

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.12.008
文章编号: 1005-8982 (2023) 12-0049-09

实验研究·论著

MicroRNA-122介导Mex3a表达抑制膀胱癌 细胞恶性生物学行为的机制研究*

付慧锋, 李卓, 刘健, 蒋颖

(湖南省人民医院 泌尿外科, 湖南 长沙 410005)

摘要: **目的** 探究miR-122介导Mex3a表达抑制膀胱癌细胞增殖、迁移,促进细胞凋亡的发生机制。**方法** 通过实时荧光定量聚合酶链反应检测miR-122和Mex3a在正常人膀胱上皮细胞SVHUC-1和人膀胱癌细胞系T24和HT1376中的表达。构建过表达miR-122和低表达Mex3a的T24细胞,并通过CCK-8法、细胞划痕实验和流式细胞术评估miR-122和Mex3a对膀胱癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响。双荧光素酶实验验证miR-122和Mex3a的靶向关系。在过表达miR-122的细胞中进一步过表达Mex3a,检测细胞增殖、迁移、凋亡和PI3K/Akt信号通路的变化。**结果** SVHUC-1细胞miR-122相对表达量较T24、HT1376细胞高($P < 0.05$),Mex3a mRNA相对表达量较T24、HT1376细胞低($P < 0.05$)。miR-122 mimic组miR-122相对表达量较mimic NC组高($P < 0.05$)。mimic NC组与miR-122 mimic组在0、24、48、72 h的T24细胞吸光度值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的细胞吸光度值有差异($P < 0.05$);②mimic NC组与miR-122 mimic组的细胞吸光度值有差异($P < 0.05$),miR-122 mimic组细胞增殖能力较mimic NC组被抑制;③mimic NC组与miR-122 mimic组细胞吸光度值变化趋势有差异($P < 0.05$)。mimic NC组划痕愈合率较miR-122 mimic组高($P < 0.05$)。mimic NC组细胞凋亡率较miR-122 mimic组低($P < 0.05$)。mimic NC组WT-Mex3a相对表达量较miR-122 mimic组高($P < 0.05$)。mimic NC组Mex3a mRNA相对表达量较miR-122 mimic组高($P < 0.05$)。si-NC组Mex3a mRNA相对表达量较si-Mex3a组高($P < 0.05$)。si-NC组p-PI3K、p-Akt蛋白较si-Mex3a组高($P < 0.05$)。si-NC组与si-Mex3a组在0、24、48和72 h的T24细胞吸光度值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点间的细胞吸光度值有差异($P < 0.05$);②si-NC组与si-Mex3a组细胞吸光度值有差异($P < 0.05$);③si-NC组与si-Mex3a组细胞吸光度值变化趋势有差异($P < 0.05$)。si-NC组划痕愈合率较si-Mex3a组高($P < 0.05$)。si-NC组细胞凋亡率较si-Mex3a组低($P < 0.05$)。miR-122 mimic+ oe-Mex3a组Mex3a mRNA相对表达量较miR-122 mimic+ oe-NC组高($P < 0.05$)。miR-122 mimic+ oe-NC组p-PI3K、p-AKT蛋白相对表达量较miR-122 mimic+ oe-Mex3a组低($P < 0.05$)。miR-122 mimic+ oe-NC组与miR-122 mimic+ oe-Mex3a组在0、24、48、72 h的T24细胞吸光度值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的细胞吸光度值有差异($P < 0.05$);②miR-122 mimic+ oe-NC组与miR-122 mimic+ oe-Mex3a组细胞吸光度值有差异($P < 0.05$),miR-122 mimic+ oe-Mex3a组较miR-122 mimic+ oe-NC组细胞增殖能力增强;③miR-122 mimic+ oe-NC组与miR-122 mimic+ oe-Mex3a组细胞吸光度值变化趋势有差异($P < 0.05$)。miR-122 mimic+ oe-NC组划痕愈合率较miR-122 mimic+ oe-Mex3a组低($P < 0.05$)。miR-122 mimic+ oe-NC组细胞凋亡率较miR-122 mimic+ oe-Mex3a组高($P < 0.05$)。**结论** miR-122可能通过抑制Mex3a的表达,抑制PI3K/Akt信号通路,从而抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移,并促进凋亡。

关键词: 膀胱癌; miR-122; Mex3a; PI3K/Akt信号通路

中图分类号: R737.14

文献标识码: A

Mechanism underlying the role of microRNA-122 in inhibiting the malignant biological behavior of bladder cancer cells via

收稿日期: 2023-01-06

* 基金项目: 湖南省自然科学基金(No:2021JJ70092);湖南省卫生健康委2020年度科研课题(No:20200044);2020年度湖南省教育厅科学研究项目(No:20C1174)

[通信作者] 李卓, E-mail: lizhuo0105@163.com

regulating the expression of Mex3a*

Fu Hui-feng, Li Zhuo, Liu Jian, Jiang Ying

(Department of Urology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism whereby microRNA-122 (miR-122) inhibited the proliferation and migration yet promoted the apoptosis of bladder cancer cells via mediating the expression of Mex3a. **Methods** The qRT-PCR was applied to detect the expressions of miR-122 and Mex3a in normal human bladder epithelial cell line SVHUC-1 and human bladder cancer cell lines T24 and HT1376. T24 cell lines overexpressing miR-122 and downregulating Mex3a were constructed, and the effects of miR-122 and Mex3a expressions on the proliferation, migration and apoptosis of bladder cancer cells were assessed by CCK-8 assay, scratch assay and flow cytometry, respectively. The regulatory relationship between miR-122 and Mex3a was detected by luciferase reporter assay. Besides, Mex3a was further overexpressed in cells overexpressing miR-122 to verify the roles of miR-122 and Mex3a in cell proliferation, migration, and apoptosis as well as the regulation of the PI3K/Akt signaling pathway. **Results** The relative expression of miR-122 in SVHUC-1 cells was higher than that in T24 and HT1376 cells ($P < 0.05$), while the relative expression of Mex3a mRNA in SVHUC-1 cells was lower than that in T24 and HT1376 cells ($P < 0.05$). The relative expression of miR-122 in the miR-122 mimic group was higher than that in the mimic NC group ($P < 0.05$). The optical density of T24 cells in the mimic NC group and the miR-122 mimic group at 0, 24 h, 48 h and 72 h were compared via repeated measures ANOVA, which revealed that they were different among the time points ($P < 0.05$) and between the groups ($P < 0.05$). Specifically, the proliferation of cells in the miR-122 mimic group was inhibited relative to that in the mimic NC group. Besides, the change trend of the optical density of T24 cells was different between the mimic NC group and the miR-122 mimic group ($P < 0.05$). As suggested by the scratch assay, the wound healing rate in the mimic NC group was higher than that in the miR-122 mimic group ($P < 0.05$). The apoptosis rate in the mimic NC group was lower than that in the miR-122 mimic group ($P < 0.05$). The relative expression of WT-Mex3a in the mimic NC group was higher than that in the miR-122 mimic group ($P < 0.05$), and the relative expression of Mex3a mRNA in the mimic NC group was also higher than that in the miR-122 mimic group ($P < 0.05$). The relative expression of Mex3a mRNA in the si-NC group was higher than that in the si-Mex3a group ($P < 0.05$). The protein expressions of p-PI3K and p-Akt in the si-NC group were higher than those in the si-Mex3a group ($P < 0.05$). The optical density of T24 cells in the si-NC group and the si-Mex3a group at 0, 24 h, 48 h and 72 h were compared via repeated measures ANOVA, which revealed that they were different among the time points ($P < 0.05$) and between the groups ($P < 0.05$), and that the change trend of the optical density of T24 cells was different between the two groups ($P < 0.05$). The wound healing rate in the si-NC group was higher than that in the si-Mex3a group ($P < 0.05$), while the apoptosis rate in the si-NC group was lower than that in the si-Mex3a group ($P < 0.05$). The relative expression of Mex3a mRNA in the miR-122 mimic+ oe-Mex3a group was higher than that in the miR-122 mimic+ oe-NC group ($P < 0.05$). The protein expressions of p-PI3K and p-Akt in the miR-122 mimic+ oe-NC group were lower than those in the miR-122 mimic+ oe-Mex3a group ($P < 0.05$). The optical density of T24 cells in the miR-122 mimic+ oe-NC group and the miR-122 mimic+ oe-Mex3a group at 0, 24 h, 48 h and 72 h were compared via repeated measures ANOVA, which revealed that they were different among the time points ($P < 0.05$) and between the groups ($P < 0.05$). Specifically, the proliferation capability of cells in the miR-122 mimic+ oe-Mex3a group was higher than that in the miR-122 mimic+ oe-NC group ($P < 0.05$). In addition, the change trend of the optical density of T24 cells was different between the miR-122 mimic+ oe-NC group and the miR-122 mimic+ oe-Mex3a group ($P < 0.05$). The wound healing rate in the miR-122 mimic+ oe-NC group was lower than that in the miR-122 mimic+ oe-Mex3a group ($P < 0.05$), while the apoptosis rate in the miR-122 mimic+ oe-NC group was higher than that in the miR-122 mimic+ oe-Mex3a group ($P < 0.05$). **Conclusions** MiR-122 inhibits the PI3K/Akt signaling pathway by suppressing the expression of Mex3a, thus restraining the proliferation and metastasis of bladder cancer cells while promoting their apoptosis.

Keywords: bladder cancer; miR-122; Mex3a; PI3K/Akt signaling pathway

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,也是全球最普遍的恶性肿瘤之一^[1]。膀胱癌的发病率和病死率排我国在泌尿系统肿瘤的第 1 位^[2]。膀胱癌按肿瘤浸润深度可分为非肌层浸润性肿瘤(70%~80%)和肌层浸润性肿瘤(20%~30%)^[3]。肌层浸润性膀胱癌患者肿瘤细胞迁移更频繁,预后较差^[4]。手术切除和化疗是治疗膀胱癌的主要方法。然而当癌症发展到晚期,表现为远处转移、耐药严重,预后较差^[5]。由于缺乏诊断和特异性治疗方法,大多数患者一经发现就被诊断为膀胱癌晚期^[6]。面对这些紧迫的挑战,探索新的肿瘤标志物,确定膀胱癌的有效治疗靶点,有助于开发更有效的抗癌疗法。

MicroRNA(miRNA)是一类由 19~24 个核苷酸组成的非编码核糖核酸,可结合靶基因的 3'-非翻译区,转录后抑制特定 mRNA 翻译并降低其稳定性,达到调控基因表达的目的^[7]。越来越多的证据表明,miRNAs 在膀胱癌中异常表达,其在肿瘤的发生、发展和迁移中起着重要作用^[8]。miR-129-5p 可以通过抑制 TGF- β_2 /Smad3 通路,抑制上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)来降低膀胱癌进展^[9]。有研究表明,miR-122 可以通过靶向宫颈癌中的 RAD21 凝聚素复合物组分(RAD21 cohesin complex component, RAD21)来抑制癌细胞的恶性生长,并促进其凋亡^[10]。研究发现,外泌体 miR-122-5p 通过下调 G 蛋白偶联受体激酶相互作用蛋白 1(G-protein-coupled receptor kinase interacting protein-1, GIT1)阻碍胃癌细胞体外增殖迁移和体内肿瘤生长^[11]。并且 miR-122 可作为肿瘤抑制因子并下调血管内皮生长因子 C 表达,抑制膀胱癌生长和血管生成^[12]。

笔者通过 StarBase 生物信息学网站分析发现 miR-122 与 Mex3a 存在结合位点。Mex3 家族有 4 个同源蛋白(Mex3a、Mex3b、Mex3c 和 Mex3d)^[13]。有研究报告 Mex3a 在肺癌^[14]、胃癌^[15]和肝癌^[16]等癌症中起关键作用。研究发现,靶向 Mex3a 的 siRNA 可以显著抑制膀胱癌细胞增殖并促进其凋亡^[17]。PI3K/Akt 信号通路在细胞增殖、分化和适应中至关重要^[18]。研究发现, Mex3a 可以通过激活 PI3K/Akt 通路促进肺腺癌的迁移、侵袭^[14]。在膀胱癌中 PI3K/Akt 通路的激活促进癌症的进展^[10]。然而 MiR-122 是否通过抑制 Mex3a 的表达,从而抑制 PI3K/Akt 信号通路,起

到抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移及促进其凋亡的作用尚未报道。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂及仪器

人胚胎肾细胞 HEK-293T(货号:YS002C)、正常人膀胱上皮细胞系 SVHUC-1(货号:YS250C)、膀胱癌细胞系 T24(货号:YS2406C)、HT1376(货号:YS904C)均购自上海雅吉生物科技有限公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(货号:164210)、MEM 培养基(货号:PM150411B)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,miR-122 mimic、si-Mex3a、oe-Mex3a 及其对照试剂均购自上海吉玛制药技术有限公司,Eagle 培养基(货号:D5796)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,Lipofectamine 2000TM 转染试剂盒(货号:11668030)、TRIzol 试剂(货号:15596026)、细胞凋亡检测试剂盒(货号:331200)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,PrimeScript™RT 试剂盒(货号:RR047A)、SYBR®Premix Ex Tap™II 试剂盒(货号:DRR820A)购自日本 TaKaRa Bio 株式会社,RIPA 裂解液(货号:P0013B)、CCK-8 试剂盒(货号:C0037)均购自上海碧云天生物技术有限公司,p-PI3K(货号:17366S)、PI3K(货号:4257S)均购自美国 CST 公司,兔抗 p-Akt(货号:ab38449)、Akt(货号:ab8805)、GAPDH(货号:ab181602)、山羊抗兔二抗(货号:ab205718)、ECL Western Blotting 底物试剂盒(货号:ab65623)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(货号:ab287865)均购自美国 Abcam 公司。

二氧化碳培养箱购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,半干转印槽转膜仪购自美国 BIO-RAD 公司,酶标仪购自美国 Biotek 公司,IX51 倒置显微镜购自日本 Olympus 株式会社,流式细胞分析仪购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,高速冷冻型微量台式离心机购自大龙兴创实验仪器(北京)有限公司。

1.2 细胞培养

人胚胎肾细胞 HEK-293T、正常人膀胱上皮细胞系 SVHUC-1 在含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素溶液的 MEM 培养基中培养;膀胱癌细胞系 T24 和 HT1376 在含有 10% FBS, 100 u/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的

Dulbecco改良的Eagle培养基中培养。细胞置于37℃、5%二氧化碳(CO₂)的条件下湿润培养。

1.3 细胞转染

细胞转染 mimic NC、miR-122 mimic、si-NC 或 si-Mex3a, 并作为 mimic NC 组(对照模拟基因)、miR-122 mimic 组(miR-122 模拟基因)、si-NC 组(对照抑制)和 si-Mex3a 组(Mex3a 抑制); 将 miR-122 mimic 与 oe-NC(对照过表达)或 oe-Mex3a(Mex3a 过表达)共同转染, 将细胞分为 miR-122 mimic + oe-NC 组和 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组。转染前将细胞接种到6孔板中, 并在37℃、5% CO₂ 条件下孵育。第2天将所需质粒与 Lipofectamine 2000 混合后转染到细胞中, 转染后置于培养基中继续培养48 h, 收集细胞。采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测转染效率。

1.4 qRT-PCR 检测 miR-122、Mex3a mRNA 的表达

采用 TRIzol 试剂从细胞中分离总 RNA。使用 PrimeScript™ RT 试剂盒逆转录成 cDNA。采用实时荧光定量 PCR 仪, 使用 SYBR® Premix Ex Tap™ II 试剂盒, 运用 Applied Biosystems 7500HT 系统进行 qRT-PCR, miRNA 的相对表达以 U6 为内参, mRNA 以 GAPDH 为内参。miR-122 正向引物: 5'-GGAGTGTG ACAATGGTG-3', 反向引物: 5'-GAACATGTCTGCGTA TCTC-3', 长度均为 80 bp; Mex3a 正向引物: 5'-CAGC AGCAACACCACGGAGTG-3', 反向引物: 5'-CGGTGTC TTGATGTAGGTGTTGG-3', 长度均为 232 bp; U6 正向引物: 5'-GAACGCCTCATGATTTGCAGG-3', 反向引物: 5'-AGAAGACTGAAACAGCACAGAGA-3', 长度均为 103 bp; GAPDH 正向引物: 5'-CATCACTGCCACCCA GAAGACTG-3', 反向引物: 5'-ATGCCAGTGAGCTTCC CGTTCAG-3', 长度均为 175 bp。并通过 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-122、Mex3a mRNA 相对表达量。每个反应重复 3 次取均值。

1.5 Western blotting 检测蛋白表达

使用 RIPA 裂解缓冲液在冰上提取蛋白, 使用增强的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒来确定每种裂解物中的总蛋白浓度。将等量的蛋白质上样到 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上, 通过电泳分离并迁移到 PVDF 膜上。将膜在室温下于 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h,

并在 4℃ 下与一抗 p-PI3K(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、p-Akt(1:1 000) 和 Akt(1:500) 孵育过夜, 以 GAPDH(1:10 000) 作为对照。随后将膜用山羊抗兔辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:2 000) 进行探测。使用 ECL Western blotting 底物试剂盒检查蛋白条带, 显影、分析。

1.6 CCK-8 法检测细胞活力

以 2 × 10³ 个/孔的密度接种将转染处理的对数生长期的细胞到 96 孔板中培养, 在 0、24、48 和 72 h 后分别每孔加入 10 μL CCK-8 溶液。在 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 2 h, 使用酶标仪测量 450 nm 波长处的吸光度值。

1.7 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

将转染后的细胞接种到 6 孔板上。当细胞融合度达到 90% 时, 用 200 μL 枪头在板中笔直地划痕, 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS) 清洗培养基和漂浮细胞, 用新鲜培养基代替。细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。继续培养 24 h 后观察空白处的间隙变化, 使用倒置显微镜观察细胞间的空白处并进行拍照, 计算划痕迁移率。

1.8 流式细胞术分析细胞凋亡

使用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒通过流式细胞分析仪分析细胞凋亡情况。收集 5 × 10⁵ 个细胞并用冷 PBS 洗涤 2 次, 重悬于 400 μL Annexin V-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC) 结合缓冲液中。后用 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 对细胞进行染色, 室温避光孵育 15 min。流式细胞分析仪检测 FITC 和 PI 荧光值, 分析细胞凋亡情况。

1.9 双荧光素酶报告实验

根据生物信息学软件 Starbase 预测结果, 设计 miR-122 和 Mex3a 结合位点的野生序列和突变序列。将野生序列和突变序列片段克隆并与 pmirGLO 载体结合, 分别命名为 WT-Mex3a 和 MUT-Mex3a。将 WT-Mex3a 或 MUT-Mex3a 和 mimic NC 和 miR-122 mimic 一起转染至 HEK-293T 细胞中。转染 48 h 后使用双荧光素酶报告基因试剂盒进行荧光素酶活性检测。

1.10 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验、方差分

析或重复测量设计的方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SVHUC-1、T24 和 HT1376 细胞 miR-122、Mex3a 相对表达量比较

SVHUC-1、T24 和 HT1376 细胞 miR-122、Mex3a mRNA 相对表达量比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),SVHUC-1 细胞 miR-122 相对表达量较 T24、HT1376 细胞高, Mex3a mRNA 相对表达量较 T24、HT1376 细胞低 ($P < 0.05$)。由于 miR-122、Mex3a mRNA 在 T24 细胞中差异表达最明显,因此笔者选择 T24 细胞系进行后续实验。见表 1。

表 1 各细胞 miR-122、Mex3a mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

细胞	miR-122 mRNA	Mex3a mRNA
SVHUC-1	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.09
T24	0.35 ± 0.03	2.38 ± 0.17
HT1376	0.43 ± 0.05	2.21 ± 0.14
<i>F</i> 值	56.792	124.546
<i>P</i> 值	0.000	0.000

2.2 过表达 miR-122 抑制膀胱癌细胞的恶性生长

2.2.1 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组 miR-122 相对表达量比较 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组 miR-122 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.11)、(2.62 ± 0.21),经 *t* 检验,差异有统计学意义 ($t = 21.841, P = 0.000$),miR-122 mimic 组较 mimic NC 组高。

2.2.2 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组不同时间点细胞增殖能力比较 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组在 0、24、48、72 h 的 T24 细胞吸光度值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的细胞吸光度值有差异 ($F = 35.652, P = 0.000$);②mimic NC 组与 miR-122 mimic 组的细胞吸光度值有差异 ($F = 154.703, P = 0.000$),miR-122 mimic 组细胞增殖能力较 mimic NC 组被抑制;③mimic NC 组与 miR-122 mimic 组细胞吸光度值变化趋势有差异 ($F = 6.659, P = 0.004$)。见表 2。

2.2.3 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组细胞迁移能力比较 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组划痕愈合率分别为 (75.6 ± 6.4)%、(34.8 ± 3.1)%,经 *t* 检验,差

表 2 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组不同时间点细胞吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
mimic NC 组	0.41 ± 0.04	0.63 ± 0.06	0.98 ± 0.1	1.52 ± 0.14
miR-122 mimic 组	0.39 ± 0.03	0.51 ± 0.05	0.76 ± 0.06	1.11 ± 0.09

异有统计学意义 ($t = 9.894, P = 0.000$),mimic NC 组较 miR-122 mimic 组高。见图 1。

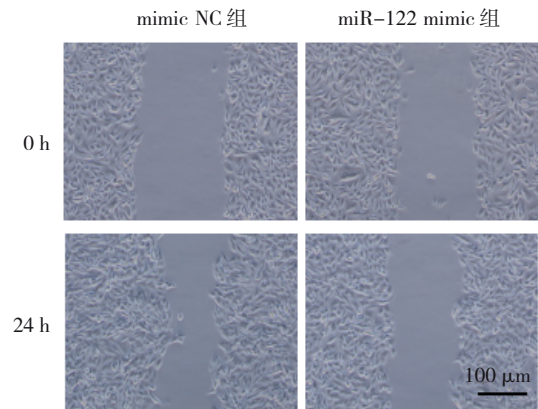


图 1 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组细胞划痕实验图

2.2.4 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组细胞凋亡率比较 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组细胞凋亡率分别为 (9.55 ± 1.35)%、(20.93 ± 1.94)%,经 *t* 检验,差异有统计学意义 ($t = 8.340, P = 0.001$),mimic NC 组较 miR-122 mimic 组低。见图 2。

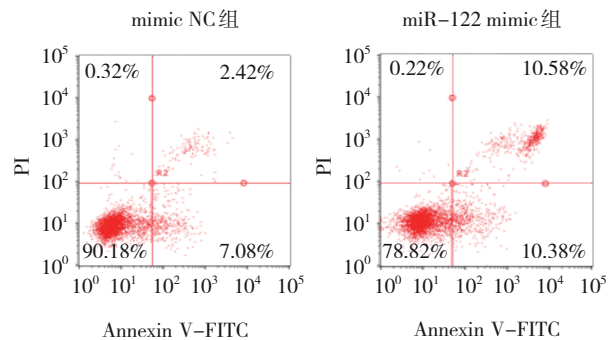


图 2 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组流式细胞图

2.3 miR-122 靶向调控 Mex3a 的表达

2.3.1 Mex3a 突变位点的设计 通过在线预测软件 Starbase (<https://starbase.sysu.edu.cn/>, 获取时间: 2022 年 12 月 28 日) 确定了 miR-122 和 Mex3a 结合的靶位点,并且设计了 WT-Mex3a 和 MUT-Mex3a。见图 3。

2.3.2 双荧光素酶报告实验结果 两组 WT-Mex3a

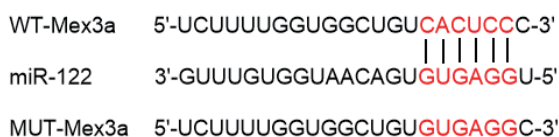


图3 生物信息学预测 miR-122 和 Mex3a 的靶向调控位点

相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$), mimic NC 组较 miR-122 mimic 组高。两组 MUT-Mex3a 相对表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 两组 WT-Mex3a、MUT-Mex3a 相对表达量比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	WT-Mex3a	MUT-Mex3a
mimic NC 组	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.07
miR-122 mimic 组	0.43 ± 0.05	0.96 ± 0.08
<i>t</i> 值	12.676	0.609
<i>P</i> 值	0.000	0.806

2.3.3 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组 Mex3a 相对表达量比较 mimic NC 组与 miR-122 mimic 组 Mex3a 相对表达量分别为(1.00 ± 0.08)、(0.45 ± 0.05),经 *t* 检验,差异有统计学意义($t = 10.102, P = 0.004$),mimic NC 组较 miR-122 mimic 组高。

2.4 敲低 Mex3a 抑制 PI3K/Akt 信号通路从而抑制膀胱癌细胞的恶性生长

2.4.1 si-NC 组与 si-Mex3a 组 Mex3a mRNA 相对表达量比较 si-NC 组与 si-Mex3a 组 Mex3a mRNA 相对表达量分别为(1.00 ± 0.08)、(0.38 ± 0.04),经 *t* 检验,差异有统计学意义($t = 12.014, P = 0.003$),si-NC 组较 si-Mex3a 组高。

2.4.2 si-NC 组与 si-Mex3a 组 PI3K、Akt 蛋白的磷酸化水平比较 si-NC 组与 si-Mex3a 组 p-PI3K 蛋白相对表达量分别为(0.46 ± 0.04)、(0.25 ± 0.05),经 *t* 检验,差异有统计学意义($t = 4.706, P = 0.001$),si-NC 组较 si-Mex3a 组高;si-NC 组与 si-Mex3a 组 p-Akt 蛋白相对表达量分别为(0.55 ± 0.04)、(0.30 ± 0.05),经 *t* 检验,差异有统计学意义($t = 5.602, P = 0.000$),si-NC 组较 si-Mex3a 组高。见图 4。

2.4.3 si-NC 组与 si-Mex3a 组不同时间点细胞增殖能力比较 si-NC 组与 si-Mex3a 组在 0、24、48、72 h 的 T24 细胞吸光度值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的细胞吸光度值有差异

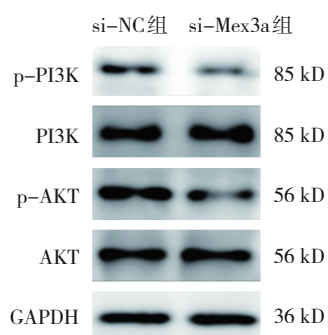


图 4 各组细胞 PI3K、Akt 蛋白条带图

($F = 25.452, P = 0.000$);②si-NC 组与 si-Mex3a 组细胞吸光度值有差异($F = 124.007, P = 0.000$);③si-NC 组与 si-Mex3a 组细胞吸光度值变化趋势有差异($F = 7.589, P = 0.002$)。见表 4。

表 4 si-NC 组与 si-Mex3a 组不同时间点吸光度值比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
si-NC 组	0.38 ± 0.03	0.61 ± 0.06	0.93 ± 0.08	1.46 ± 0.15
si-Mex3a 组	0.40 ± 0.04	0.53 ± 0.05	0.72 ± 0.07	1.05 ± 0.11

2.4.4 si-NC 组与 si-Mex3a 组细胞迁移能力比较 si-NC 组与 si-Mex3a 组划痕愈合率分别为(73.2 ± 7.1)%、(36.4 ± 3.8)%,经 *t* 检验,差异有统计学意义($t = 7.932, P = 0.001$),si-NC 组较 si-Mex3a 组高。见图 5。

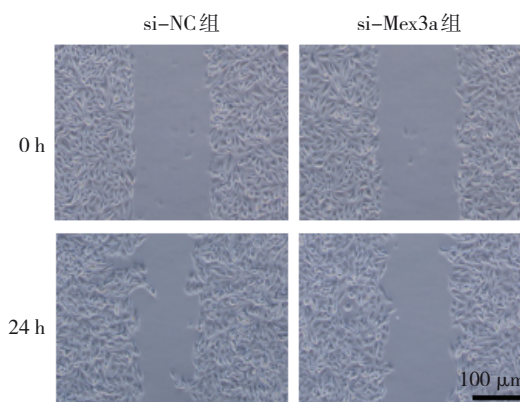


图 5 si-NC 组与 si-Mex3a 组流式细胞图

2.4.5 si-NC 组与 si-Mex3a 组细胞凋亡率的比较 si-NC 组与 si-Mex3a 组细胞凋亡率分别为(10.22 ± 1.13)%、(22.16 ± 2.07)%,经 *t* 检验,差异有统计学意义($t = 8.769, P = 0.001$),si-NC 组较 si-Mex3a 组低。见图 6。

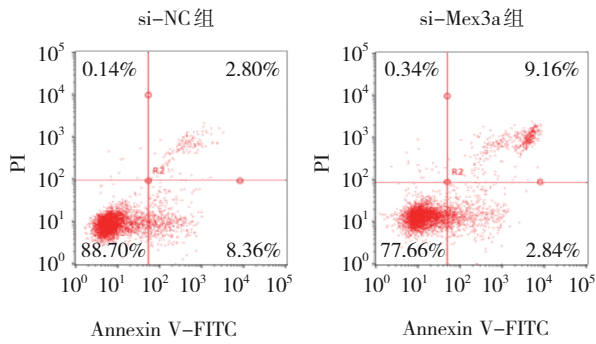


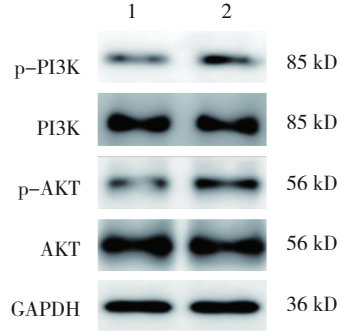
图 6 si-NC 组与 si-Mex3a 组流式细胞图

2.5 过表达 Mex3a 抑制 miR-122 mimic 对膀胱癌细胞恶性生长的抑制作用

2.5.1 miR-122 mimic+ oe-NC 组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组中 Mex3a mRNA 相对表达量比较 miR-122 mimic + oe-NC 组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组中 Mex3a mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.11)、(1.86 ± 0.16), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t=7.672, P=0.002$), miR-122 mimic + oe-Mex3a 组较 miR-122 mimic + oe-NC 组高。

2.5.2 miR-122 mimic + oe-NC 组与 miR-122 mimic+oe-Mex3a 组 PI3K 和 Akt 蛋白的磷酸化水平比较 miR-122 mimic + oe-NC 组与 miR-122 mimic+ oe-Mex3a 组 p-PI3K 蛋白相对表达量分别为 (0.22 ± 0.03)、(0.39 ± 0.04), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t=3.673, P=0.008$), miR-122 mimic + oe-NC 组较 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组低; miR-122 mimic + oe-NC 组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组 p-AKT 蛋白相对表达量分别为 (0.28 ± 0.03)、(0.48 ± 0.05), 经

t 检验, 差异有统计学意义 ($t=4.322, P=0.002$), miR-122 mimic + oe-NC 组较 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组低。见图 7。



1: miR-122 mimic+ oe-NC 组; 2: miR-122 mimic+oe-Mex3a 组。

图 7 miR-122 mimic + oe-NC 组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组蛋白条带图

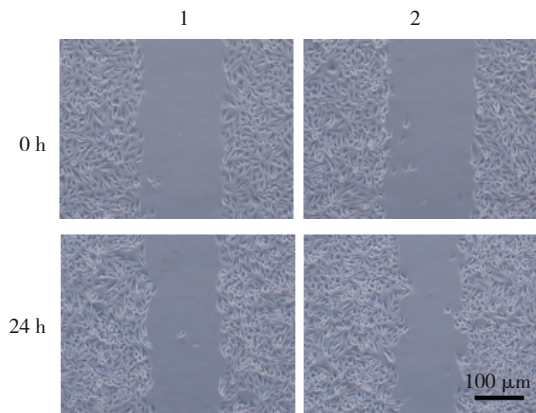
2.5.3 miR-122 mimic+oe-NC 组与 miR-122 mimic+ oe-Mex3a 组不同时间点细胞增殖能力比较 miR-122 mimic + oe-NC 组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组在 0、24、48 和 72 h 的 T24 细胞吸光度值比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞吸光度值有差异 ($F=19.672, P=0.000$); ②miR-122 mimic + oe-NC 组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组细胞吸光度值有差异 ($F=117.905, P=0.000$), miR-122 mimic + oe-Mex3a 组较 miR-122 mimic + oe-NC 组细胞增殖能力增强; ③miR-122 mimic + oe-NC 组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组细胞吸光度值变化趋势有差异 ($F=4.124, P=0.024$)。见表 5。

表 5 miR-122 mimic+oe-NC 组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组不同时间点细胞吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
miR-122 mimic + oe-NC 组	0.37 ± 0.04	0.49 ± 0.04	0.71 ± 0.07	1.05 ± 0.11
miR-122 mimic + oe-Mex3a 组	0.39 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.89 ± 0.09	1.38 ± 0.15

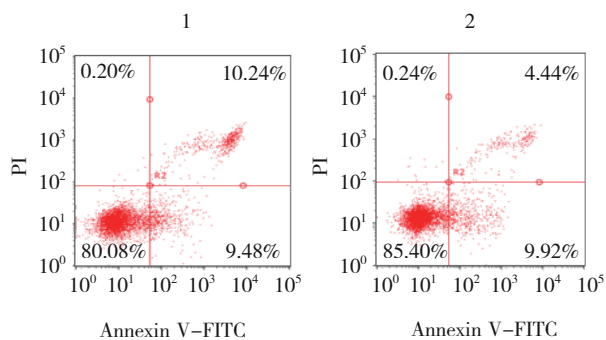
2.5.4 miR-122 mimic + oe-NC 组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组细胞迁移能力比较 miR-122 mimic + oe-NC 组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组划痕愈合率分别为 (33.1 ± 2.8)%、(56.3 ± 5.9)%, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t=6.186, P=0.004$), miR-122 mimic + oe-NC 组较 miR-122 mimic + oe-Mex3a 组低。见图 8。

2.5.5 miR-122 mimic+ oe-NC 组与 miR-122 mimic+ oe-Mex3a 组细胞凋亡率的比较 miR-122 mimic+ oe-NC 组与 miR-122 mimic+ oe-Mex3a 组细胞凋亡率分别为 (19.76 ± 2.24)%、(14.35 ± 1.63)%, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t=3.382, P=0.0277$), miR-122 mimic+ oe-NC 组较 miR-122 mimic+ oe-Mex3a 组高。见图 9。



1: miR-122 mimic + oe-NC组; 2: miR-122 mimic + oe-Mex3a组。

图8 miR-122 mimic + oe-NC组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a组细胞划痕实验图



1: miR-122 mimic + oe-NC组; 2: miR-122 mimic + oe-Mex3a组。

图9 miR-122 mimic + oe-NC组与 miR-122 mimic + oe-Mex3a组流式细胞图

3 讨论

膀胱癌作为世界上最常见的异质性和恶性肿瘤之一，每年新增约40万例^[1]。65岁以上的老年人通常更容易患膀胱癌，男性膀胱癌发病率约为女性的4倍^[19]。大多数膀胱癌患者有膀胱移行细胞癌，其次是膀胱鳞状细胞癌和膀胱腺癌^[20]。事实上，内在因素和外在因素都与这种多因素人类癌症类型的发病机制有关^[21]。具体而言，职业和环境暴露于致癌物（如吸烟）是膀胱癌最常见的致病因素，占30%~50%^[22]。然而对膀胱癌在分子水平上的致病性了解不足限制了其临床治疗的进展。

越来越多的证据表明，miRNAs在各种疾病的发病、发展和恢复中起着关键作用，包括癌症、糖尿病、中枢神经系统疾病和脑血管疾病^[23]，并参与基因的转录调节^[24]。有研究表明，miRNAs在细胞生长和增殖等生物过程中发挥作用，许多miRNAs有可能成为治疗癌症和代谢性疾病的治疗

靶点^[25-26]。有研究证实，miR-3065-3p通过靶向细胞因子受体样因子1促进结肠癌的干性和迁移性^[27]。此外有研究表明，miR-143-3p和miR-495-3p共同靶向细胞周期蛋白依赖激酶1，从而抑制宫颈癌的发生、发展^[28]。本研究结果发现，膀胱癌中miR-122低表达，过表达miR-122可以明显抑制膀胱癌细胞的增殖和迁移，促进细胞凋亡。

为识别miR-122的下游靶标，笔者通过StarBase生物信息学网站分析发现miR-122与Mex3a存在结合位点。Mex3a属于人类Mex3基因家族，Mex3基因包含2个异质核糖核蛋白K同源（KH）结构域（命名为KH1和KH2），这2个氨基酸的保守区域通过KH结构域结合RNA^[13]。目前，有研究表明，Mex3a在mRNA的转录后过程和基因表达中起关键作用^[13]。Mex3a基因表达可能与恶性肿瘤的发展和进展密切相关。有研究发现敲除Mex3a可抑制人胃癌细胞的生长和迁移，但具体的生物学机制不清楚^[15]。有研究发现，Mex3a在肠道分化、极性和干性特征中起着至关重要的作用，这可能通过抑制CDX2引起癌变^[30]。研究发现，Mex3a可以通过抑制Akt信号通路和EMT参与宫颈癌的抗肿瘤活性^[31]。通过双荧光素酶实验证实miR-122靶向结合Mex3a，过表达miR-122后Mex3a的表达水平明显降低，证明miR-122可以负向调控Mex3a的表达。敲低Mex3a通过抑制PI3K/Akt信号通路而抑制膀胱癌细胞的恶性生长。此外，本研究还发现，进一步过表达Mex3a，可以部分逆转miR-122 mimic对膀胱癌细胞恶性生长的抑制作用。

综上所述，miR-122通过抑制Mex3a的表达，抑制PI3K/Akt信号通路，从而抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移，促进其凋亡。这些结果表明miR-122参与膀胱癌的进展，也可以作为膀胱癌的预后生物标志物，为膀胱癌提供了一个新的潜在治疗靶点。

参 考 文 献：

- [1] ANTONI S, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends[J]. *Eur Urol*, 2017, 71(1): 96-108.
- [2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] van RHIJN B W G, BURGER M, LOTAN Y, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy[J]. *Eur Urol*, 2009, 56(3):

- 430-442.
- [4] DY G W, GORE J L, FOROUZANFAR M H, et al. Global burden of urologic cancers, 1990 - 2013[J]. *Eur Urol*, 2017, 71(3): 437-446.
- [5] DREICER R. Chemotherapy for advanced urothelial cancer: end of the beginning?[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(5): 567-569.
- [6] ROBERTSON A G, KIM J, AL-AHMADIE H, et al. Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer[J]. *Cell*, 2018, 174(4): 1033.
- [7] ZHOU B C, LI Z Y, YANG H W, et al. Extracellular miRNAs: origin, function and biomarkers in hepatic diseases[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(10): 2865-2890.
- [8] YANG X, YUAN W B, TAO J, et al. Identification of circular RNA signature in bladder cancer[J]. *J Cancer*, 2017, 8(17): 3456-3463.
- [9] SU Y J, FENG W L, SHI J Y, et al. Correction to: circRIP2 accelerates bladder cancer progression via miR-1305/Tgf- β 2/smad3 pathway[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 1.
- [10] YANG Y L, LIU Y, LIU W, et al. miR-122 inhibits the cervical cancer development by targeting the oncogene RAD21[J]. *Biochem Genet*, 2022, 60(1): 303-314.
- [11] JIAO Y G, ZHANG L, LI J, et al. Exosomal miR-122-5p inhibits tumorigenicity of gastric cancer by downregulating *GIT1*[J]. *Int J Biol Markers*, 2021, 36(1): 36-46.
- [12] WANG Y, XING Q F, LIU X Q, et al. MiR-122 targets VEGFC in bladder cancer to inhibit tumor growth and angiogenesis[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(7): 3056-3066.
- [13] BUCHET-POYAU K, COURCHET J, LE HIR H, et al. Identification and characterization of human Mex-3 proteins, a novel family of evolutionarily conserved RNA-binding proteins differentially localized to processing bodies[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(4): 1289-1300.
- [14] LIANG J H, LI H X, HAN J Y, et al. Mex3a interacts with LAMA2 to promote lung adenocarcinoma metastasis via PI3K/AKT pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8): 614.
- [15] JIANG H, ZHANG X M, LUO J H, et al. Knockdown of hMex-3A by small RNA interference suppresses cell proliferation and migration in human gastric cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(3): 575-580.
- [16] YANG D Q, JIAO Y, LI Y Q, et al. Clinical characteristics and prognostic value of MEX3A mRNA in liver cancer[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8252.
- [17] HUANG Y, FANG C, SHI J W, et al. Identification of hMex-3A and its effect on human bladder cancer cell proliferation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37): 61215-61225.
- [18] TANG J, QING M F, LI M, et al. Dexamethasone inhibits BMP7-induced osteogenic differentiation in rat dental follicle cells via the PI3K/AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway[J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(17): 2663-2672.
- [19] SANLI O, DOBRUCH J, KNOWLES M A, et al. Bladder cancer[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17022.
- [20] KIM Y S, MARUVADA P, MILNER J A. Metabolomics in biomarker discovery: future uses for cancer prevention[J]. *Future Oncol*, 2008, 4(1): 93-102.
- [21] INAMURA K. Bladder cancer: new insights into its molecular pathology[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(4): 100.
- [22] ZHAO M, HE X L, TENG X D. Understanding the molecular pathogenesis and prognostics of bladder cancer: an overview[J]. *Chin J Cancer Res*, 2016, 28(1): 92-98.
- [23] EYILETEN C, WICIK Z, de ROSA S, et al. MicroRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in ischemic stroke-a comprehensive review and bioinformatic analysis[J]. *Cells*, 2018, 7(12): 249.
- [24] BOYD S D. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask[J]. *Lab Invest*, 2008, 88(6): 569-578.
- [25] LIU B J, DU R K, ZHOU L, et al. miR-200c/141 regulates breast cancer stem cell heterogeneity via targeting HIPK1/ β -catenin axis[J]. *Theranostics*, 2018, 8(21): 5801-5813.
- [26] LOVAT F, FASSAN M, SACCHI D, et al. Knockout of both miR-15/16 loci induces acute myeloid leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(51): 13069-13074.
- [27] LI Y F, XUN J, WANG B T, et al. miR-3065-3p promotes stemness and metastasis by targeting CRLF1 in colorectal cancer[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 429.
- [28] TANG J, PAN H, WANG W, et al. MiR-495-3p and miR-143-3p co-target CDK1 to inhibit the development of cervical cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(11): 2323-2334.
- [29] XUE B, CHUANG CH, PROSSER H M, et al. miR-200 deficiency promotes lung cancer metastasis by activating notch signaling in cancer-associated fibroblasts[J]. *Genes Dev*, 2021, 35(15/16): 1109-1122.
- [30] PEREIRA B, SOUSA S, BARROS R, et al. CDX2 regulation by the RNA-binding protein MEX3A: impact on intestinal differentiation and stemness[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): 3986-3999.
- [31] XU Y C, PAN S Y, CHEN H, et al. MEX3A suppresses proliferation and EMT via inhibiting Akt signaling pathway in cervical cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(4): 1446-1462.

(李科 编辑)

本文引用格式: 付慧锋, 李卓, 刘健, 等. MicroRNA-122 介导 Mex3a 表达抑制膀胱癌细胞恶性生物学行为的机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(12): 49-57.

Cite this article as: FU H F, LI Z, LIU J, et al. Mechanism underlying the role of microRNA-122 in inhibiting the malignant biological behavior of bladder cancer cells via regulating the expression of Mex3a[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(12): 49-57.