

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.08.015

论著·基础

miR-489-3p 靶向 PTEN/PI3K/Akt 信号通路对膀胱癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

王哲,张敬,吴仁通,张潮,陈怀安,苗文隆

基金项目:河北省张家口市科技局指导性项目(2121071D)

作者单位:075000 河北省张家口,河北北方学院附属第一医院泌尿外科(王哲、吴仁通、张潮、陈怀安、苗文隆),肿瘤内科(张敬)

通信作者:王哲,E-mail:fandc26655@163.com

【摘要】目的 探讨微小 RNA(miR)-489-3p 靶向第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)/磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路对膀胱癌(BC)细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。**方法** 2021 年 1—7 月于河北北方学院附属第一医院进行细胞实验,利用火山图从癌症基因组图谱(TCGA-BLCA)数据库筛选 BC 差异表达 miRNA。以 110 例 BC 患者的癌组织及其癌旁组织和购买的人膀胱上皮永生生化细胞 SV-HUC-1 及人 BC 细胞系 5637、J82、T24 为研究对象,采用实时荧光定量 PCR 测定 miR-489-3p 和 PTEN mRNA 的表达。根据 miR-489-3p 的相对表达量均值将 BC 患者分为低表达组(≤ 0.36)70 例和高表达组(> 0.36)40 例,并分析 miR-489-3p 表达在 BC 患者不同临床病理特征中的变化。双荧光素酶实验验证 miR-489-3p 和 PTEN 的靶向关系。选择 miR-489-3p 表达最低的 T24 细胞进行转染实验,T24 细胞随机分组为对照组、miR-NC(阴性对照组)、miR-489-3p mimics(模拟物)组、miR-489-3p mimics + pcDNA 组、miR-489-3p mimics + pc-PTEN 组。MTT 和克隆形成实验、Transwell 实验、流式细胞术分别检测细胞增殖、侵袭和凋亡;Western-blot 检测 PTEN、PI3K、Akt 蛋白表达。**结果** 通过火山图筛选出 BC 组织中显著下调的 miR-489-3p。BC 癌组织中 miR-489-3p 表达低于癌旁组织,PTEN mRNA 表达高于癌旁组织($t = 186.168, 510.107, P$ 均 < 0.001);BC 细胞系 miR-489-3p 表达低于 SV-HUC-1 细胞,PTEN mRNA 表达高于 SV-HUC-1 细胞($F = 883.826, 807.220, P$ 均 < 0.001)。miR-489-3p 低表达组患者 TNM 分期 T₃₋₄、有淋巴结转移、肿瘤低分化比例高于高表达组($P < 0.05$)。双荧光素酶实验显示,miR-489-3p 靶向负调控 PTEN 表达。miR-489-3p mimics 组凋亡率及 PI3K、Akt 蛋白表达水平高于 miR-NC 组,PTEN 蛋白表达水平、OD 值(24 h、48 h、72 h)、克隆数目和细胞侵袭数低于 miR-NC 组(P 均 < 0.01);miR-489-3p mimics + pc-PTEN 组凋亡率及 PI3K、Akt 蛋白表达水平低于 miR-489-3p mimics 组,PTEN 蛋白表达水平、OD 值(24 h、48 h、72 h)、克隆数目和细胞侵袭数高于 miR-489-3p mimics 组($P < 0.01$)。**结论** miR-489-3p 可能通过靶向下调 PTEN 表达,激活 PI3K/Akt 信号通路,进而抑制 BC 细胞增殖、侵袭,促进凋亡。

【关键词】 膀胱癌;微小 RNA-489-3p;第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因;磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B;增殖;凋亡;侵袭

【中图分类号】 R737.14

【文献标识码】 A

Effects of miR-489-3p targeting PTEN/PI3K/Akt signaling pathway on proliferation, apoptosis and invasion of bladder cancer cells Wang Zhe*, Zhang Jing, Wu Rentong, Zhang Chao, Chen Huaian, Miao Wenlong. * Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Hebei Province, Zhangjiakou 075000, China

Corresponding author: Wang Zhe, E-mail: fandc26655@163.com

Funding program: Guiding Project of Science and Technology Bureau of Zhangjiakou City, Hebei Province (2121071D)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of microRNA (miR)-489-3p targeting chromosome 10 deleted phosphatase and tensin homolog gene (PTEN)/phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway in the bladder Effects of cancer (BC) cell proliferation, apoptosis and invasion.**Methods** From June 2018 to July 2021, experiments were conducted at the First Affiliated Hospital of Hebei North University, using volcano plots to screen BC differentially expressed miRNAs from The Cancer Genome Atlas (TCGA-BLCA) database. The cancer tissues and adjacent tissues of 110 BC patients, purchased human bladder epithelial immortalized cells SV-HUC-1 and human BC cell lines 5637, J82, and T24 were used as the research objects, and real-time quantitative PCR was used to determine miR-489-3p and PTEN mRNA expression. According to the relative expression of miR-489-3p, BC patients were divided into 70 cases with low expression

group (≤ 0.36) and 40 cases in high expression group (> 0.36). changes in characteristics. The dual-luciferase experiment verified the targeting relationship between miR-489-3p and PTEN. T24 cells with the lowest expression of miR-489-3p were selected for transfection experiments. T24 cells were randomly divided into control group, miR-NC (negative control) group, miR-489-3p mimics (mimetic) group, and miR-489-3p mimics + pcDNA group and miR-489-3p mimics + pc-PTEN group. MTT and colony formation assay, Transwell assay, and flow cytometry were used to detect cell proliferation, invasion and apoptosis, respectively; Western-blot was used to detect the protein expressions of PTEN, PI3K and Akt. **Results** The significantly down-regulated miR-489-3p in BC tissues was screened by volcano plot. The expression of miR-489-3p in BC cancer tissues was lower than that in adjacent tissues, and the expression of PTEN mRNA was higher than that in adjacent tissues ($t = 186.168, 510.107, P < 0.001$); the expression of miR-489-3p in BC cell lines was lower than that in SV-The expression of PTEN mRNA in HUC-1 cells was higher than that in SV-HUC-1 cells ($F = 883.826, 807.220, \text{both } P < 0.001$). The proportion of patients with low miR-489-3p expression in TNM stage T₃₋₄, lymph node metastasis, and poorly differentiated tumors was higher than that in the high expression group. Dual-luciferase experiments revealed that miR-489-3p targets negatively regulate PTEN expression. The apoptosis rate and PI3K and Akt protein expression levels in the miR-489-3p mimics group were higher than those in the miR-NC group. The miR-489-3p mimics + pc-PTEN group had lower apoptotic rate and PI3K and Akt protein expression levels than the miR-489-3p mimics group, and the OD values (24 h, 48 h, 72 h), the number of clones and the number of cell invasion were higher than those in the miR-489-3p mimics group ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-489-3p may target down-regulate PTEN expression and activate PI3K/Akt signaling pathway, thereby inhibiting BC cell proliferation, invasion, and promoting apoptosis.

【Key words】 Bladder cancer; Micro RNA-489-3p; Phosphate and tension homology deleted on chromosome ten; Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B; Proliferation; Apoptosis; Invasion

膀胱癌 (bladder cancer, BC) 是我国常见的泌尿系统恶性肿瘤, 男性发病率是女性的 3~4 倍, 大部分患者只能通过药物治疗来缓解病情^[1-2]。因此, 明确 BC 的发展机制、寻找有效的分子靶点和诊断标志物是 BC 临床治疗的关键。微小 RNA (miR)-489-3p 已被证实参与调控 BC 等肿瘤细胞的增殖、侵袭、凋亡^[3-4]。在冠心病内皮细胞中, 抑制 miR-26a-5p 表达可靶向第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN) 正调控磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路促进其细胞凋亡^[5]。然而, miR-489-3p 是否通过调控 PTEN 影响 BC 的增殖、凋亡、侵袭仍不清楚。因此, 本研究将通过癌症基因组图谱 (TCGA-BLCA) 数据库分析 BC 中差异表达的 miRNA, 并探讨 miR-489-3p 与 BC 临床病理特征的关系及其在 BC 细胞中的功能和潜在的分子机制, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 组织和细胞来源 收集 2018 年 6 月—2021 年 7 月河北北方学院附属第一医院泌尿外科 110 例 BC 患者手术切取的癌组织及其癌旁组织, 于 -80°C 冰箱冷冻保存, 并收集 BC 患者的临床病理资料。本研究获得医院伦理委员会批准 (K2021095), 患者及家属均知情同意并签署知情同意书, 且术前均未进行放疗或化疗。人膀胱上皮永生化细胞 SV-HUC-1 及人膀胱癌细

胞系 5637、J82、T24 购自南京科佰生物科技有限公司。

1.2 试剂与仪器 (1) 试剂、试剂: RPMI1640 培养基、胎牛血清, 购自美国 HyClone 公司; 胰蛋白酶、Trizol、Lipofectamine 2000 转染试剂、噻唑蓝 (MTT) 试剂、Transwell 小室, 均购自美国 Invitrogen 公司; PTEN、PI3K、Akt 抗体及相应二抗, 购自美国 CST 公司; 逆转录试剂盒, 购自上海赛默飞公司; SYBR premix Ex Taq PCR 试剂盒, 购自北京智杰方远科技有限公司; Annexin-V/PI 细胞凋亡检测试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒, 购自上海翌圣生物科技有限公司; miR-489-3p 模拟物 (miR-489-3p mimics)、miR-489-3p 抑制物 (anti-miR-489-3p) 和阴性对照 miR-NC、PTEN 过表达重组载体 (pc-PTEN) 和空载体 pcDNA, 购自上海吉玛制药技术有限公司。(2) 仪器、设备: StepOne™ PCR 仪购自美国 Thermo Fisher 公司, Herocell 180 CO₂ 细胞培养箱购自上海润度生物科技有限公司, PowerPac™ 电泳仪、GelDoc Go 凝胶成像系统、iMark 酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司, Dx FLEX 流式细胞仪购自贝克曼库尔特国际贸易 (上海) 有限公司。

1.3 细胞培养及分组 2021 年 1—7 月进行细胞实验。将人膀胱上皮永生化细胞 SV-HUC-1 及人膀胱癌细胞系 5637、J82、T24 置于含有 10% 胎牛血清及青、链霉素混合液的 RPMI1640 培养基, 在 37℃、CO₂ 含量为 5% 的细胞培养箱中培养。采用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 miR-NC、miR-489-3p mimics、miR-489-3p

mimics + pcDNA、miR-489-3p mimics + pc-PTEN 分别转染至生长状态较好的 T24 细胞中,并记为:miR-NC 组、miR-489-3p mimics 组、miR-489-3p mimics + pcDNA 组和 miR-489-3p mimics + pc-PTEN 组,另取常规培养的 T24 细胞作为对照组。48 h 后收集各组 T24 细胞用于后续实验。

1.4 差异 miRNA 的筛选 下载 TCGA-BLCA miRNA 测序数据,应用 R 软件(3.6.3 版本)中 DESeq2 包进行差异分析,并使用 ggplot2 包绘制火山图,蓝色为低表达,红色为高表达,筛选参数:LogFC > 1 且 $P < 0.05$ 。

1.5 观测指标与方法

1.5.1 miR-489-3p 和 PTEN mRNA 水平检测:采用 Trizol 法提取 RNA,使用逆转录试剂盒将其逆转录成 cDNA,然后根据 SYBR premix Ex Taq PCR 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 反应。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 miR-489-3p 和 PTEN mRNA 的相对表达量,以 U6 或 GAPDH 作为内参基因。miR-489-3p 引物序列:5'-GGGGTGACATCACATATAC-3' (正向),5'-CAGT-GCGTGTCTGGACT-3' (反向);U6 引物序列:5'-CCTGCTTCGGCAGCAC-3' (正向),5'-AACGCT-TCACGAATTTGCGT-3' (反向);PTEN 引物序列:5'-AAGACCATAACCCACCACAGC-3' (正向),5'-AC-CAGTTCGTCCTTTCCAG-3' (反向);GAPDH 引物序列:5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTT-3' (正向),5'-AGGGCCATCCACAGTCTTC-3' (反向)。

1.5.2 T24 细胞增殖检测:将转染后的各组 T24 细胞制备成细胞悬液,接种至 96 孔细胞板上,培养至 24、48、72 h 时,分别加入 MTT 试剂(浓度为 5 g/L)20 μ l,4 h 后利用酶标仪检测 450 nm 处的光密度值(OD)。每组处理后的 T24 细胞(每孔 1×10^3)置于 10 cm 培养皿中,培养 2 周,最后用 1% 结晶紫染色,计数细胞集落数(克隆数目)。

1.5.3 T24 细胞侵袭检测:Transwell 法检测细胞侵袭。将解冻后的基质胶与不含胎牛血清的 RPMI1640 培养基充分混合,然后平铺在 Transwell 小室的上室,待其凝固后加入细胞悬液 200 μ l,下室中加入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 600 μ l,2 h 后擦去未侵袭的细胞,采用多聚甲醛和结晶紫进行固定和染色,20 min 后在显微镜下随机选取 5 个视野进行拍照并计数。染色的细胞即为发生侵袭的细胞。

1.5.4 T24 细胞凋亡检测:按照 Annexin-V/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明对转染后的各组 T24 细胞进行处理,并使用流式细胞仪检测其细胞凋亡率。

1.5.5 T24 细胞中 PTEN、PI3K、Akt 蛋白表达检测:采用 Western-blot 实验检测 T24 细胞中蛋白表达。提取转染后各组 T24 细胞的总蛋白,将定量后的蛋白样品进行电泳、转膜、封闭、洗膜,然后加入 PTEN、PI3K、Akt 抗体,4 $^{\circ}$ C 培养过夜,洗涤后加入相应二抗,培养 1 h,使用 ECL 化学发光系统检测各组 T24 细胞的蛋白表达水平。

1.5.6 T24 细胞的相对荧光素酶活性:将 miR-489-3p mimics 与 miR-NC 分别与构建好的 WT-PTEN 3' UTR 或 MUT-PTEN 3' UTR 载体质粒利用 Lipofectamine 2000 转染试剂转染至 T24 细胞中,共分成 4 组:miR-NC + WT-PTEN 3' UTR 组、miR-489-3p mimics + WT-PTEN 3' UTR 组、miR-NC + MUT-PTEN 3' UTR 组和 miR-489-3p mimics + MUT-PTEN 3' UTR 组。培养 48 h 后,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定各组 T24 细胞的相对荧光素酶活性。为进一步验证 miR-489-3p 与 PTEN 的作用关系,利用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 miR-NC、miR-489-3p mimics、anti-miR-NC (抑制物阴性对照)、anti-miR-489-3p (抑制物)分别转染至 T24 细胞中,并记为 miR-NC 组、miR-489-3p mimics 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-489-3p 组,48 h 后收集各组细胞按照 1.5.5 的方法检测 PTEN 蛋白的表达水平。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 差异 miRNA 的筛选 通过火山图分析 TCGA 数据库中 BC 组织中差异 miRNA,筛选到 miR-489-3p 在 BC 组织中显著下调,见图 1。

2.2 BC 组织和细胞系中 miR-489-3p 和 PTEN mRNA 表达水平比较 与癌旁组织比较,BC 癌组织中 miR-489-3p 相对表达量下降,PTEN mRNA 相对表达量上升($P < 0.01$);与 SV-HUC-1 细胞比较,5637、J82、T24 细胞中 miR-489-3p 相对表达量降低,PTEN mRNA 相对表达量升高($P < 0.05$),见表 1。其中,T24 细胞中 miR-489-3p 相对表达量最低,PTEN mRNA 相对表达量最高,故选择 T24 细胞进行转染实验。

2.3 miR-489-3p 表达在 BC 患者不同临床病理特征中比较 根据 miR-489-3p 的相对表达量均值为低表达组(≤ 0.36)70 例和高表达组(> 0.36)40 例,miR-489-3p 低表达组患者 TNM 分期 T₃₋₄、有淋巴结转

表 1 BC 组织及细胞系中 miR-489-3p 和 PTEN mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of mRNA expression levels of miR-489-3p and PTEN in BC tissues and cell lines

组织与细胞	n	miR-489-3p	t(F)/P 值	PTEN mRNA	t(F)/P 值
癌旁组织	110	1.00 ± 0.02	t/P = 186.168/ <0.001	0.99 ± 0.01	t/P = 510.107/ <0.001
癌组织	110	0.36 ± 0.03		3.47 ± 0.05	
细胞系			F/P = 883.826/ <0.001		F/P = 807.220/ <0.001
SV-HUC-1	6	1.01 ± 0.03		1.00 ± 0.01	
5637	6	0.71 ± 0.02 ^a		2.83 ± 0.08 ^a	
J82	6	0.54 ± 0.03 ^a		3.25 ± 0.11 ^a	
T24	6	0.32 ± 0.01 ^a		3.51 ± 0.14 ^a	

注:与 SV-HUC-1 细胞比较,^aP < 0.05

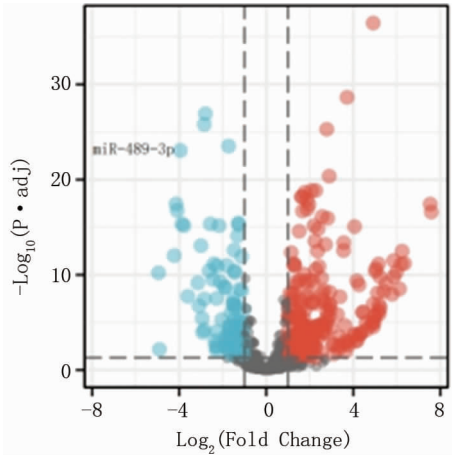


图 1 火山图分析 BC 组织中的差异 miRNA

Fig. 1 Volcano plot analysis of differential miRNAs in BC tissues

移、肿瘤低分化比例高于高表达组 ($P < 0.05$), 而 2 组患者性别、年龄及远处转移比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 不同临床病理特征 BC 患者中 miR-489-3p 表达比较 [例(%)]

Tab. 2 Comparison of miR-489-3p expression in BC patients with different clinicopathological features

项目	低表达组 (n = 70)	高表达组 (n = 40)	χ^2 值	P 值
性别				
男	45 (64.3)	27 (67.5)	0.116	0.733
女	25 (35.7)	13 (32.5)		
年龄				
≤60 岁	44 (62.9)	21 (52.5)	1.130	0.288
>60 岁	26 (37.1)	19 (47.5)		
TNM 分期				
T ₁₋₂	36 (51.4)	31 (77.5)	7.267	0.007
T ₃₋₄	34 (48.6)	9 (22.5)		
淋巴结转移				
N ₀	42 (60.0)	34 (85.0)	7.450	0.006
N ₁₋₃	28 (40.0)	6 (15.0)		
远处转移				
M ₀	56 (80.0)	28 (70.0)	1.410	0.235
M ₁	14 (20.0)	12 (30.0)		
分化程度				
中高分化	33 (47.1)	28 (70.0)	5.384	0.020
低分化	37 (52.9)	12 (30.0)		

2.4 miR-489-3p 和 PTEN 的靶向关系 生物信息学网站预测结果显示, miR-489-3p 和 PTEN 3' UTR 有互补的结合位点, 见图 2。miR-489-3p mimics + WT-PTEN 3' UTR 组相对荧光素酶活性低于 miR-NC + WT-PTEN 3' UTR 组 ($P < 0.05$); 而与 miR-NC + MUT-PTEN 3' UTR 组比较, miR-489-3p mimics + MUT-PTEN 3' UTR 组相对荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。另外, miR-489-3p mimics 组 PTEN 蛋白表达水平低于 miR-NC 组, anti-miR-489-3p 组 PTEN 蛋白表达水平高于 anti-miR-NC 组 ($P < 0.05$), 见图 3、表 4。

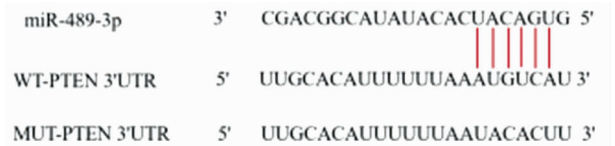
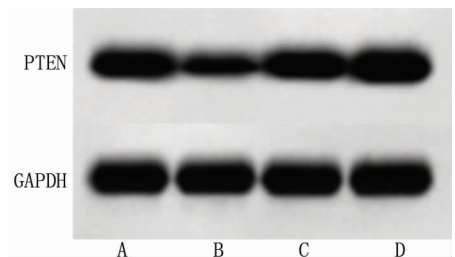


图 2 miR-489-3p 和 PTEN 的结合位点
Fig. 2 The binding site of miR-489-3p and PTEN



注: A. miR-NC 组; B. miR-489-3p mimics 组; C. anti-miR-NC 组; D. anti-miR-489-3p 组

图 3 各组 T24 细胞中 PTEN 蛋白表达比较

Fig. 3 PTEN protein expression in T24 cells in each group

2.5 各组 T24 细胞的增殖、侵袭、凋亡及 PI3K、Akt 蛋白表达比较 与对照组、miR-NC 组比较, miR-489-3p mimics 组 PTEN 蛋白表达水平降低, OD 值(24 h、48 h、

表 3 各组相对荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of relative luciferase activity in each group

组别	n	相对荧光素酶活性
miR-NC + WT-PTEN 3' UTR 组	6	0.99 ± 0.01
miR-489-3p mimics + WT-PTEN 3' UTR 组	6	0.34 ± 0.03 ^a
miR-NC + MUT-PTEN 3' UTR 组	6	1.00 ± 0.02
miR-489-3p mimics + MUT-PTEN 3' UTR 组	6	1.01 ± 0.01
F/P 值		1 743.467/ <0.001

注:与 miR-NC + WT-PTEN 3' UTR 组比较, ^aP < 0.05

表 4 各组 PTEN 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 PTEN protein expression comparison in each group

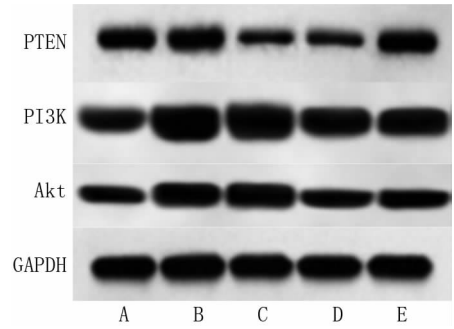
组别	n	PTEN 蛋白
miR-NC 组	6	0.71 ± 0.03
miR-489-3p mimics 组	6	0.28 ± 0.01 ^a
anti-miR-NC 组	6	0.70 ± 0.02
anti-miR-489-3p 组	6	1.17 ± 0.04 ^b
F/P 值		1 057.333/ <0.001

注:与 miR-NC 组比较, ^aP < 0.05; 与 anti-miR-NC 组比较, ^bP < 0.05

72 h) 下降, 克隆数目和细胞侵袭数减少, 凋亡率和 PI3K、Akt 蛋白表达水平增高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 miR-489-3p mimics 组、miR-489-3p mimics + pcDNA 组比较, miR-489-3p mimics + pc-PTEN 组 PTEN 蛋白表达水平升高, OD 值(24 h、48 h、72 h) 增加, 克隆数目和细胞侵袭数增多, 凋亡率和 PI3K、Akt 蛋白表达水平下降, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 4、图 5、表 5、表 6。

3 讨论

外科手术是治疗 BC 的主要方法, 但由于其术后复发率高, 患者的生存率仍然较低^[6]。因此, 探究新



注: A. 对照组; B. miR-NC 组; C. miR-489-3p mimics 组; D. miR-489-3p mimics + pcDNA 组; E. miR-489-3p mimics + pc-PTEN 组

图 5 各组 T24 细胞中蛋白表达免疫印迹图

Fig. 5 Immunoblot of protein expression in T24 cells in each group

的靶向药物是 BC 临床治疗的重中之重。

国内外研究表明, miRNA 与肿瘤细胞的生长、凋亡等联系密切, 可作为肿瘤早期诊断或预后标志物^[7-8], 也可通过与靶基因结合发挥抑癌或抗癌作用^[9-11]。本研究首先通过火山图分析 TCGA 数据库 BC 组织中差异 miRNA, 进而筛选到显著下调的 miR-489-3p。以往研究表明, miR-489-3p 通过调控不同靶点抑制胰腺癌、胶质瘤、骨肉瘤细胞进展^[12-14], 但是 miR-489-3p 在 BC 中的研究极少。本研究发现, miR-489-3p 在 BC 组织和细胞系中的表达降低, 与 Li 等^[15]的研究结果一致。另外, 本研究还发现, miR-489-3p 低表达与 BC 患者的临床分级明显相关, 说明 miR-489-3p 可能作为抑癌因子在 BC 中起作用。由于 T24 细胞中 miR-489-3p 相对表达量最低, 因此选择 T24 细胞进行转染实验。

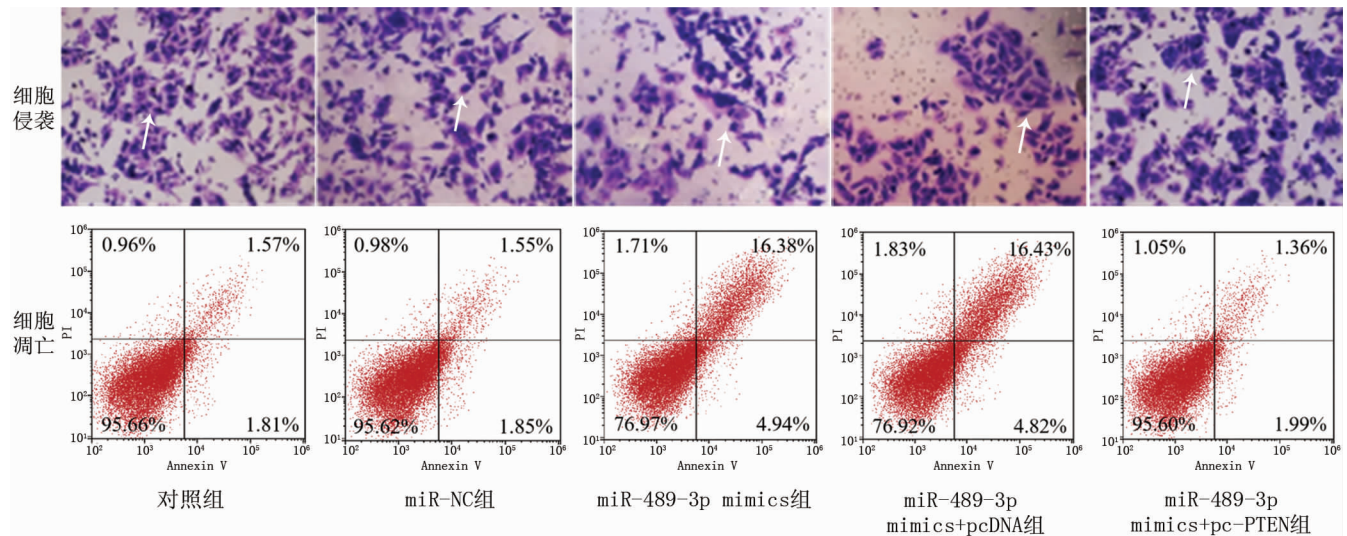


图 4 各组 T24 细胞侵袭(结晶紫染色, ×200)、凋亡情况比较

Fig. 4 Invasion (crystal violet staining, ×200) and apoptosis of T24 cells in each group

表 5 各组 T24 细胞 PTEN 蛋白表达及各时点 OD 值、克隆数目比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.5 PTEN protein expression in T24 cells in each group, OD value and number of clones at each time point comparison

组别	n	PTEN/GAPDH	OD 值(490 nm)			克隆数目(个)
			24 h	48 h	72 h	
对照组	6	1.00 ± 0.02	1.05 ± 0.02	1.72 ± 0.06	2.16 ± 0.09	346.28 ± 38.21
miR-NC 组	6	0.99 ± 0.01	1.03 ± 0.02	1.70 ± 0.05	2.15 ± 0.08	343.95 ± 36.49
miR-489-3p mimics 组	6	0.28 ± 0.01 ^{ab}	0.62 ± 0.01 ^{ab}	1.18 ± 0.03 ^{ab}	1.49 ± 0.05 ^{ab}	162.34 ± 12.51 ^{ab}
miR-489-3p mimics + pcDNA 组	6	0.29 ± 0.02	0.63 ± 0.02	1.20 ± 0.05	1.50 ± 0.06	163.16 ± 13.21
miR-489-3p mimics + pc-PTEN 组	6	0.85 ± 0.04 ^{cd}	1.02 ± 0.03 ^{cd}	1.73 ± 0.06 ^{cd}	2.17 ± 0.04 ^{cd}	345.78 ± 29.46 ^{cd}
F/P 值		1556.190/ <0.001	683.864/ <0.001	190.947/ <0.001	179.365/ <0.001	75.197/ <0.001

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05;与 miR-NC 组比较,^b*P* < 0.05;与 miR-489-3p mimics 组比较,^c*P* < 0.05;与 miR-489-3p mimics + pcDNA 组比较,^d*P* < 0.05

表 6 各组 T24 细胞侵袭数、凋亡率及 PI3K、Akt 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.6 Invasion number, apoptosis rate and PI3K and Akt protein expression of T24 cells in each group

组别	n	细胞侵袭数(个)	凋亡率(%)	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH
对照组	6	113.42 ± 5.12	3.38 ± 1.06	0.92 ± 0.04	1.00 ± 0.03
miR-NC 组	6	112.15 ± 5.09	3.40 ± 1.07	0.91 ± 0.03	1.01 ± 0.04
miR-489-3p mimics 组	6	42.14 ± 3.23 ^{ab}	21.32 ± 1.09 ^{ab}	1.63 ± 0.07 ^{ab}	1.38 ± 0.05 ^{ab}
miR-489-3p mimics + pcDNA 组	6	43.56 ± 3.34	21.25 ± 1.07	1.62 ± 0.05	1.36 ± 0.03
miR-489-3p mimics + pc-PTEN 组	6	113.21 ± 5.31 ^{cd}	3.35 ± 1.03 ^{cd}	0.89 ± 0.03 ^{cd}	0.99 ± 0.02 ^{cd}
F/P 值		433.838/ <0.001	509.749/ <0.001	430.631/ <0.001	196.048/ <0.001

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05;与 miR-NC 组比较,^b*P* < 0.05;与 miR-489-3p mimics 组比较,^c*P* < 0.05;与 miR-489-3p mimics + pcDNA 组比较,^d*P* < 0.05

进一步研究发现,miR-489-3p 过表达抑制了 T24 细胞增殖和侵袭并诱导了细胞凋亡,这与 miR-489-3p 在其他癌细胞中的作用一致,进一步揭示了 miR-489-3p 在 BC 中的抗癌功能。然而,miR-489-3p 调控 BC 细胞生物学行为的分子机制还不清楚,需进行更一步的研究。

本研究通过生物信息学网站预测得知 PTEN 是 miR-489-3p 的潜在靶基因,并证实了 miR-489-3p 靶向负调控 PTEN 表达。PTEN 是 10q23.3 染色体上的一种抑癌基因,具有双重磷酸酶特性^[16]。研究显示,PTEN 参与癌细胞的生长、转移等过程^[17-18]。本研究发现,PTEN 在 BC 组织和细胞中上调,与 Man 等^[19]的实验结果一致,提示 PTEN 在 BC 中发挥促癌作用。此外,本研究还表明同时过表达 miR-489-3p 和 PTEN 后促进了 T24 细胞增殖和侵袭,阻碍了细胞凋亡,揭示 miR-489-3p 靶向 PTEN 调控 BC 细胞的增殖、侵袭和凋亡。

最近的研究显示,PTEN 能够通过调控 PI3K/Akt 通路蛋白表达影响肿瘤细胞的发生、发展^[20]。在 BC 细胞中,PTEN 的激活可抑制 PI3K、Akt 蛋白表达^[21]。大量文献表明,PI3K/Akt 通路参与调控 BC 在内的各种类型癌细胞的增殖、凋亡和侵袭,且 PTEN 与该通路呈负向调控的关系^[21-24]。本研究也显示,miR-489-3p

过表达可提高 PI3K、Akt 蛋白表达,而过表达 PTEN 能够逆转上述蛋白表达水平及 miR-489-3p 过表达对 T24 细胞增殖、侵袭的阻滞和对凋亡的增强作用。说明 miR-489-3p 通过靶向抑制 PTEN 表达,激活 PI3K/Akt 信号通路,调控 BC 细胞的增殖、凋亡和侵袭。

综上所述,miR-489-3p 抑制 BC 细胞的增殖和侵袭、促进凋亡,其机制可能与靶向下调 PTEN 蛋白表达,激活 PI3K/Akt 信号通路有关。miR-489-3p 可能作为分子标志物,为 BC 提供新的靶向治疗思路。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

王哲:研究构思,论文撰写;张敬:课题设计;吴仁通:数据获取;张潮:统计学分析;陈怀安:修改论文;苗文隆:论文终审

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34. DOI:10.3322/caac.21551.
- [2] DeSantis CE, Miller KD, Dale W, et al. Cancer statistics for adults aged 85 years and older, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(6): 452-467. DOI:10.3322/caac.21577.
- [3] Yang X, Zhu X, Yan Z, et al. miR-489-3p/SIX1 axis regulates melanoma proliferation and glycolytic potential [J]. Mol Ther Oncolytics, 2019, 16(1): 30-40. DOI:10.1016/j.omto.2019.11.001.
- [4] Sun D, Li T, Xin H, et al. miR-489-3p inhibits proliferation and migration of bladder cancer cells through downregulation of histone deacetylase 2 [J]. Oncol Lett, 2020, 20(4): 8-20. DOI:10.3892/

- ol. 2020. 11869.
- [5] Jing R, Zhong QQ, Long TY, et al. Downregulated miRNA-26a-5p induces the apoptosis of endothelial cells in coronary heart disease by inhibiting PI3K/AKT pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11):4940-4947. DOI:10.26355/eurrev_201906_18084.
- [6] 王东,付晓亮,舒涛,等. miR-302 通过下调靶基因 RAB22A 抑制膀胱癌进展[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(14):2646-2651, 2608. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.009.
- Wang D, Fu XL, Shu T, et al. MiR-302 inhibits the progression of bladder cancer by down-regulating target gene RAB22A [J]. *Modern Biomedical Progress*, 2019, 12(14):2646-2651, 2608. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.009.
- [7] Rasoolnezhad M, Safaralizadeh R, Hosseinpourfeizi MA, et al. MiRNA-138-5p: A strong tumor suppressor targeting PD-L1 inhibits proliferation and motility of breast cancer cells and induces apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 896(1):173933-173944. DOI:10.1016/j.ejphar.2021.173933.
- [8] 欧阳波,武明瑞,李家兵. MicroRNA-7 对膀胱癌诊断和复发的作用机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(8):54-57. DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2019.08.011.
- Ouyang B, Wu MR, Li JB. The role of microRNA-7 in the diagnosis and recurrence of bladder cancer [J]. *Chin J Modern Med*, 2019, 29(8):54-57. DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2019.08.011.
- [9] 罗华荣,王天如,陈晨,等. ROS/SRC/FAK 信号通路在膀胱癌疾病进展中的作用机制研究[J]. *疑难病杂志*, 2021, 20(9):918-923. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2021.09.012.
- Luo HR, Wang TR, Chen C, et al. Role of ROS/SRC/FAK signaling pathway in the progression of bladder cancer [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2021, 20(9):918-923. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2021.09.012.
- [10] 徐长阳,刘敏,刘鹏,等. 角蛋白 7 在膀胱癌中的表达及与临床预后的关系[J]. *疑难病杂志*, 2020, 19(12):1229-1232, 1237. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.12.011.
- Xu CY, Liu M, Liu P, et al. Expression of keratin 7 in bladder cancer and its relationship with clinical prognosis [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2020, 19(12):1229-1232, 1237. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.12.011.
- [11] 徐林飞,张海涛,刘晟,等. 长链非编码 RNA MINCR 靶向微小 RNA-876-5p 调控膀胱癌细胞生物学行为的分子机制研究[J]. *中国医药*, 2021, 16(4):613-617. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2021.04.031.
- Xu LF, Zhang HT, Liu S, et al. Molecular mechanism of long non-coding RNA MINCR regulating bladder cancer cell biological behavior by targeting microRNA-876-5p [J]. *China Medicine*, 2021, 16(4):613-617. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2021.04.031.
- [12] Zhang D, He Z, Shen Y, et al. MiR-489-3p reduced pancreatic cancer proliferation and metastasis by targeting PKM2 and LDHA involving glycolysis [J]. *Front Oncol*, 2021, 11(1):651535-651548. DOI:10.3389/fonc.2021.651535.
- [13] Cheng Z, Wang G, Zhu W, et al. LEF1-AS1 accelerates tumorigenesis in glioma by sponging miR-489-3p to enhance HIGD1A [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8):690-701. DOI:10.1038/s41419-020-02823-0.
- [14] Liu Q, Yang G, Qian Y. Loss of microRNA-489-3p promotes osteosarcoma metastasis by activating PAX3-MET pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(4):1312-1321. DOI:10.1002/mc.22593.
- [15] Li J, Qu W, Jiang Y, et al. miR-489 suppresses proliferation and invasion of human bladder cancer cells [J]. *Oncol Res*, 2016, 24(6):391-398. DOI:10.3727/096504016X14666990347518.
- [16] 祁闪闪,杨李,卢文婕,等. 调控 PTEN 表达和活性的研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(12):2289-2293. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2020.12.023.
- Qi SS, Yang L, Lu WJ, et al. Research progress in regulation of PTEN expression and activity [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2020, 36(12):2289-2293. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2020.12.023.
- [17] Zhao WT, Lin XL, Liu Y, et al. miR-26a promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis by inhibiting PTEN and inhibits cell growth by repressing EZH2 [J]. *Lab Invest*, 2019, 99(10):1484-1500. DOI:10.1038/s41374-019-0270-5.
- [18] Yu D, Wang XY, Jin ZL. Linc00702 inhibits cell growth and metastasis through regulating PTEN in colorectal cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7):3624-3632. DOI:10.26355/eurrev_202004_20824.
- [19] Man X, Piao C, Lin X, et al. USP13 functions as a tumor suppressor by blocking the NF- κ B-mediated PTEN downregulation in human bladder cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):259-285. DOI:10.1186/s13046-019-1262-4.
- [20] Gu X, Zhou L, Chen L, et al. Human schlafen 5 inhibits proliferation and promotes apoptosis in lung adenocarcinoma via the PTEN/PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021(1):6628682-6628693. DOI:10.1155/2021/6628682.
- [21] 孙超群,杨树立,陈桂平,等. 氧化苦参碱通过 PTEN/PI3K/Akt/mTOR 通路对人膀胱癌 T24 细胞增殖、凋亡的影响研究[J]. *新中医*, 2019, 51(9):9-12. DOI:10.13457/j.cnki.jncm.2019.09.003.
- Sun CQ, Yang SL, Chen GP, et al. Effect of oxymatrine on the proliferation and apoptosis of human bladder cancer T24 cells by PTEN/PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *New J Tradit Chin Med*, 2019, 51(9):9-12. DOI:10.13457/j.cnki.jncm.2019.09.003.
- [22] 陈旭,郑玉,彭泉,等. 汉黄芩素经 PTEN/PI3K/AKT 信号通路对乳腺癌细胞增殖的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(3):363-368. DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.006.
- Chen X, Zheng Y, Peng Q, et al. Effect of baicalein on the proliferation of breast cancer cells by PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Anhui Med Univ*, 2021, 56(3):363-368. DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.006.
- [23] Zhou JS, Yang ZS, Cheng SY, et al. miRNA-425-5p enhances lung cancer growth via the PTEN/PI3K/AKT signaling axis [J]. *BMC Pulm Med*, 2020, 20(1):223-230. DOI:10.1186/s12890-020-01261-0.
- [24] Yu X, Li S, Pang M, et al. TSPAN7 exerts anti-tumor effects in bladder cancer through the PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. *Front Oncol*, 2021, 10(1):613869-613881. DOI:10.3389/fonc.2020.613869.