

MiR-let-7g-3p 靶向 HMGB2 调控膀胱癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡

邹震海,程琪,李中,高五岳,孙巍,刘贝贝,郭园园,刘建民
蚌埠医学院第一附属医院泌尿外科,安徽 蚌埠 233004

摘要:目的 探讨 MiR-let-7g-3p 靶向 HMGB2 对膀胱癌细胞生物学行为的影响及其分子机制。方法 通过 qRT-PCR 检测膀胱癌组织和癌旁组织以及正常尿路上皮细胞 SV-HUC-1 和膀胱癌细胞(T24、5637 和 EJ)中 let-7g-3p 的表达水平;通过转染过表达或敲低 T24 细胞 let-7g-3p 表达,检测细胞增殖、迁移和侵袭、和凋亡等变化;对过表达 let-7g-3p 的细胞进行转录组测序,结合生物信息学分析,通过双荧光素酶报告实验、qRT-PCR 和 Western-blot 分析 let-7g-3p 靶向负性调控 HMGB2 基因;qRT-PCR 检测正常尿路上皮细胞和膀胱癌细胞(T24、5637 和 EJ)中 HMGB2 的表达水平,并且在敲低 HMGB2 的细胞株中,敲低 let-7g-3p,检测细胞生物学行为改变。结果 qRT-qPCR 证实 let-7g-3p 在膀胱癌组织和细胞表达明显下调($P<0.01$);过表达 let-7g-3p 可抑制细胞增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡($P<0.01$);相反,敲低 let-7g-3p 表达可促进细胞增殖、迁移和侵袭,抑制细胞凋亡($P<0.01$)。生物信息学和转录组测序结果显示, HMGB2 是 let-7g-3p 作用于膀胱癌细胞的关键分子;双荧光素酶报告实验、qRT-PCR 和 Western blot 显示, HMGB2 受 let-7g-3p 的负性调控;HMGB2 膀胱癌细胞中表达水平均明显上调($P<0.01$),敲低 HMGB2 可部分逆转敲低 let-7g-3p 对膀胱癌细胞生长的促进作用。结论 MiRNA-let-7g-3p 通过靶向负性调控 HMGB2 基因抑制膀胱癌细胞的生物行为。
关键词: let-7g-3p; HMGB2 基因;膀胱肿瘤

microRNA let-7g-3p regulates proliferation, migration, invasion and apoptosis of bladder cancer cells by targeting HMGB2

ZOU Zhenhai, CHENG Qi, LI Zhong, GAO Wuyue, SUN Wei, LIU Beibei, GUO Yuanyuan, LIU Jianmin
Department of Urology, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism by which microRNA let-7g-3p regulates biological behaviors of bladder cancer cells. **Methods** The expression levels of let-7g-3p in bladder cancer and adjacent tissues, normal bladder epithelial cells (HUC cells) and bladder cancer cells (T24, 5637 and EJ cells) were detected using qRT-PCR. T24 cells were transfected with let-7g-3p mimic or inhibitor, and the changes in cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis were examined. Transcriptome sequencing was carried out in cells overexpressing let-7g-3p, and the results of bioinformatics analysis, double luciferase reporter gene assay, qRT-PCR and Western blotting confirmed that HMGB2 gene was the target gene of let-7g-3p. The expression of HMGB2 was examined in HUC, T24, 5637 and EJ cells, and in cells with HMGB2 knockdown, the effect of let-7g-3p knockdown on the biological behaviors were observed. **Results** qRT-qPCR confirmed that let-7g-3p expression was significantly lower in bladder cancer tissues and cells ($P<0.01$). Overexpression of let-7g-3p inhibited cell proliferation, migration and invasion, and promoted cell apoptosis, while let-7g-3p knock-down produced the opposite effects. Bioinformatics and transcriptome sequencing results showed that HMGB2 was the key molecule that mediate the effect of let-7g-3p on bladder cancer cells. Luciferase reporter gene assay, qRT-PCR and Western blotting all confirmed that HMGB2 was negatively regulated by let-7g-3p ($P<0.01$). Knocking down HMGB2 could partially reverse the effect of let-7g-3p knockdown on the biological behaviors of the bladder cancer cells. **Conclusion** The microRNA let-7g-3p can inhibit the biological behavior of bladder cancer cells by negatively regulating HMGB2 gene.

Keywords: let-7g-3p; HMGB2; bladder cancer

膀胱癌是目前最常见的9大癌症之一,在所有新诊断的病例中,75%表现为非肌肉浸润性膀胱癌(NMIBC),25%表现为肌肉浸润性膀胱癌(MIBC),并

且在所有实体癌中,膀胱癌的复发率最高^[1,2]。经一线治疗后,50%~70%的NMIBC患者会在5年内复发,10%~30%的患者将进展为MIBC^[3]。可见,如何降低膀胱癌复发率,改善患者生存预后是膀胱癌领域的重要问题。

微小核糖核酸(miRNAs)是一种小的非编码核糖核酸,由19~25个核苷酸组成^[4]。目前,已有多种miRNAs在癌症中被证明是促癌基因(如miR-92和miR-194)或抑癌基因(如miR-199b和miR-99a)^[5-8]。然而在膀胱癌中,还有许多下调miRNAs尚未得到充分的研究,其功能和靶基因有待进一步阐明。let-7g-3p是定

收稿日期:2022-04-10

基金项目:国家自然科学基金(81702495);安徽省卫健委科研项目重点项目(AHWJ2021a007);安徽省高校自然科学研究项目重点项目(KJ2021A0706);蚌埠医学院科技项目(2020bypd008);蚌埠医学院研究生创新计划项目(Byycx21074)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81702495).

作者简介:邹震海,在读硕士研究生,E-mail: wein660736@163.com

通信作者:刘建民,主任医师,Email: liu_john_jm@sina.com

位于3号染色体上属于let-7基因家族编码的一种miRNAs,let-7家族编码的miRNAs已被证实能够通过负性调控ras表达来发挥致癌作用^[9]。let-7g-3p参与多种人类代谢性疾病,例如阿尔茨海默症、肿瘤以及Graves病等^[10,11]。在肿瘤研究方面,研究发现let-7g-3p参与细胞外基质中受体的相互作用并且与癌症中的蛋白多糖的合成有关,该机制与小儿星形细胞瘤的发生发展有关^[12]。但目前尚未有研究报道let-7g-3p对膀胱癌生物学行为的影响并且其下游的相关信号因子和潜在机制仍然未知。

因此本研究将let-7g-3p作为研究对象,通过多种实验方法,旨在明确let-7g-3p靶向HMGB2抑制膀胱癌的作用和分子机制,为临床治疗膀胱癌提供潜在的治疗靶点和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

正常人尿路上皮细胞系SV-HUC-1,以及膀胱癌细胞系T24、5637和EJ(中国科学院上海细胞库);RPMI 1640培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗和胰酶(Gibco);脂质体转染试剂Lipo2000、TRIzol、PowerUp SYBR Green Master MIX PCR试剂盒和山羊抗兔二抗(Thermo Fish);逆转录试剂盒(Takara);mimics-NC、let-7g-3p mimics、Inhibitor-NC、let-7g-3p inhibitor、si-NC以及si-HMGB2均由上海吉玛公司设计并合成;HMGB2抗体(Abcam)。

1.2 组织样本

所有组织样本均来源于在蚌埠医学院第一附属医院纳入治疗的BLCA患者,患者他们均未在术前接受放疗或术前化疗。所有标本均按医学伦理规范进行处理。

1.3 细胞培养及转染

正常人尿路上皮细胞系HUC,以及膀胱癌细胞系T24、5637及EJ细胞置于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。培养箱条件37℃、5%CO₂。当细胞融合度在80%左右时0.25%胰酶消化传代,每2d换液或传代1次。在其生长状态良好时,将T24细胞接种于6孔板中,生长至60%融合度,按照Lipofectamine 2000试剂说明书,将miR-NC、let-7g-3p-mimics、let-7g-3p-inhibitor、si-NC以及si-HMGB2转染入细胞(序列见表1)。

1.4 CCK8细胞增殖实验

将转染后的T24细胞接种于96孔板中,分别培养24、48、72h后,每孔加入10μL CCK8溶液,避光,37℃条件下孵育1h,酶标仪检测细胞在450nm处的吸光度值A_{450nm},实验重复3次。

1.5 Transwell小室法

收集转染后的细胞,细胞侵袭实验中,上室面制备Matrigel胶后,将细胞用无血清培养基调整为2×10⁵/mL,

表1 RNA Oligo序列

Tab.1 RNA oligo sequences

Gene	Sequence (5'-3')
miR-NC-sence	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
miR-NC-antisence	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
let-7g-3p-mimics-sence	CUGUACAGGCCACUGCCUU
let-7g-3p-mimics-antisence	AAGGCAGUGGCCUGUACAG
let-7g-3p-inhibitor-sence	GCAAGGCAGUGGCCUGUACAG
let-7g-3p-inhibitor-antisence	AUGUCAGGCCACUGCCUUGC
si-NC-sence	AGGUUUACAUGUCCAAUAUG
si-NC-antisence	UAUUGGAACAUGUAAACCUGG
si-HMGB2-sence	CUGCAAAGGAGAAGUCGAATT
si-HMGB2-antisence	UUCGACUUCUCCUUUGCAGTT

吸取100μL加入上室。下室加入含20%胎牛血清的1640培养基。37℃恒温培养箱中培养24h后,轻轻去除上室中的细胞和Matrigel胶,4%多聚甲醛固定30min后结晶紫染色,显微镜下拍照并分析。细胞迁移实验中,Transwell上室不加入Matrigel胶,其余步骤同细胞侵袭实验,实验重复3次。

1.6 流式细胞术

收集转染后的细胞,取5~10万重悬的细胞,1000g离心5min,弃上清。195μLAnnexin V-FITC结合液重悬细胞。加入5μLAnnexin V-FITC,10μL碘化丙啶染色液,混匀后室温孵育10~20min,流式上机检测,实验重复3次。

1.7 RNA的提取及实时荧光定量PCR

根据说明书,使用Trizol试剂从组织和细胞中分离总RNA,反转录成互补脱氧核糖核酸(cDNA),PowerUp SYBR Green Master MIX PCR试剂盒用于测定let-7g-3p的表达水平(U6作为内参基因),SYBR Green Mix用于测定HMGB2(GAPDH作为内参基因)的表达水平。95℃预变性1min后,95℃变性20s,60℃退火20s,共40个循环,2^{-ΔΔCt}法用于计算目的基因的相对表达量。使用Primer 5.0设计引物(表2)。

表2 引物序列

Tab.2 Primer sequence

Gene	Primer sequence (5'-3')
let-7g-3p-F	CGCGCTGTACAGGCCACTG
U6-F	CGCTTCGGCAGCACATATACTAA
Micro-R	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
HMGB2-F	CGGGGCAAATGTCTCTCGTA
HMGB2-R	CGGAAGAGTCCGGGTGTTT
GAPDH-F	GGAGCGAGATCCCTCCAAAT
GAPDH-R	GGCTGTGTCATACTTCTCATGG

1.8 转录组测序分析

收集转染 mimics-NC 和 let-7g-3p-mimics 后的 T24 细胞, 每组各 3 个样本, 采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, Nanodrop 分光光度计 (ND-ONE-W) 检测 RNA 样品的纯度、浓度和完整性, 进行文库构建, 加入 Fragmentation Buffer 将 mRNA 进行随机打断, 以 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物合成第一条 cDNA 链, 然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第二条 cDNA 链, 利用 AMPure XP 磁珠纯化 cDNA, 纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 然后用 AMPure XP 磁珠进行片段大小选择, 最后通过 PCR 富集得到 cDNA 文库。文库构建完成后, 使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度 (文库有效浓度 > 2 nmol/L) 进行准确定量, 以保证文库质量。库检合格后, 不同文库按照目标下机数据量进行混合, 用 Illumina 平台进行测序。

1.9 Western blot

收集细胞后使用冷 PBS 洗涤两次, RIPA 细胞裂解液冰上裂解 30 min, 将裂解物以 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定上清液中的蛋白质浓度。在 SDS-PAGE 上加入等量的蛋白质样品并转移到 PVDF 膜上, 随后使用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 4 °C 孵育一抗摇床过夜。第 2 天二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 使用化学发光试剂观察蛋白质条带并使用 Image J 进行分析。

1.10 双荧光素酶报告实验

构建 HMGB2 野生型及突变型质粒, 将细胞接种于 6 孔板中, 分别或同时转染 HMGB2 野生型质粒、HMGB2 突变型质粒、mimics-NC 和 let-7g-3p mimics, 用双荧光素酶报告基因试剂盒检测各组荧光素酶活性。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件和 GraphPad Prism9 进行数据分析处理。计量资料以均数 ± 标准差表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 let-7g-3p 在膀胱癌中的表达水平

与癌旁组织相比, 膀胱癌组织中 let-7g-3p 的表达水平下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1)。

与正常尿路上皮细胞 SV-HUC-1 相比, 膀胱癌细胞系 T24、5637 和 EJ 细胞中 let-7g-3p 的表达水平下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2)。其中 T24 细胞的表达水平最低, 且在膀胱癌细胞系中, T24 侵袭性较强, 因此后续选择 T24 细胞作为实验对象。

2.2 let-7g-3p 和 HMGB2 转染效率的验证

将 miR-NC、let-7g-3p-mimics、let-7g-3p-inhibitor、

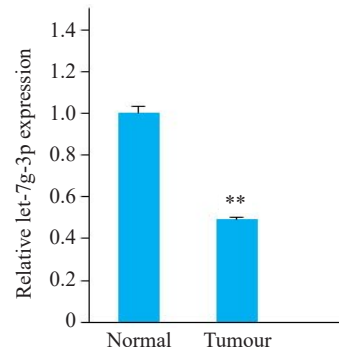


图1 let-7g-3p在膀胱癌组织中的表达水平
Fig.1 Expression level of let-7g-3p in bladder cancer tissues ($n=5$, ** $P < 0.01$).

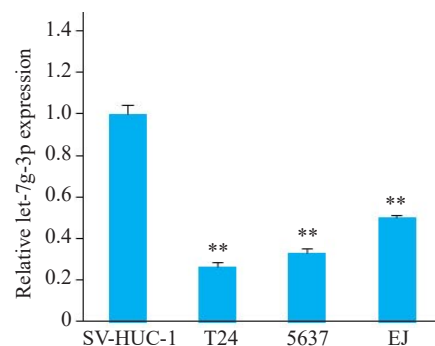


图2 let-7g-3p在膀胱癌细胞中的表达水平
Fig.2 Expression level of let-7g-3p in bladder cancer cells lines ($n=3$). ** $P < 0.01$ vs SV-HUC-1.

si-NC 以及 si-HMGB2 转染入膀胱癌细胞后, 通过 qRT-PCR 进行了转染效率的验证, 结果显示 T24 细胞中 let-7g-3p 和 HMGB2 的表达水平被成功敲低和过表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3)。

2.3 let-7g-3p 对膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响

CCK8 增殖实验显示, 与 mimics-NC 组相比, let-7g-3p mimics 组的 T24 细胞的增殖能力明显减弱 ($P < 0.01$, 图 4A); Transwell 迁移和侵袭实验显示, 细胞的迁移和侵袭能力均减弱 ($P < 0.01$, 图 4B、C); 流式细胞术分析显示, let-7g-3p mimics 组的 T24 细胞凋亡增加 ($P < 0.01$, 图 4D)。反之, 与 inhibitor-NC 组相比, let-7g-3p inhibitor 组的 T24 细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显增强, 且凋亡减少。

2.3 let-7g-3p 和 HMGB2 的靶向关系

为寻找 let-7g-3p 下游的目的基因, 我们对过表达 let-7g-3p 的 T24 细胞进行了转录组测序, 同组样本的生物学重复相关性均在 99% 以上, 经过测序质量控制, 共得到 73.38 Gb 的总碱基数, 结果显示 let-7g-3p mimics 组与 mir-NC 组相比共有 1597 个差异表达的基因, 其中

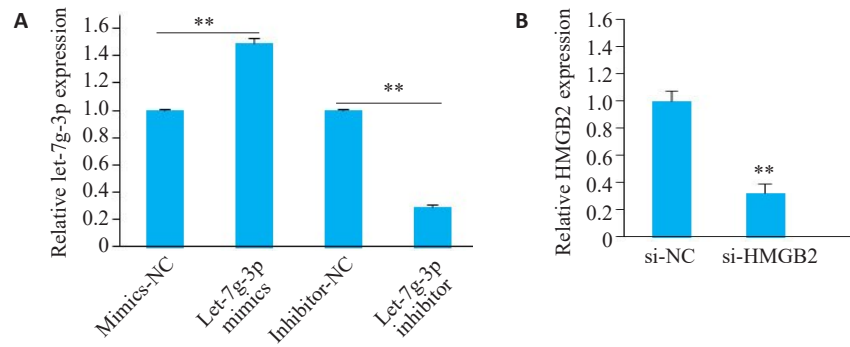


图3 let-7g-3p和HMGB2转染效率的验证

Fig.3 Expression of let-7g-3p and HMGB2 in bladder cancer cells. **A:** let-7g-3p was successfully knocked down or over-expressed in bladder cancer cells. **B:** HMGB2 was successfully knocked down in bladder cancer cells. ** $P < 0.01$ ($n = 3$).

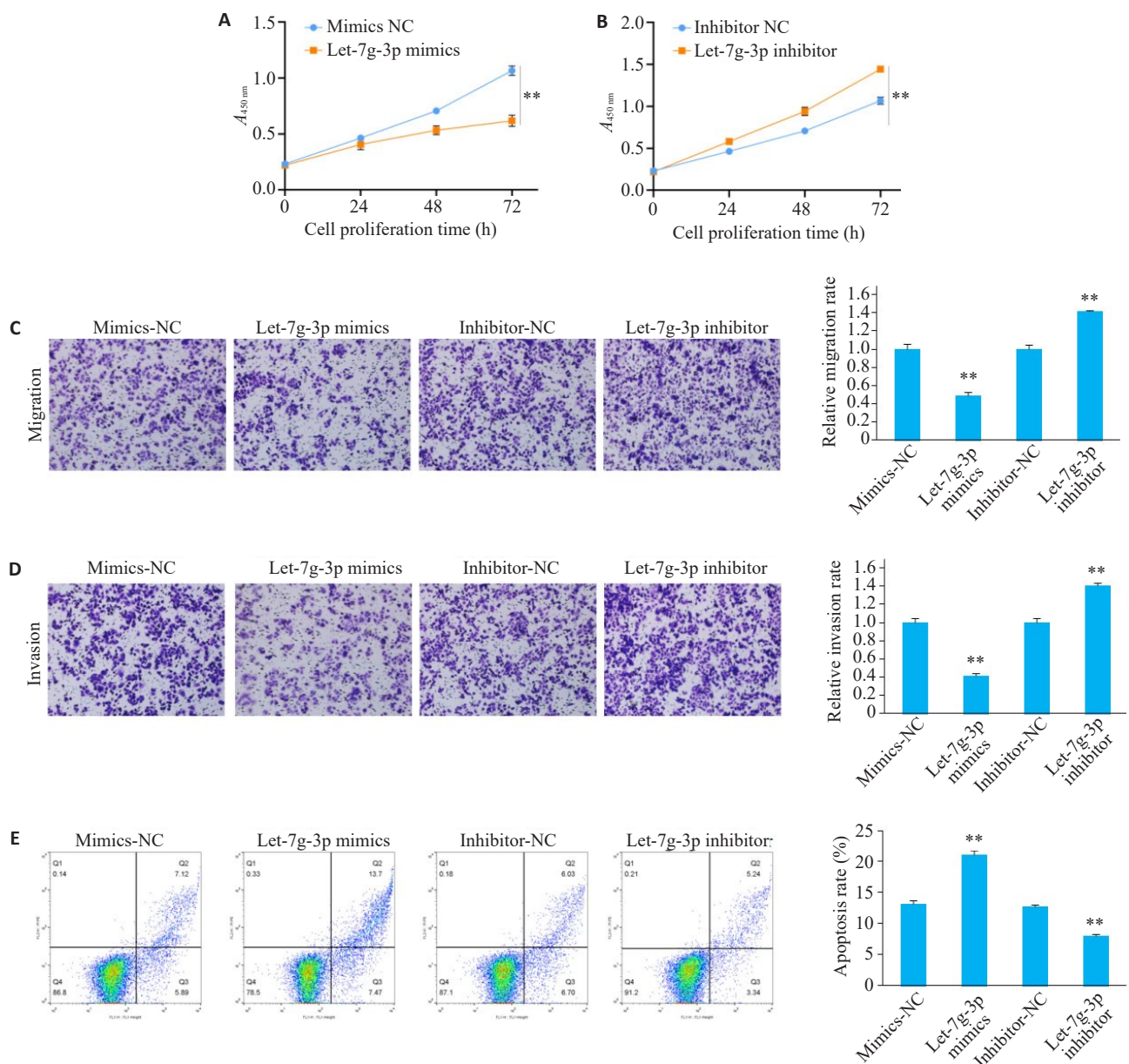


图4 let-7g-3p对膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响

Fig.4 Effects of let-7g-3p on proliferation, migration, invasion and apoptosis of bladder cancer cells. **A, B:** CCK8 assay for assessing the proliferation ability of T24 cells with let-7g-3p knockdown or overexpression. **C, D:** Transwell assay for assessing migration and invasion ability of T24 cells with let-7g-3p knockdown or overexpression (Original magnification: $\times 100$). **E:** Flow cytometry for assessing apoptosis of T24 cells with let-7g-3p knockdown or overexpression. ** $P < 0.01$ vs NC ($n = 3$).

有718个上调基因和879个下调基因(图5A)。接着以let-7g-3p为结合靶点,从Targetscan, MiRDB和miRT-abase这3个在线数据库中获取了let-7g-3p的下游目的基因并取交集,最终共有31个基因纳入考虑(图5B)。

其中, HMGB2基因在测序结果中显示表达下调, 并且在线数据库都表明let-7g-3p和HMGB2之间存在结合位点(图5C、D), 因此, 我们选择HMGB2作为let-7g-3p的下游靶标并进行了进一步的验证。

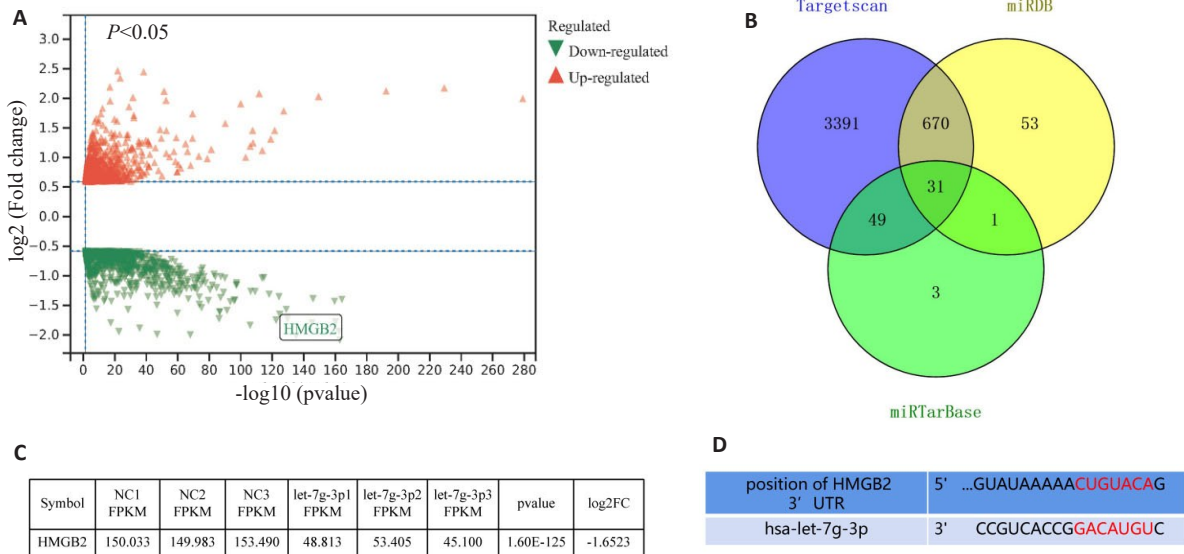


图5 let-7g-3p与HMGB2的靶向关系

Fig.5 Targeting relationship between let-7g-3p and HMGB2. A: Result of transcriptome sequencing. B: Wayne diagram of the major databases. C: Expression level of HMGB2 in each group of samples in the results of transcriptome sequencing. D: Binding site between let-7g-3p and HMGB2.

双荧光素酶报告实验的结果显示,在野生型HMGB2中,转染let-7g-3p mimics的293T细胞的荧光素酶活性显著降低($P < 0.01$),同时在突变型HMGB2中,两者之间无明显差异($P > 0.05$,图6)。为明确let-7g-3p如何调控HMGB2,进一步进行qRT-PCR实验,结果显示,let-7g-3p mimics组的HMGB2的表达水平与mimics-NC组相比明显下调($P < 0.001$,图7A),Western blot结果显示let-7g-3p组的HMGB2的蛋白水平与mimics-NC组相比下调($P < 0.01$,图7B、C)。而在过表达HMGB2后let-7g-3p的表达水平无明显变化($P > 0.05$,图7D)。

2.4 HMGB2在膀胱癌细胞中的表达水平

与正常尿路上皮细胞SV-HUC-1相比,膀胱癌细胞系T24、5637和EJ细胞中HMGB2的表达水平上调,差异有统计学意义($P < 0.01$,图8)。

2.5 let-7g-3p靶向HMGB2对膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响

CCK8细胞增殖实验显示敲低HMGB2部分逆转了敲低let-7g-3p促进膀胱癌细胞增殖的作用($P < 0.01$,图9A);Transwell迁移和侵袭实验显示,敲低HMGB2同样能够逆转敲低let-7g-3p促进膀胱癌细胞迁移和

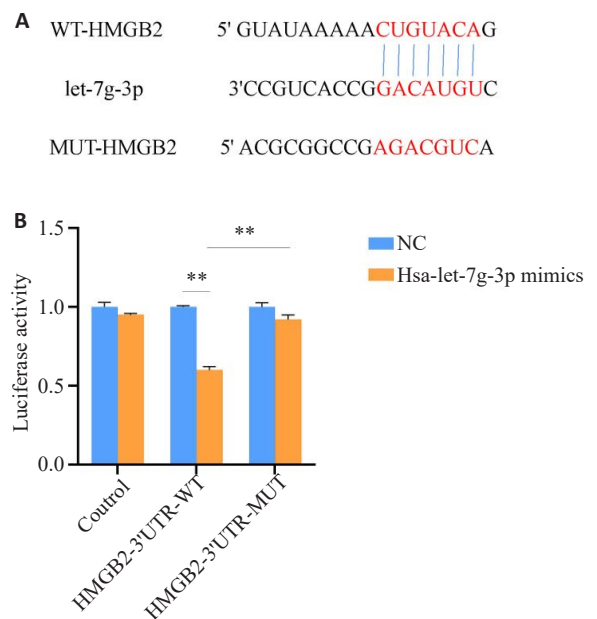


图6 双荧光素酶报告实验的结果

Fig.6 Results of the double luciferase reporter gene assay ($n=3$, $**P < 0.01$).

侵袭的作用($P < 0.01$,图9B、C);流式细胞术的结果显示,敲低HMGB2可以增加let-7g-3p抑制的细胞凋亡

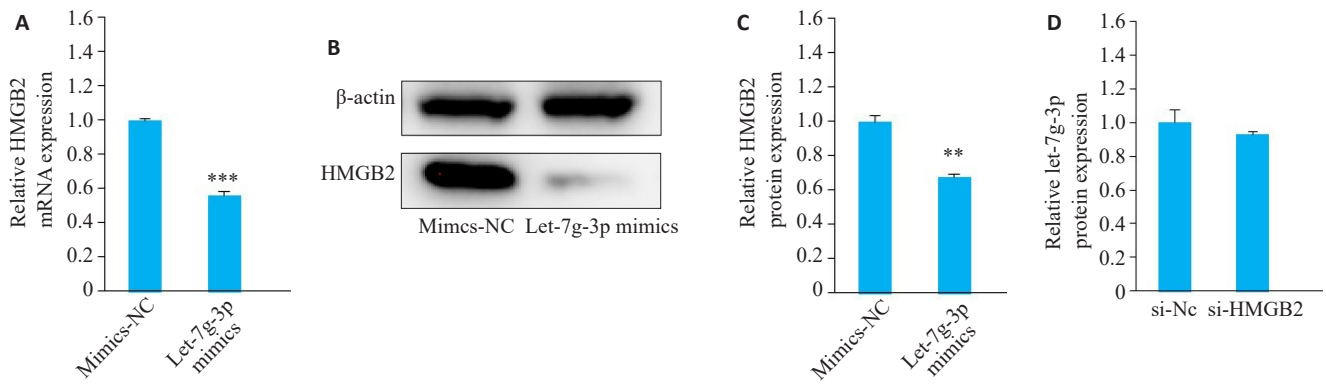


图7 过表达let-7g-3p可以显著降低HMGB2的表达水平

Fig.7 Overexpression of let-7g-3p significantly reduces the expression level of HMGB2. **A**: Overexpression of let-7g-3p reduces the mRNA expression level of HMGB2 detected by qRT-PCR. **B**, **C**: Overexpression of let-7g-3p reduces protein expression level of HMGB2 detected by Western blotting. **D**: Overexpression of HMGB2 does not affect the expression level of let-7g-3p detected by qRT-PCR. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$).

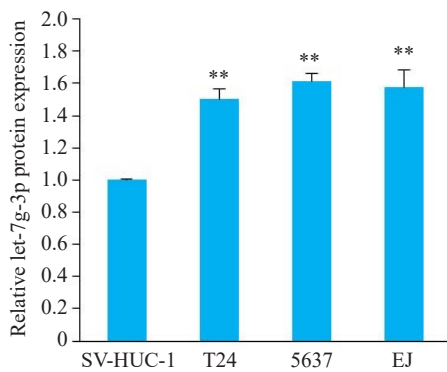


图8 HMGB2在膀胱癌细胞中的表达水平

Fig.8 Expression level of HMGB2 in bladder cancer cells. ** $P < 0.01$ vs SV-HUC-1 ($n=3$).

($P < 0.01$, 图9D)。

2.6 let-7g-3p下游靶基因的GO和KEGG通路富集分析

为确定let-7g-3p下游靶基因的生物学功能和重要通路,对测序结果中的1597个差异表达基因进行了GO和KEGG通路富集分析,结果显示这些差异表达基因参与了与细胞进程等相关的途径(图10A),此外,KEGG富集分析显示这些差异表达基因与癌症中的蛋白多糖、细胞凋亡以及一些致癌途径如P53和TNF信号通路有关(图10B)。

3 讨论

本研究首次揭示了let-7g-3p在调节膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡中的功能作用及其下游的相关分子机制,通过qRT-PCR实验发现let-7g-3p在膀胱癌组织和细胞中的表达明显下调,之后在过表达let-7g-3p后显示膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力受到抑制同时凋亡增多,下调let-7g-3p后结果相反。以上结果表明

let-7g-3p可以抑制膀胱癌细胞的生物学行为。在之前的研究中,circ_0001017能够通过靶向let-7g-3p抑制胶质瘤细胞增殖、EMT、迁移和侵袭,促进胶质瘤细胞凋亡^[13],该结果证明在胶质瘤细胞中,let-7g-3p扮演着促癌因子的作用,这可能是由于let-7g-3p在不同肿瘤细胞中发挥相反的作用效果。

miRNA通常靶向一个或多个mRNA,通过与下游的目的mRNA特异性碱基配对引起mRNA的直接降解或翻译抑制,在转录后水平调控基因表达,从而调控细胞分化、生长、增殖、迁移和凋亡等^[4]。目前发现微小核糖核酸参与了哺乳动物基因组中超过50%的mRNA的调控^[14]。因此,为进一步探讨let-7g-3p的作用机制,我们对过表达let-7g-3p的膀胱癌细胞进行了转录组测序,发现HMGB2基因的表达量降低,并且在3个在线生物信息学分析的网站中,均表明HMGB2的3'UTR区存在let-7g-3p的碱基结合位点。同时,双荧光素酶报告实验验证了let-7g-3p和HMGB2的靶向关系。本研究qRT-PCR和Western blot进一步证实过表达let-7g-3p可以下调HMGB2的表达水平。基于以上结果,推测let-7g-3p通过负性调控HMGB2来抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并促进凋亡。HMGB2在膀胱癌细胞系中的表达水平均明显增高,在敲低HMGB2基因的膀胱癌细胞中,同时敲低let-7g-3p进行Rescue实验,实验结果表明过敲低HMGB2基因可以部分挽救敲低let-7g-3p对膀胱癌细胞生长的促进作用。以上实验证明了let-7g-3p是通过负性调控HMGB2来抑制膀胱癌细胞的生物学行为。

高迁移率族盒蛋白(HMGB)在建立活性或非活性染色质方面发挥着重要功能^[15]。哺乳动物HMGB蛋白包含两个HMG盒结构域和一个酸性C末端^[16]。

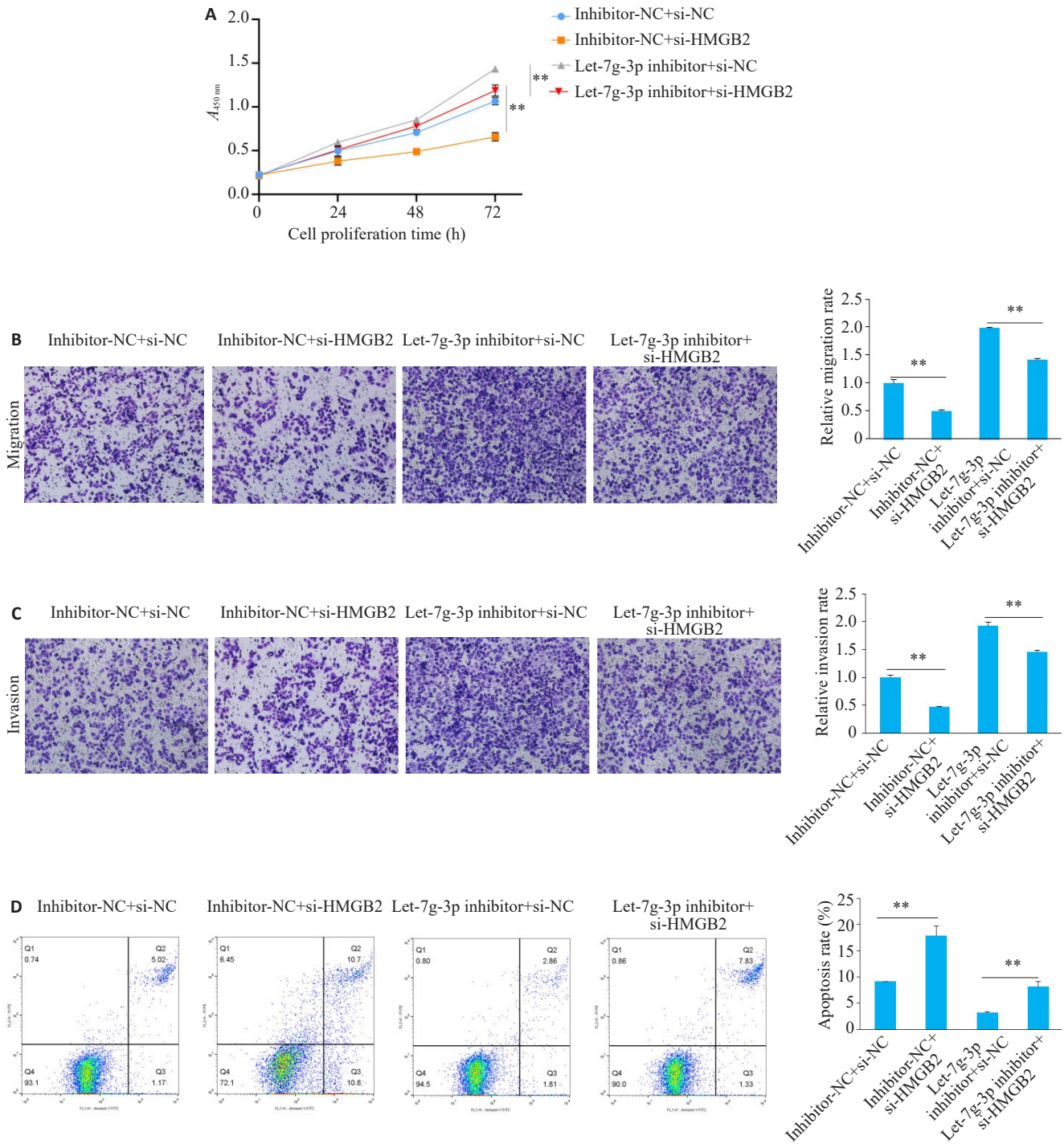


图9 let-7g-3p 靶向HMGB2调控膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡

Fig.9 let-7g-3p targets HMGB2 to regulate the proliferation, migration, invasion and apoptosis of bladder cancer cells. A: Knock-down of HMGB2 partially reverses the effect of let-7g-3p knockdown on migration and invasion of T24 cells. B, C: Knock-down of HMGB2 partially reverses the effect of let-7g-3p knockdown on proliferation of T24 cells ($\times 100$). D: Knock-down of HMGB2 partially reverses the effect of let-7g-3p knockdown on apoptosis of T24 cells. ** $P < 0.01$ ($n = 3$).

HMGB 蛋白可以进行翻译后修饰,以影响它们与 DNA、蛋白质伴侣和细胞定位的相互作用。例如, HMGB1 可以进行乙酰化、磷酸化、甲基化、核糖基化和氧化,从而产生一系列复杂的潜在调控机制^[17,18]。有研究发现, HMGB2 在肺腺癌组织中高表达,与肺腺癌患

者的预后密切相关,该机制可能是由于 HMGB2 参与了细胞周期的调控使得细胞的增殖能力增强^[19],并且在肝细胞癌^[20]、胰腺癌^[16]和皮肤癌^[21]等不同类型的癌症中均发现了 HMGB2 的过表达。同时,有研究表明 HMGB2 的表达水平在膀胱癌患者中高度增加,并且

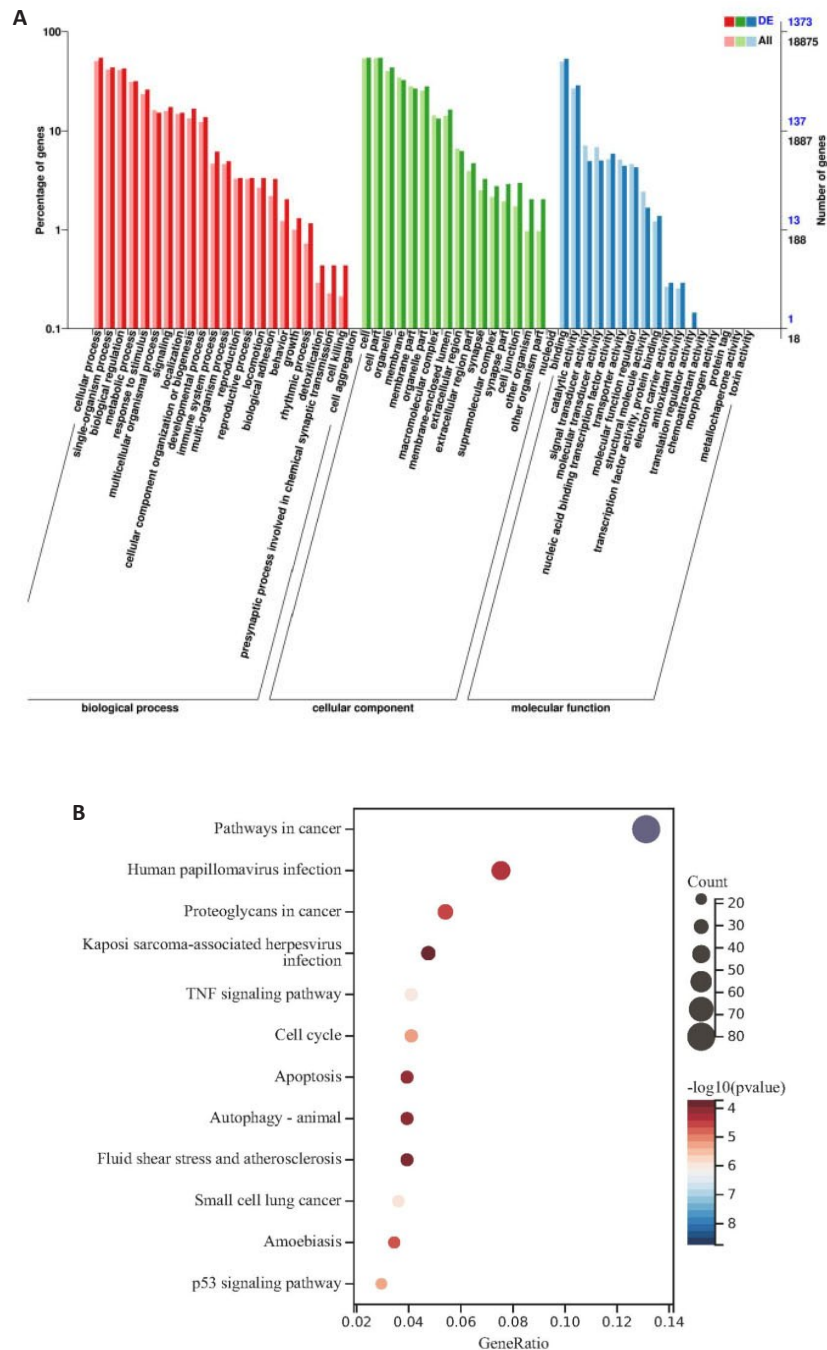


图10 GO和KEGG通路富集分析的结果

Fig.10 Enrichment analysis of GO and KEGG pathways. A: Histogram of GO enrichment analysis. B: Bubble diagram of KEGG pathways enrichment analysis.

HMGB2 的过表达与膀胱肿瘤的进展和血管生成显著相关^[22],这与本研究结果相一致。

研究证实了 let-7g-3p 的过表达可以抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力,并促进凋亡,但 let-7g-3p 在膀胱癌进展中的潜在机制仍未阐明。同时,过表达 let-7g-3p 组的膀胱癌细胞的增殖率明显低于对照组,且凋亡率明显高于对照组。因此,推断 let-7g-3p 主要通过抑制细胞增殖和促进细胞凋亡来干扰膀胱癌细胞的生长。通过对转录组测序的结果进行 GO 和 KEGG 富集

分析,结果表明,let-7g-3p 的下游靶基因参与了与细胞进程等相关的途径,并且主要富集于细胞凋亡以及 P53、TNF 等信号通路中。P53 作为一种重要的转录因子,由位于人类 17 号染色体短臂(17p13.1)的 TP53 基因位点编码,在诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡中起到重要作用^[23]。目前,已有多种 miRNA 被证实通过靶向 P53 来影响肿瘤进展^[24,25]。一项关于体细胞 DNA 突变分析表明,近一半的高级别肌肉浸润性膀胱癌具有 TP53 突变,并且 TP53 功能在 76% 的患者中失活^[26]。因其在肿

瘤细胞中有超过50%的突变率,通过诱导突变 p53 降解,从而改善其促肿瘤功能已经肿瘤靶向治疗的一项新的策略^[27]。以上分析表明 let-7g-3p 可能主要通过靶向 HMGB2/P53 抑制细胞增殖并诱导细胞发生坏死性凋亡来抑制膀胱癌细胞的生物学行为,但这仍然需要进一步的实验验证。

综上所述,本研究证实了 MiRNA-let-7g-3p 靶向负性调控 HMGB2 抑制膀胱癌细胞的生物学行为,这可能为膀胱癌细胞的治疗和预后提供了新的靶点,有关 let-7g-3p/HMGB2 轴的下游机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Pugashetti N, Alibhai SMH, Yap SA. Non-muscle-invasive bladder cancer: review of diagnosis and management[J]. J Curr Clin Care, 2015,105: 540-50.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA A Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [3] Kamat AM, Hahn NM, Efsthathiou JA, et al. Bladder cancer [J]. Lancet, 2016, 388(10061): 2796-810.
- [4] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer[J]. Dis Model Mech, 2021, 14(4): 047662-71.
- [5] Wang H, Ke C, Ma X, et al. microRNA-92 promotes invasion and chemoresistance by targeting GSK3 β and activating Wnt signaling in bladder cancer cells[J]. Tumour Biol, 2016, 2016(9):517-25.
- [6] Wang YM, Sun GY, Wang CH, et al. miR-194-5p inhibits cell migration and invasion in bladder cancer by targeting E2F3 [J]. J BUON, 2018, 23(5): 1492-9.
- [7] 刘晨溪, 赵红娟, 田伟, 等. miR-199b-3p 对肾癌细胞增殖、凋亡、侵袭的影响及其机制探讨[J]. 山东医药, 2022, 62(4): 26-30, 35.
- [8] 王科, 彭国光, 谭玉莲, 等. miR-99a 对口腔鳞癌增殖能力的影响[J]. 上海口腔医学, 2021, 30(1): 44-9.
- [9] Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(10): 3903-8.
- [10] Gui YX, Liu H, Zhang LS, et al. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease[J]. Oncotarget, 2015, 6(35): 37043-53.
- [11] Hiratsuka I, Yamada H, Munetsuna E, et al. Circulating microRNAs in Graves' disease in relation to clinical activity[J]. Thyroid, 2016, 26(10): 1431-40.
- [12] López-Aguilar JE, Velázquez-Flores MA, Simón-Martínez LA, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for pediatric astrocytomas [J]. Arch Med Res, 2017, 48(4): 323-32.
- [13] Li T, Li YL, Zhang W, et al. Hsa_circ_0001017 inhibits proliferation and metastasis via regulating the let-7g-3p/NDST3 axis in glioma [J]. Folia Neuropathol, 2021, 59(2): 174-88.
- [14] Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. Genome Res, 2009, 19(1): 92-105.
- [15] Cai X, Ding HJ, Liu YX, et al. Expression of HMGB2 indicates worse survival of patients and is required for the maintenance of Warburg effect in pancreatic cancer [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(2): 119-27.
- [16] Catena R, Escoffier E, Caron C, et al. HMGB4, a novel member of the HMGB family, is preferentially expressed in the mouse testis and localizes to the basal pole of elongating spermatids I [J]. Biol Reprod, 2009, 80: 358-66.
- [17] Richard SA, Jiang YY, Xiang LH, et al. Post-translational modifications of high mobility group box 1 and cancer [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(12): 5181-96.
- [18] Kwak MS, Kim HS, Lee B, et al. Immunological significance of HMGB1 post-translational modification and redox biology [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1189-93.
- [19] 付蓓, 贺惠娟. HMGB2 对肺腺癌细胞周期和增殖的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(1): 164-9.
- [20] Kwon JH, Kim J, Park JY, et al. Overexpression of high-mobility group box 2 is associated with tumor aggressiveness and prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(22): 5511-21.
- [21] Guggenheim ER, Xu D, Zhang CX, et al. Photoaffinity isolation and identification of proteins in cancer cell extracts that bind to platinum-modified DNA [J]. ChemBiochem, 2009, 10(1): 141-57.
- [22] Wang W, Jiang H, Zhu H, et al. Overexpression of high mobility group box 1 and 2 is associated with the progression and angiogenesis of human bladder carcinoma [J]. Oncol Lett, 2013, 5(3): 884-8.
- [23] Marcel V, Catez F, Diaz JJ. p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity [J]. Oncogene, 2015, 34(44): 5513-23.
- [24] 祖木热来提·艾尼瓦尔, 热孜婉古丽·吾布力, 哈提古丽·尼斯尔. 上调 miRNA-22 表达对卵巢癌细胞株 SKOV-3 侵袭的影响及与 VEGF 和 P53 蛋白表达的关系研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(16): 1732-5.
- [25] You ZY, Peng DD, Cao YX, et al. P53 suppresses the progression of hepatocellular carcinoma via miR-15a by decreasing OGT expression and EZH2 stabilization [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(19): 9168-82.
- [26] Network CGAR. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma [J]. Nature, 2014, 507(7492): 315-22.
- [27] Hu JH, Cao JS, Topatana W, et al. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies [J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 157-63.

(编辑:林萍)