

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.18.003

miR-345 靶向调控 TGM1 抑制膀胱癌的初步研究*

雷永华 王 磊 赵致广 张 伟 付晓亮[△]

(空军军医大学唐都医院 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨 miR-345 调控 TGM1 表达影响膀胱癌的分子生物学机制。**方法:**首先,采用 RT-qPCR 检测 T24 和 RT4 细胞中 miR-345、TGM1 的表达;再采用 miRNA-NC、miR-345 mimic、NC inhibitor、miR-345 inhibitor、control siRNA、siTGM1 和 pc-DNA3.1/TGM1 等转染膀胱癌细胞;然后,采用 MTT 实验检测细胞增殖,Transwell 实验检测细胞侵袭,流式细胞仪检测细胞凋亡,双荧光报告酶检测 miR-345 的靶基因;最后,采用 Western blot 检测 TGM1 在细胞中的表达。**结果:**miR-345 在 T24 和 RT4 细胞中表达低于正常细胞($P<0.05$)。miR-345 过表达时,T24 和 RT4 细胞的增殖侵袭能力减弱,细胞凋亡率上升;miR-345 表达沉默时,细胞增殖和侵袭能力增强,细胞凋亡率下降。双荧光报告基因检测结果显示 TGM1 为 miR-345 的靶基因,miR-345 过表达抑制 TGM1 的表达($P<0.05$);miR-345 表达沉默时则表达上调($P<0.05$)。当 TGM1 表达沉默时,T24 和 RT4 细胞的增殖和侵袭能力减弱,细胞凋亡率上升;TGM1 过表达时该细胞的增殖和侵袭能力增强,细胞凋亡率下降。**结论:**miR-345 通过下调靶基因 TGM1 的表达,抑制膀胱癌细胞的增殖、侵袭并促进细胞凋亡。

关键词:miR-345;TGM1;膀胱癌;细胞侵袭**中图分类号:**R-33;R737.14 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)18-3412-08

miR-345 Inhibits the Bladder Cancer by Inhibiting Target Gene TGM1*

LEI Yong-hua, WANG Lei, ZHAO Zhi-guang, ZHANG Wei, FU Xiao-liang[△]

(Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To explore the molecular mechanism of miR-345-regulated bladder cancer through targeting TGM1. **Methods:** First, the expression of miR-345 and TGM1 in T24 or RT4 were detected by RT-qPCR. Then, the miRNA-NC, miR-345 mimic, NC-inhibitor, miR-345 inhibitor, control siRNA, siTGM1 and pc-DNA3.1/TGM1 were transfected into the bladder cancer cells. The proliferation and invasion was detected by MTT assay and Transwell assay, respectively. The flow cytometry was used to detect the apoptosis of the cells. The target gene of miR-345 was detected by Double fluorescent reporter. Finally, the protein expression of TGM1 in cells was detected by Western blot. **Results:** The expression of miR-345 in T24 and RT4 cells were lower than in normal cells. The abilities of proliferation and invasion of T24 and RT4 cells were decreased and the apoptosis rates were increased when miR-345 was overexpressed. While the expression of miR-345 was silenced, the abilities of proliferation and invasion were enhanced, and the apoptosis rates were decreased. We found that TGM1 was the target gene of miR-345 by Dual fluorescent reporter, and the expression of TGM1 was inhibited by the overexpression of miR-345 ($P<0.05$), the expression was up-regulated when the expression of miR-345 was silenced ($P<0.05$). The abilities of proliferation and invasion of T24 and RT4 cells were decreased, and the apoptosis rates were increased. The abilities of proliferation and invasion were increased, and the apoptosis rates were decreased when the TGM1 was overexpressed. **Conclusions:** miR-345 inhibits the proliferation, invasion and apoptosis of bladder cancer cells by decreasing the expression of target gene TGM1.

Key words: miR-345; TGM1; Bladder cancer; Cell invasion**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R737.14 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2018)18-3412-08

前言

膀胱癌是一种较为常见的泌尿生殖系统恶性肿瘤,其发病率在不断攀升。Chen 等^[1]报道显示 2005 年我国膀胱癌的发病病例数已超过 8 万,死亡病例数接近 3.3 万。膀胱癌的特性为多中心、易侵袭、易耐药及术后易复发,患者初次手术治疗复发率高达 50%~70%,部分治疗患者肿瘤恶性程度加重,癌细胞发

生侵袭及迁移^[2]。目前的手术治疗方式及多种化疗非手术治疗疗效仍较差,并且目前仍未有公认且普遍使用的诊断及预后评估标记物^[3]。此外,对膀胱癌的发病机制的研究也非常匮乏,深入研究其发病机制将为该疾病的诊断、预后评估及其治疗提供理论基础。

近年来的研究显示多种 miRNA 表达异常与膀胱癌的发生发展具有紧密联系,前期的研究显示 miR-345 在膀胱癌细胞中

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81700666)

作者简介:雷永华(1985-),本科,研究方向:泌尿系统疾病微创治疗,电话:17791733939, E-mail: Leiyonghuatangdu@163.com

[△] 通讯作者:付晓亮(1982-),研究方向:泌尿生殖系肿瘤, E-mail: 13319285621@163.com

(收稿日期:2018-04-08 接受日期:2018-04-30)

表达异常,但其与膀胱癌之间的联系尚不完全清楚。但多项研究显示 miR-345 参与多种肿瘤的发生发展,如胃癌、非小球肺癌、胶质瘤、胰腺癌等。miRNA 主要通过调控靶基因的表达发挥功能,我们通过生物信息学分析检索 miR-345 的潜在靶向调控基因,通过分子生物学研究分析两者的调控关系以及对膀胱癌细胞生命活动的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

HBdMEC 人膀胱微血管内皮细胞、T24、RT4 人膀胱癌细胞均购于上海艾睿生物科技有限公司。U6、miR-345、GAPDH、TGM1 等引物由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.2 细胞培养

以 HBdMEC、T24、RT4 等细胞系做为研究材料,以含有 10%胎牛血清及 100 μ mol/L 链霉素 / 青霉素细胞完全培养基培养细胞,将细胞置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,以生长状态良好的细胞进行研究。

1.3 细胞转染

在上海吉玛制药技术有限公司合成 miRNA-NC、miR-345 mimic、NC inhibitor、miR-3188 inhibitor 以及 siTGM1 等,采用 Lipofectamine2000 脂质体将上述核苷酸片段以推荐浓度 20 nM 转染 T24 或 RT4 细胞,转染细胞后继续培养 24 h,以 RT-qPCR 检测细胞转染效率。

1.4 细胞总 RNA 提取

将细胞收集后转移至新的 RNase free 离心管中,向离心管中加入 1 mL Trizol,剧烈震荡,取 0.2 mL 预冷氯仿加入其中再次震荡混匀,静置 5 min,于冷冻高速离心机中以 12000 rpm 离心 15 min,吸取上清转移至新 RNase free 离心管,加入 1/2 体积的预冷异丙醇震荡混匀,冰箱或冰上静置 10 min,于冷冻离心机中再次离心 10 min,去除上清,随即用 75%预冷乙醇洗涤两次,离心机中离心 1 min,吸除剩余乙醇,超净工作台中吹干,加入 RNase free 水溶解并混匀,测定细胞总 RNA OD260/280 及核酸浓度,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 合成 cDNA 及实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

取 1 μ g 细胞总 RNA,利用 M-MLV 逆转录试剂盒或 Taq-Man microRNA 逆转录试剂盒逆转录 mRNA 或 miRNA,利用 Power SYBR Green PCR Master Mix 进行荧光定量 PCR 检测。检测程序为:95 $^{\circ}$ C,10 s;55 $^{\circ}$ C,15 s;72 $^{\circ}$ C,30 s;45 个循环。内参分别为 GAPDH 和 U6。

1.6 细胞增殖(MTT)实验

以方法 1.2 培养待检测细胞,培养结束后酶解为单细胞,将细胞悬液接种在 96 孔板中,以正常细胞培养条件继续培养,在细胞培养 24 h、48 h 和 72 h 时,利用全自动荧光酶标仪检测细胞悬液的吸光值,测定波长为 490 nm,记录检测结果并绘制细胞生长曲线。

1.7 细胞侵袭实验

将待检测的细胞悬液接种于 24 孔板中,置于培养箱中培养过夜,待细胞培养至融合度约为 70%时进行细胞转染,取孔径大小为 8 μ m 的 PET 膜小室置于 24 孔板中,并在小室底部加入经过稀释的 Matrigel 胶(8:1),将需检测的细胞于 200 μ L 无血清培养基中重悬,转入培养室的上孔中,下孔中加入完全

培养以作为趋化物,将 24 孔板置于 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养,培养 24 h 后,将上室中未发生侵袭的细胞擦除,再利用浓度为 0.1%的结晶紫溶液染色,记录实验结果并统计。

1.8 细胞凋亡实验

收集培养的细胞并悬浮,600 rpm 离心 5 min,弃去上清;利用孵育缓冲液洗涤 1 次,再次离心 5 min,加入 0.1 mL 标记液重悬,于常温下孵育 15 min;600 rpm 离心 5 min 后用孵育缓冲液再次洗涤 1 次;随后加入荧光溶液置于 4 $^{\circ}$ C 条件下避光处理 20 min,每隔 5 min 振动一次;利用流式细胞仪检测细胞凋亡,激发光波长为 488 nm,用 515 nm 通带滤器检测 FITC 荧光,560 nm 滤器检测 PI,随后统计细胞凋亡。

1.9 结合位点预测

miR-345 靶基因的预测分析软件为: microRNA.org-Targets and Expression (<http://34.236.212.39/microna/microna/getGeneForm.do>) 以及 Target Scan Human 7.1 (http://www.targetscan.org/vert_71/),并利用该系统分析 miR-345 与靶基因 TGM1 的结合位点。

1.10 双荧光酶报告检测

将 TGM1 的 miR-345 预测靶点序列或突变序列 3'-UTR 构建于 pmirGLO 载体。突变 TGM1 序列以正常 TGM1 3'-UTR 序列为模板,对两者预测结合位点进行点突变。利用 Dharm-FECT Duo 试剂将 miRNA-NC、miR-345mimic、NC inhibitor 或 miR-345inhibitor 分别与不同载体转染待检测细胞,置于 5% CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h,采用 Dual-Glo Luciferase 分析系统检测并统计实验结果。

1.11 蛋白提取定量及 Western blot 检测

按方法 1.2 培养细胞,培养 48 h 后收集细胞,加入 RIPA 试剂裂解,混匀后于冰上孵育 20 min,4 $^{\circ}$ C 离心机中 12000 rpm 离心 15 min,保留上清弃去沉淀。首先用 BCA 法检测 TGM1 蛋白浓度。将蛋白与加样缓冲液混合均匀后加热变性,利用 SDS-PAGE 方法分离 TGM1 蛋白;电泳后利用转膜缓冲液电泳转移至醋酸纤维膜;结束转膜进行封闭处理,利用 TBST 缓冲液配制 5%脱脂奶粉,常温条件下处理 1 h;一抗 TGM1 孵育过夜,浓度为 1:500,孵育条件为 4 $^{\circ}$ C;一抗孵育后利用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min;再以 1:10000 浓度的 IgG 标记的羊抗兔二抗常温孵育 1 h;用 TBST 再次洗涤 3 次,每次洗涤 5 min,在膜上加入 ECL 显影液,显影并拍照,GAPDH 作为内参。

1.12 统计学分析

采用 SPSS19.0 数据统计软件处理数据结果。本研究以平均值 $\pm$ 标准差表示所有统计数据,采用 Student's t 检验以及单因素方差分析(ANOVA)统计并分析,以 P 值小于 0.05 时为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱内皮细胞与膀胱癌细胞中 miR-345 的表达差异

为了分析 miR-345 在膀胱癌中的具体生物功能,首先分析其在该癌细胞中的表达变化。利用 RT-qPCR 检测 miR-345 在 T24 和 RT4 膀胱癌细胞中的表达,结果显示(如图 1),与正常膀胱细胞相比,T24 膀胱癌细胞中 miR-345 的表达下降约 2.8 倍(P<0.05),RT4 细胞中表达下降约 3.7 倍(P<0.05),上述结果表明 miR-345 与膀胱癌发生发展具有非常紧密的联系。

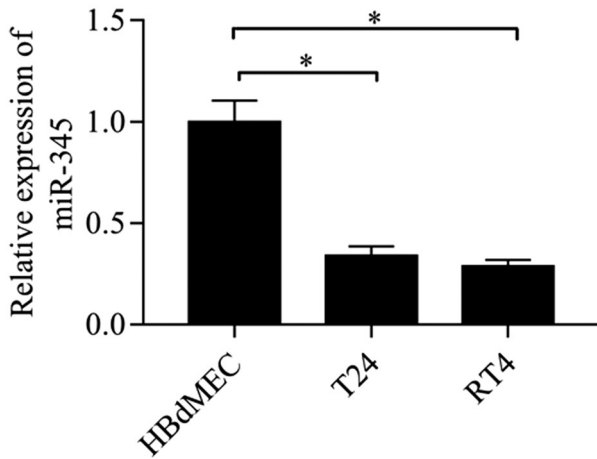


图 1 miR-345 在膀胱癌细胞中的相对表达

Fig.1 Relative expression of miR-345 in the bladder cancer cells

Note: * $P < 0.05$, compared with group HBdMEC.

2.2 miR-345 对 T24 和 RT4 细胞增殖和侵袭的影响

由上述结果可知,在膀胱癌细胞中 miR-345 的表达呈现明

显的下降趋势,因此认为 miR-345 的表达变化与膀胱癌的发生发展相关,故本研究利用 miRNA-NC、miR-345mimic、NC inhibitor 或 miR-345 inhibitor 分别转染 T24 或 RT4 细胞,深入了解 miR-345 对膀胱癌细胞增殖和侵袭的影响。结果显示(图 2A),与 miRNA-NC 组相比,miR-345 在 T24 和 RT4 细胞中的表达显著上升($P < 0.01$);与 NC inhibitor 组相比,miRNA-345 在两细胞系中的表达水平显著下降($P < 0.05$)。MTT 实验结果显示(图 2B),miR-345 mimic 组的 T24 和 RT4 细胞增殖能力都显著低于 miRNA-NC 组 ($P < 0.05$);miR-345 inhibitor 组的 T24 和 RT4 细胞增殖能力都明显高于 NC inhibitor 组 ($P < 0.05$),表明 miR-345 可抑制膀胱癌细胞的增殖。细胞侵袭实验显示(图 2C、D),与 miRNA-NC 组相比,miR-345 mimic 组发生侵袭的细胞数量显著偏低;与 NC inhibitor 组相比,miR-345 inhibitor 组发生侵袭的细胞数量明显增加,差异具有统计学差异($P < 0.05$),表明膀胱癌细胞的侵袭能力受 miR-345 抑制。该研究结果表明 miR-345 可抑制膀胱癌细胞的增殖及侵袭,miR-345 的表达水平与该细胞的增殖和侵袭能力呈负相关。

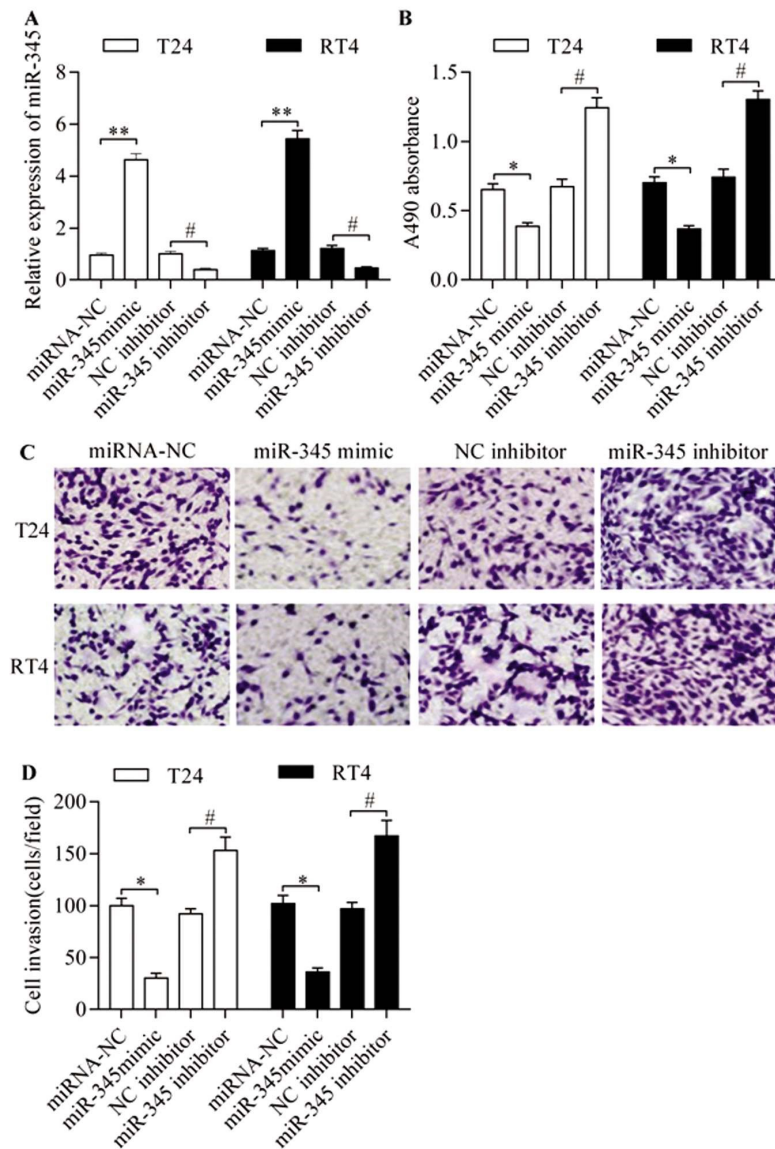


图 2 miR-345 对膀胱癌细胞增殖和侵袭的调控

Fig.2 Regulation of miR-345 on the proliferation and invasion of bladder cancer cells

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with group miRNA-NC; # $P < 0.05$, compared with group NC inhibitor.

2.3 miR-345 对 T24 和 RT4 细胞凋亡的影响

癌症的恶化一般为癌细胞的恶性增殖及细胞程序性凋亡异常有密切关系,因此本研究分析了 miR-345 对膀胱癌细胞凋亡的影响。结果显示(图 3):与 miRNA-NC 组相比,当 miR-345

在膀胱癌细胞中过表达时,T24 与 RT4 细胞的凋亡率显著上升($P<0.01$);与 NC inhibitor 组相比,当 miR-345 表达沉默时,细胞凋亡率显著下降($P<0.05$)。该研究结果表明 miR-345 对癌细胞凋亡具有明显促进作用。

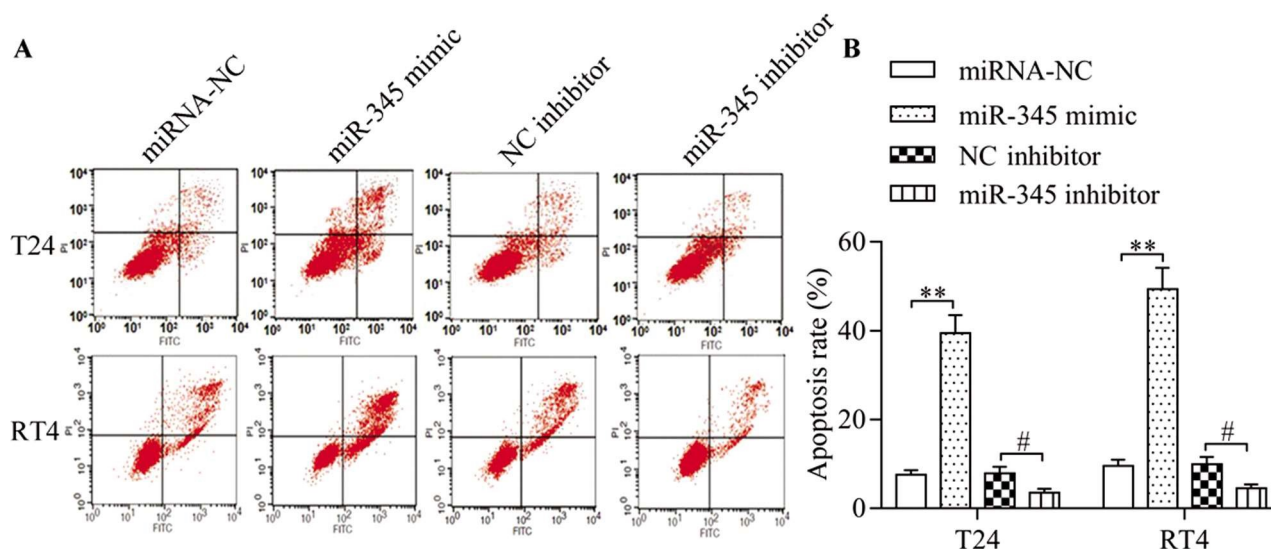


图 3 miR-345 对膀胱癌细胞凋亡的影响

Fig.3 Regulation of miR-345 on the apoptosis of bladder cancer cells

Note: ** $P<0.01$, compared with group miRNA-NC; # $P<0.05$, compared with group NC inhibitor.

2.4 miR-345 靶向调控 TGM1

miRNAs 为非编码单链核苷酸,其作用的发挥依赖于对功能基因的转录后表达调控,影响细胞的生命活动。因此利用生物信息学分析预测了成熟 miR-345 的靶向调控基因,结果显示(图 4A) 在 TGM1 mRNA 的 3'-UTR 区域含有一个 miR-345 结合位点。因此,本研究通过构建野生型(WT-UTR)和 3'-UTR 突变(MT-UTR)的 TGM1 基因荧光报告载体,验证上述位点是否为 miR-345 的直接结合位点,结果显示(图 4B) 在 TGM1 WT-UTR 荧光报告载体转染细胞系中,与 miRNA-NC 转染细胞组相比,miR-345 mimic 转染细胞组的细胞荧光活性下降约 48%($P<0.05$);与 NC inhibitor 转染细胞组相比,miR-345 inhibitor 转染细胞组的细胞荧光活性上升约 40%($P<0.05$)。在 TGM1 MT-UTR 荧光报告载体转染的细胞系中,与 miRNA-NC 转染细胞组相比,miR-345 mimic 转染细胞组的细胞荧光活性无显著差异($P>0.05$);与 NC inhibitor 转染细胞组相比,miR-345 inhibitor 转染细胞组的细胞荧光活性也无明显差异($P>0.05$),说明 miR-345 可与 TGM1 mRNA 的 3'-UTR 特异并稳定结合。该研究结果表明 TGM1 可能是 miR-345 的一个潜在靶向调控基因。

2.5 miR-345 通过调控 TGM1 的表达影响膀胱癌细胞的侵袭和增殖

通过荧光报告载体分析得出 TGM1 表达可能受 miR-345 的靶向调控,因此利用 RT-qPCR 和 Western blot 对上述结果进行验证。利用 miRNA-NC、miR-345 mimic、NC inhibitor 及 miR-345 分别转染 T24 或 RT4 细胞,检测细胞中 TGM1 的表达变化,结果显示(图 5),当 miR-345 过表达时,TGM1 的表达水平与 miRNA-NC 组相比显著下调($P<0.05$);当 miR-345 表达沉默时,TGM1 表达水平与 NC inhibitor 组相比显著上调($P<0.05$)。

05)。该研究结果表明 miR-345 可抑制 TGM1 在膀胱癌细胞中的表达。

随之又分析了 TGM1 对膀胱癌细胞增殖及侵袭能力的影响。利用 pc-DNA3.1 空载(control 组)、pc-DNA3.1/TGM1、control siRNA 和 siTGM1 分别转染 T24 和 RT4 细胞,检测细胞转染后 TGM1 的表达水平,结果显示(图 6A)与 control 组相比,

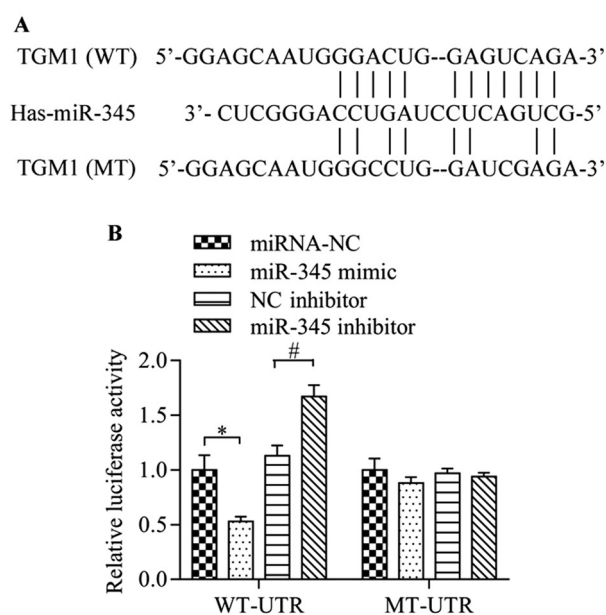


图 4 miR-345 对 TGM1 WT-3'UTR 和 mut-3'UTR 双荧光酶报告载体荧光活性的影响

Fig.4 Effect of miR-345 on the fluorescent activity of TGM1 WT-3'UTR and mut-3'UTR Dual-Luciferase reporter vector

Note: * $P<0.05$, compared with group miRNA-NC; # $P<0.05$, compared with group NC inhibitor.

pc-DNA3.1/TGM1 组 TGM1 的表达水平显著上调 ($P<0.05$); 与 control siRNA 转染细胞相比, siTGM1 转染组 TGM1 表达水平显著下调 ($P<0.05$)。并研究分析膀胱癌细胞在不同 TGM1 表达水平下的增殖及侵袭能力, 结果显示当 TGM1 过表达时, 膀胱癌细胞的增殖(图 6B)及侵袭(图 6C、D)能力明显增强 ($P<0.05$); 同时, 当 TGM1 表达沉默时, 膀胱癌细胞的增殖(图 6B)及侵袭(图 6C、D)能力明显减弱 ($P<0.05$)。该研究结果表明 TGM1 对膀胱癌细胞的增殖及侵袭有促进作用。

2.6 TGM1 对膀胱癌细胞凋亡的影响

研究分析了 TGM1 对膀胱癌细胞凋亡的影响, 结果显示(图 7), 当 TGM1 过表达时, 与 control 相比, T24 细胞和 RT4 细胞的凋亡率都显著下降 ($P<0.05$); 当 TGM1 表达沉默时, T24 细胞和 RT4 细胞的凋亡率都明显上升 ($P<0.01$)。该研究结果表明 TGM1 对癌细胞凋亡可能具有抑制作用。综上, 在膀胱癌细胞中, TGM1 表达受 miR-345 抑制, 从而抑制癌细胞的增殖、侵袭并促进细胞凋亡。

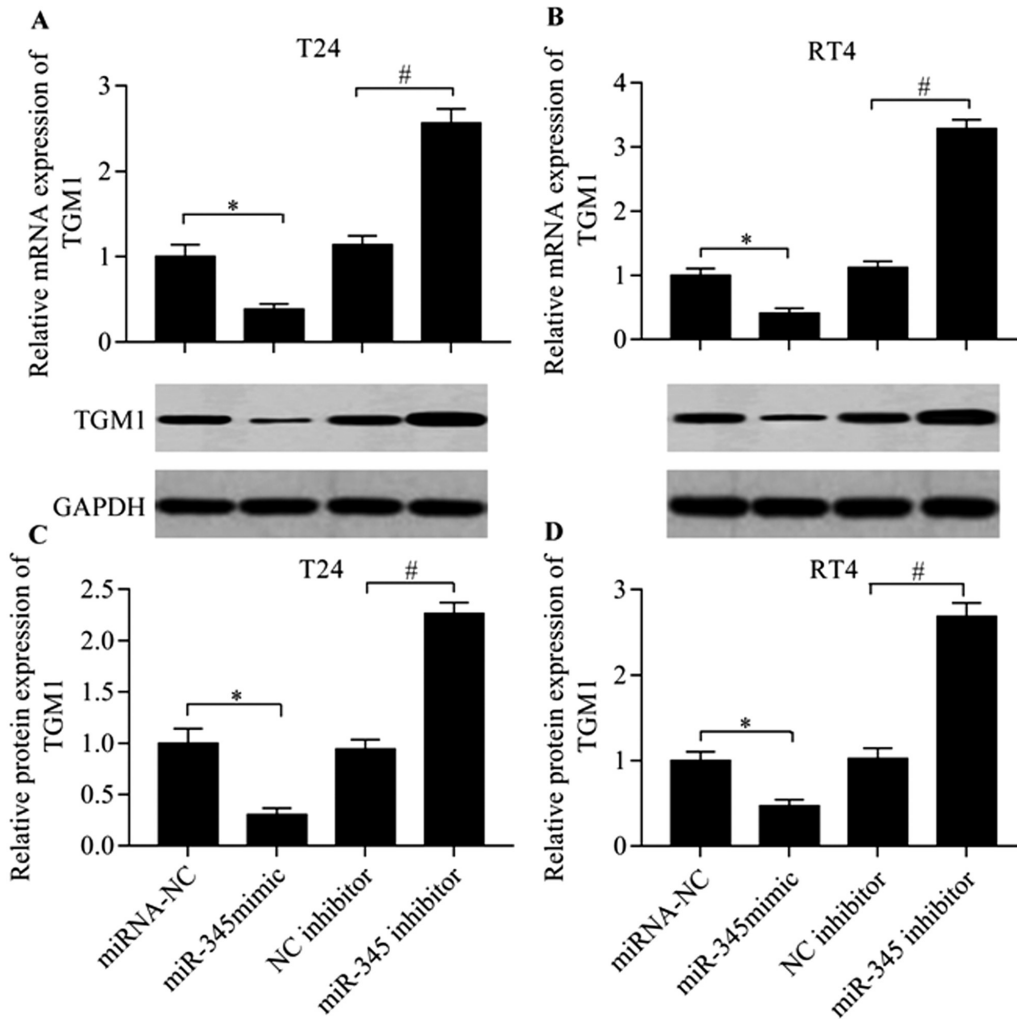


图 5 miR-345 对 TGM1 表达的影响

Fig.5 Effect of miR-345 on the expression of TGM1

Note: * $P<0.05$ compared with group miRNA-NC; # $P<0.05$, compared with group NC inhibitor.

3 讨论

在真核生物中, miRNAs 种类繁多多样, 其表达具有高度保守性、组织特异性以及时序性, miRNAs 并不表达功能蛋白, 主要以调控基因的表达以发挥对细胞生命活动的调控^[4]。近年来的研究显示某些 miRNAs 与肿瘤的发生发展具有紧密联系, 并且其表达具有特异性, 如在肺癌、乳腺癌、甲状腺乳头状癌及结肠癌等组织或细胞中都有特定的 miRNA 表达异常^[23,5-7]。本研究结果显示 miR-345 在膀胱癌细胞中表达异常, 并且目前尚未发现其他 miR-345 在膀胱癌中表达异常的相关报道。

Feng 等^[8]研究报道在胃癌细胞中 miR-345 中表达显著下

降, 当胃癌患者组织中 miR-345 表达水平较低时, 患者的存活率会显著降低; 体外研究显示 miR-345 能够明显抑制胃癌细胞的迁移和侵袭, miR-345 在上述细胞中可以抑制细胞的分化, 并且其靶基因为 FOXQ1。Ma 等^[9]研究显示在非小球肺癌细胞 A549/GR 中 miR-345 的表达水平显著低于正常细胞, 并通过胰岛素生长因子受体 1 信号途径, 参与吉非替尼耐药性。Zhang 等^[10]报道显示 miR-345 在肝细胞癌中的表达与正常肝细胞相比显著下降, 当 miR-345 在肝癌细胞中过表达时, 可显著抑制细胞的迁移和侵袭, 而其表达沉默时, 癌细胞的新陈代谢活性显著上调, 并且其靶基因为 YAP1, miR-345 通过抑制 YAP1 表达抑制肝癌细胞的新陈代谢活性。Oikawa 等^[11]研究表明

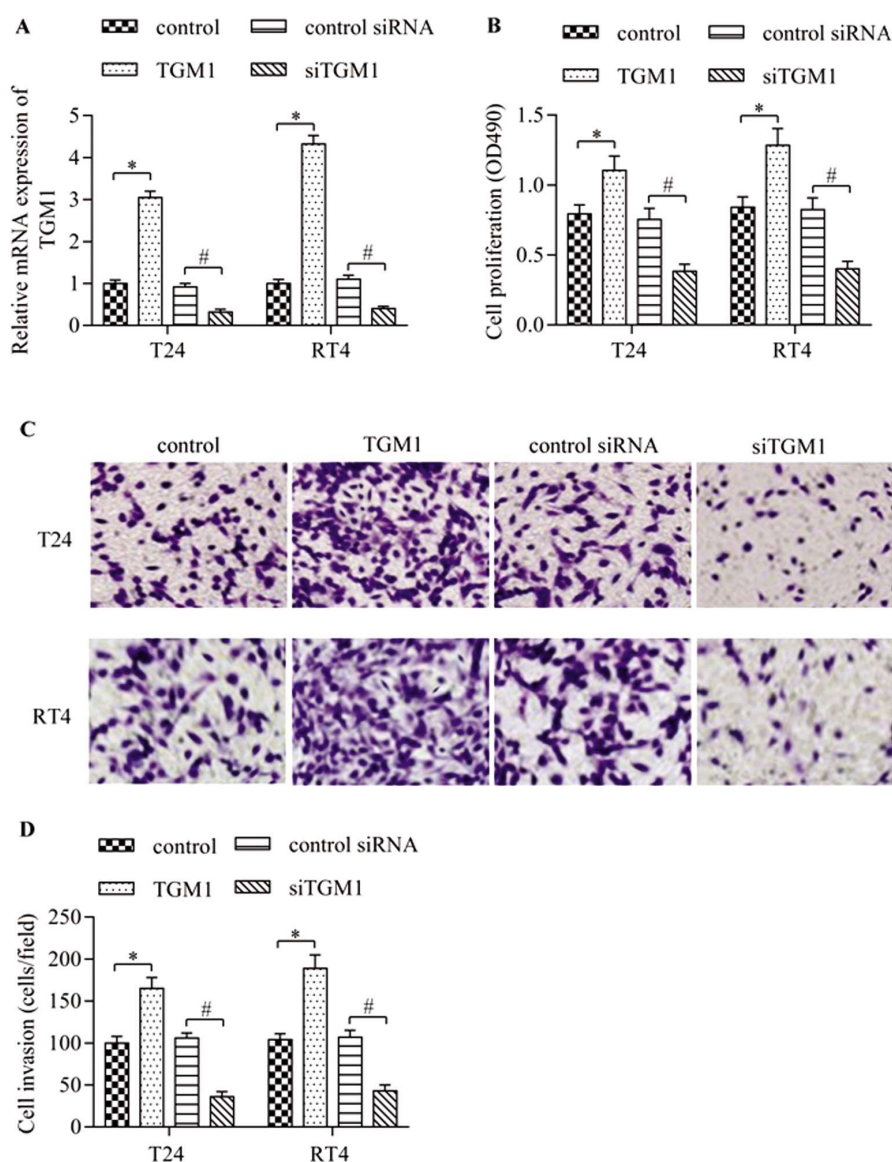


图6 TGM1对膀胱癌细胞增殖和侵袭的调控

Fig.6 Regulation of TGM1 on proliferation and invasion of bladder cells

注:与 control 组相比,* $P<0.05$;与 control siRNA 组相比,# $P<0.05$ 。Note: * $P<0.05$ compared with group control; # $P<0.05$, compared with group control siRNA.

miR-345 参与心脏节律的调控,抑制心脏细胞中胆碱乙酰转移酶的表达。另有研究显示 miR-345 在胶质瘤细胞中表达异常,并且其表达水平与胶质瘤患者的生存具有一定联系,miR-345 在胶质瘤中的表达呈现下降趋势,表达水平越低,患者的生存时间越短^[12]。Yu 等^[13] 研究显示在原发性肝细胞癌细胞中,miR-345 的表达水平比正常细胞偏低,当该疾病患者中肝癌细胞中的 miR-345 表达缺失时,该疾病的治愈可能性非常低;miR-345 在原发性肝癌细胞中恢复表达时,癌细胞的侵袭和侵袭能力显著下降,在小鼠中,miR-345 过表达时会显著抑制癌细胞向肺转移。Srivastava 等^[14] 研究表明 miR-345 在胰腺癌组织和细胞系中的表达水平显著下降;当 miR-345 在胰腺癌细胞系中过表达时,细胞的增殖能力显著下降,同时细胞凋亡率明显上升,在该细胞中 miR-345 的靶向调控基因为 BCL-2,当 BCL-2 过表达时可逆转 miR-345 过表达对胰腺癌细胞生长增殖的抑制作用。Chen 等^[15] 报道显示在前列腺癌临床组织和细

胞系中,miR-345 的表达显著下降,其过表达可抑制前列腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,miR-345 的靶向调控基因为 Smad1,当 Smad1 的 3'-UTR 缺失时可逆转 miR-345 对癌细胞的迁移和侵袭能力的抑制作用。在本研究中,miR-345 在膀胱癌细胞中表达显著下降,并且当 miR-345 在其中过表达时,细胞的增殖和侵袭能力显著下降,细胞的凋亡率也显著上升。随后,生物信息学分析结果显示 miR-345 与 TGM1 具有结合位点,TGM1 可能为 miR-345 的潜在靶向调控基因。

TGM1 是转谷氨酰胺酶(TGM)家族成员^[16],其基因定位于染色体 14q11.2 位点,该基因长度为 14095 bp,含有 15 个外显子,编码转谷氨酰胺酶-1(TGM-1)酶,该蛋白含有 817 个氨基酸残基,其分子大小约为 89 kD^[17]。有研究显示 TGM1 可调控细胞的 Wnt/ β -catenin 信号通路活性^[16,18],当胃癌细胞中 TGM1 表达被抑制时, β -catenin 在细胞核中的积累量显著下降,同时 Wnt/ β -catenin 信号途径的转录活性也显著下调。有报道表明当

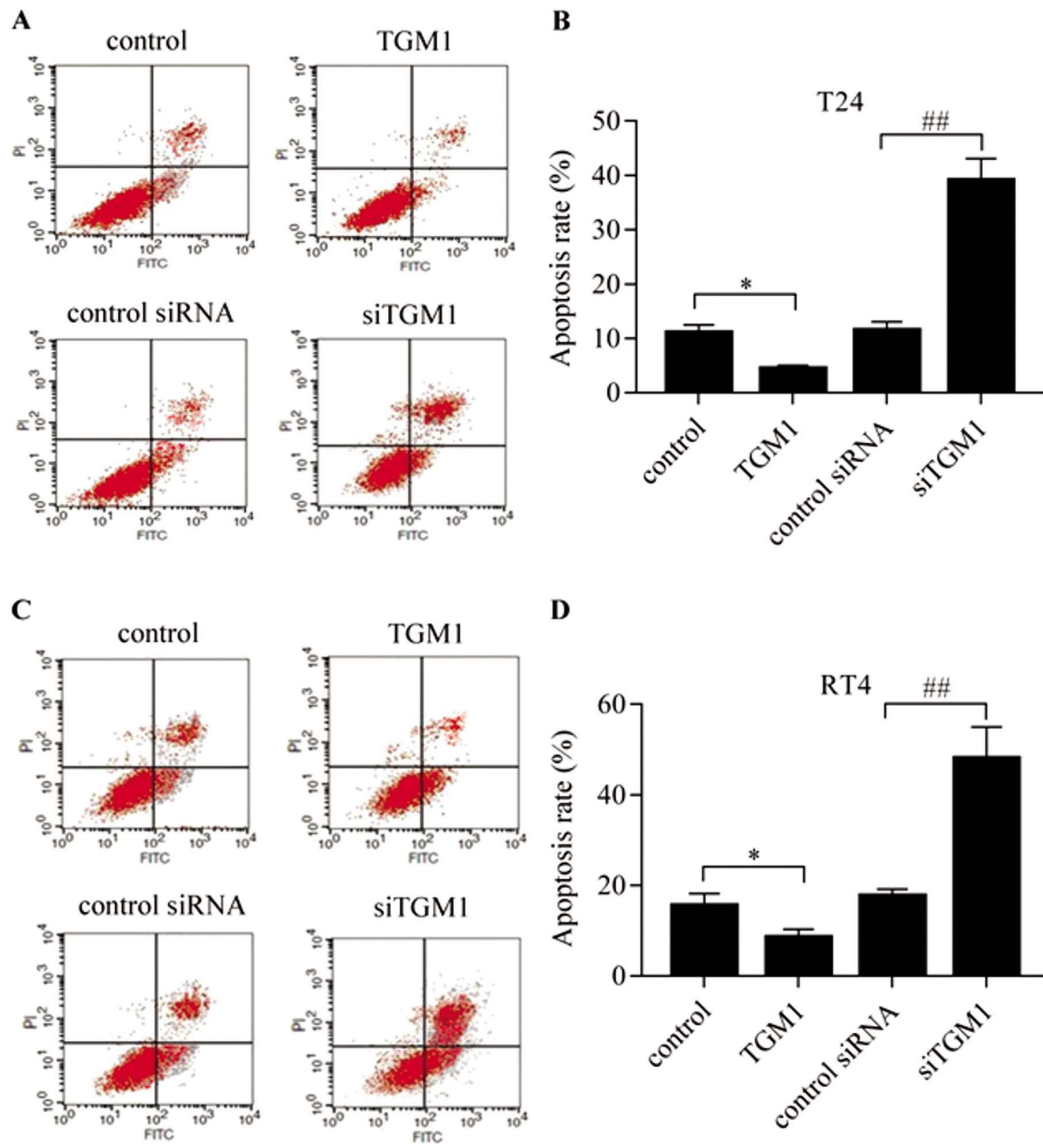


图 7 TGM1 对膀胱癌细胞凋亡的调控

Fig.7 Regulation of TGM1 on apoptosis of bladder cells

Note: * $P < 0.05$ compared with group control; ## $P < 0.01$, compared with group control siRNA.

Wnt 信号途径活性上升时,可明显促进细胞的增殖能力,同时细胞凋亡也显著下降^[19,20]。目前,关于 TGM1 对肿瘤影响的研究较少,但对 Wnt/ β -catenin 信号途径与肿瘤关系的研究较多。Kimberly 等^[21]研究显示 β -catenin 在乳腺癌细胞核中的聚积程度越高,肿瘤的恶化程度越高,同时该疾病的治愈率越低。Yu 等^[22]研究表明在肺癌细胞中 β -catenin 的表达沉默时,癌细胞的增殖和迁移能力显著下降,同时癌细胞的凋亡率上升,癌细胞中 Myc、PCNA、VEGF 等与癌症发生发展相关基因的表达活性显著下调,并激活与细胞凋亡相关的 bax/caspase-3 信号通路。Liang 等^[23]报道显示在结直肠癌中 miR-27a-3p 通过靶向调控 RXR α 表达,并影响 β -catenin 的表达活性,最终影响结肠癌的发展。Chen 等^[24]研究显示在人类结直肠癌组织及细胞中, Wnt/ β -catenin 信号途径活性异常活化,该信号途径抑制因子 FH535 表达异常,从而引起 Wnt/ β -catenin 活性异常,当 FH535 在结直肠癌细胞中过表达时, Wnt/ β -catenin 表达受抑制,细胞增殖及侵袭能力显著下降,另外 FH535 对 Wnt/ β -catenin 信号

途径下游基因 Cyclin D1 的表达活性具有显著抑制作用,同时 Cyclin D1 的 mRNA 存活时间也明显缩短,最终影响结直肠癌细胞的增殖能力。研究也表明 FH535 影响结直肠癌细胞的 DNA 复制、细胞循环和新陈代谢等生命过程。Zhang 等^[25]报道显示在胰腺神经内分泌肿瘤中,MEG3 参与调控 Wnt/ β -catenin 信号转导途径的活性,在该肿瘤细胞中 MEG3 的表达量与正常细胞相比显著下降;当 MEG3 在上述肿瘤细胞中过表达时,能够通过 miR-183 抑制 BRI3 的表达,而 BRI3 可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号途径促进肿瘤发展,因此 MEG3 作为肿瘤抑制因子抑制细胞的生长代谢。在本研究中,TGM1 表达受 miR-345 抑制而下调,当 TGM1 过表达时,膀胱癌细胞的增殖能力显著上升,细胞侵袭能力也明显增强,同时细胞凋亡率显著下降;当 TGM1 表达沉默时,膀胱癌细胞的增殖能力则明显下降,细胞侵袭能力明显减弱,细胞凋亡率显著上升。

综上,在膀胱癌细胞中,miR-345 可靶向下调 TGM1 的表达,进而抑制膀胱癌的发生发展过程。

参 考 文 献(References)

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2016, 66 (2): 115-132
- [2] He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102 (52): 19075-19080
- [3] Iorio M, Ferracin M, Liu C, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. Cancer Research, 2005, 65 (16): 7065-7070
- [4] Monteleone K, Selvaggi C, Cacciotti G, et al. MicroRNA-29 family expression and its relation to antiviral immune response and viro-immunological markers in HIV-1-infected patients [J]. Bmc Infectious Diseases, 2015, 15 (1): 51-61
- [5] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(101): 2999-3004
- [6] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis [J]. Cell, 2006, 9 (3): 189-198
- [7] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues[J]. Oncogene, 2006, 25(17): 2537-2545
- [8] Feng A, Yuan X, Li X. MicroRNA-345 inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer by targeting FOXQ1[J]. Oncology Reports, 2017, 38(5): 2752-2760
- [9] Ma W, Kang Y, Ning L, et al. Identification of microRNAs involved in gefitinib resistance of non-small-cell lung cancer through the insulin-like growth factor receptor 1 signaling pathway [J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2017, 14(4): 2853-2862
- [10] Zhang H, Liu H, Bi H. MicroRNA-345 inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by inhibiting YAP1 [J]. Oncology Reports, 2017, 38 (2): 843-849
- [11] Oikawa S, Kai Y, Mano A, et al. Various regulatory modes for circadian rhythmicity and sexual dimorphism in the Non-Neuronal cardiac cholinergic system [J]. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2017, 10(4): 435-435
- [12] Sathipati SY, Huang HL, Ho SY. Estimating survival time of patients with glioblastoma multiforme and characterization of the identified microRNA signatures[J]. Bmc Genomics, 2016, 17(13): 1022
- [13] Yu M, Xue H, Wang Y, et al. miR-345 inhibits tumor metastasis and EMT by targeting IRF1-mediated mTOR/STAT3/AKT pathway in hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Oncology, 2017, 50(3): 975-983
- [14] Srivastava SK, Bhardwaj A, Arora S, et al. MicroRNA-345 induces apoptosis in pancreatic cancer cells through potentiation of caspase-dependent and -independent pathways[J]. Br J Cancer, 2015, 113 (4): 660-668
- [15] Chen QG, Zhou W, Han T, et al. MiR-345 suppresses proliferation, migration and invasion by targeting Smad1 in human prostate cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(1): 213-224
- [16] Huang H, Chen Z, Ni X. Tissue transglutaminase-1 promotes stemness and chemoresistance in gastric cancer cells by regulating Wnt/beta-catenin signaling[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2017, 242 (2): 194-202
- [17] Herman ML, Farasat S, Steinbach PJ, et al. Transglutaminase-1 gene mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: summary of mutations (including 23 novel) and modeling of TGase-1 [J]. Hum Mutat, 2009, 30(4): 537-547
- [18] Hampton PJ, Ross OK, Reynolds NJ. Increased nuclear beta-catenin in suprabasal involved psoriatic epidermis [J]. British Journal of Dermatology, 2007, 157(6): 1168-1177
- [19] Sherwood V. WNT signaling: an emerging mediator of cancer cell metabolism?[J]. Molecular & Cellular Biology, 2015, 35(1): 2-10
- [20] Pai P, Rachagani S, Dhawan P, et al. Mucins and Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers: an unholy nexus[J]. Carcinogenesis, 2016, 37(3): 223-232
- [21] Arnold KM, Pohlig RT, Sims-Mourtada J. Co-activation of Hedgehog and Wnt signaling pathways is associated with poor outcomes in triple negative breast cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 14(5): 5285-5292
- [22] Yu W, Li L, Zheng F, et al. Beta-catenin cooperates with CREB binding protein to promote the growth of tumor cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(2): 467-478
- [23] Liang J, Tang J, Shi H, et al. miR-27a-3p targeting RXR α promotes colorectal cancer progression by activating Wnt/beta-catenin pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(47): 82991-83008
- [24] Chen Y, Rao X, Huang K, et al. FH535 inhibits proliferation and motility of colon cancer cells by targeting Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. J Cancer, 2017, 8(16): 3142-3153
- [25] Zhang YY, Feng HM. MEG3 suppresses human pancreatic neuroendocrine tumor cells growth and metastasis by down-regulation of Mir-183[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(1): 345-356