



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2025.01.012

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2025.01.012>

· 论著 ·

微小 RNA-221/222 对垂体瘤细胞增殖、凋亡、迁移的影响

董文静 张赛春 颜世举 熊新娟 谷伟军

[摘要] **目的** 探讨微小 RNA-221/222 (miR-221/222) 对垂体瘤细胞增殖、凋亡、迁移等生物学行为的影响。**方法** 选取 2022 年 6 月 ~ 2023 年 12 月在解放军总医院海南医院未接受手术治疗的垂体瘤患者 5 例作为垂体瘤组,另选取同期在该院性别及年龄相匹配的健康体检者 5 例为健康对照组;将人垂体瘤细胞系 GT1-1 分为 miR-221/222 模拟物组、miR-221/222 抑制物组及阴性对照组。采用 CCK-8 检测 miR-221/222 对人垂体瘤细胞系 GT1-1 分裂增殖能力的影响;采用流式细胞术 (FCM) 检测 miR-221/222 对人垂体瘤细胞系 GT1-1 凋亡的影响;采用 Transwell 法检测 miR-221/222 对垂体瘤细胞迁移的影响;采用 Western Blot 检测 miR-221/222 对垂体瘤细胞中 Caspase3、Cleaved-Caspase3、E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达水平的影响。**结果** 与健康对照组比较,垂体瘤组的血浆外泌体 miR-221/222 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与阴性对照组比较,miR-221/222 模拟物组可显著促进垂体瘤细胞增殖、迁移,抑制凋亡;而 miR-221/222 抑制物组可显著抑制垂体瘤细胞增殖、迁移,促进凋亡 ($P < 0.001$);与阴性对照组比较,miR-221/222 模拟物组可显著抑制 Cleaved-Caspase3、E-cadherin 蛋白的表达,促进 N-cadherin 蛋白表达水平 ($P < 0.001$),miR-221/222 抑制物组可显著促进 Cleaved-Caspase3、E-cadherin 蛋白的表达,抑制 N-cadherin 蛋白表达水平 ($P < 0.001$) **结论** 在人垂体瘤细胞中,miR-221/222 高表达可促进垂体瘤细胞增殖,在垂体瘤发生发展过程中起到原癌基因的作用。

[关键词] 微小 RNA-221/222; 垂体腺瘤; 增殖; 凋亡; 迁移; 上皮间质转化**[中图分类号]** R318.15;R736**[文献标识码]** A

Effect of mircoRNA-221/222 on proliferation, apoptosis and migration of pituitary adenoma cells

Dong Wenjing, Zhang Saichun, Yan Shiju, Xiong Xinjuan, Gu Weijun. Chinese People's Liberation Army Medical College, Beijing 100039, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of microRNA-221/222 (miR-221/222) on the biological behaviors of pituitary tumor cells such as proliferation, apoptosis and migration. **Methods** Five patients with pituitary tumors who did not receive surgical treatment at Hainan Hospital of PLA General Hospital from June 2022 to December 2023 were selected as the pituitary tumor group, and another five healthy medical checkups matched by gender and age at the hospital during the same period were selected as the healthy control group. The human pituitary tumor cell line GT1-1 was divided into miR-221/222 mimic group, miR-221/222 inhibitor group and negative control group. CCK-8 was used to detect the effect of miR-221/222 on the division and proliferation ability of human pituitary tumor cell line GT1-1; flow cytometry (FCM) was used to detect the effect of miR-221/222 on the apoptosis of human pituitary tumor cell line GT1-1 apoptosis; Transwell assay was used to detect the effect of miR-221/222 on the migration of pituitary tumor cells; Western Blot assay was used to detect the effect of miR-221/222 on the Cleaved in pituitary tumor cells-Caspase3, Caspase3, E-cadherin, N-cadherin protein expression levels in pituitary tumor cells. **Results** Compared with the healthy control group, the plasma exosome miR-221/222 levels were significantly higher in the pituitary tumor group ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, the miR-221/222 mimics group significantly promoted the proliferation and migration of pituitary tumor cells and inhibited apoptosis, while the miR-221/222 inhibitors group significantly inhibited the proliferation and migration of pituitary tumor cells and promoted apoptosis ($P <$

基金项目:北京市自然科学基金面上项目(7232155)

作者单位:100039 北京,解放军医学院(董文静、熊新娟);解放军总医院第一医学中心内分泌科(董文静、张赛春、谷伟军);解放军总医院海南医院骨科(颜世举);解放军第 960 医院烧伤科(熊新娟)

通讯作者:谷伟军, E-mail: guweijun301@163.com

0.001); compared with the negative control group, the miR-221/222 mimics group could significantly inhibit the expression of Cleaved-Caspase3, E-cadherin protein, and promote the expression level of N-cadherin protein ($P < 0.001$), and the miR-221/222 inhibitor group significantly promoted the expression of Cleaved-Caspase3, E-cadherin proteins and inhibited the level of N-cadherin protein expression ($P < 0.001$). **Conclusion** In human pituitary tumor cells, high expression of miR-221/222 promotes the proliferation of pituitary tumor cells and acts as a proto-oncogene during pituitary tumor development.

[Key words] MicroRNA-221/222; Pituitary adenoma; Proliferation; Apoptosis; Migration; Epithelial-mesenchymal transition

垂体腺瘤(PitNET)是一种常见的颅内肿瘤,约占所有颅内原发肿瘤的10%~15%,其可分为非功能性垂体腺瘤和功能性垂体腺瘤,后者包括泌乳素瘤、生长激素瘤等^[1]。绝大多数垂体腺瘤在生物学上属于良性,但部分垂体瘤呈局部侵袭性生长,通常侵犯海绵窦、视交叉等重要周围组织,引起激素分泌紊乱、视觉缺损等临床症状^[2]。内镜下手术切除是垂体瘤的主要治疗方式,但因其周围组织结构复杂,手术完整切除十分困难,同时有研究指出,垂体瘤10年复发率约为10%^[3]。因此,阐明调控垂体瘤细胞增殖、迁移等生物学行为的潜在分子机制有助于垂体瘤的早期诊断及治疗,以利于改善患者的预后。微小RNA(miR)是一类18~27个核苷酸组成的非编码单链RNA分子,广泛存在于真核细胞内,参与细胞增殖、凋亡、衰老等重要生物学行为^[4]。miR-221/222在恶性脑膜瘤、乳腺癌中发挥了重要作用,但在垂体瘤中相关报道甚少。因此本研究聚焦血浆中外泌体miR-221/222对于垂体瘤细胞增殖、凋亡、迁移等的影响,探索垂体瘤早期诊断、精准治疗的新靶点。

对象与方法

1. 对象:选取2022年6月~2023年12月在解放军总医院海南医院未接受手术治疗的垂体瘤患者5例(垂体瘤组),排除已进行放化疗、复发和资料不全者。另选取性别及年龄相匹配的同期在解放军总医院海南医院的健康体检者5例(健康对照组)。本研究获得解放军总医院海南医院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。人垂体瘤细胞系GT1-1购自上海富衡生物;转染剂Lipofectamine²⁰⁰⁰购自美国Life technologies公司;miR-221/222模拟物、miR-221/222抑制物购自上海亚载生物;Cleaved-Caspase3一抗、Caspase3一抗、E-cadherin一抗及N-cadherin一抗均购自美国Cell Signaling Tech公司;CCK-8试剂盒购自中国生工生物工程上海(股份)有限公司;凋亡试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;Transwell小室购自美国CORNING公司;外泌体提取纯化试剂盒购自上海宇玫博生物科技有限公司;实时定量PCR试剂盒购自北京康润诚业生物科技有限公司。

2. 方法

(1)RNA提取:取垂体瘤组患者及健康对照组受试者清晨空腹采集的全血,在4℃下5 000 rpm离心5 min,取上清即为血浆。4℃下3 000 g离心10 min,去除细胞碎片。加入外泌体浓缩溶液混匀,4℃下静置后10 000 g离心60 min,弃上清,沉淀中富含外泌体颗粒,以PBS重悬,并进行纯化。外泌体中加入1 ml Trizol试剂,裂解后加入氯仿,4℃下12 000 rpm离心15 min,取上层水相,加入异丙醇,离心、洗涤、干燥后溶于DEPC水中,获得总RNA。逆转录获得cDNA,并进行荧光定量PCR检测。

(2)细胞分组与转染:将人垂体瘤细胞系GT1-1置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,在5%CO₂、37℃恒温培养箱中培养,每隔2 d更换培养基一次。待GT1-1细胞处于对数生长期、75%融合度时,参照Lipofectamine²⁰⁰⁰使用说明进行转染,miR-221/222模拟物组、miR-221/222抑制物组、阴性对照组细胞分别添加miR-221/222模拟物、抑制物、无关对照序列,转染终浓度为50 nM,转染3 h后更换为新鲜DMEM培养基常规培养。

(3)CCK-8检测:将细胞接种于96孔板,每组细胞设置3个复孔。同一时间点向每孔加入10 μl的CCK-8试剂,在37℃细胞培养箱中避光孵育40 min,分别检测细胞在24 h、48 h、72 h、96 h于450 nm处的OD值,并进行数据分析。

(4)流式细胞术:转染48 h,胰酶消化后收集细胞,PBS缓冲液洗涤细胞,加入250 μl 1×Binding Buffer重悬细胞,调节其浓度为1×10⁶细胞/ml。加入5 μl AnnexinV-FITC和5 μl碘化丙啶(PI),室温避光条件下孵育15 min,使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

(5)Transwell实验:转染48 h后取100 μl细胞悬液加入Transwell小室至上室,下室加入500 μl含20%FBS的DMEM培养基,常规培养24 h后,取出Transwell小室,PBS轻柔冲洗,甲醛固定30 min,结晶紫染色30 min,显微镜下随机选取3个视野观察细胞,计数并进行数据分析。

(6)Western Blot:转染48 h后用细胞裂解液提取总蛋白,对各组总蛋白利用BCA法进行蛋白定量,配

置 8% SDS-PAGE 凝胶,每组上样 30 μg 总蛋白,恒压 80 V 电泳蛋白样品,100 V 恒压冰浴 60 min 转模,使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液室温下封闭 60 min,与稀释后的 Cleaved-Caspase3、E-cadherin、N-cadherin 一抗 4 ℃ 孵育过夜,TBST 缓冲液洗涤 5 次,与 HRP 偶联的二抗溶液室温下孵育 1 h,TBST 缓冲液洗涤 5 次,加入显影液显色曝光,采用 Image J 图像分析软件进行数据分析。

3. 统计学处理:应用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 垂体瘤组与健康对照组血浆外泌体 miR-221/222 的表达情况:垂体瘤组患者血浆外泌体 miR-221/222 水平高于健康对照组[(5.82 ± 1.75) 比 (1.00 ± 0.41), (3.93 ± 0.81) 比 (1.00 ± 0.30), *P* < 0.001]。

2. miR-221/222 对人垂体瘤细胞系 GT1-1 分裂增殖、凋亡及迁移能力的影响:阴性对照组、miR-221/222 模拟物组 24 h、48 h、72 h 及 96 h 人垂体瘤细胞系 GT1-1 分裂增殖能力均依次升高,miR-221/222 抑制物组 24 h、48 h、72 h 人垂体瘤细胞系 GT1-1 分裂增殖能力均依次升高 (*P* < 0.05);与同期阴性对照组比较,miR-221/222 模拟物组 72 h 和 96 h 人垂体瘤细胞增殖能力显著升高,miR-221/222 抑制物组 72 h 和 96 h 垂体瘤细胞增殖能力显著降低;miR-221/222 模拟物组 72 h 和 96 h 垂体瘤细胞增殖速率显著高于同期 miR-221/222 抑制物组 (*P* < 0.001)。见表 1。与阴性对照组相比,miR-221/222 模拟物组垂体瘤细胞凋亡率显著降低,迁移率显著升高;miR-221/222 抑制物组垂体瘤细胞凋亡率显著升高,迁移率显著降低 (*P* < 0.05)。与 miR-221/222 模拟物组比较,miR-221/222 抑制物组细胞凋亡率显著升高,细胞迁移率显著降低 (*P* < 0.001)。见表 2。

表 2 不同组别人垂体瘤细胞系 GT1-1 凋亡及迁移能力比较

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞凋亡率(%)	细胞迁移率(%)
阴性对照组	7.31 ± 0.65	281.66 ± 23.35
miR-221/222 模拟物组	2.96 ± 0.70 ^a	522.33 ± 29.53 ^a
miR-221/222 抑制物组	23.83 ± 1.33 ^{ab}	58.00 ± 6.55 ^{ab}
<i>F</i> 值	617.308	148.307
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注:与阴性对照组比较,^a*P* < 0.001;与 miR-221/222 模拟物组比较,^b*P* < 0.001

表 1 不同组别人垂体瘤细胞系 GT1-1 分裂增殖能力比较

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	铺板时间(h)	OD 值
阴性对照组	24	0.33 ± 0.01
	48	0.48 ± 0.03 ^c
	72	0.79 ± 0.05 ^{cd}
	96	0.94 ± 0.12 ^{ede}
miR-221/222 模拟物组	24	0.39 ± 0.01
	48	0.60 ± 0.02 ^c
	72	1.06 ± 0.10 ^{acd}
	96	1.36 ± 0.12 ^{acde}
miR-221/222 抑制物组	24	0.30 ± 0.01
	48	0.40 ± 0.04 ^c
	72	0.54 ± 0.05 ^{abcd}
	96	0.59 ± 0.10 ^{abcd}

注:与同期阴性对照组比较,^a*P* < 0.05;与同期 miR-221/222 模拟物组比较,^b*P* < 0.05;与同组 24 h 比较,^c*P* < 0.05;与同组 48 h 比较,^d*P* < 0.05;与同组 72 h 比较,^e*P* < 0.05

3. 3 组垂体瘤细胞 Cleaved-Caspase3、Caspase3、E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达水平比较:阴性对照组、miR-221/222 模拟物组及抑制物组人垂体瘤细胞 Caspase3 蛋白表达水平比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。与阴性对照组比较,miR-221/222 模拟物组垂体瘤细胞中 Cleaved-Caspase3、E-cadherin 蛋白表达水平显著降低,N-cadherin 蛋白表达水平显著升高;miR-221/222 抑制物组垂体 Cleaved-Caspase3、E-cadherin 蛋白表达水平显著升高,N-cadherin 蛋白表达水平显著降低 (*P* < 0.001)。与 miR-221/222 模拟物组比较,miR-221/222 抑制物组 Cleaved-Caspase3、E-cadherin 蛋白表达水平显著升高,N-cadherin 蛋白表达水平显著降低 (*P* < 0.001)。见表 3。

表 3 3 组人垂体瘤细胞 Cleaved-Caspase3、Caspase3、E-cadherin 及 N-cadherin 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Cleaved-Caspase3	Caspase3	E-cadherin	N-cadherin
阴性对照组	1.03 ± 0.13	1.02 ± 0.12	1.01 ± 0.09	1.04 ± 0.07
miR-221/222 模拟物组	0.33 ± 0.02 ^a	0.97 ± 0.06	0.25 ± 0.02 ^a	3.91 ± 0.18 ^a
miR-221/222 抑制物组	2.58 ± 0.11 ^{ab}	1.02 ± 0.07	4.04 ± 0.28 ^{ab}	0.33 ± 0.03 ^{ab}
<i>F</i> 值	257.803	8.581	105.400	74.286
<i>P</i> 值	<0.001	0.480	<0.001	<0.001

注:与阴性对照组比较,^a*P* < 0.001;与 miR-221/222 模拟物组比较,^b*P* < 0.001

讨 论

垂体瘤是常见的颅内肿瘤,绝大部分属于良性肿瘤,但在临床中部分垂体瘤呈局部侵袭性生长,压迫周围重要组织,并对手术根治造成困难。细胞增殖与细胞凋亡

是垂体瘤发生、发展的两个重要生物学过程,垂体瘤细胞的快速增殖与低水平凋亡导致瘤体迅速增大,出现压迫症状,甚至是局部侵袭性生长^[2,5]。因此,探讨在垂体瘤生长、迁移中的关键分子,对其治疗具有重要意义。

MiR 为非编码单链 RNA 分子,其本身不参与基因的转录与翻译过程,而是通过与目标基因 mRNA 中的 3' 非编码区特异性结合,通过一系列分子生物学作用,降解目标基因 mRNA 或阻断目标基因 mRNA 翻译,起到转录后调控的作用^[4]。既往研究发现,在垂体瘤中,miR-30d、miR-543 通过抑制细胞凋亡、促进细胞侵袭,起到原癌基因的作用,而 miR-149、miR-34a 等可通过抑制细胞增殖及侵袭,促进细胞凋亡,从而抑制垂体瘤生长,起到抑癌基因作用^[6-7]。人 miR-221 与 miR-222 具有高度同源的核心序列,在 X 染色体上前后排列编码^[8]。研究表明,在恶性胶质瘤中,miR-221/222 通过调控 JAK/STAT 信号通路,促进肿瘤血管生成,从而促进胶质瘤进展^[9]。在前列腺癌中,miR-221/222 通过抑制 Caspase-10 蛋白的表达,进一步抑制细胞凋亡,促进细胞增殖,推动了肿瘤的发生与发展^[10]。由此可见,miR-221/222 在多种肿瘤的发病机制中起到重要作用,但在垂体瘤中尚未见报道。细胞凋亡是一种细胞程序性死亡,是机体内清除异常细胞的重要途径之一,在肿瘤细胞中,细胞凋亡常常处于抑制或缺陷状态,使得机体无法清除异常或病变细胞,最终导致肿瘤形成^[11]。Caspase 蛋白及即半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶,可通过多种信号通路调节细胞凋亡,Caspase-3 为 Caspase 家族的核心成员,是执行细胞凋亡的关键蛋白,在肿瘤、缺血再灌注损伤等多种疾病的发生发展中发挥重要作用^[12]。Cleaved-Caspase-3 是 Caspase-3 蛋白活化过程中的剪切片段,其表达水平可反映 Caspase-3 蛋白的活性和细胞凋亡水平^[13]。本研究发现,miR-221/222 模拟物可显著促进垂体瘤细胞增殖,并通过抑制 Cleaved-Caspase3,抑制 Caspase-3 蛋白活性,进而抑制垂体瘤细胞凋亡,在垂体瘤中起到原癌基因的作用。上皮间质转化(EMT)是上皮细胞逐渐转化为间质样细胞的过程,使上皮细胞失去极性和细胞粘附功能,是细胞转移和侵袭的重要环节,在胚胎发育、器官纤维化、肿瘤转移侵袭中发挥重要作用^[14]。研究表明,肿瘤细胞可通过 EMT 进行迁移、侵入毛细血管、淋巴管,完成局部及远处转移^[15]。研究发现,在乳腺癌中,miR-221/222 通过激活肿瘤干细胞中 Akt/NF- κ B/COX-2 信号通路,促进乳腺癌细胞 EMT,促进乳腺癌转移^[16]。本研究发现,miR-221/222 模拟物可抑制上皮细胞标志物 E-cadherin 蛋白的表达,促进间质上皮标志物 N-cadherin 蛋白的表达,促进垂体瘤细胞 EMT,进而促进垂体瘤细胞迁移。

然而,本研究仍有一定的局限性:GT1-1 细胞系在侵袭小室中未发现侵袭能力,未能探明 miR-221/222 是否对垂体瘤细胞侵袭起到调控作用。我们在下一步研究中,拟通过转录组测序、生物信息分析及查阅文献等方法,确定 miR-221/222 在垂体瘤细胞系中的靶基因,并在体内及体外实验中进行验证。

综上所述,本研究发现 miR-221/222 可促进垂体瘤细胞增殖,并通过抑制 Cleaved-Caspase3 蛋白的表达,抑制垂体瘤细胞凋亡,同时通过抑制 E-cadherin 蛋白的表达、促进 N-cadherin 蛋白的表达,促进垂体瘤细胞迁移,促进垂体瘤发生与发展。因此,miR-221/222 可作为垂体瘤诊断和分子治疗的新靶点,具有重要的临床意义。

参 考 文 献

- [1] Yang Q, Li X. Molecular Network Basis of Invasive Pituitary Adenoma: A Review[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10;7.
- [2] Melmed S, Kaiser UB, Lopes MB, et al. Clinical Biology of the Pituitary Adenoma[J]. Endocr Rev, 2022, 43(6): 1003-1037.
- [3] Dai C, Liu X, Ma W, et al. The Treatment of Refractory Pituitary Adenomas[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10;334.
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [5] Kontogeorgos G, Thodou E, Osamura RY, et al. High-risk pituitary adenomas and strategies for predicting response to treatment[J]. Hormones (Athens), 2022, 21(1): 1-14.
- [6] Sun B, Dai C, Zhao S, et al. MicroRNA-30d target TIMP3 induces pituitary tumor cell growth and invasion[J]. Gland Surg, 2021, 10(12): 3314-3323.
- [7] Zhang Z, Schafer A, Voellger B, et al. MicroRNA-149 Regulates Proliferation, Migration, and Invasion of Pituitary Adenoma Cells by Targeting ADAM12 and MMP14[J]. Curr Med Sci, 2022, 42(6): 1131-1139.
- [8] Zhu Z, Zhang D, Lee H, et al. Macrophage-derived apoptotic bodies promote the proliferation of the recipient cells via shuttling microRNA-221/222[J]. J Leukoc Biol, 2017, 101(6): 1349-1359.
- [9] Xu CH, Liu Y, Xiao LM, et al. Silencing microRNA-221/222 cluster suppresses glioblastoma angiogenesis by suppressor of cytokine signaling-3-dependent JAK/STAT pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 22272-22284.
- [10] Wang L, Liu C, Li C, et al. Effects of microRNA-221/222 on cell proliferation and apoptosis in prostate cancer cells[J]. Gene, 2015, 572(2): 252-258.
- [11] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516.
- [12] Dejas L, Santoni K, Meunier E, et al. Regulated cell death in neutrophils: From apoptosis to NETosis and pyroptosis[J]. Semin Immunol, 2023, 70: 101849.
- [13] Zhu P, Ke ZR, Chen JX, et al. Advances in mechanism and regulation of PANoptosis: Prospects in disease treatment[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1120034.
- [14] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178-196.
- [15] Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis[J]. Annu Rev Pathol, 2018, 13: 395-412.
- [16] Li B, Lu Y, Yu L, et al. miR-221/222 promote cancer stem-like cell properties and tumor growth of breast cancer via targeting PTEN and sustained Akt/NF- κ B/COX-2 activation[J]. Chem Biol Interact, 2017, 277: 33-42.

(收稿日期: 2024-09-23)

(本文编辑: 李丹青)