

王宏欣, 付苏, 淳雪莉, 等. miR-4539 通过靶向作用于叉头盒转录因子 1 抑制胶质瘤细胞生长的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 91-97.

Wang HX, Fu S, Chun XL, et al. miR-4539 inhibits the growth of glioma cells by targeting Foxp1 [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 91-97.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 013

miR-4539 通过靶向作用于叉头盒转录因子 1 抑制胶质瘤细胞生长的实验研究

王宏欣¹, 付 苏², 淳雪莉², 张 帆^{2*}

(1. 成都上锦南府医院, 四川大学华西医院上锦医院神经外科, 成都 510117; 2. 四川大学华西医院, 成都 510117)

【摘要】 目的 探讨 miR-4539 抑制胶质瘤细胞生长的效应及相关机制。**方法** 采用 RT-PCR 法检测脑胶质瘤标本和 7 株胶质瘤细胞株中 miR-4539 的表达水平。采用 CCK-8 法、流式细胞法、Western blot 法检测 miR-4539 在胶质瘤细胞中的作用。采用双荧光素酶实验验证叉头盒转录因子 1(Foxp1)是否是 miR-4539 的直接靶点。构建小鼠移植瘤模型, 探讨 miR-4539 转染对小鼠肿瘤生长的抑制作用。**结果** (1) miR-4539 在胶质瘤组织中的表达水平显著低于正常脑组织 ($P < 0.05$)。miR-4539 在 7 个常用的人脑胶质瘤细胞系 (U87、U251、U373、T98G、LN18、LN229、SF295) 中的表达量显著低于人正常脑胶质细胞株 HEB ($P < 0.05$)。(2) 与 miR-NC 组相比, miR-4539 转染 72 h 后, T98G 细胞和 LN18 细胞中 miR-4539 的表达水平都显著增加 ($P < 0.05$)。CCK-8 检测显示, 外源性 miR-4539 过表达可显著抑制 T98G 和 LN18 细胞的增殖。同时可诱导 T98G 和 LN18 细胞周期阻滞, G0/G1 期细胞百分率增加, S 期细胞百分率降低, 且细胞周期调控蛋白 cyclinD1、cyclinE1 和 Ser780 的表达水平也显著降低 ($P < 0.05$)。(3) 荧光素酶报告显示, Foxp1 是 miR-4539 的直接靶点, 可被 miR-4539 直接调控。接种 T98G 细胞后 6 周, miR-4539 转染组小鼠移植瘤平均体积、平均重量均显著小于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。(4) T98G 和 LN18 细胞过表达 miR-4539 后, Foxp1 mRNA 和蛋白表达都显著降低, 免疫荧光结果也确认, miR-4539 降低了 Foxp1 在 T98G 细胞和 LN18 细胞中的表达。**结论** miR-4539 可通过靶向作用于 Foxp1 发挥抑癌因子效应, 有望成为脑胶质瘤患者诊断和治疗的新靶点。

【关键词】 脑胶质瘤; miRNA; 叉头盒转录因子 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0091-07

miR-4539 inhibits the growth of glioma cells by targeting Foxp1

WANG Hongxin¹, FU Su², CHUN Xueli², ZHANG Fan^{2*}

(1. Chengdu Shang Jin Nan Fu Hospital, West China Hospital, S.C.U. Neurosurgery, Chengdu 510117, China.

2. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 510117)

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of miR-4539 on the growth of glioma cells. **Methods** The expression levels of miR-4539 in glioma samples and 7 glioma cell lines were detected by RT-PCR. CCK-8 method, flow cytometry and Western blot were used to detect the role of miR-4539 in glioma cells. Dual luciferase assay was used to verify whether Foxp1 is a direct target of miR-4539. To investigate the inhibitory effect of miR-4539 transfection on tumor growth in mice, a mouse transplanted tumor model was constructed. **Results** (1) The expression level of miR-4539 in

【作者简介】 王宏欣 (1988—), 女, 本科, 研究方向: 神经外科方面。E-mail: whx20212020@163.com

【通信作者】 张帆 (1984—), 男, 博士, 研究方向: 神经凋亡, 神经线粒体功能障碍。E-mail: neurozhangfan@163.com

glioma tissues was significantly lower than that in normal brain tissues ($P < 0.05$). The expression level of miR-4539 in 7 commonly used human glioma cell lines (U87, U251, U373, T98G, LN18, LN229, SF295) was significantly lower than that in human normal glioma cell line HEB ($P < 0.05$). (2) Compared with the miR-NC group, the expression levels of miR-4539 in T98G cells and LN18 cells were significantly increased 72 h after transfection of miR-4539 ($P < 0.05$). CCK-8 showed that the overexpression of exogenous miR-4539 significantly inhibited the proliferation of T98G and LN18 cells. Meanwhile, T98G and LN18 cell cycle arrest was induced, and the percentage of G0/G1 phase cells was increased, while the percentage of S phase cells was decreased, and the expression levels of cell cycle regulatory proteins cyclinD1, cyclinE1 and Ser780 were also significantly decreased ($P < 0.05$). (3) Luciferase reports showed that Foxp1 is a direct target of miR-4539 and can be directly regulated by miR-4539. At 6 weeks after T98G cells were inoculated, the average volume and weight of transplanted tumor in the miR-4539-transfected mice were significantly smaller than those in the miR-NC group ($P < 0.05$). (4) After overexpression of miR-4539 in T98G and LN18 cells, the expression of Foxp1 mRNA and protein were significantly decreased. Immunofluorescence result also confirmed that miR-4539 reduced the expression of Foxp1 in T98G and LN18 cells. **Conclusions** MiR-4539 acts as a tumor suppressor by targeting Foxp1, which is expected to be a new target for the diagnosis and treatment of gliomas.

【Keywords】 glioma; miRNA; forked head box transcription factor 1

胶质瘤是成年人最常见的原发性恶性脑肿瘤,近年来形成了以手术切除为主,配合以放化疗的综合治疗体系,但胶质瘤患者的生存率并没有显著提高^[1]。尤其对恶性度较高的 IV 级胶质瘤,也被称为多形性胶质母细胞瘤 (GBM),患者的中位生存期仅为一年^[2]。因此,迫切需要开发出新的更有效的生物标志物来及早诊断及治疗脑胶质瘤。miRNAs 是一种内源性的非编码小 RNA 分子,约有 18~25 个核苷酸,通过与靶信使 RNAs (miRNAs) 3'-非翻译区 (3'-UTR) 的互补序列结合,在转录后调节其靶基因的表达^[3-4]。越来越多的证据表明,miRNAs 在各种人类癌症中调控失调,并参与肿瘤发生过程,包括细胞增殖、凋亡、血管生成和侵袭^[5-6]。以前的研究结果已经在人脑胶质瘤中发现了几个致癌和抑瘤的 miRNAs,如 miR-10b^[7]、miR-30^[8]、miR-203^[9]等。这些特异的 miRNAs 可以潜在地作为有效的生物标志物来提高诊断和预后的准确性,或者作为针对恶性脑瘤的新的治疗策略的靶点。但关于 miR-4539 在脑胶质瘤中的研究很少,因此,本研究探讨了 miR-4539 抑制胶质瘤细胞生长的效应及相关机制,以期对脑胶质瘤的诊断、治疗提供更多潜在的靶点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雌性免疫缺陷裸鼠 (BALB/C-null), 4 周龄, 20 只, 体重 20~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2017-0033], 饲养于海

南医学院动物实验中心 [SYXK (琼) 2017-0033]。实验室内温度约为 25℃, 相对湿度为 50%~60%, 每日 12 h / 12 h 明暗交替, 实验前适应性饲养 1 周。实验研究过程按照 3R 原则, 动物实验开展前获得本院实验动物伦理委员会审批 (IACUC-2019-324)。

1.1.2 组织样本及细胞系

脑胶质瘤患者新鲜肿瘤组织取自我院神经外科, 新鲜胶质瘤标本离体后立即冷冻于液氮中, 保存于 -80℃ 进行核酸提取。所有的组织病理学诊断都是由两位经验丰富的神经病理学家根据世界卫生组织的标准独立确定的。瘤患者在术前均未接受过化疗或放疗, 8 个非肿瘤性脑组织是在交通事故中死亡的个人同意的情况下通过收集捐赠获得的, 并且被证实没有任何先前的病理损害。本研究由中国医科大学伦理委员会批准。正常脑胶质细胞株 HEB 及脑胶质瘤细胞 U87、U251、U373、T98G、LN18、LN229 和 SF295 均购自美国典型培养物保藏中心, 在添加 10% 胎牛血清和青霉素/链霉素 (100 U/mL) 的 Eagle's 培养基中培养。细胞在 37℃ 含 5% CO₂ 的孵育箱中孵育。

1.2 主要试剂与仪器

慢病毒载体 (上海吉满生物科技有限公司); MirVana miRNA 试剂盒 (上海觅拓生物科技有限公司); 荧光素酶报告分析系统试剂盒 (美国 Santa Cruz 公司); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (上海晶抗生物工程有限公司); cyclinD1 蛋白、cyclinE1 蛋白、Ser780 蛋白、Foxp1 蛋白多克隆抗体 (艾美捷生物公司); TaKaRa RNA PCR 试剂盒 (南京诺唯赞

生物科技股份有限公司)。实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(杭州博日科技有限公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司);Western blot 垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 RT-PCR 检测

RT-PCR 定量分析根据 MirVana miRNA 试剂盒说明书的操作步骤进行。从冷冻的胶质瘤组织和胶质瘤细胞系中提取总 RNA,测定 RNA 浓度。合成 cDNA 后进行定量实时 PCR,以 RNU6B 作为内源性对照,用非肿瘤性脑组织进行校正。为评价 miR-4539 转染胶质瘤细胞后 Foxp1 mRNA 表达的变化,采用 TaKaRa RNA PCR 试剂盒和 SYBR PreMix Ex TaqII 试剂盒进行 cDNA 合成和实时定量 PCR, GAPDH 作为内源性对照。所有反应均重复 3 次。用 2^{-ΔΔCt} 法计算相关基因 mRNA 表达的相对定量。引物序列见表 1。

1.3.2 慢病毒载体、质粒构建及转导

从 miRBase 数据库获得 miR-4539 成熟序列。用限制性内切酶 EcoRI 线性化 GV217 载体(Ubi-EGFP-MCS)。将含有成熟 miR-4539 序列的片段导入 GV217 载体的多克隆位点。使用 HEK-293T 包装细胞,采用脂质体 2000 制造病毒。慢病毒载体在 -80℃ 保存直至使用。为了实现靶向高表达,将人 Foxp1cDNA 克隆到 pcDNA3.1 载体中。将胶质瘤细胞株 T98G 细胞和 LN18 细胞接种于 6 孔板中。当细胞融合达到 30% 时,分别用 1 μL 的 miR-4539 慢病毒载体(滴度:3×10⁸ TU/mL)或 1 μL 的慢病毒载体(滴度:3×10⁸ TU/mL)感染细胞。感染后 14 h 更换细胞培养液。分别于感染后 24、48、72 h 用倒置荧光显微镜观察胶质瘤细胞株中绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况,评价其感染效率,转导后 72 h 荧光蛋白表达水平相对较高。质粒转染按脂质体 3000 转染试剂厂家说明书进行。

1.3.3 小鼠模型构建及检测指标

小鼠被安置和维持在层流橱柜中,自由饮食

水。将稳定转染的 T98G 细胞(miR-4539 和 miR-NC)按每 0.2 毫升 5×10⁶ 个的密度注射到裸鼠腋下。每周用游标卡尺测量肿瘤大小 1 次,用公式 V=(D×d²)/2 计算肿瘤体积,其中 D 为最长直径(mm),d 为最短直径(mm)。6 周后处死小鼠,称量肿瘤重量并拍照。

1.3.4 双荧光素酶报告实验

HEK-293T 细胞以每孔 1×10⁴ 细胞密度接种于 96 孔板。将 3'-UTR 质粒共转染 HEK-293T 细胞。转染 48 h 后收集细胞裂解产物,用双荧光素酶报告分析系统测定荧光素酶活性。将相对的 Renilla 荧光素酶活性进行归一化,作为转染效率的内对照。

1.3.5 CCK-8 检测及流式细胞检测

CCK-8 检测:培养 24 h 后收集转染细胞,悬浮于 DMEM 中,以 3×10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中。于接种后不同时间点(0、24、48、72 h)检测细胞增殖情况。在这些特定的时间,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液进行检测。在 37℃ 孵育 2 h 后,在 450 nm 处测定光密度(OD)值。流式细胞检测:应用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。转染后 48 h 胰蛋白酶消化细胞,冰 PBS 洗涤。将这些细胞重新悬浮在 100 μL 的结合缓冲液中,并用 5 μL 的 Annexin V-FITC 和 5 μL 的碘化丙啶处理。在室温黑暗中孵育 20 min 后,用流式细胞仪对细胞进行分析。

1.3.6 Western blot 检测

收集各组细胞后提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。混合上样缓冲液,煮沸变性,电泳、转膜、封闭、一抗/二抗孵育、ECL 法显影定影。通过 Quantity One 软件分析条带强度,以 GAPDH 为内参,检测 cyclinD1 蛋白、cyclinE1 蛋白、Ser780 蛋白、Foxp1 蛋白的表达。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件分析处理数据,计量资料均以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多样本计量资料比较采用方差分析,两两样本比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 目的基因的引物序列
Table 1 Primer sequence of target gene

基因	正义链序列	反义链序列
Gene	Justice chain sequences	Antisense chain sequences
Foxp1	5'-GCTGCGAAGTGGAACCATC-3'	5'-CCTCCTTCTGCACACATTTGAA-3'
GAPDH	5'-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3'	5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'

2 结果

2.1 miR-4539 在胶质瘤组织中的表达

RT-PCR 检测结果显示,与正常脑组织比较胶质瘤组织中 miR-4539 的表达水平明显降低 ($P<0.05$)。miR-4539 在 7 个常用的人脑胶质瘤细胞系(U87、U251、U373、T98G、LN18、LN229 和 SF295)中的表达量明显低于人正常脑胶质细胞株 HEB($P<0.05$),图 1。

2.2 miR-4539 过表达对胶质瘤细胞增殖活性的影响

与 miR-NC 组相比,miR-4539 组中的 miR-4539

表达水平、OD₄₅₀ 在 T98G 细胞和 LN18 细胞中均明显增加 ($P<0.05$),EDU 染色结果显示,miR-4539 转染的 T98G 细胞和 LN18 细胞的 EDU 掺入率明显低于相应的 miR-NC 组细胞,图 2。

2.3 miR-4539 过表达对胶质瘤细胞周期的影响

与 miR-NC 组相比,miR-4539 组 G0/G1 期细胞百分率增加,S 期细胞百分率及 cyclinD1、cyclinE1 和 Ser780 蛋白表达均明显降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$),图 3。

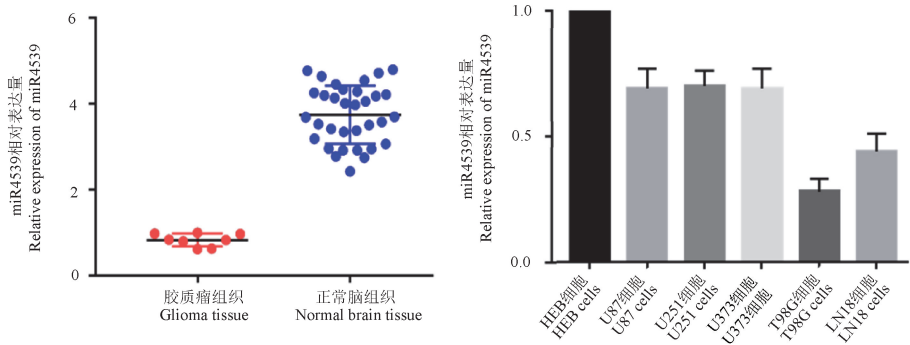
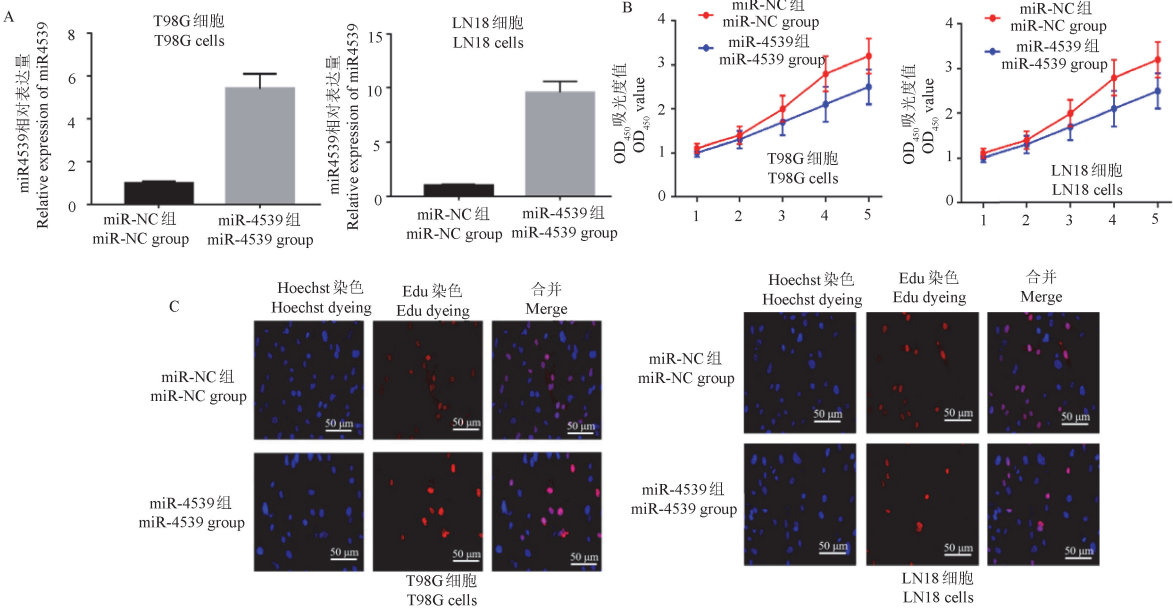


图 1 miR-4539 在胶质瘤组织及细胞系中的表达

Figure 1 Expression of miR-4539 in glioma tissues and cell lines

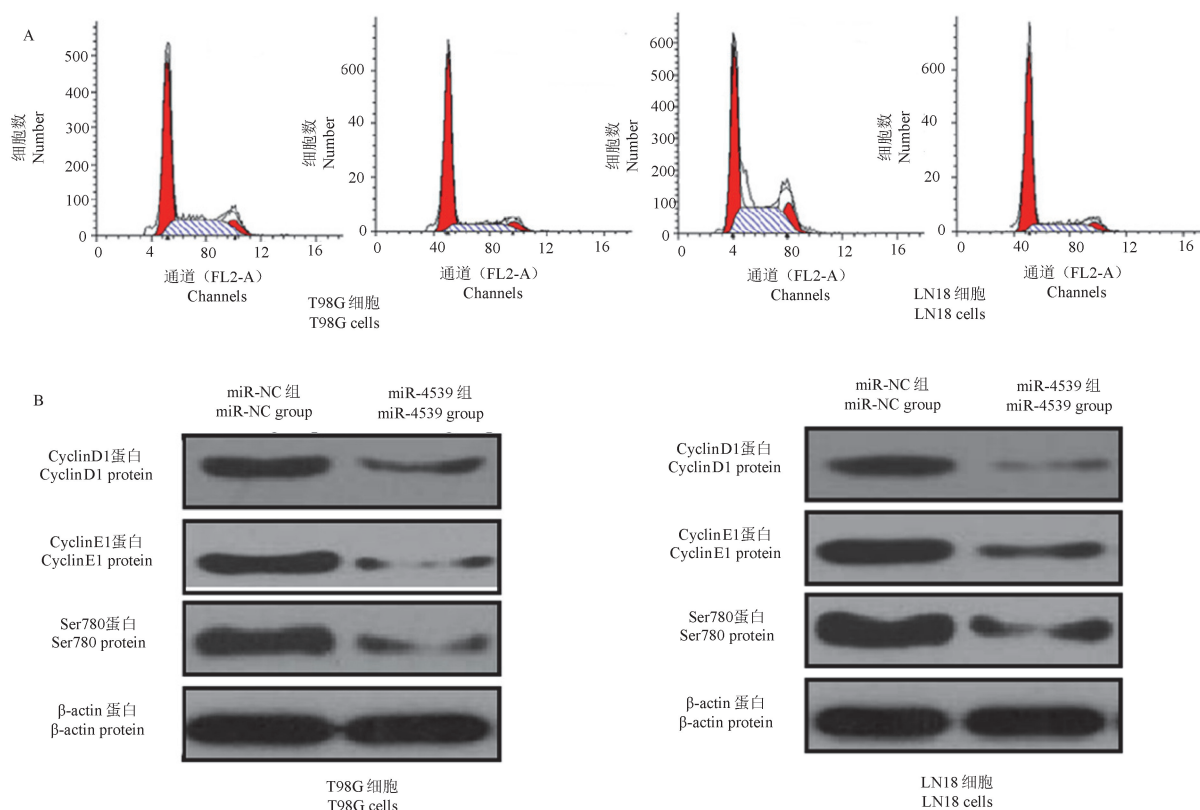


注:A:miR-4539 相对表达量;B:miR-4539 对 T98G 细胞和 LN18 细胞活性的影响;C:Edu 染色检测 miR-4539 对 T98G 细胞和 LN18 细胞增殖的影响。

图 2 miR-4539 过表达对胶质瘤细胞增殖活性的影响

Note. A, Relative expression level of miR-4539. B, Effects of miR-4539 on T98G and LN18 cell activities. C, Edu staining was used to detect the effects of miR-4539 on proliferation of T98G cells and LN18 cells.

Figure 2 Effect of overexpression of miR-4539 on proliferation of glioma cells



注:A:流式细胞检测各组细胞 G0/G1 期和 S 期细胞百分率;B:Western blot 检测各组周期蛋白的表达。

图 3 miR-4539 过表达对胶质瘤细胞周期的影响

Note. A, Percentage of G0/G1 and S phase cells in each group was detected by flow cytometry. B, Western blot was used to detect cyclin expression in each group.

Figure 3 Effect of miR-4539 overexpression on glioma cell cycle

2.4 Foxp1 作为 miR-4539 的直接靶点的鉴定

与 pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/NC 相比, pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/miR-4539 荧光素酶活性明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/miR-4539 与 pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/NC 的荧光素酶活性无明显差异 ($P > 0.05$),图 4。

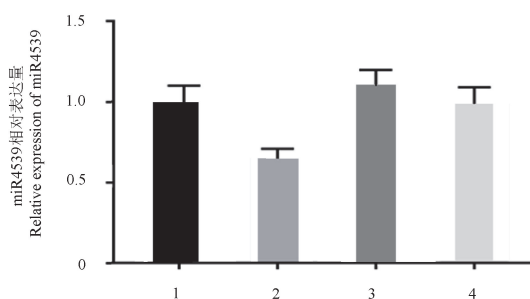
2.5 转染 miR-4539 对小鼠肿瘤生长抑制作用

miR-4539 组裸鼠腋下移植瘤平均体积及肿瘤的平均重量明显低于 miR-NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),图 5。

2.6 miR-4539 对胶质瘤细胞中 Foxp1 的调控作用

与 miR-NC 组相比,miR-4539 组 T98G 和 LN18 胶质瘤细胞中 Foxp1 mRNA、蛋白表达水平均明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);免疫荧光分析发现,miR-4539 降低了 Foxp1 在 T98G 细胞和 LN18 细胞中的表达,图 6。

野生型
WT
FOX P1 3'UTR 5'-AGGCAGUAAGGCCAA CAGGGUCA-3'
Has-miR-4539 3'-CUAUCUACGGAUCAGUCCCA-5'
突变型
Mut
FOX P1 3'UTR 5'-AGCGUAGCCCUAGCAUACUGGCA-3'
Has-miR-4539 3'-CGGAUCUGGACGAACUGUCCCA-5'



注:1: pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/NC; 2: pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/miR-4539; 3: pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/miR-4539; 4: pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/NC。

图 4 Foxp1 作为 miR-4539 的直接靶点的鉴定

Note. 1, pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/NC. 2, pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/miR-4539. 3, pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/miR-4539. 4, pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/NC.

Figure 4 Identification of Foxp1 as a direct target for miR-4539

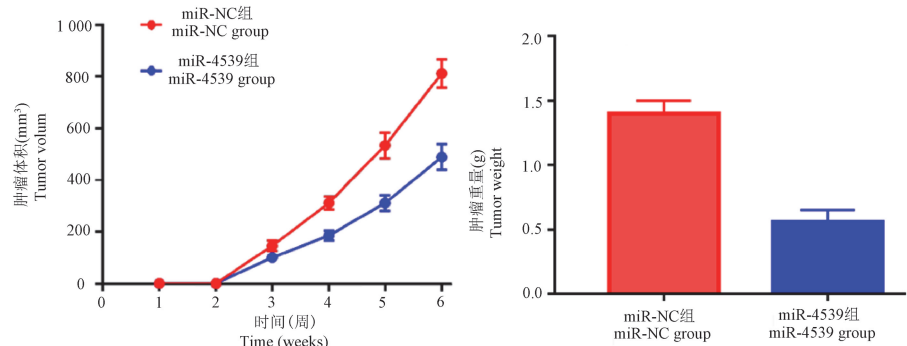
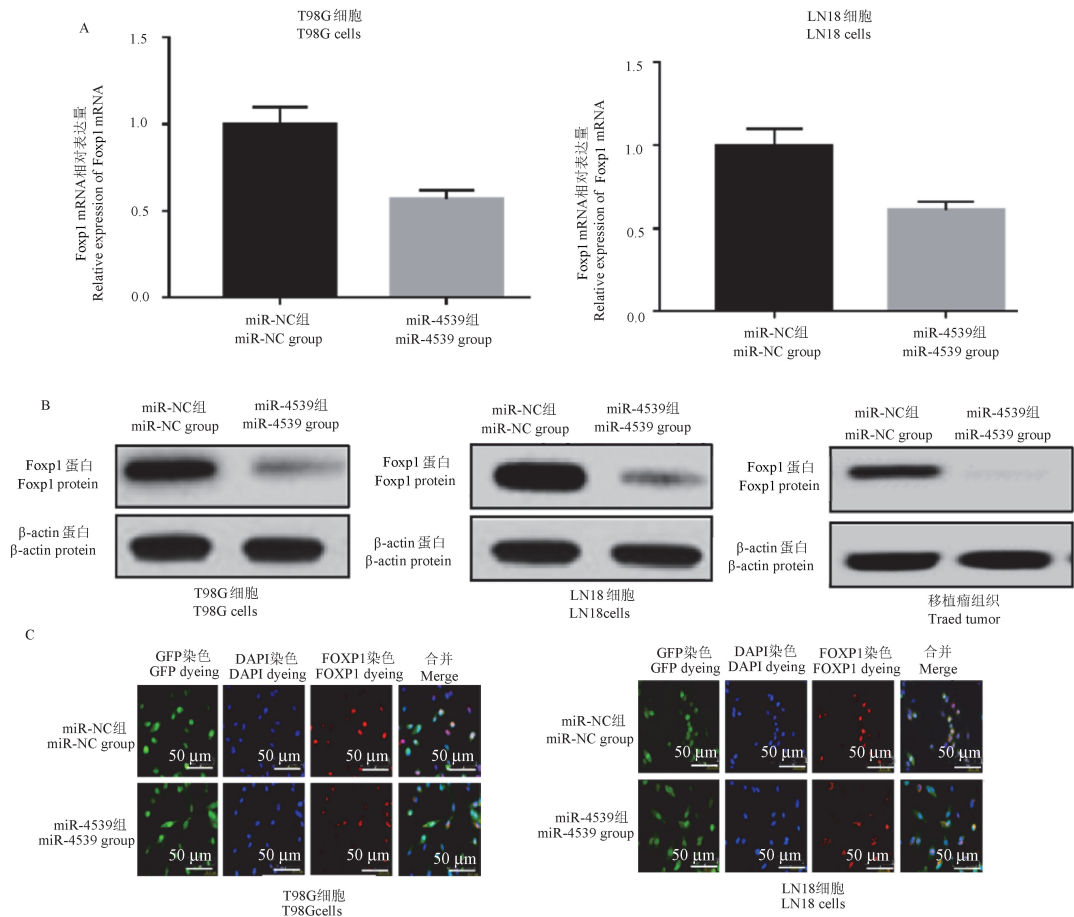


图 5 转染 miR-4539 对小鼠肿瘤生长抑制作用

Figure 5 Inhibitory effect of miR-4539 transfection on tumor growth in mice



注: A: Foxp1 mRNA 相对表达量; B: Western blot 检测各组 Foxp1 蛋白表达; C: 免疫荧光检测 Foxp1 蛋白表达。

图 6 miR-4539 对胶质瘤细胞中 Foxp1 的调控作用

Note. A, Relative expression level of Foxp1 mRNA. B, Foxp1 protein expression in each group was detected by Western blot. C, Foxp1 protein expression was detected by immunofluorescence.

Figure 6 Regulatory effect of miR-4539 on Foxp1 in glioma cells

3 讨论

研究表明, miRNAs 在各种人类癌症中通过调节靶基因表达水平而发挥癌基因或肿瘤抑制因子的功能, 如 miR-141、miR-196、miR-155、miR-34a、miR-326 和 miR-184 被发现参与了胶质瘤的细胞增

殖、凋亡和侵袭等几个关键过程^[10]。此外, 这些失调的 miRNAs 还被证明对诊断和预测预后以及对胶质瘤患者的最终治疗干预具有重要价值。然而, miR-4359 在胶质瘤中的临床意义和生物学功能尚不清楚。本研究中, 我们发现 miR-4359 在胶质瘤组织和细胞系中的表达明显低于在非肿瘤性脑组织

或细胞系中的表达。这些结果提示 miR-4359 可能作为一种肿瘤抑制因子负向调节胶质瘤的发生。因此,我们进一步评估了 miR-4359 对胶质瘤细胞增殖的影响。结果表明,miR-4359 过表达可显著抑制胶质瘤细胞增殖,诱导细胞周期阻滞,促进细胞凋亡。我们还发现 miR-4359 在体内对胶质瘤细胞的致瘤性有抑制作用。

为了确定 miR-4359 调节胶质瘤生长的机制,我们使用公开可用的在线算法(TargetScan、Miranda 和 PITA)预测了它的目标基因,并通过执行微阵列分析、Western blot 和荧光素酶分析最终确定,miR-4359 负调控其靶基因 Foxp1 在胶质瘤细胞中的表达。Foxp1 是 Foxp 转录因子基因家族的成员,包括 43 个人类基因,参与转录调节和 DNA 修复,并在免疫反应、器官发育和癌症发病机制中发挥关键作用。与其他家族成员相似,Foxp1 具有多种功能,例如调节 B 细胞发育、单核细胞分化、促进心脏瓣膜和肺发育等^[11]。此外,根据细胞类型的不同,Foxp1 可作为癌症驱动因子或肿瘤抑制因子参与调节各种人类癌症的发生。Foxp1 的表达缺失最初报道在几种类型的实体肿瘤中,如结肠癌^[12]和乳腺癌^[13]。作为癌基因,Foxp1 在 B 细胞淋巴瘤中直接抑制广泛的促凋亡基因。最近的一项研究表明^[14],在 B 细胞淋巴瘤、结直肠癌和黑色素瘤等不同的人类癌症中,Foxp1 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的转录增强子。然而,Foxp1 在肿瘤发生中的作用及其在胶质瘤中的临床意义仍然知之甚少。Gomez 等^[15]人发现,Foxp1 高表达预示胶质母细胞瘤患者生存率较低,沉默 Foxp1 的表达则可抑制肿瘤的生长,因此,Foxp1 可能在脑胶质瘤中起到了癌基因的作用。在本研究中,通过 RT-PCR 和 Western blot 检测发现,当 T98G 细和 LN18 细胞过表达 miR-4359 后,Foxp1 mRNA 和蛋白表达都显著降低,这表明在脑胶质瘤中,Foxp1 可被 miR-4359 直接靶向并下调,并且 Foxp1 在功能上参与了 miR-4359 介导的肿瘤生长抑制。但 miR-4359/Foxp1 对具体的下游信号讨论的影响仍值得进一步研究。

综上所述,本研究发现,miR-4359 通过直接调节转录因子 Foxp1 的表达抑制肿瘤生长,抑制胶质瘤细胞增殖。我们的结果证实了 miR-4359 在胶质瘤中作为一种肿瘤抑制性 miRNA 的作用,并提示 miR-4359 可能成为治疗胶质瘤的新靶点。

参考文献:

[1] 李德培,陈银生,郭铮铮,等. 脑胶质瘤的临床疗效和预后

因素分析(附 741 例报告)[J]. 中华神经外科杂志, 2018, 34(9): 905-909.

- [2] 高一凡, 宫宇娇, 程华坤, 等. RTK/ECM/Integrin 相关信号通路促进胶质母细胞瘤侵袭的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2019, 42(1): 69-72.
- [3] Zhang Y, Xu Y, Li F, et al. Dissecting dysfunctional crosstalk pathways regulated by miRNAs during glioma progression [J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 25769-25782.
- [4] Sun L, Li D, Yuan Y, et al. Intestinal long non-coding RNAs in response to simulated microgravity stress in *Caenorhabditis elegans* [J]. Sci Rep UK, 2021, 11(1): 1997.
- [5] Liu M, Chen Y, Huang B, et al. Tumor-suppressing effects of microRNA-612 in bladder cancer cells by targeting malic enzyme 1 expression [J]. Int J Oncol, 2018, 52(6): 1923-1933.
- [6] Huang S, Cui H, Lou Z, et al. Association of rs3787016 in long non-coding RNAs POLR2E and rs2910164 in miRNA-146a with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Iran J Public Health, 2018, 47(5): 623-632.
- [7] Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, et al. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC [J]. Int J Cancer, 2009, 125(6): 1407-1413.
- [8] Jiang L, Lin C, Song L, et al. MicroRNA-30e* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF- κ B/I κ B α negative feedback loop [J]. J Clin Invest, 2012, 122(1): 33-47.
- [9] Dontula R, Dinasarapu A, Chetty C, et al. MicroRNA 203 modulates glioma cell migration via robo1/ERK/MMP-9 signaling [J]. Genes Cancer, 2013, 4(7-8): 285-296.
- [10] Peng T, Zhang S, Li W, et al. MicroRNA-141 inhibits glioma cells growth and metastasis by targeting TGF- β 2 [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(8): 3513-3521.
- [11] Barrans SL, Fenton JA, Banham A, et al. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome [J]. Blood, 2004, 104(9): 2933-2935.
- [12] Zhang J, Chen J, Ma T, et al. Genetic variants of FOXP1 and FOXF1 are associated with the susceptibility of oesophageal adenocarcinoma in Chinese population [J]. J Genetic, 2018, 97(1): 1-6.
- [13] Halacli SO, Dogan AL. FOXP1 regulation via the PI3K/Akt/p70S6K signaling pathway in breast cancer cells [J]. Oncol Lett, 2015, 9(3): 1482-1488.
- [14] Yang S, Liu Y, Li MY, et al. FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 124.
- [15] Gomez GG, Volinia S, Croce CM, et al. Suppression of microRNA-9 by mutant EGFR signaling upregulates FOXP1 to enhance glioblastoma tumorigenicity [J]. Cancer Res, 2014, 74(5): 1429-1439.

[收稿日期]2021-05-28