DOI:10.16016/j.1000-5404.201912083

miR-124 在膀胱癌中的表达及其临床意义

王 阳[1],胡跃世[1],李 征[1],朱 清[1],段启新[1],刘 磊[1],马慧利[2],李明林[1] 473009 河南 南阳,河南省南阳市中心医院:泌尿外科[1],肿瘤内科[2]

[摘要] **目的** 探讨 miR-124 在膀胱癌中的表达及其临床意义。**方法** RT-qPCR 检测人正常膀胱尿路上皮细胞 SV-HUC-1 及膀胱癌细胞(5637、J82、T24、TCCSUP、UM-UC-3)中 miR-124 的表达;收集本院 2013 年 1 月至 2016 年 1 月 114 例膀胱癌患者的术后组织标本,采用原位杂交法检测 miR-124 在膀胱癌及癌旁组织中的表达,并分析其与临床病理特征及预后的相关性。细胞试验分 3 组:分别将 miRNA-NC(miRNA-NC 组)、miRNA-124 mimics(miRNA-124 mimics 组)和 miR-124 inhibitor(miR-124 inhibitor 组)转染至膀胱癌 T24 细胞,CCK-8 试验检测 miR-124 表达对细胞增殖能力的影响,Western blot 检测其增殖相关蛋白(PCNA、Ki-67)和 p-AKT 表达。**结果** qPCR 结果显示,miR-124 在膀胱癌细胞 5637、J82、T24、TCCSUP、UM-UC-3 中的表达均低于正常膀胱尿路上皮细胞 SV-HUC-1($P<0.05$);原位杂交试验结果显示,miR-124 在正常膀胱尿路上皮细胞中呈高表达,在非浸润性和浸润性膀胱癌组织中低表达;miR-124 表达与膀胱癌临床 T 分期、淋巴结转移及肿瘤分化程度密切相关($\chi^2=6.829$,$P=0.009$;$\chi^2=6.844$,$P=0.009$;$\chi^2=5.111$,$P=0.024$);Kaplan-Meier 分析显示,miR-124 低表达组患者的总生存率(OS)和无病生存期(DFS)明显低于高表达组患者($\chi^2=22.7$, $P<0.01$;$\chi^2=26.57$, $P<0.01$)。多因素分析结果表明 miR-124 低表达是影响膀胱癌患者预后的独立危险因素(OS HR=4.63; 95% *CI*:1.39~7.23; $P=0.007$; DFS HR=5.82; 95% *CI*: 1.56~11.42; $P=0.003$)。与 miRNA-NC 组比较,miR-124mimics 组 T24 细胞增殖能力明显下降($P<0.05$),增殖相关蛋白(PCNA、Ki-67)和 p-AKT 表达量明显降低($P<0.05$);而 miR-124 inhibitor 组中 T24 细胞增殖能力增强,PCNA、Ki-67 及 p-AKT 的蛋白表达量升高($P<0.05$)。**结论** miR-124 在膀胱癌细胞及组织中低表达,并促进膀胱癌细胞的增殖能力,低表达 miR-124 的膀胱癌患者预后较差,其机制可能与 AKT 信号通路的激活有关。

[关键词] 膀胱癌; miR-124; 细胞增殖; AKT 信号通路

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.14 [文献标志码] A

Expression of microRNA-124 in bladder cancer and its clinical significance

WANG Yang[1], HU Yueshi[1], LI Zheng[1], ZHU Qing[1], DUAN Qixin[1], LIU Lei[1], MA Huili[2], LI Minglin[1]

[1]Department of Urology, [2]Department of Oncology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan Province, 473009, China

[**Abstract**] Objective To investigate the expression of microRNA-124 (miR-124) in bladder cancer and its clinical significance. Methods The expression of miR-124 in a normal bladder urothelial cell line (SV-HUC-1) and 5 bladder cancer cell lines (5 637, J82, T24, TCCSUP and UM-UC-3) was detected using RT-qPCR. We also detected the expression of miR-124 using *in situ* hybridization in 114 tissue specimens of bladder cancer and adenocarcinoma tissues from patients undergoing surgeries in our hospital between January, 2013 and January, 2016. The correlations of miR-124 expression with the clinicopathological characteristics and prognosis of the patients were analyzed. In the *in vitro* experiment, we tested the effect of transfection with miR-124 mimics and miR-124 inhibitor on the proliferation of bladder cancer T24 cells using CCK-8 assay and on the cellular expression of PCNA, Ki-67 and p-AKT using Western blotting. Results The expression of miR-124 in the 5 bladder cancer cell lines was significantly lower than that in normal bladder urothelial cells.

[通信作者] 李明林,E-mail:liminglinvip@126.com

The results of *in situ* hybridization showed that miR-124 was highly expressed in normal bladder urothelial cells but lowly expressed in non-invasive and invasive bladder cancer tissues. The expression of miR-124 was closely correlated with clinical T stage (*Chi*-square = 6.829, $P = 0.009$), lymph node metastasis (*Chi*-square = 6.844, $P = 0.009$) and tumor differentiation (*Chi*-square = 5.111, $P = 0.024$). Kaplan-Meier analysis showed that compared with those with a high expression of miR-124, the patients with a low expression of miR-124 had significantly shorter overall survival (*Chi*-square = 22.7, $P < 0.01$) and disease-free survival (*Chi*-square = 26.57, $P < 0.01$). Multivariate analysis showed that a low expression of miR-124 was an independent risk factor for a poor prognosis in patients with bladder cancer in terms of both the overall survival (HR = 4.63, 95% *CI*: 1.39 ~ 7.23; $P = 0.007$) and disease-free survival (HR = 5.82, 95% *CI*: 1.56 ~ 11.42; $P = 0.003$). In the cell experiment, transfection with the miR-124 mimics significantly attenuated the proliferation of T24 cells ($P < 0.05$) and lowered the expressions of proliferation-related proteins (PCNA, Ki-67) and p-AKT as compared with the negative control ($P < 0.05$), while transfection with the miR-124 inhibitor resulted in the reverse changes ($P < 0.05$). **Conclusion** The low expression of miR-124 in bladder cancer cells and tissues can promote cancer cell proliferation and is associated with a poor prognosis of the patients possibly in relation with the activation of AKT signaling pathway.

[**Key words**] bladder cancer; microRNA-124; cell proliferation; AKT signaling pathway

Corresponding author: LI Minglin, E-mail: liminglinvip@126.com

MicroRNAs(miRNA)是一类内源性的单链非编码单链小分子RNA,其通常长度为17~24个核苷酸,其能够与靶基因的mRNA互补序列结合从而引起mRNA的降解或抑制翻译过程[1]。研究发现,miRNA在多种肿瘤中发挥至关重要的作用,广泛参与肿瘤的细胞增殖、血管形成、细胞凋亡、侵袭及转移等生物学过程[2]。miR-124在已被证实在多种肿瘤中发挥类似抑瘤基因的功能,但其在膀胱癌中的生物学功能及作用机制仍未见相关报道[3-4]。因此,本研究拟通过用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerasechain reaction, RT-qPCR)和原位杂交技术检测114例膀胱癌细胞及组织中的表达情况,探讨其表达水平与膀胱癌临床病理特征及预后的关系,分析miR-124表达改变对生物学功能的影响并探讨其相关机制,旨在为膀胱癌的治疗、诊断及预后标志物的开发提供参考来源和理论基础。

1 材料与方法

1.1 检测对象

人正常膀胱上皮细胞SV-HUC-1及膀胱癌细胞株5637、J82、T24、TCCSUP、UMUC3均购于中国科学院细胞库。临床标本取自2013年1月至2016年1月我院114例行根治性膀胱切除术,纳入患者术前均未行放化疗及免疫治疗等治疗,均经组织病理学证实为膀胱尿路上皮癌及癌旁组织(癌旁组织选择距癌灶边缘5 cm以上),患者住院资料均完整。其中男性74例,女性40例,年龄35~77(62.5±8.3)岁;TNM分期Ⅰ~Ⅱ期患者69例,Ⅲ~Ⅳ期患者45例;高、中分化患者63例,低分化患者51例。所有的组织样本采集后均立即置于液氮中保存。本研究经我院伦理委员会批准(批件号:2012-0064)。

1.2 主要试剂

RPMI 1640、DMEM、F12K培养液及PBS购自美国GIBCO公司;胎牛血清购于杭四季青公司;TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司;DEPC水购自武汉塞维尔生物技术有限公司;反转录及miRNA荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)购自大连宝生物公司,miR-124原位杂交探针序列、miR-124模拟物(miR-124 mimic)、miR-124抑制剂(miR-124 inhibitor)及其阴性对照(miRNA-NC)均购自广州锐博生物公司;封闭液和预杂交液均购自福州迈新生物公司。脂质体Lipofectamine 2000均购自美国Invitrogen公司。CCK-8细胞增殖试剂盒购自碧云天生物科技有限公司;兔抗人PCNA、Ki-67、AKT、p-AKT和β-actin单克隆抗体以及辣根过氧化物标记的二抗均购自美国CST公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 SV-HUC-1细胞使用含有10%胎牛血清和1%青霉素链霉素的F12K培养基培养;J82细胞使用含有10%胎牛血清和1%青霉素链霉素的DMEM培养;5637、T24、TCCSUP、UMUC-3细胞于含10%胎牛血清和1%青霉素链霉素的RPMI 1640培养基中培养;细胞置于37 ℃、5% CO_2的恒温培养箱中培养。

1.3.2 实时荧光定量PCR 用TRIzol® RNA提取试剂(Invitrogen公司)提取总RNA,采用PTC-100/

PTC-200 型 PCR 仪按 RT 试剂盒说明反转录合成 cDNA 链;采用 Applied Biosystems7500 RT-PCR system 按说明进行 PCR 检测,设 3 个复孔,以看家基因 GAPDH 和 U6 作为内参,miR-124 及 U6 引物序列为:miR-124 上游引物序列为 5′-ATGGCGGATGAAGTAATCGCG-3′,下游引物序列为 5′-GAAACTCACAACTTGATCAGTTC-3′;U6 上游引物序列为 5′-ACAGCGTGCTAGATCATCAGC-3′;下游引物序列为 5′-GGTCATGAGTCAGCCACGAT-3′。反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 15 s、60 ℃ 35 s,循环 40 次;计算各组 CT 值,采用定量 PCR 中的相对定量法及 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算 miRNA 的表达水平。

1.3.3 原位杂交 将切除的新鲜标本尽快在 4% 多聚甲醛中固定 4 h,以免 mRNA 降解,制作石蜡切片并切厚度为 4 μm 的连续切片;将石蜡切片行二甲苯脱蜡,水洗,3%H_2O_2 室温作用 10 min,水洗 2 次;在切片上加入 1 mL 3%柠檬酸和 2 滴胃蛋白酶,混匀 37 ℃ 消化 20 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min,再水洗 1 次;湿盒底部加 20%甘油保湿,每个蜡块 20 μL 预杂交液,置于 38 ℃恒温箱 3 h;每个蜡块 20 μL 杂交液,将原位杂交专用盖玻片盖在切片上,在杂交仪中 42 ℃ 杂交过夜;依次置于 2×柠檬酸盐缓冲盐酸液(Saline sodium citrate buffer, SSC)液 5 min、0.5×SSC 液 15 min、0.2×SSC 液 15 min 洗涤;滴加封闭液,37 ℃ 恒温孵育 30 min;滴加生物素化鼠抗地高辛,37 ℃ 恒温孵育 60 min;PBS 洗 4 次,每次 5 min;加 DAB 显色液,苏木精复染,酒精脱水,二甲苯透明;最后中性树胶封片,显微镜观察。

1.3.4 原位杂交结果分析 根据组织阳性着色程度评分:无着色为 0 分;浅黄色为 1 分;棕黄色为 2 分;棕褐色为 3 分;根据组织中的阳性细胞数计分:0%~10%为 1 分;>10%~50%为 2 分;>50%~75%为 3 分;>75%为 4 分。两种评分方法乘积得到判定阳性结果:两者乘积<8 为低表达,≥8 为高表达。

1.3.5 病例随访 随访调查患者死亡时间及原因以及发生远处转移的时间,观测患者总生存期(overall survival, OS)及无病生存期(disease-free survival, DFS)。随访从第一次明确诊断开始,到发生远处转移时间或死亡时间或末次随访时间;发现患者死亡或转移随访即终结,随访截止时间为 2019 年 1 月 1 日。

1.3.6 CCK-8 增殖试验 严格参照 CCK-8 试剂盒说明书的步骤进行试验,分为 3 组:分别将 miRNA-NC(miRNA-NC 组)、miRNA-124 mimics(miRNA-124 mimics 组)和 miR-124 inhibitor(miR-124 inhibitor 组)转染至膀胱癌 T24 细胞,并转染后的细胞接种于 96 孔板中并置于恒温培养箱培养,待细胞贴壁后,分别于 0、24、48、72 h 时间点加入 10 μL CCK-8,继续置于 37 ℃恒温培养箱培养 2~4 h,使用酶联免疫检测仪于 450 nm 波长处检测各组的细胞光密度值[D(450)],计算增殖率。

1.3.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)试验 经过处理的细胞铺种在 6 孔板中,待细胞生长良好吸去旧培养基,PBS 冲洗细胞 1~2 次。加入含蛋白酶抑制剂(PMSF)的 RIPA 裂解液,细胞刮刀将细胞刮下收集至 EP 管中,冰上裂解细胞 30 min,高速离心并收集上清,即为细胞的总蛋白,并置于-80 ℃冰箱保存;BCA 法对蛋白进行定量,完成后加入上样缓冲液混匀,煮沸 5 min 变性。配置的相应浓度的分离胶和浓缩胶,加样并进行电泳,后进行转膜操作,转膜完成后用 10%脱脂牛奶封闭 1 h,TBST 洗膜 1~2 次,裁剪条带后加入一抗 4 ℃过夜孵育。第二日取出 PVDF 膜并用 TBST 洗涤 3~5 次,每次 5 min;随后加入二抗孵育 1 h,TBST 洗涤 3~5 次,ECL 发光试剂盒进行显影,化学发光仪检测并拍照。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件,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和 LSD-t 检验;计数资料以百分数表示,采用 χ^2 检验。使用 Kaplan-Meier 绘制生存曲线,采用 Log-rank 分析 miR-124 与膀胱癌患者临床预后的关系。

2 结果

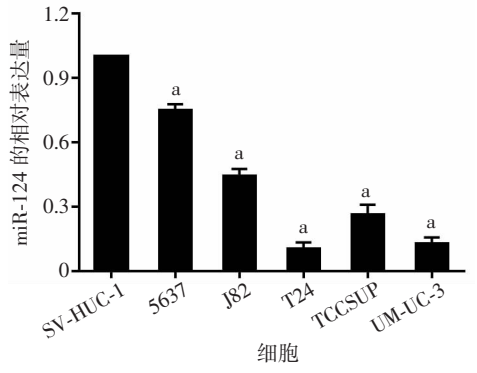
2.1 miR-124 在人正常膀胱尿路上皮及膀胱癌细胞中的表达

qPCR 检测 miR-124 在人正常膀胱尿路上皮细胞及膀胱癌细胞中的表达,结果发现,与人正常膀胱尿路上皮细胞 SV-HUC-1 比较,膀胱癌细胞 5637、J82、T24、TCCSUP、UMUC3 中 miR-124 的表达水平明显降低(t=16.37, P<0.01; t=29.99, P<0.01; t=50.84, P<0.01; t=28.3, P<0.01; t=56.95, P<0.01,图 1)。

2.2 miR-124 在膀胱癌组织中的表达及与临床病理参数的关系

采用原位杂交技术检测 114 例膀胱癌组织及癌旁正常组织中 miR-124 的表达。结果显示,miR-124 蛋白主要定位于细胞质,染色呈棕褐色,在正常膀胱组织中明显高表达,在癌组织中显著低表达(图 2);miR-124 正常膀胱组织呈阳性表达有 81 例,在膀胱癌组织呈阳性表达有 42 例,miR-124 在正常膀胱组织的阳性表达显著高于膀胱癌组织(P<0.001)。相关性分析表明,miR-124 低表达与膀胱癌临床 T 分期、淋巴结转移及肿瘤分化程度密切相关(P<0.05),但与性别、年龄、

远处转移等无明显相关性($P>0.05$),见表 2。



a:$P<0.01$,与 SV-HUC-1 比较

图 1 qPCR 检测 miR-124 在人正常膀胱尿路上皮及膀胱癌细胞中的表达 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.3 miR-124 表达与膀胱癌患者预后的关系

将所收集的膀胱癌样本分成 miR-124 高表达组和 miR-124 低表达组,通过 Kaplan-Meier 法通过绘制生存曲线,分析 miR-124 表达与膀胱癌预后的关系,结果发现,miR-124 高表达的膀胱癌患者中,3 年患者随访中出现 5 例失访;miR-124 低表达膀胱癌患者中,3 年患者随访中出现 4 例失访;miR-124 低表达组患者的总生存期(overall survival, OS)明显短于高表达组患者($\chi^2=22.7$, $P<0.01$);miR-124 低表达组患者的无病生存期(disease-free survival, DFS)也明显短于高表达组患者($\chi^2=26.57$, $P<0.01$)。提示 miR-124 表达越低,膀胱癌患者预后越差。多因素分析结果提示,miR-124 在膀胱中低表达是影响膀胱癌患者预后的独立危险因素(OS HR=4.63; 95% *CI*: 1.39~7.23; $P=0.007$; DFS HR=5.82; 95% *CI*: 1.56~11.42; $P=0.003$)。见图 3。

表 2 miR-124 在膀胱癌组织中的表达与临床病理特征的相关性 [例(%)]

临床病理参数	*n*	低表达组	高表达组	χ^2	*P*
性别					
男	74	46(45.61)	28(54.39)	0.090	0.764
女	40	26(66.67)	14(33.33)		
年龄/岁					
≤60	67	46(43.59)	21(56.41)	2.122	0.146
>60	47	26(62.5)	21(37.5)		
TNM 分期					
T1-T2	69	37(64.44)	32(35.56)	6.829	0.009
T3-T4	45	35(22.22)	10(77.78)		
淋巴结转移					
N0	78	43(59.18)	35(40.81)	6.844	0.009
N1-N3	36	29(21.42)	7(78.57)		
远处转移					
M0	86	57(53.45)	29(46.55)	1.466	0.226
M1	28	15(33.33)	13(66.67)		
分化程度					
中高分化	63	34(54.35)	29(45.65)	5.111	0.024
低分化	51	38(23.53)	13(76.47)		

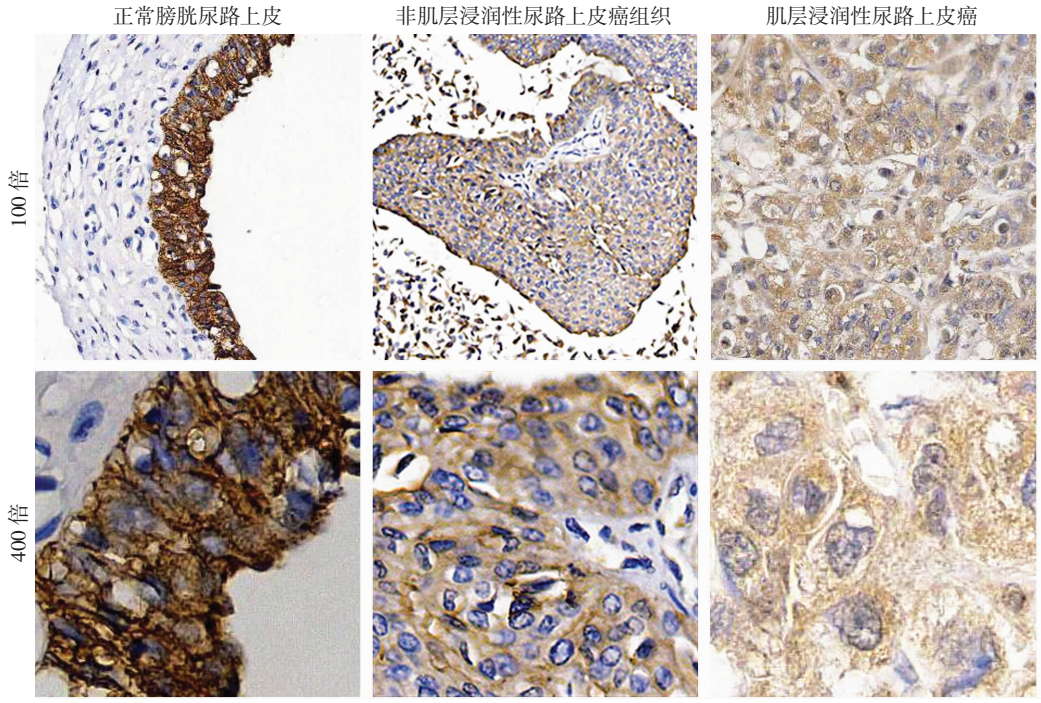
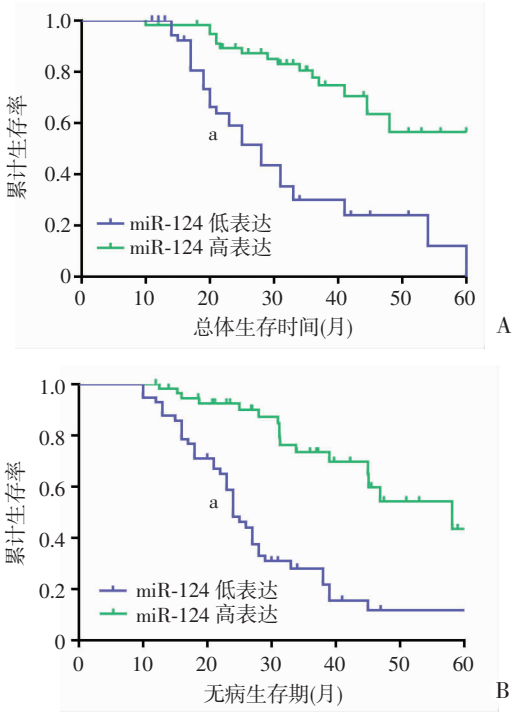


图 2 原位杂交技术检测 miR-124 在正常膀胱组织、非浸润性及浸润性膀胱癌组织中的表达



A:总体生存期;B:无病生存期　a:$P<0.01$,与 miR-124 高表达组比较

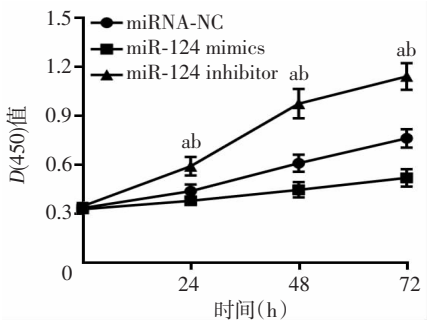
图 3　miR-124 表达水平与膀胱癌患者总生存期及无病生存期的关系

2.4　CCK-8 法检测 miR-124 表达改变对膀胱癌细胞 T24 增殖能力的影响

采用 CCK-8 增殖试验检测 3 组 T24 细胞在 0、24、48、72 h 各时间点的增殖情况。结果表明,与对照组(miRNA-NC)相比,miR-124 mimics 组各时间点的细胞增殖能力明显降低($P<0.05$);而 miR-124 inhibitor 组细胞增殖能力明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$,图 4)。

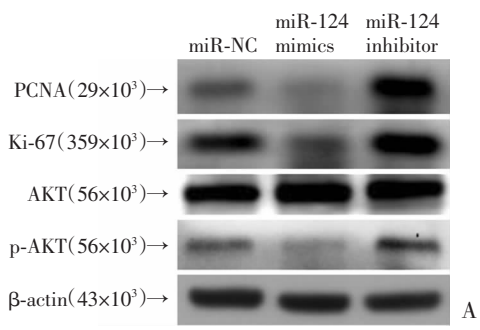
2.5　miR-124 表达改变对膀胱癌细胞增殖相关蛋白及 AKT 信号通路的影响

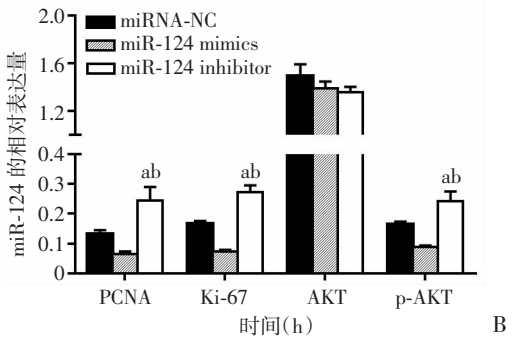
为明确上调 miR-124 表达后,膀胱癌细胞增殖能力降低的潜在调控机制,采用 Western blot 检测 miR-124 表达改变后增殖相关蛋白 PCNA、Ki-67 及 AKT 信号通路蛋白的表达水平。结果显示,与 miRNA-NC 组比较,miR-124 mimics 组 T24 细胞的增殖相关蛋白 PCNA、Ki-67 以及磷酸化的 p-AKT 蛋白表达水平降低($P<0.05$),而 AKT 蛋白表达水平未发生变化($P>0.05$);miR-124 inhibitor 组中的 PCNA、Ki-67 及 p-AKT 的蛋白表达水平较 miRNA-NC 组和 miR-124 mimics 组升高($P<0.05$),而 AKT 蛋白表达水平未发生变化($P>0.05$),见图 5。



a:$P<0.05$,与 miRNA-NC 组比较;b:$P<0.05$,与 miR-124 mimics 组比较

图 4　CCK-8 检测各组膀胱癌细胞的增殖能力　($n=3,\bar{x}\pm s$)





A: Western blot 检测结果;B:PCNA、Ki-67、AKT 及 p-AKT 蛋白半定量分析($n=3,\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与 miRNA-NC 组比较;b:$P<0.05$,与 miR-124 mimics 组比较

图 5　Western blot 检测 PCNA、Ki-67、AKT 及 p-AKT 蛋白的表达水平

3 讨论

膀胱癌是常见的癌症[5]。在我国,随着诊疗技术及筛查手段的提高,膀胱癌的发病率呈逐年递增趋势,男性膀胱癌的患病率是女性的3~4倍,现已位居全部恶性肿瘤中第十位[6]。早期膀胱癌患者症状不典型,多因出现血尿后前来就诊,往往大多数患者被确诊为膀胱癌时已发生转移,导致膀胱癌患者疗效欠佳且预后较差[7]。有研究指出,由于膀胱癌新的治疗药物进展缓慢以及治疗手段未有明显改进,导致膀胱癌近30年来生存率未得到明显改善[8]。因此,深入探究膀胱癌的分子机制及发病机理,寻找新的诊断标志物及分子治疗靶点,一直是目前研究重点与难点,对改善膀胱癌治疗效果、降低死亡率及改善患者预后具有至关重要的临床意义[9]。

miRNA作为生命过程的重要调控分子,与肿瘤的发生、发展关系密切[10]。研究发现,miRNA在多种肿瘤表型差异表达明显,提示其可作为肿瘤的诊断及预后标志物[11]。ZHANG等[12]采用miRNA表达谱确定了miR-191、miR-23-3p、miR-145、miR-328和miR-18a这5个血清miRNAs与非小细胞肺癌(non-small cell lung Cancer, NSCLC)患者的3年总生存率显著相关,提示他们可以作为晚期NSCLC患者的预后预测因子。研究报道,胃癌患者血清中高表达的miR-451和miR-16将预示着更高的总体生存率[13]。在ZHU等[14]采用表达谱芯片共筛选出了miR-16、miR-25、miR-92a、miR-451和miR-486-5p共5个miRNA在非贲门腺癌患者血浆中的水平持续升高,并被作为检测早期非贲门腺癌的潜在无创生物标志物。上述结果表明,miRNA在多种肿瘤进展过程中发挥重要作用,并可作为肿瘤的早期诊断及预后评判指标。miR-124作为抑瘤因子在多种肿瘤中发挥抑瘤作用[15]。在NSCLC细胞中,miR-124表达水平明显低于正常肺上皮BEAS-2E细胞;且miR-124在NSCLC组织的表达水平明显低于正常肺组织,miR-124的表达水平与肿瘤转移(TNM)的分期、分化程度和淋巴结转移显著相关。本研究结果显示,miR-124在人膀胱癌细胞5637、J82、T24、TCCSUP、UMUC3中的表达水平均明显低于SV-HUC-1($P<0.01$);与miR-124在膀胱癌细胞中的表达趋势相一致的是,原位杂交技术结果表明miR-124在正常膀胱组织中呈强阳性表达,在非浸润性膀胱癌组织中表达降低,在浸润性膀胱癌组织中的表达较前两者更低。说明miR-124可能参与了膀胱癌发生、发展过程。miR-124低表达与膀胱癌临床T分期、淋巴结转移及肿瘤分化程度密切相关($P<0.05$),但与性别、年龄、远处转移等无明显相关性($P>0.05$)。miR-124低表达可能与膀胱癌的恶性程度及不良预后呈正相关,提示其可能参与了膀胱癌发生的恶性进程。

有研究发现,与正常肺细胞和组织相比,miR-124在NSCLC细胞株SPC-A1、NCI-H1650及NSCLC组织的表达下调。miR-124低表达患者的OS和PFS明显缩短。进一步机制探讨发现,肿瘤抑制因子miR-124通过抑制靶基因泛素特异性蛋白酶14(Ubiquitin-specific protease 14, USP4)的表达,负调控NSCLC细胞生长和自我更新,进而提高NSCLC细胞对吉非替尼的敏感性[16]。本研究分析miR-124表达与膀胱癌患者预后之间的关系,Kaplan-Meier结果显示,miR-124低表达组患者的OS和DFS明显短于高表达组患者($P<0.01$);多因素分析结果提示,miR-124在膀胱中低表达是影响膀胱癌患者预后的独立危险因素。提示miR-124表达越低,膀胱癌患者预后越差,有望成为膀胱癌新的预后标志物。

miR-124在胃癌组织样品和细胞系中的表达都显著降低,且过表达miR-124(miR-124 mimics)可明显抑制了胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力[17]。有研究报道,与miR-NC组比较,过表达miR-124(miR-124 mimics)可显著降低结直肠癌细胞的活力,明显诱导细胞凋亡和抑制细胞侵袭能力($P<0.05$);并且明显增强了Wnt4的表达。由此提出miR-124可能通过调控Wnt/β-catenin信号通路,抑制肿瘤细胞的增殖并促进其凋亡[18]。本研究采用Lipofectamine 2000将miR-124 mimic、miR-124 inhibitor及miRNA-NC转染至T24细胞中,CCK-8检测细胞增殖能力,结果发现,与miRNA-NC组相比,miR-124 mimics组T24细胞增殖能力明显下降($P<0.05$),而miR-124 inhibitor组中T24细胞增殖能力增强($P<0.05$)。说明上调miR-124可抑制T24细胞的增殖能力。这与CAO等[19]研究结果相一致。PI3K/Akt信号通路作为细胞内重要信号转导通路之一,其通过影响下游多种效应分子的活化状态,在细胞内发挥着抑制凋亡、促进增殖的关键作用,与多种实体肿瘤的发生、发展关系密切[20-21]。本研究采用Western blot检测增殖相关蛋白(PCNA、Ki-67)及PI3K/AKT通路中AKT以及磷酸化的p-AKT的表达水平,结果表明,与miRNA-NC比较,miR-124 mimics组中的PCNA、Ki-67及p-AKT蛋白表达量降低($P<0.05$);miR-124 inhibitor组中的PCNA、Ki-67及p-AKT的蛋白表达量较miRNA-NC组和miR-124 mimics组升高($P<0.05$),而总AKT蛋白表达量未发生变化($P>0.05$)。提示上调miR-124有效抑制T24细胞的增殖和PI3K/AKT通路的活化,miR-124可能通过AKT信

号通路调控膀胱癌细胞的增殖,进而影响肿瘤的恶性进程。

综上所述,miR-124 在膀胱癌组织与癌细胞中均明显降低,与膀胱癌临床 T 分期、淋巴结转移及肿瘤分化程度及不良预后密切相关,上调 miR-124 可显著减少细胞增殖,其机制可能与 AKT 信号通路有关,有望为膀胱癌的预后评判和治疗提供新的标志物和治疗靶点。

参考文献:

[1] CUI J, ZHOU B, ROSS S A, *et al*. Nutrition, microRNAs, and human health[J]. Adv Nutr, 2017, 8(1): 105-112. DOI: 10.3945/an.116.013839.

[2] ZENDJABIL M, FAVARD S, TSE C, *et al*. The microRNAs as biomarkers: What prospects? [J]. C R Biol, 2017, 340(2): 114-131. DOI: 10.1016/j.crvi.2016.12.001.

[3] SHI P, CHEN C, LI X, *et al*. MicroRNA-124 suppresses cell proliferation and invasion of triple negative breast cancer cells by targeting STAT3[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(5): 3667-3675. DOI: 10.3892/mmr.2019.10044.

[4] JIA X, WANG X, GUO X, *et al*. MicroRNA-124: An emerging therapeutic target in cancer[J]. Cancer Med, 2019, 8(12): 5638-5650. DOI: 10.1002/cam4.2489.

[5] THOMA C. Combining epigenetic and immune checkpoint inhibitors in bladder cancer[J]. Nat Rev Urol, 2019, 16(9): 507. DOI: 10.1038/s41585-019-0221-3.

[6] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34. DOI: 10.3322/caac.21551.

[7] DESANTIS C E, MILLER K D, 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.

[8] ELSHARKAWI F, ELSABAH M, SHABAYEK M, *et al*. Urine and serum exosomes as novel biomarkers in detection of bladder cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2019, 20(7): 2219-2224. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.7.2219.

[9] LI Q, WANG H, PENG H, *et al*. MicroRNAs: Key Players in Bladder Cancer[J]. Mol Diagn Ther, 2019, 23(5): 579-601. DOI: 10.1007/s40291-019-00410-4.

[10] ORSO F, QUIRICO L, DETTORI D, *et al*. Role of miRNAs in tumor and endothelial cell interactions during tumor progression[J]. Semin Cancer Biol, 2019, pii: S1044-579X(19)30169-5. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.07.024.

[11] VOS P D, LEEDMAN P J, FILIPOVSKA A, *et al*. Modulation of miRNA function by natural and synthetic RNA-binding proteins in cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(19): 3745-3752. DOI: 10.1007/s00018-019-03163-9.

[12] ZHANG Y, ROTH JA, YU H, *et al*. A 5-MicroRNA signature identified from serum MicroRNA profiling predicts survival in patients with advanced stage non-small cell lung cancer[J]. Carcinogenesis, 2019, 40(5): 643-650. DOI: 10.1093/carcin/bgy132.

[13] REN C, CHEN H, HAN C, *et al*. High expression of miR-16 and miR-451 predicating better prognosis in patients with gastric cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(12): 2489-2496. DOI: 10.1007/s00432-016-2243-z.

[14] ZHU C, REN C, HAN J, *et al*. A five-microRNA panel in plasma was identified as potential biomarker for early detection of gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2014, 110(9): 2291-2299. DOI: 10.1038/bjc.2014.119.

[15] MA J, WENG L, WANG Z, *et al*. MiR-124 induces autophagy-related cell death in cholangiocarcinoma cells through direct targeting of the EZH2-STAT3 signaling axis[J]. Exp Cell Res, 2018, 366(2): 103-113. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.02.037.

[16] YU F, LIU J B, WU Z J, *et al*. Tumor suppressive microRNA-124a inhibits stemness and enhances gefitinib sensitivity of non-small cell lung cancer cells by targeting ubiquitin-specific protease 14[J]. Cancer Lett, 2018, 427: 74-84. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.04.022.

[17] LI X, YU Z, LI Y, *et al*. The tumor suppressor miR-124 inhibits cell proliferation by targeting STAT3 and functions as a prognostic marker for postoperative NSCLC patients[J]. Int J Oncol. 2015, 46(2): 798-808. DOI: 10.3892/ijo.2014.2786.

[18] LU M L, ZHANG Y, LI J, *et al*. MicroRNA-124 inhibits colorectal cancer cell proliferation and suppresses tumor growth by interacting with PLCB1 and regulating Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(1): 121-136. DOI: 10.26355/eurrev_201901_16756.

[19] CAO Z, XU L, ZHAO S, *et al*. The functions of microRNA-124 on bladder cancer[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 3429-3439. DOI: 10.2147/OTT.S193661.

[20] LIM H J, CROWE P, YANG J L. Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(4): 671-689. DOI: 10.1007/s00432-014-1803-3.

[21] HOUÉDÉ N, POURQUIER P. Targeting the genetic alterations of the PI3K-AKT-mTOR pathway: its potential use in the treatment of bladder cancers[J]. Pharmacol Ther, 2015, 145: 1-18. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.06.004.

(收稿:2019-12-10;修回:2020-03-13)

(编辑 汪勤俭)