (图 5)。

## 讨 论

miRNA 通过在转录后调控促瘤因子或抑瘤因子的表达水平而参与多种肿瘤的发生发展过程。有研究显示, miRNA-449b 及其家族成员在胃癌<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[10-11]</sup>、小细胞肺癌<sup>[12]</sup>和前列腺癌<sup>[13]</sup>等多种颅

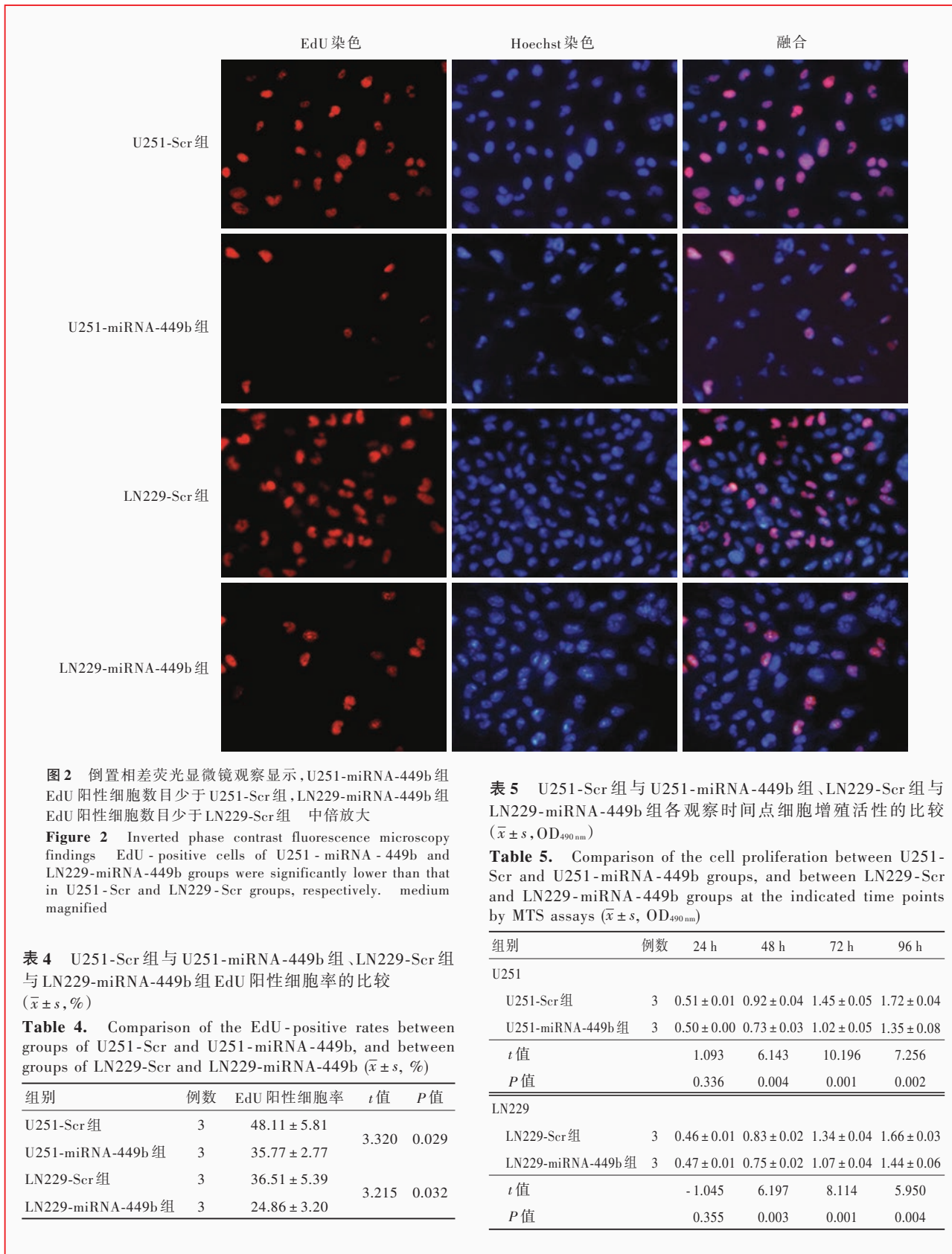


图 2 倒置相差荧光显微镜观察显示, U251-miRNA-449b 组 EdU 阳性细胞数目少于 U251-Scr 组, LN229-miRNA-449b 组 EdU 阳性细胞数目少于 LN229-Scr 组 中倍放大

Figure 2 Inverted phase contrast fluorescence microscopy findings. EdU-positive cells of U251-miRNA-449b and LN229-miRNA-449b groups were significantly lower than that in U251-Scr and LN229-Scr groups, respectively. medium magnified

表 4 U251-Scr 组与 U251-miRNA-449b 组、LN229-Scr 组与 LN229-miRNA-449b 组 EdU 阳性细胞率的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Table 4. Comparison of the EdU-positive rates between groups of U251-Scr and U251-miRNA-449b, and between groups of LN229-Scr and LN229-miRNA-449b ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	例数	EdU 阳性细胞率	t 值	P 值
U251-Scr 组	3	48.11 ± 5.81	3.320	0.029
U251-miRNA-449b 组	3	35.77 ± 2.77		
LN229-Scr 组	3	36.51 ± 5.39	3.215	0.032
LN229-miRNA-449b 组	3	24.86 ± 3.20		

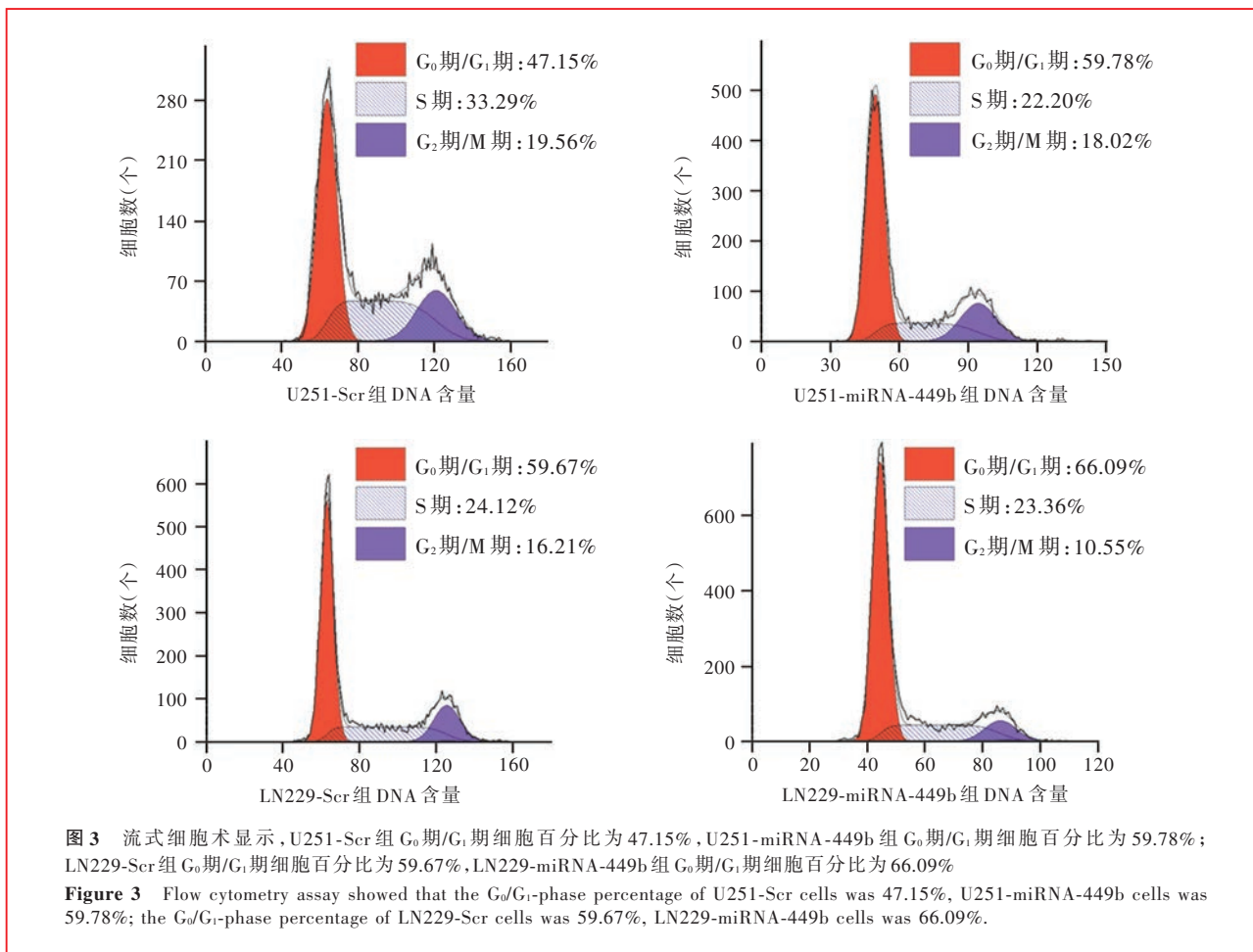
表 5 U251-Scr 组与 U251-miRNA-449b 组、LN229-Scr 组与 LN229-miRNA-449b 组各观察时间点细胞增殖活性的比较 ( $\bar{x} \pm s, OD_{490nm}$ )

Table 5. Comparison of the cell proliferation between U251-Scr and U251-miRNA-449b groups, and between LN229-Scr and LN229-miRNA-449b groups at the indicated time points by MTS assays ( $\bar{x} \pm s, OD_{490nm}$ )

组别	例数	24 h	48 h	72 h	96 h
U251					
U251-Scr 组	3	0.51 ± 0.01	0.92 ± 0.04	1.45 ± 0.05	1.72 ± 0.04
U251-miRNA-449b 组	3	0.50 ± 0.00	0.73 ± 0.03	1.02 ± 0.05	1.35 ± 0.08
t 值		1.093	6.143	10.196	7.256
P 值		0.336	0.004	0.001	0.002
LN229					
LN229-Scr 组	3	0.46 ± 0.01	0.83 ± 0.02	1.34 ± 0.04	1.66 ± 0.03
LN229-miRNA-449b 组	3	0.47 ± 0.01	0.75 ± 0.02	1.07 ± 0.04	1.44 ± 0.06
t 值		-1.045	6.197	8.114	5.950
P 值		0.355	0.003	0.001	0.004

外恶性肿瘤中均表达降低,且该表达变化与肿瘤发生发展密切相关。在胃癌组织中,miRNA-449a/b 表

达水平显著低于周围正常组织,且补充外源性 miRNA-449 可以通过靶向敲低细胞周期蛋白依赖



**表 6** U251-Scr 组与 U251-miRNA-449b 组、LN229-Scr 组与 LN229-miRNA-449b 组细胞周期的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

**Table 6.** Comparison of percentages of cell phase between U251-Scr and U251-miRNA-449b groups, and between LN229-Scr and LN229-miRNA-449b groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	例数	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S期	G <sub>2</sub> /M期
U251-Scr组	3	47.15 ± 0.84	33.29 ± 1.98	19.56 ± 1.37
U251-miRNA-449b组	3	59.78 ± 1.28	22.20 ± 1.88	18.02 ± 0.64
<i>t</i> 值		-14.320	7.036	1.774
<i>P</i> 值		<0.001	0.002	0.151
LN229-Scr组	3	59.67 ± 2.10	24.11 ± 1.56	16.21 ± 0.90
LN229-miRNA-449b组	3	66.09 ± 1.95	23.36 ± 1.44	10.55 ± 0.71
<i>t</i> 值		-3.879	0.615	8.583
<i>P</i> 值		0.018	0.572	0.001

性激酶 6(CDK6)等细胞周期调控因子而有效诱导胃癌细胞 G<sub>1</sub>期/S期阻滞,从而抑制细胞增殖活性,与此同时,还可以上调 P53 蛋白表达,从而促进细胞凋亡<sup>[6]</sup>;与乳腺癌周围正常组织相比,乳腺癌组织中 miRNA-449b-5p 表达显著降低,可通过直接靶向敲

低 CREPT 基因而调控 Wnt/β-连环蛋白(β-catenin)信号转导通路,而抑制乳腺癌细胞增殖与侵袭<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,不同级别胶质瘤 miRNA-449b 表达水平均低于对照组,提示 miRNA-449b 表达减少是胶质瘤的普遍分子病理学特征;同时,随着胶质瘤恶性程度的增加,miRNA-449b 表达水平降低,提示 miRNA-449b 表达减少在胶质瘤的发生与恶性进展中均发挥重要作用,可以作为辅助评价胶质瘤良恶性级别的可靠参考指标。

肿瘤细胞快速增殖是导致恶性胶质瘤高复发率和高病死率的重要原因之一。有研究显示,miRNA-449a/b 可以抑制肿瘤细胞增殖,是通过靶向敲低 CDC25A 和 CDK6 基因,抑制磷酸化视网膜神经胶质瘤蛋白(pRb)磷酸化而降低腺病毒 E2 启动子结合因子 1(E2F1)表达水平实现的,E2F1 可上调下游细胞周期依赖蛋白 Cyclin B1 和 Cyclin E 表达,而参与细胞周期 G<sub>1</sub>期/S期的调控<sup>[14-15]</sup>。此外,Cyclin D1 和 E2F3 是 G<sub>1</sub>期/S期的重要调控因子<sup>[16-17]</sup>。研究显示,miRNA-449b 在结直肠癌中可以通过靶向敲

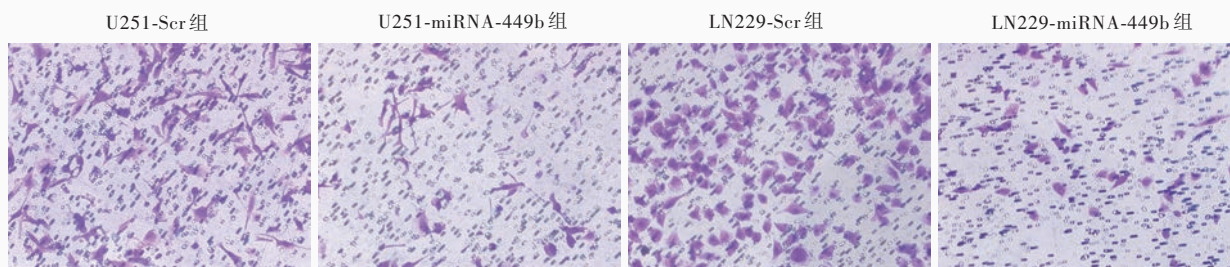


图 4 倒置相差荧光显微镜显示, U251-miRNA-449b 组侵袭细胞数目低于 U251-Scr 组, LN229-miRNA-449b 组侵袭细胞数目低于 LN229-Scr 组 结晶紫染色 中倍放大

Figure 4 Inverted phase contrast fluorescence microscopy findings The numbers of invasive cells of U251-miRNA-449b and LN229-miRNA-449b groups were significantly lower than that in the groups of U251-Scr and LN229-Scr, respectively. Crystal violet staining medium magnified

表 7 U251-Scr 组与 U251-miRNA-449b 组、LN229-Scr 组与 LN229-miRNA-449b 组侵袭细胞数目的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 个)

Table 7. Comparison of the number of invasive cells between U251-Scr group and U251-miRNA-449b group, and between LN229-Scr group and LN229-miRNA-449b group ( $\bar{x} \pm s$ , number)

组别	例数	侵袭细胞数目	t 值	P 值	组别	例数	侵袭细胞数目	t 值	P 值
U251-Scr 组	3	126.67 ± 15.53	7.257	0.002	LN229-Scr 组	3	116.33 ± 18.04	5.747	0.005
U251-miRNA-449b 组	3	60.33 ± 3.06			LN229-miRNA-449b 组	3	53.00 ± 6.25		

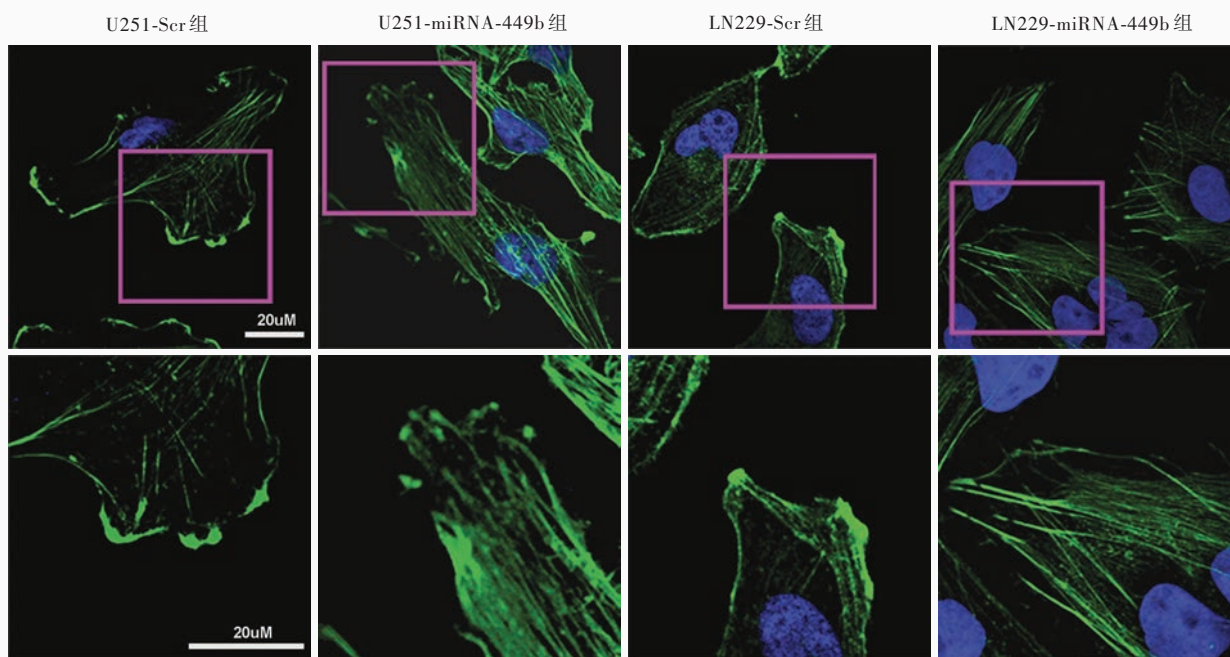


图 5 激光扫描共聚焦显微镜显示, U251-Scr 组和 LN229-Scr 组 F-actin 局部聚集于细胞突起部位和胞膜内侧, U251-miRNA-449b 组和 LN229-miRNA-449b 组 F-actin 散在分布于肿瘤细胞内(下图为上图的局部放大) F-actin 荧光染色

Figure 5 Laser scanning confocal microscopy showed that F-actin was centralized mostly on cell cortex or lamellae in the groups of U251-Scr and LN229-Scr, whereas diffusely distributed in the groups of U251-miRNA-449b and LN229-miRNA-449b. F-actin fluorescence staining

低 *Cyclin D1* 和 *E2F3* 基因而抑制肿瘤细胞的增殖活性<sup>[7]</sup>; miRNA-449 可以抑制乳头状甲状腺癌细胞的增殖能力, 补充外源性 miRNA-449 可以通过靶向敲低 *RET* 基因而使  $\beta$ -连环蛋白失活, 而导致 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞百分比增加<sup>[4]</sup>; miRNA-449 还可通过下调肝细胞生长因子受体表达而使细胞外信号调节激酶 1/2

(ERK1/2) 去磷酸化, 抑制 ERK 信号转导通路, 从而抑制肝癌细胞的增殖活性<sup>[18]</sup>。miRNA-449 对肿瘤细胞增殖能力的上述调控作用提示其可能是重要的抑瘤 miRNA。本研究结果显示, 转染外源性 miRNA-449b 可以有效诱导胶质母细胞瘤细胞系 U251 和 LN229 的 G<sub>1</sub>/S 期阻滞, 并抑制肿瘤细胞增



殖活性,提示 miRNA-449b 可以通过影响胶质瘤细胞周期的重要因子而调控细胞周期与增殖,且 miRNA-449b 异常低表达可能是导致胶质瘤细胞快速增殖的原因之一。

肿瘤细胞活跃的迁移侵袭能力是胶质瘤尤其是恶性胶质瘤的重要生物学行为特征,也是导致胶质瘤手术难以完全切除和术后易复发的重要原因。肿瘤细胞活跃的迁移侵袭能力涉及多种分子机制,F-actin 的有序聚合和解聚是细胞迁移侵袭的重要驱动力,F-actin 是由 G-actin 聚集而成的双螺旋结构肌动蛋白丝,是真核细胞蛋白骨架的重要组成部分<sup>[19]</sup>。F-actin 在细胞膜内侧通过 ADP-F-actin 的解离和 ATP-F-actin 的聚集为细胞的迁移侵袭提供动力<sup>[20-21]</sup>。小 GTP 酶家族是一类参与多种信号转导通路的重要蛋白,其家族成员是肌动蛋白细胞骨架的关键调控分子<sup>[22]</sup>。一项体外实验结果显示,miRNA-449a/b 通过直接与 R-Ras mRNA 3' 非翻译区(3'UTR)相结合而抑制 R-Ras 的表达,而 R-Ras 可以直接与细胞质膜上的磷脂酶 C(PLC)相结合而激活整合素 PLC-Ca<sup>2+</sup> 信号转导通路,使内质网释放钙离子,随后激活钙离子依赖性肌动蛋白结合蛋白,从而参与 actin 网络重塑<sup>[23-24]</sup>。此外,CDC25A 和 TPD52 也是 miRNA-449b 的靶基因,转染外源性 miRNA-449b 可以有效降低 CDC25A 和 TPD52 的表达<sup>[11,14]</sup>,其中,CDC25A 通过 CDK2 去磷酸化增加 Foxo1 的稳定性,Foxo1 可以直接调控基质金属蛋白酶-1(MMP-1)的转录,从而参与肿瘤细胞迁移侵袭等生物学功能的调控<sup>[25]</sup>;TPD52 与前列腺癌<sup>[26]</sup>、卵巢癌<sup>[27]</sup>等多种恶性肿瘤的发生发展密切相关,敲低 TPD52 可有效抑制肿瘤细胞增殖与侵袭能力<sup>[28-29]</sup>。本研究发现,miRNA-449b 可显著抑制 F-actin 在细胞突起部位和细胞膜内侧的聚集,使其散在分布于细胞内,提示 miRNA-449b 可以通过调控胶质瘤细胞 F-actin 的聚合与解聚,参与细胞骨架的重塑,从而抑制胶质瘤细胞的迁移侵袭能力。

综上所述,miRNA-449b 是胶质瘤重要的抑瘤 miRNA,在各级别胶质瘤中表达水平降低且随胶质瘤恶性程度的升高而降低;miRNA-449b 可以有效抑制胶质瘤细胞的增殖活性和迁移侵袭能力,提示其在胶质瘤细胞中表达减少是导致胶质瘤细胞无限增殖和过度迁移侵袭的重要原因,为胶质瘤基因治疗靶点的优选和治疗策略的优化提供了重要线索和客观参考依据。

利益冲突 无

## 参 考 文 献

- [1] Kong YW, Ferland - Mccollough D, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management[J]. Lancet Oncol, 2012, 13: E249-258.
- [2] Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy[J]. Trends Mol Med, 2014, 20:460-469.
- [3] Lv J, Zhang Z, Pan L, Zhang Y. MicroRNA-34/449 family and viral infections[J]. Virus Res, 2019, 260:1-6.
- [4] Li Z, Huang X, Xu J, Su Q, Zhao J, Ma J. miR - 449 overexpression inhibits papillary thyroid carcinoma cell growth by targeting RET kinase- $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2016, 49:1629-1637.
- [5] Yan F, Liu H, Hao J, Liu Z. Dynamical behaviors of Rb-E2F pathway including negative feedback loops involving miR449 [J]. PLoS One, 2012, 7:E43908.
- [6] Bou KT, Futoma - Kazmierczak E, Jacobsen A, Krogh A, Bardram L, Hother C, Gronbaek K, Federspiel B, Lund AH, Friis-Hansen L. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer[J]. Mol Cancer, 2011, 10:29.
- [7] Fang Y, Gu X, Li Z, Xiang J, Chen Z. miR-449b inhibits the proliferation of SW1116 colon cancer stem cells through downregulation of CCND1 and E2F3 expression[J]. Oncol Rep, 2013, 30:399-406.
- [8] Sandbothe M, Buurman R, Reich N, Greiwe L, Vajen B, Gürlevik E, Schäffer V, Eilers M, Kühnel F, Vaquero A, Longereich T, Roessler S, Schirmacher P, Manns MP, Illig T, Schlegelberger B, Skawran B. The microRNA - 449 family inhibits TGF - beta - mediated liver cancer cell migration by targeting SOX4[J]. J Hepatol, 2017, 66:1012-1021.
- [9] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. Acta Neuropathol, 2016, 131:803-820.
- [10] Jiang J, Yang X, He X, Ma W, Wang J, Zhou Q, Li M, Yu S. MicroRNA - 449b - 5p suppresses the growth and invasion of breast cancer cells via inhibiting CREPT - mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. Chem Biol Interact, 2019, 302:74-82.
- [11] Zhang Z, Wang J, Gao R, Yang X, Zhang Y, Li J, Zhang J, Zhao X, Xi C, Lu X. Downregulation of microRNA - 449 promotes migration and invasion of breast cancer cells by targeting tumor protein D52 (TPD52)[J]. Oncol Res, 2017, 25: 753-761.
- [12] You J, Zhang Y, Li Y, Fang N, Liu B, Zu L, Zhou Q. MiR-449a suppresses cell invasion by inhibiting MAP2K1 in non - small cell lung cancer[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5:2730-2744.
- [13] Chen W, Liu Y, Chen H, Ning H, Ding K. Loss of miR-449a-caused PrLZ overexpression promotes prostate cancer metastasis [J]. Int J Oncol, 2017, 51:435-444.
- [14] Yang X, Feng M, Jiang X, Wu Z, Li Z, Aau M, Yu Q. miR - 449a and miR - 449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb - E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A[J]. Genes Dev, 2009, 23: 2388-2393.
- [15] Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3:11-20.
- [16] Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue[J]. Cell, 1994, 79:551-555.
- [17] Humbert PO, Verona R, Trimarchi JM, Rogers C, Dandapani S,

- Lees JA. E2f3 is critical for normal cellular proliferation [J]. *Genes Dev*, 2000, 14:690-703.
- [18] Buurman R, Gurlevik E, Schäffer V, Eilers M, Sandbothe M, Kreipe H, Wilken L, Schlegelberger B, Kühnel F, Skawran B. Histone deacetylases activate hepatocyte growth factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143:811-820.
- [19] Bugyi B, Carlner MF. Control of actin filament treadmill in cell motility[J]. *Annu Rev Biophys*, 2010, 39:449-470.
- [20] Krause M, Gautreau A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15:577-590.
- [21] Bravo - Cordero JJ, Magalhaes MA, Eddy RJ, Hodgson L, Condeelis J. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14:405-415.
- [22] Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. Nucleating actin for invasion [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11:177-187.
- [23] Chevalier B, Adamiok A, Mercey O, Revinski DR, Zaragosi LE, Pasini A, Kodjabachian L, Barbry P, Marcet B. miR - 34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8386.
- [24] Ada - Nguema AS, Xenias H, Hofman JM, Wiggins CH, Sheetz MP, Keely PJ. The small GTPase R-Ras regulates organization of actin and drives membrane protrusions through the activity of PLCepsilon [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119:1307-1319.
- [25] Feng X, Wu Z, Wu Y, Hankey W, Prior TW, Li L, Ganju RK, Shen R, Zou X. Cdc25A regulates matrix metalloprotease 1 through Foxo1 and mediates metastasis of breast cancer cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31:3457-3471.
- [26] Dasari C, Yagham DP, Walther R, Walther R, Ummanni R. Tumor protein D52 (isoform 3) contributes to prostate cancer cell growth via targeting nuclear factor - kB transactivation in LNCaP cells[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39:1010428317698382.
- [27] Byrne JA, Balleine RL, Schoenberg Fejzo M, Mercieca J, Chiew YE, Livnat Y, St Heaps L, Peters GB, Byth K, Karlan BY, Slamon DJ, Harnett P, Defazio A. Tumor protein D52 (TPD52) is overexpressed and a gene amplification target in ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*, 2005, 117:1049-1054.
- [28] Goto Y, Nishikawa R, Kojima S, Chiyomaru T, Enokida H, Inoguchi S, Kinoshita T, Fuse M, Sakamoto S, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Tumour-suppressive microRNA-224 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting oncogenic TPD52 in prostate cancer[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588:1973-1982.
- [29] Chen H, Xu H, Meng YG, Zhang Y, Chen JY, Wei XN. miR-139 - 5p regulates proliferation, apoptosis, and cell cycle of uterine leiomyoma cells by targeting TPD52 [J]. *Oncol Targets Ther*, 2016, 9:6151-6160.

(收稿日期:2019-11-20)

## · 小词典 ·

### 中英文对照名词词汇(五)

- 丝状肌动蛋白 filamentous actin(F-actin)
- 髓鞘蛋白脂质蛋白 proteolipid protein(PLP)
- 体感诱发电位 somatosensory-evoked potential(SEP)
- 体素内不相干运动成像 intravoxel incoherent motion(IVIM)
- 调节性T细胞 regulatory T cell(Treg)
- 调强放射治疗 intensity modulated radiation therapy(IMRT)
- 同型半胱氨酸 homocysteine(Hcy)
- 同源性磷酸酶-张力蛋白 phosphatase and tensin homologue(PTEN)
- 铜绿假单胞菌外毒素A pseudomonas exotoxin A(PE)
- 统一帕金森病评价量表 Parkinson's Disease Rating Scale(UPDRS)
- $\alpha$ -突触核蛋白  $\alpha$ -synuclein( $\alpha$ -Syn)
- <sup>18</sup>F-脱氧葡萄糖 <sup>18</sup>F-fluoro-2-deoxy-D-glucose(<sup>18</sup>F-FDG)
- 微小RNA microRNA(miRNA)
- 无进展生存期 progression free survival(PFS)
- 无阈值簇增强 threshold free cluster enhancement(TFCE)
- 系统性红斑狼疮 systemic lupus erythematosus(SLE)
- 细胞程序性死亡 programmed cell death(PCD)
- 细胞程序性死亡蛋白1 programmed cell death protein 1(PD1)
- 细胞程序性死亡蛋白配体1 programmed cell death protein ligand 1(PDL1)
- 细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4(CTLA-4)
- 细胞毒性T细胞 cytotoxic T lymphocyte(CTL)
- 细胞黏附分子1 cell adhesion molecule 1(CADM1)
- 细胞角蛋白 cytokeratin(CK)
- T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 T cell immunoglobulin and mucin-containing protein-3(TIM-3)
- 细胞黏附分子1 cell adhesion molecule 1(CADM1)
- 细胞外基质 extracellular matrix(ECM)
- 细胞外囊泡 extracellular vesicles(EVs)
- 细胞外信号调节激酶1/2 extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK1/2)
- 细胞周期蛋白依赖性激酶4/6 cyclin-dependent kinase 4/6(CDK4/6)
- 纤维母细胞生长因子 fibroblast growth factor(FGF)
- 纤维母细胞生长因子受体3 fibroblast growth factor receptor 3(FGFR3)
- 腺病毒E2启动子结合因子1 adenovirus E2 factor 1(E2F1)
- 腺苷酸活化蛋白激酶 adenosine monophosphate-activated protein kinase(AMPK)
- 相对脑血流量 relative cerebral blood flow(rCBF)
- 相对脑血容量 relative cerebral blood volume(rCBV)
- 小干扰RNA small interference RNA(siRNA)