DOI:10.16016/j.1000-5404.202101122

热损伤诱导的 tRNA 碎片 tRF-Ile-AAT-1 抑制膀胱尿路上皮癌细胞的增殖与侵袭

姜 力,张俊勇,谭 鹏,苟 扬,胡植雅,林艳君,姜 庆 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院泌尿外科

[**摘要**] **目的** 探讨热损伤诱导高度恶性与低度恶性膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial cancer,BUC)细胞之间差异表达的 tRNA 碎片对 BUC 细胞增殖与侵袭的影响。**方法** 对高度恶性 BUC 细胞株 T24 和低度恶性 BUC 细胞株 5637 行热损伤处理。对热损伤前后细胞进行 tRNA 碎片(transfer RNA stress-induced fragments,tRFs)测序,筛选出热损伤后在 T24 中表达下降且在 5637 细胞中表达上升的 tRFs,并对其行细胞株及临床标本 RT-PCR 检测及验证。构建目的 tRF 的单链模拟物(mimic)和反义链(inhibitor),并转染至热损伤后的 T24 及 5637 细胞中,分组为:相对应的 Heat 组、载体对照组、Mimic 组、Inhibitor 组。通过 CCK-8、流式细胞术、Transwell 实验检测 tRF 对 BUC 细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的调控作用。**结果** 通过测序及细胞株 RT-PCR 检测,所筛选出的 tRFs 分别为 tRF-chrM.Ser-GCT、tRF-Ile-AAT-1,而只有 tRF-Ile-AAT-1 在低级别 BUC 患者行第 2 次经尿道膀胱肿瘤电切(transurethral resection of bladder tumor,TURBT)所取标本中表达量较第 1 次 TURBT 的标本显著升高[(1.61±0.16)倍,$P<0.01$];且在高级别 BUC 患者中表达量较第 1 次 TURBT 标本显著降低[(0.75±0.14)倍,$P<0.05$]。CCK-8 结果显示 $T24^{Heat}$+Mimic 组 BUC 细胞的增殖受到明显抑制($P<0.05$);流式细胞术结果显示 $T24^{Heat}$+Mimic 组的凋亡率较 $T24^{Heat}$ 组显著上升[(5.88±1.01)倍,$P<0.01$];Transwell 实验提示 $T24^{Heat}$+Mimic 组迁移的 T24 数量较 $T24^{Heat}$ 组显著下降[(0.40±0.05)倍,$P<0.01$],侵袭的 T24 数量较 $T24^{Heat}$ 组显著下降[(0.23±0.04)倍,$P<0.01$]。5637^{Heat}+ Inhibitor 组 BUC 细胞增殖明显增强($P<0.05$),其凋亡率较 5637^{Heat} 组显著下降[(0.11±0.02)倍,$P<0.01$],迁移细胞数较 5637^{Heat} 组显著上升[(1.81±0.29)倍,$P<0.01$],侵袭细胞数较 5637^{Heat} 组显著上升[(2.70±0.15)倍,$P<0.01$]。**结论** 热损伤诱导的 tRNA 碎片 tRF-Ile-AAT-1,可抑制 BUC 细胞的增殖与侵袭能力。

[**关键词**] 膀胱尿路上皮癌;转运 RNA 碎片;热损伤;tRF-Ile-AAT-1
[**中图法分类号**] R394.3;R73-37;R737.14 [**文献标志码**] A

Heat injury-induced tRNA fragment tRF-Ile-AAT-1 inhibits proliferation and invasion of bladder urothelial cancer cells

JIANG Li, ZHANG Junyong, TAN Peng, GOU Yang, HU Zhiya, LIN Yanjun, JIANG Qing Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of tRNA fragment differentially expressed between high and low malignant bladder urothelial carcinoma (BUC) cells induced by heat injury on the proliferation and invasion of BUC cells. **Methods** High-grade BUC cell line T24 and low-grade BUC cell line 5637 were inflicted to heat injury. Then transfer RNA stress-induced fragments (tRFs) in these cells were sequenced before and after injury, and the tRFs whose expression decreased in T24 cells while increased in 5637 cells after heat injury were screened out, and further verified in clinical specimen by RT-PCR. The single-chain mimic and antisense strand (inhibitor) of this target tRF were constructed and transfected into heat injured T24 and 5637 cells respectively, and the cells were assigned into heat injury, vector control, mimic and inhibitor groups. Finally, CCK-8 assay, flow cytometry and Transwell test were conducted respectively to

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81803057);重庆医科大学附属第二医院"宽仁英才"项目(KY2019Y026)
[**通信作者**] 姜 庆,E-mail:jq001002@sina.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

detect the regulatory effect of this tRF on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of BUC cells. **Results** The originally selected tRFs were identified as tRF-chrM. Ser-GCT and tRF-Ile-AAT-1 through sequencing and RT-PCR in cell lines. However, when comparing the specimens from the second surgery of transurethral resection of bladder tumor (TURBT) with those from the first one, the results discovered that only tRF-Ile-AAT-1 levels were increased in low-grade BUC patients (1.61±0.16 times, $P<0.01$) while decreased in high-grade BUC patients (0.75±0.14 times, $P<0.05$). In the T24 cells experiments, when compared with the $T24^{Heat}$ group, the proliferation of BUC cells in the $T24^{Heat}$+Mimic group was inhibited ($P<0.05$), the apoptotic rate was significantly improved (5.88±1.01 times, $P<0.01$), and the number of migrated and invaded cells were both greatly diminished (0.40±0.05 times, $P<0.01$; 0.23±0.04 times, $P<0.01$). Moreover, the proliferation of BUC cells in the 5637^{Heat}+ Inhibitor group was enhanced ($P<0.05$), the apoptotic rate was declined (0.11±0.02 times, $P<0.01$), and the number of migrated cells as well as invaded cells were both elevated (1.81±0.29 times, $P<0.01$; 2.70±0.15 times, $P<0.01$), as compared with the 5637^{Heat} group. **Conclusion** tRNA fragment tRF-Ile-AAT-1 induced by heat injury can inhibit the proliferation and invasion in BUC cells.

[**Key words**] bladder urothelial carcinoma; transfer RNA fragments; heat injury; tRF-Ile-AAT-1

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81803057) and the "Kuanren Talents" Project of the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (KY2019Y026). Corresponding author: JIANG Qing, E-mail: jq001002@sina.com

经尿道膀胱肿瘤电切(transurethral resection of the bladder tumor, TURBT)是非肌层浸润性膀胱癌(nonmuscle-invasive bladder cancer, NMIBC)治疗的金标准和肌层浸润性膀胱癌(muscle-invasive bladder cancer, MIBC)姑息治疗的重要方式[1]。其不稳定的术后复发率和复发后的病理进展越来越引起泌尿外科医生的关注[2-4]。究其机制,一方面电切术中膀胱尿路上皮癌瘤体形态改变,容易引起切除的不彻底;另一方面,电切时肿瘤组织破碎可引起肿瘤细胞在膀胱腔内播撒。从分子生物学机制出发,上述现象亦可能与肿瘤细胞热损伤所介导的恶性程度增加有关[5-7]。该机制已在多种肿瘤模型中被广泛证实,但在 TURBT 中尚少见报道。

近期研究表明,热损伤或缺氧可诱导肿瘤细胞产生转运 RNA 应激诱导的碎片(transfer RNA stress-induced fragments, tiRNAs or tRFs)以调节其自身的生物学行为[8-9]。例如,在与膀胱尿路上皮癌同样具有较强异质性的乳腺癌中[10-12],缺氧刺激可抑制高侵袭性乳腺癌细胞 LM2 表达 tRFGln,且向 LM2 细胞内转染 tRFGln 可抑制其增殖与侵袭,而沉默低侵袭性乳腺癌细胞 MDA 中的 tRFGln 却增强了该细胞的增殖与侵袭[13]。类似的研究观察到,tRFLeu/miR-1280 可通过干预 JAG2/Notch 通路抑制结肠癌干细胞的自我更新和转移[14]。以上研究提示,高度恶性的肿瘤细胞可以通过抑制自身 tRNA 裂解来抵抗环境变化,而低度恶性的肿瘤细胞产生的 tRFs 可能具有抗肿瘤效果。基于此种假设,本研究采用测序技术,筛选热损伤后在低度恶性的膀胱尿路上皮癌细胞(bladder urothelial carcinoma, BUC)中表达上调,但在热损伤后高度恶性的 BUC 细胞中表达下降的 tRF,观察该 tRF 对 BUC 细胞增殖与侵袭能力的影响,以期达到探索 TURBT 术后复发和进展机制的目的,为临床中膀胱肿瘤基因治疗提供可能的靶点。

1 资料与方法

1.1 试验材料

收集 2017 年 9 月至 2020 年 9 月间于重庆医科大学附属第二医院泌尿外科行第 1 次及第 2 次 TURBT 的 NMIBC 患者。纳入标准:原发性膀胱尿路上皮癌诊断明确;第 1 次 TUBRT 术前未接受放疗、静脉化疗、介入治疗;术后仅行常规方案吡柔比星膀胱灌注化疗;临床基线资料及瘤体标本保存完整。排除标准:转移性膀胱肿瘤或合并其他恶性肿瘤疾病;接受过纳入标准之外其他肿瘤治疗;TURBT 术后行其他药物灌注化疗;临床基线资料或标本保存不完整。本实验通过重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准(2017-4-190)。参与试验的患者均签署知情同意书,其术后肿瘤标本液氮冻存。

主要试剂:RPMI1640 培养基(美国 Corning 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),miRNA Purification Kit 试剂盒、miRNA cDNA Synthesis Kit 试剂盒、miRNA qPCR Assay Kit 试剂盒(北京康为世纪公司),Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(武汉博士德公司),Lipofectamine™3000(美国 Thermo 公司),tRF-Ile-AAT-

1 的 mimic 和 inhibitor(上海吉荧生物技术公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养、热损伤处理及细胞转染 人高度恶性 BUC 细胞 T24 和低度恶性 BUC 细胞 5637 由重庆医科大学附属第二医院中心实验保存,购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。所有细胞培养在含 10%胎牛血清和青链霉素双抗的 RPMI1640 培养基中,置于 37 ℃、5%CO_2 的培养箱中培养。细胞生长达 90%时传代培养,此处标记为:T24 组和 5637 组。当细胞生长至 80%~90%时,更换新鲜培养基,将培养皿漂浮于 48 ℃恒温水浴箱内水浴 10 min[15]。然后重新置于 37 ℃并含 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 备用,此处标记为:$T24^{Heat}$ 组和 5637^{Heat} 组。转染前 24 h,将细胞接种到 6 孔板中,并根据 Lipofectamine 3000 说明书进行转染。使用 Lipofectamine 3000 转染 tRF-Ile-AAT-1 合成单链模拟物(mimic)、反义链(inhibitor)和相应的载体对照序列(LNA 寡核苷酸修饰),序列见表 1,此处分别标记为:$T24^{Heat}$+Mimic 组、$T24^{Heat}$+Inhibitor 组、$T24^{Heat}$+载体对照组;5637^{Heat}+Mimic 组、5637^{Heat}+Inhibitor 组、5637^{Heat}+载体对照组。根据说明书,每个孔对 tRF-Ile-AAT-1 的 mimic 及 inhibitor 的最佳终浓度为 100 nmol/L。

表 1 tRF-Ile-AAT-1 单链模拟物和反义链序列与长度

核苷酸	序列	产物长度/bp
mimic	5′-UCCCCGUACGGGCCACCA-3′	18
mimic 载体对照	5′-UCUACUCUUUCUAGGAGGUUGUGA-3′	24
inhibitor	5′-T+G+GTGGCCCGTA+CGGG+G+A-3′	18
inhibitor 载体对照	5′-UCUACUCUUUCUAGGAGGUUGUGA-3′	24

1.2.2 提取 miRNA 将 BUC 组织在液氮中磨碎,贴壁细胞吸去培养液后,分别加入 TRIzol,振荡混匀,静置后再次离心。取上清加入氯仿,剧烈振荡,室温放置后再次离心。将上层液体移入离心管中,加入无水乙醇混匀,加入吸附柱 RM(Spin Columns RM)中离心。弃吸附柱 RM,向流出液加入乙醇,并加入吸附柱 RS(Spin Columns RS)。离心后将吸附柱 RS 重新放回收集管中,加入 Buffer RWT,离心后倒掉废液。再向吸附柱 RS 中加入 Buffer RW2 并离心,重复 2 次。将吸附柱 RS 置于室温晾干。再置于无酶离心管中,加入无酶水并室温放置 1 min,离心后收集 RNA 溶液冻存于 -80 ℃中备用。

1.2.3 tiRNA 及 tRF 测序 用 NanoDrop ND-1000 测定总 RNA 样品的纯度和浓度。对总 RNA 样品进行预处理,以去除一些干扰小 RNA-seq 文库构建的 RNA 修饰。将每个样品的总 RNA 依次连接到 3′和 5′小 RNA 衔接子上。然后使用 Illumina 的专有反转录引物和扩增引物合成并扩增 cDNA。随后,从 PAGE 凝胶中提取并纯化 134~160 bp PCR 扩增片段。最后,通过 Agilent 2100 生物分析仪对完成的文库进行定量。使文库变性并稀释至 1.3 mL 的加载体积和 1.8 pmol/L 的加载浓度。根据制造商的说明,使用 NextSeq 500/550 V2 试剂盒(#FC-404-2005,Illumina)将稀释的文库加载到试剂盒中,并在 Illumina NextSeq 500 系统上进行测序。然后收集数据并进行分析。

1.2.4 RT-PCR 检测 用 TRIzol 试剂从细胞系和组织中提取 miRNA,使用随机引物和逆转录酶 PCR 试剂盒合成 cDNA。通过实时 PCR 评估筛选出的 2 个差异表达的 tRFs。U6 表达用作内部对照。各分子引物序列如表 2 所示(试剂盒自带 tRF-chrM. Ser-GCT 和 tRF-Ile-AAT-1 通用的下游引物,未展示)。

表 2 Real-time PCR 所用引物序列与长度

分子	引物序列	产物长度/bp
U6	上游:5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′ 下游:5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′	96
tRF-chrM. Ser-GCT	上游:5′-GAGAAAGCTCACAAGAACTGCT-3′	24
tRF-Ile-AAT-1	上游:5′-TCCCCGTACGGGCCACC-3′	18

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖 将 BUC 细胞按照每孔(4~4.5)×10^3 接种到 96 孔平底微孔板中,并在 $T24^{Heat}$ 组、$T24^{Heat}$+载体对照组、$T24^{Heat}$+Mimic 组、$T24^{Heat}$+Inhibitor 组;5637^{Heat} 组、5637^{Heat}+载体对照组、5637^{Heat}+Mimic 组、5637^{Heat}+Inhibitor 组设置 3 个重复孔。将处理后的细胞培养 24、48、72 h 后,添加 CCK-8 试剂,并在 450 nm 下测量光密度值 D(450),绘制相应的生长曲线。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 采用 Annexin V-PI 双染色进行定量分析。首先将漂浮的细胞放入 1.5 mL EP 管中,然后再用 0.25%胰蛋白酶将培养皿中的细胞消化成单个细胞,收集细胞悬液,并以 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,PBS 重新悬浮细胞沉淀,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,重复 2 次。最后,将 1×10^6 细胞重悬于 500 μL PBS(pH=7.2)缓冲液中,分别加入 5 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI 染液,避光孵育 15 min,然后通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.7 Transwell 实验评估细胞迁移和侵袭能力 将细胞重悬于无血清 RPMI1640(5×10^4/100 μL)中,并将 Matrigel 基质胶铺入上室。于下室加入包含 750 μL

含 10% FBS 的培养基。将 T24 和 5637 细胞系加入上室孵育时间 48 h。用 PBS 洗涤后,用棉签除去小室上表面的细胞,将膜下表面上的细胞固定并用 0.5%结晶紫溶液染色并计数。迁移能力检测于未铺基质胶的 Transwell 小室内进行,其步骤与侵袭能力检测一致。

1.3　统计学分析

使用 SPSS 18.0 统计软件分析数据。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,满足方差齐性及正态分布者采用独立样本 t 检验或单因素方差分析,不满足则采用秩和检验。计数资料采用卡方检验或秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

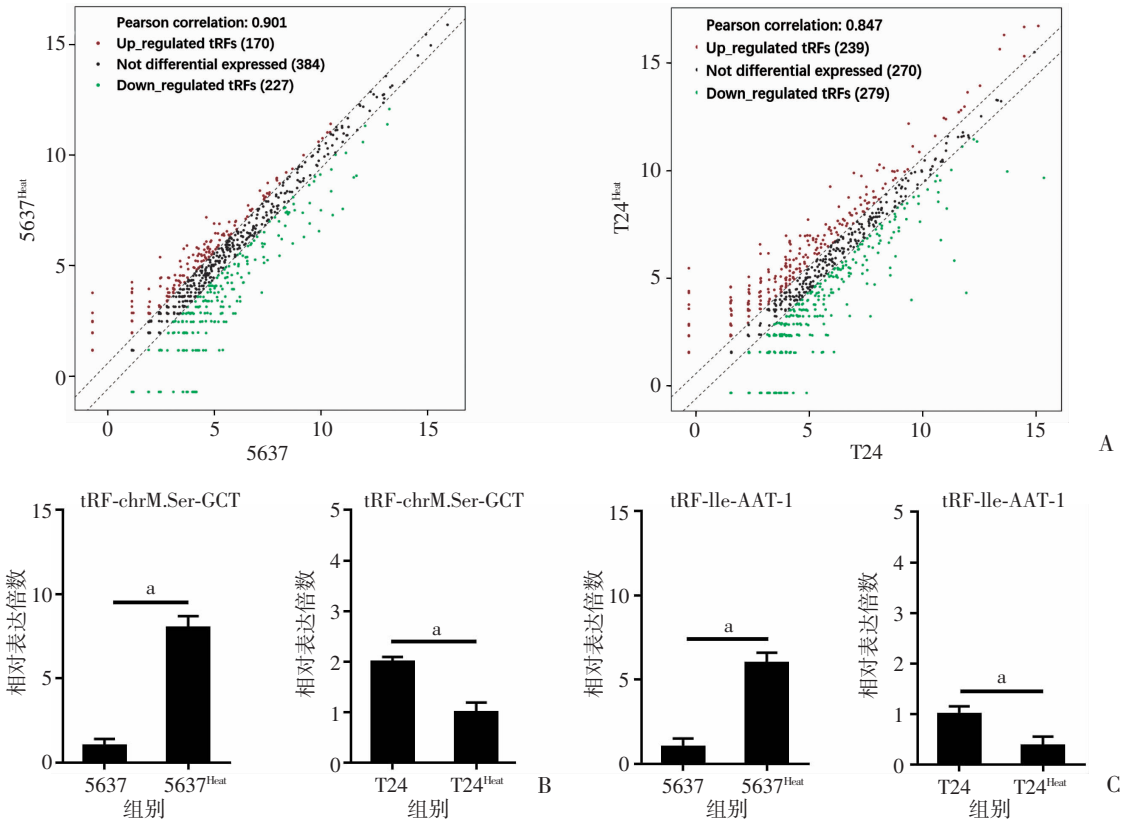
2.1　测序及细胞 RT-PCR 筛选出两种差异表达 tRFs

5637 和 T24 经热损伤处理后,通过 small RNA-seq 测序筛选出大量 tRFs 在 5637 中表达升高而在 T24 中表达降低(图 1A)。RT-PCR 实验逆向验证后发现 tRF-chrM. Ser-GCT 在 5637^{Heat} 组中升高至 5637 组的(8.33±0.25)倍,而在 $T24^{Heat}$ 组中下降至 T24 组的(0.51±0.09)倍(图 1B,$P<0.05$)。此外,tRF-Ile-AAT-1 在 5637^{Heat} 组中升高至 5637 组的(6.04±0.84)倍,而在 $T24^{Heat}$ 组中下降至 T24 组的(0.37±0.18)倍(图 1C,$P<0.05$)。因此,tRF-chrM. Ser-GCT 和 tRF-Ile-AAT-1 将行 RT-PCR 实验进一步检测它们在临床样本中差异表达。

2.2　RT-PCR 检测不同级别 BUC 临床标本中 tRF-Ile-AAT-1 呈差异表达

共纳入 BUC 患者 10 例,其中男性 6 例,女性 4 例;年龄 54~81 岁,平均 69.7 岁;低级别 BUC 5 例,高级别 BUC 5 例;患者中第 1 次行 TURBT 时瘤体为单个的 7 例,多个的 3 例,瘤体直径 0.8 ~1.7 cm;第 2 次行 TURBT 时瘤体为单个的 9 例,多个的 1 例,瘤体直径 0.6~1.5 cm。

对同一患者 2 次 TURBT 术后标本 RT-PCR 检测显示,无论是高级别还是低级别的患者,tRF-chrM. Ser-GCT 在 2 次 TURBT 术后标本中表达无明显差异(图 2A、C),而 tRF-Ile-AAT-1 在低级别 BUC 患者第 2 次 TURBT 术后 BUC 标本中的表达高于第 1 次 TURBT($P<0.05$,图 2B),且在高级别 BUC 的表达又低于第 1 次 TURBT($P<0.05$,图 2D)。因此,tRF-Ile-AAT-1 为最终所筛选的目的 tRF,用于后续细胞实验。



A: small RNA-seq 测序筛选结果;B: RT-PCR 法检测 tRF-chrM. Ser-GCT 在不同 BUC 细胞热损伤前后的表达 a: $P<0.05$;C: RT-PCR 法检测 tRF-Ile-AAT-1 在不同 BUC 细胞热损伤前后的表达　a: $P<0.05$

图 1　热损伤后的不同恶性程度 BUC 细胞中 tRFs 的差异表达

2.3　tRF-Ile-AAT-1 抑制 BUC 细胞的增殖

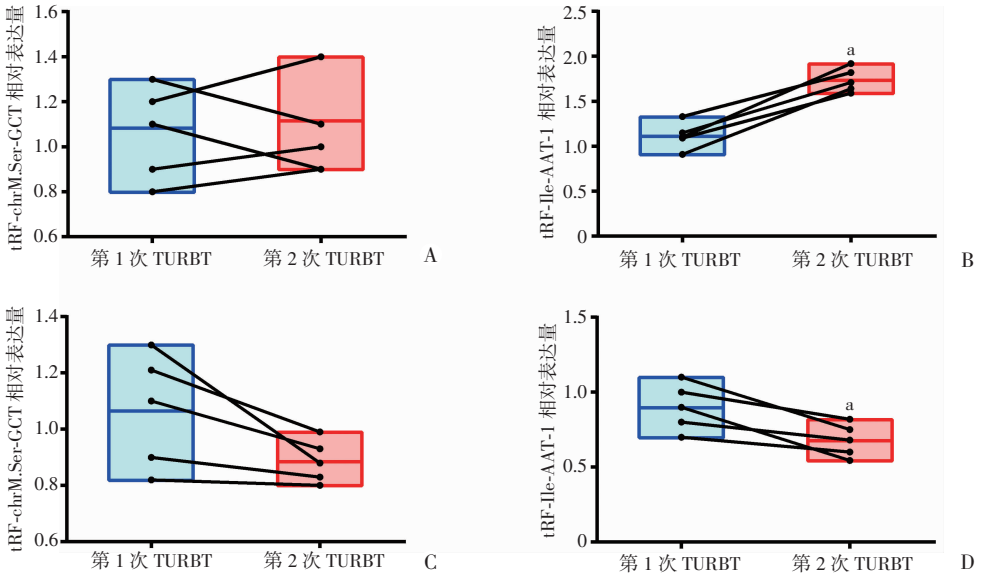
在热损伤后的 5637 细胞中,与 5637^{Heat} 组相比,通过转染 tRF-Ile-AAT-1 inhibitor 抑制其表达水平可显著提高 5637^{Heat}+Inhibitor 组的增殖能力(图 3A,$P<0.05$)。在热损伤后的 T24 细胞中,通过转染 tRF-Ile-AAT-1 mimic 提高其在 $T24^{Heat}$+Mimic 组中的表达,与 $T24^{Heat}$ 组相比,有效抑制了 T24 细胞的增殖能力(图 3B,$P<0.05$)。

2.4　tRF-Ile-AAT-1 促进 BUC 细胞的凋亡

通过向热损伤后的 5637 细胞转染 tRF-Ile-AAT-1 inhibitor,抑制其表达水平可显著降低 5637^{Heat} + Inhibitor 组细胞的凋亡率至(8.06±1.82)%(如图 4A 中 Annexin V-PI 双染色流式结果第 2、3 象限所示),与 5637^{Heat} 组(72.83±3.21)%的凋亡率相比,差异有统计学意义(图 4B,$P<0.01$)。而转染 tRF-Ile-AAT-1 mimic 有效提高了 $T24^{Heat}$+Mimic 组细胞的凋亡率,达(76.78±3.95)%,与 $T24^{Heat}$ 组(13.35±2.72)%的凋亡率相比,差异有统计学意义(图 4C,$P<0.01$)。

2.5　tRF-Ile-AAT-1 抑制 BUC 细胞的迁移与侵袭

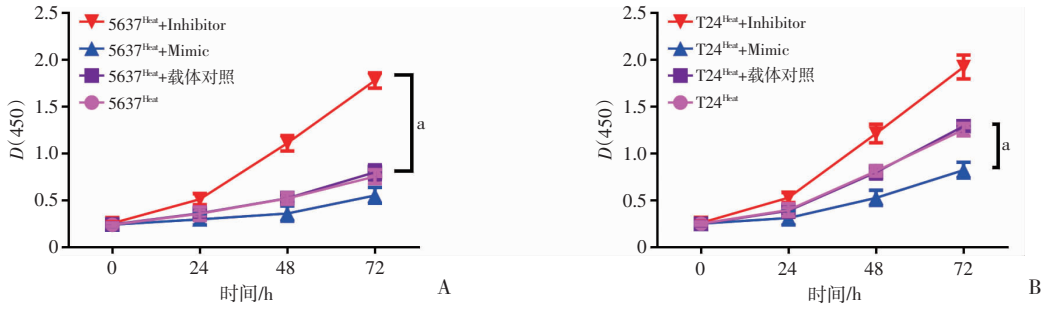
在热损伤的 5637 细胞中转染 tRF-Ile-AAT-1 inhibitor 后,5637^{Heat} + Inhibitor 组细胞迁移数量为(314.67±18.88)个,显著高于 5637^{Heat} 组的(175.33±17.79)个($P<0.01$,图 5A、B);侵袭细胞数量为(557.00±36.17)个,也高于 5637^{Heat} 组的(194.33±20.40)个($P<0.01$,图 5D、E)。而转染 tRF-Ile-AAT-1 mimic 的 $T24^{Heat}$+Mimic 组中细胞迁移数量,由 $T24^{Heat}$ 组的(191.00±17.09)个下降至(76.33±12.86)个,差异有统计学意义($P<0.01$,图 5A、C);侵袭的细胞数由 $T24^{Heat}$ 组的(366.33±19.86)个下降至(84.33±16.04)个,差异有统计学意义($P<0.01$,图 5D、F)。说明 tRF-Ile-AAT-1 可有效抑制 BUC 细胞的迁移与侵袭。



a:$P<0.05$

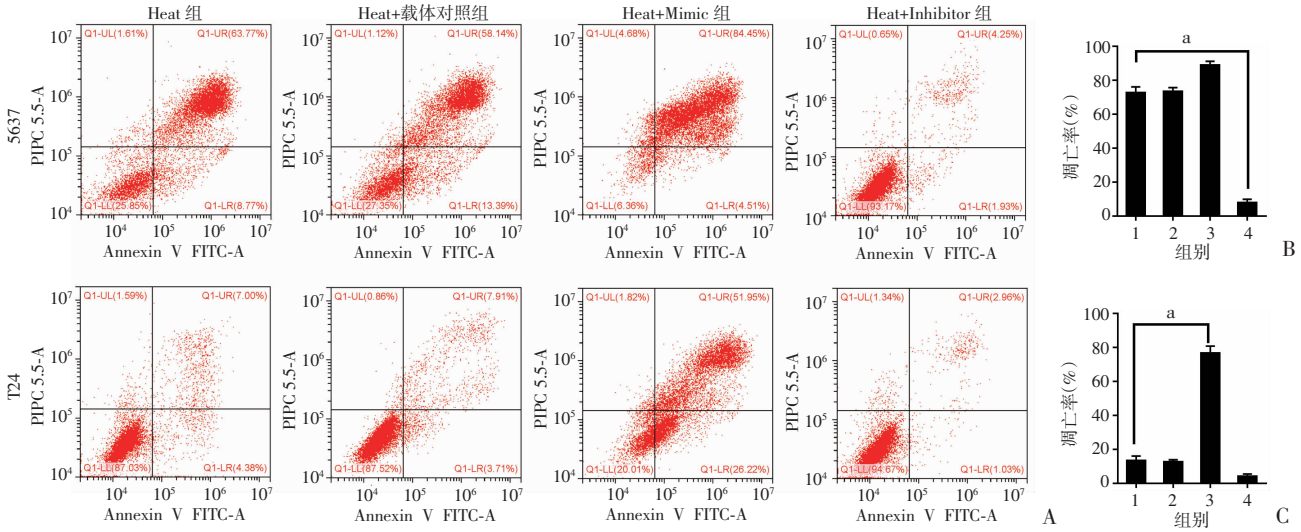
A:tRF-chrM.Ser-GCT 在 TURBT 术后低级别 BUC 标本中的表达;B:tRF-Ile-AAT-1 在 TURBT 术后低级别 BUC 标本中的表达;C:tRF-chrM.Ser-GCT 在 TURBT 术后高级别 BUC 标本中的表达;D:tRF-Ile-AAT-1 在 TURBT 术后高级别 BUC 标本中的表达;方框代表患者行 TURBT 所取肿瘤标本中 tRFs 相对于内参表达区间;2 次 TURBT 的连线代表同 1 例患者的前后对应关系

图 2　tRFs 在 2 次 TURBT 术后及不同分级 BUC 中的表达差异



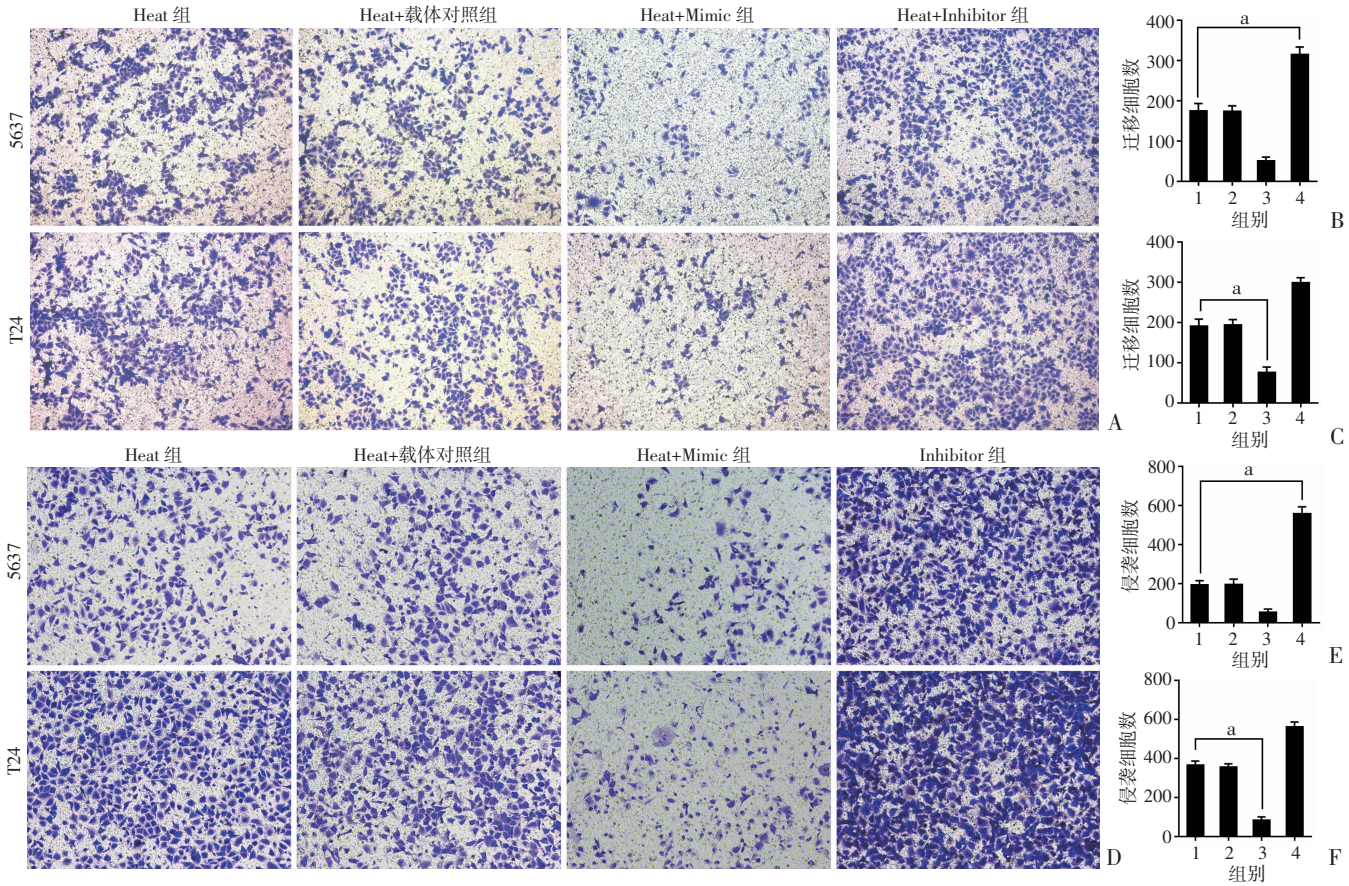
A:5637 细胞　a:$P<0.05$;B:T24 细胞　a:$P<0.05$

图 3　CCK-8 实验检测 tRF-Ile-AAT-1 调控 BUC 细胞的增殖



A：流式细胞术检测 tRF-Ile-AAT-1 的 inhibitor 和 mimic 干预热损伤后的 BUC 细胞的凋亡变化；B、C：流式细胞术检测 tRF-Ile-AAT-1 的 inhibitor 和 mimic 干预热损伤后的 BUC 细胞凋亡率的变化　1：Heat 组；2：Heat+载体对照组；3：Heat+Mimic 组；4：Heat+Inhibitor 组；a：$P<0.01$

图 4　tRF-Ile-AAT-1 对 BUC 细胞凋亡的影响



A：tRF-Ile-AAT-1 的 mimic 和 inhibitor 干预热损伤后的 BUC 细胞迁移能力的变化(×100)；B、C：tRF-Ile-AAT-1 的 mimic 和 inhibitor 干预热损伤后的 BUC 细胞迁移细胞数的变化　a：$P<0.01$；D：tRF-Ile-AAT-1 的 mimic 和 inhibitor 干预热损伤后的 BUC 细胞侵袭能力的变化(×100)；E、F：tRF-Ile-AAT-1 的 mimic 和 inhibitor 干预热损伤后的 BUC 细胞侵袭细胞数的变化；1：Heat 组；2：Heat+载体对照组；3：Heat+Mimic 组；4：Heat+Inhibitor 组；a：$P<0.01$

图 5　Transwell 实验检测 tRF-Ile-AAT-1 对 BUC 细胞迁移与侵袭能力的影响

3 讨论

尽管 TURBT 被认为是 NMIBC 手术治疗的金标准[1],但术后高复发率和肿瘤进展现象时有报道:NMIBC 患者中有 27%~78%在术后出现肿瘤复发;并且 10.3%~35%的 NMIBC 在 TURBT 术后表现出病理进展或升级[2-4]。由此可见,即使采用相同的治疗策略,BUC 患者之间的预后仍存在很大差异。大量研究证实,热损伤可诱导肿瘤细胞恶性程度进展[5-7]。膀胱肿瘤等离子电切的组织切割面温度为 40~70 ℃,此原理同样可以对膀胱肿瘤细胞造成热损伤。然而,热损伤可诱导肿瘤细胞恶性程度进展的机制在 TURBT 术后肿瘤复发和进展中却未获证实。

tRFs 即应激诱导型 tRNA 片段,是细胞内最丰富的非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)来源之一[8]。细胞受到外界刺激时,tRNA 裂解成为多种 tRFs。tRFs 可与细胞内 AGO 蛋白(argonaute proteins)结合,通过调节目的 mRNA 的翻译活性,调控应激蛋白的合成以适应微环境的变化[8]。研究表明,热损伤或缺氧可以刺激肿瘤细胞产生 tRFs,从而调节癌细胞的生物学行为[16]。现已证实,高度恶性的肿瘤细胞可以通过抑制自身 tRNA 裂解来减少 tRFs 产生,从而维持其恶性生物学行为[13-14]。在此基础上,本研究对所有 BUC 细胞行热损伤处理后,筛选出于低度恶性 BUC 细胞中表达增加,但于高度恶性 BUC 细胞中表达减少的 tRFs:tRF-chrM. Ser-GCT 和 tRF-Ile-AAT-1。本研究在进一步的临床验证中,分别检测了低级别与高级别 BUC 在第 1 次和第 2 次行 TURBT 所取临床标本中 tRF-chrM. Ser-GCT 和 tRF-Ile-AAT-1 表达差异。根据上述理论,低级别 BUC 在经过第 1 次 TURBT 热损伤后,残余或复发的瘤体经由第 2 次电切获取,其可能高表达目的 tRF。而高级别 BUC 经过第 1 次 TURBT 热损伤后,残余或复发的瘤体经由第 2 次电切获取,标本中目的 tRF 表达则应下降。这即是目的 tRF 在不同级别 BUC 电切后表达差异的原因。因此,本试验在排除了两次 TURBT 术后标本中表达差异无明显变化的 tRF-chrM. Ser-GCT 之后,最终筛选出来的目的 tRF 为 tRF-Ile-AAT-1。而目前学术界对于 tRF-Ile-AAT-1 的研究尚处于空白状态,其分子生物学功能均少见报道。本研究使用 tRF-Ile-AAT-1 的 mimic 和 inhibitor 来调节其在热损伤 BUC 细胞模型中的表达水平,从增殖、凋亡、迁移和侵袭 4 个角度证实 tRF-Ile-AAT-1 具有抑制膀胱尿路上皮癌细胞的作用。

综上,本研究初步探讨 TURBT 术后 BUC 复发和恶性程度进展的部分机制。因 TURBT 可进一步诱导低级别 BUC 细胞产生 tRF-Ile-AAT-1 以抑制肿瘤进展,所以 TURBT 可能更适用于低级别 BUC。相反,对高级别 BUC 行 TURBT 可能更具有促进肿瘤进展的潜在风险。同时,本研究认为调控 tRFs 可能成为一种有前途的肿瘤基因治疗策略,尤其是用于辅助某些特定治疗,如引起细胞应激的物理治疗等。

众所周知,BUC 是一种具有高异质性的恶性肿瘤[17, 10]。近年来 BUC 的分子分型相关研究方兴未艾。这些研究进一步阐释了不同 BUC 病例之间、同一病例不同时期、甚至同一病例不同细胞之间分子分型的内在差异[18-19]。然而,由于种种原因,本研究无法将 BUC 固有分子分型的潜在差异纳入考量。如果能根据 BUC 不同的分子分型,将应激后 tRFs 在 BUC 发生、发展中扮演的角色进行严谨和深入的分析,这对于进一步探索 BUC 的精准治疗将大有裨益。

参考文献:

[1] BABJUK M, BURGER M, COMPÉRAT E M, *et al*. European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TaT1 and carcinoma in situ)-2019 update[J]. Eur Urol, 2019, 76(5): 639-657. DOI:10.1016/j.eururo.2019.08.016.

[2] BABJUK M. Second resection for non-muscle-invasive bladder carcinoma: current role and future perspectives[J]. Eur Urol, 2010, 58(2): 191-192. DOI:10.1016/j.eururo.2010.04.019.

[3] SHIM J S, CHOI H, NOH T I, *et al*. The clinical significance of a second transurethral resection for T1 high-grade bladder cancer: Results of a prospective study[J]. Korean J Urol, 2015, 56(6): 429-434. DOI:10.4111/kju.2015.56.6.429.

[4] MISTRETTA F A, CARRION D M, NAZZANI S, *et al*. Bladder recurrence of primary upper tract urinary carcinoma following nephroureterectomy, and risk of upper urinary tract recurrence after ureteral stent positioning in patients with primary bladder cancer[J]. Italian J Urol Nephrol, 2019, 71(3): 191-200. DOI:10.23736/S0393-2249.19.03311-3.

[5] CHEN H, MA G, WANG X Y, *et al*. Time interval after heat stress plays an important role in the combination therapy of hyperthermia and cancer chemotherapy agents[J]. Int J Hyperthermia, 2020, 37(1): 254-255. DOI: 10.1080/02656736.2020.1736343.

[6] CHEN S Y, LIU M Y, HUANG H M, *et al*. Heat stress-induced multiple multipolar divisions of human cancer cells[J]. Cells, 2019, 8(8): E888. DOI:10.3390/cells8080888.

[7] BLESSING N A, KASTURIRANGAN S, ZINK E M, *et al*. Osmotic and heat stress-dependent regulation of MLK4β and MLK3 by the CHIP E3 ligase in ovarian cancer cells[J]. Cell Signal, 2017, 39: 66-73. DOI:10.1016/j.cellsig.2017.07.021.

[8] KIM H K, FUCHS G, WANG S C, *et al*. A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis[J]. Nature, 2017, 552(7683): 57-62. DOI:10.1038/nature25005.

[9] SCHORN A J, GUTBROD M J, LEBLANC C, *et al*. LTR-retrotransposon control by tRNA-derived small RNAs[J]. Cell, 2017, 170(1): 61-71.e11. DOI:10.1016/j.cell.2017.06.013.

[10] TORAB P, YAN Y, YAMASHITA H, *et al*. Three-dimensional microtumors for probing heterogeneity of invasive bladder cancer[J]. Anal Chem, 2020, 92(13): 8768-8775. DOI:10.1021/acs.analchem.0c00057.

[11] ZHANG L J, WU B, ZHA Z L, *et al*. Clinicopathological factors in bladder cancer for cancer-specific survival outcomes following radical cystectomy: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 716. DOI:10.1186/s12885-019-5924-6.

[12] LOPEZ-BELTRAN A, HENRIQUES V, MONTIRONI R, *et al*. Variants and new entities of bladder cancer[J]. Histopathology, 2019, 74(1): 77-96. DOI:10.1111/his.13752.

[13] GOODARZI H, LIU X H, NGUYEN H C, *et al*. Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression *via* YBX1 displacement[J]. Cell, 2015, 161(4): 790-802. DOI:10.1016/j.cell.2015.02.053.

[14] HUANG B Q, YANG H P, CHENG X X, *et al*. tRF/miR-1280 suppresses stem cell-like cells and metastasis in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2017, 77(12): 3194-3206. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-3146.

[15] CHENG J W, LI M X, LV Y. Sublethal heat treatment promotes epithelial-mesenchymal transition and enhances the malignant potential of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2014, 59(4): 1650. DOI:10.1002/hep.26630.

[16] CHEN Y Y, SHEN J. Mucosal immunity and tRNA, tRF, and tiRNA[J]. J Mol Med (Berl), 2021, 99(1): 47-56. DOI:10.1007/s00109-020-02008-4.

[17] HUANG H M, LI H X. Tumor heterogeneity and the potential role of liquid biopsy in bladder cancer[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(2): 91-108. DOI:10.1002/cac2.12129.

[18] MORERA D S, HASANALI S L, BELEW D, *et al*. Clinical parameters outperform molecular subtypes for predicting outcome in bladder cancer: results from multiple cohorts, including TCGA[J]. J Urol, 2020, 203(1): 62-72. DOI:10.1097/JU.0000000000000351.

[19] SJÖDAHL G, JACKSON C L, BARTLETT J M, *et al*. Molecular profiling in muscle-invasive bladder cancer: more than the sum of its parts[J]. J Pathol, 2019, 247(5): 563-573. DOI:10.1002/path.5230.

(**收稿**:2021-01-14;**修回**:2021-04-30)

(编辑 汪勤俭)