

## · 基础研究 ·

## 过表达 miR-101-3p 可下调 TOP2A 基因表达抑制膀胱癌细胞的增殖和迁移

李智, 卫中庆, 吴硕, 高杰, 王振中

(南京医科大学第二附属医院, 江苏南京 210000)

## Overexpression of miR-101-3p inhibits the proliferation and migration of bladder cancer cells by down-regulating the expression of TOP2A gene

LI Zhi, WEI Zhong-qing, WU Shuo, GAO Jie, WANG Zhen-zhong

(Department of Urology, Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210000, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To identify and confirm the upstream miRNA of TOP2A oncogene and to explore its role and possible mechanism in bladder cancer. **Methods** The potential miRNAs binding to TOP2A in bladder cancer were predicted with starBase database, which were further mined with TCGA database. The correlation and survival analysis of all predicted miRNAs and target genes were ranked. Double luciferase reporter gene experiment and interference assay were conducted according to the predicted binding sites to confirm the binding of candidate genes miR-101-3p and TOP2A. The correlation between the expressions of miR-101-3p and TOP2A was analyzed with qRT-PCR. The mimics and inhibitor of miR-101-3p and their negative controls were transfected. The changes of cell proliferation and migration were detected with CCK8, wound healing assay and Transwell assay. The regulatory role of miR-101-3p/TOP2A signal axis in the malignant phenotype of tumor cells was determined with cell cotransfection technique and cell function recovery experiment. **Results** A total of 147 miRNAs were predicted in starBase database. TCGA database showed that miR-101-3p and TOP2A genes had the highest correlation coefficient and were closely related to the poor prognosis of bladder cancer patients, which were used as candidate genes for follow-up experiments. Double luciferase reporter gene assay and interference assay confirmed their binding ability in bladder cancer, and miR-101-3p could down-regulate the expression of TOP2A gene. There was a negative correlation between the expression of miR-101-3p and TOP2A genes in clinical tissue specimens. In addition, in vitro experiments showed that miR-101-3p could inhibit the proliferation and migration of bladder cancer cells. Overexpression of the TOP2A gene could restore the proliferation and migration of bladder cancer cells. **Conclusion** Overexpression of miR-101-3p can down-regulate the expression of TOP2A gene and inhibit the proliferation and migration of bladder cancer cells.

**KEY WORDS:** TOP2A; miR-101-3p; bladder cancer; cell proliferation; cell migration

**摘要:** **目的** 发现并确认膀胱癌致癌基因 TOP2A 的上游 miRNA, 并探讨其在膀胱癌中发挥的具体作用及可能机制。 **方法** starBase 数据库用于预测膀胱癌中潜在和 TOP2A 结合的 miRNAs, 并运用 TCGA 数据库挖掘对所有预测的 miRNAs 与靶基因的相关性和生存分析进行排序; 根据预测的结合位点情况构建双荧光素酶报告基因实验和干扰实验, 以确认候选基因 miR-101-3p 和 TOP2A 基因的结合情况; qRT-PCR 用于分析两基因在临床组织水平表达相关性; 运用细胞转染技术在膀胱癌细胞中分别转染 miR-101-3p mimics 和 inhibitor 及各自的阴性对照, 随后采用 CCK8, 细胞划痕愈合实验和 Transwell 实验测定细胞的增殖及迁移能力变化情况; 细胞共转染技术和细胞功能回复实验以明确 miR-101-3p/TOP2A 信号轴在肿瘤细胞恶性表型中的调控作用。 **结果** starBase 数据库预测获得 147 个 miRNAs; TCGA 数据库分析显示, miR-101-3p 和 TOP2A 基因相关系数最高, 且与膀胱癌患者不良预后密切相关, 作为后续实验候选基因; 双荧光素酶报告基因实验和干扰实验证实两者在膀胱癌中的结合能力, miR-101-3p 可以下调 TOP2A 基因的表达; 临床组织标本中, miR-101-3p 和 TOP2A 基因的表达具有负相关性; 此外, 体外实验显示, miR-101-3p 可以抑制膀胱癌细胞的增殖和迁移能力; 过表达 TOP2A 基因, 可以恢复膀胱癌细胞的增殖和迁移能力。 **结论** 过表达 miR-101-3p 可以下调 TOP2A 基因表达抑制膀胱癌细胞增殖和迁移。

**关键词:** TOP2A; miR-101-3p; 膀胱癌; 细胞增殖; 细胞迁移

**中图分类号:** R737.14

**文献标志码:** A

**DOI:** 10.3969/j.issn.1009-8291.2020.08.014

**收稿日期:** 2020-04-14

**修回日期:** 2020-06-12

**通信作者:** 卫中庆, 主任医师. E-mail: weizq1@163.com

**作者简介:** 李智, 主治医师. 研究方向: 泌尿外科微创手术.

E-mail: 85677539@qq.com

随着大规模高通量测序技术的应用和普及, 越来越多的证据表明非编码 RNA 在肿瘤进展中扮演重要角色<sup>[1]</sup>。miRNA 是一种小 RNA, 其长度大约为 19~22 个核苷酸, 本身并不具备编码蛋白质功能, 在

机体内广泛分布<sup>[2]</sup>。这一类小 RNA 可以通过调节靶基因的转录情况,控制基因的合成和降解稳定性而影响 mRNA 的表达水平<sup>[3]</sup>。大量证据显示,miRNA 在肿瘤的生长、增殖、迁移、侵袭以及细胞凋亡进程中参与众多调控机制,从而诱导致癌或者是抑癌的生物作用<sup>[4-5]</sup>。在肿瘤预防和诊断中,miRNA 可以发挥包括肿瘤的预测以及预后评估的作用,一系列研究结果证实,miRNA 在多种肿瘤诊治中可以被用作预测相关分子标记物,包括胃癌和白血病等<sup>[6-7]</sup>。TOP2A 基因即拓扑异构酶 2- $\alpha$ ,主要参与 DNA 的复制,转录以及调控 DNA 的拓扑结构,是一种关键的酶<sup>[8]</sup>。前期研究发现 TOP2A 基因在肿瘤进程中扮演致癌基因的角色,包括结肠癌、前列腺癌、膀胱癌等<sup>[9-11]</sup>。作为一种关键的致癌基因, TOP2A 基因的失调机制一直是研究热点,为了进一步阐明膀胱癌中 TOP2A 基因异常表达的原因和机制,我们运用生物信息学技术和细胞生物学实验技术,在膀胱癌组织和细胞模型中进行实验,以探索相关 miRNA 在膀胱癌参与调控 TOP2A 基因的潜在机制和生物学功能。

## 1 材料与方 法

**1.1 组织标本来源** 20 对膀胱癌组织标本及相应的癌旁正常组织标本收集自 2015 年至 2018 年在南京医科大学第二附属医院接受膀胱癌根治的患者。男性 13 例,女性 7 例,中位确诊年龄为 72 岁,所有患者术前未接受新辅助化疗或放疗。所有临床组织标本均由医院病理科免疫组化结果确认为癌组织或正常上皮组织。本研究通过南医大二附院医学伦理审查会审核,所有患者均签署知情同意书意愿参与临床试验。

**1.2 细胞培养** 膀胱癌细胞系(T24, 5637, UMUC-3 and BIU-3) 购买于中桥新舟生物科技公司(shanghai, China)。T24 细胞系、5637 细胞系和 BIU-3 细胞系使用 1640 培养基(Gibco, USA), UMUC-3 细胞系采用的是 DMEM 细胞系,细胞培养基中加入 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素抗生素。细胞培养箱设置的条件为 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub>。

**1.3 细胞转染** 细胞转染时使用的 miR-101-3p mimic/inhibitor, NC mimic/inhibitor 以及 pcDNA3.0-TOP2A 由万类生物公司构建设计(Shenyang, China)。膀胱癌细胞系培养至 70%~80% 密度时进行转染操作,根据产品说明书使用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒(Invitrogen, USA)进行转染,转染后 48 h 使用 qRT-PCR 测定转染效率并进行后续实验。

**1.4 qRT-PCR 实验** 对于培养的细胞,我们采用

RNAiso Plus 试剂盒(TaKaRA, Japan)提取其中的总 RNA 进行逆转录操作。首先将总 RNA 采用 Super M-MLV 逆转录试剂盒(BioTeke, China)进行 cDNA 的合成和扩增,产物的 real-time PCR 定量分析采用的是 2 $\times$ Power Taq PCR MasterMix 试剂盒(BioTeke, China)。最后我们将结果按照 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法进行基因相对定量统计分析,所使用的内参选择为 GAPDH 和 U6 基因,RT-PCR 引物序列如表 1 所示。

表 1 qRT-PCR 引物序列

名称	序列(5'-3')
miR-101-3p-F	TCCGAAAGTCAATAGTGTC
miR-101-3p-R	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT
TOP2A-F	CATTGAAGACGCTTCGTTATGG
TOP2A-R	CAGAAGAGAGGGCCAGTTGTG
GAPDH-F	CTGGGCTACACTGAGCACC
GAPDH-R	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG

**1.5 CCK-8 实验** 我们采用 CCK-8 实验来测定膀胱癌细胞系增殖能力的变化情况。实验操作按照 CCK-8 试剂盒(CCK-8, Sigma-Aldrich, USA)的产品说明书进行。T24 细胞系和 UMUC-3 细胞系悬液计数后按照每孔约 3 000 个细胞接种在 96 孔板中,同时每组设置 5 个副孔。将细胞转染后分别培养 0、24、48、72 h 后,在每孔中加入 10  $\mu$ L 的 CCK-8 试剂并继续培养 2 h 以孵育反应发生。最后,测定小孔中在 450 nm 处的吸光度值来判断细胞的增殖能力情况。

**1.6 划痕愈合实验** 我们采用划痕愈合实验来测定膀胱癌细胞的横向迁移能力变化。在 6 孔板中培养膀胱癌细胞和转染,在细胞长满后用枪头划伤单层细胞,同时更换无血清的空培养基继续培养细胞,加入丝裂霉素(Sigma-Aldrich, USA)以抑制细胞的分化潜力。利用显微镜观察划痕,分别在 0 和 24 h 在同一位置拍照记录,分别进行 3 次独立的重复实验后分析实验结果。

**1.7 Transwell 实验** 细胞的侵袭能力测定使用的是 Transwell 实验。首先,在 Transwell 小室上层覆盖一层 Matrigel 胶(BD, USA),随后将膀胱癌细胞按照每孔约 20 000 个细胞接种在小室上层,并加入 100  $\mu$ L 的无血清培养基,同时在小室下层加入 800  $\mu$ L 的含有 20% 胎牛血清的培养基,以诱导细胞向小室下层迁移。经过 24 h 的培养后,用 PBS 洗涤小室

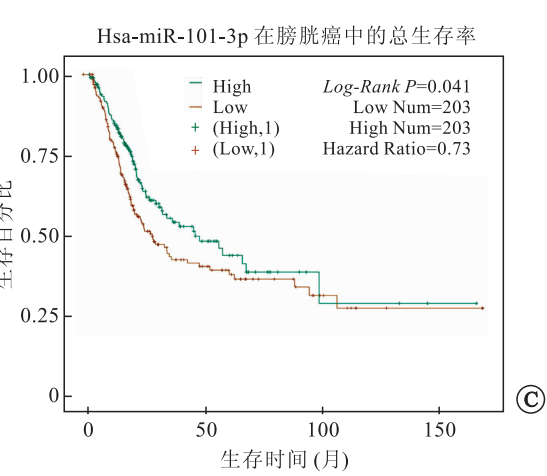
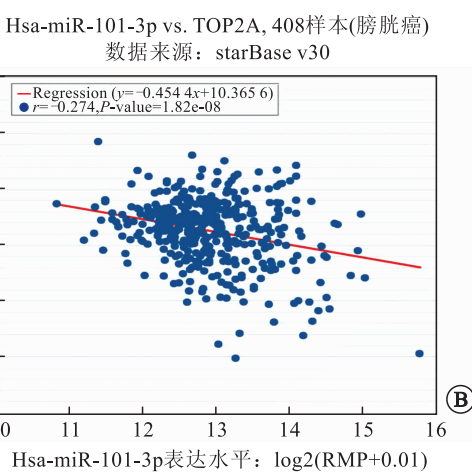
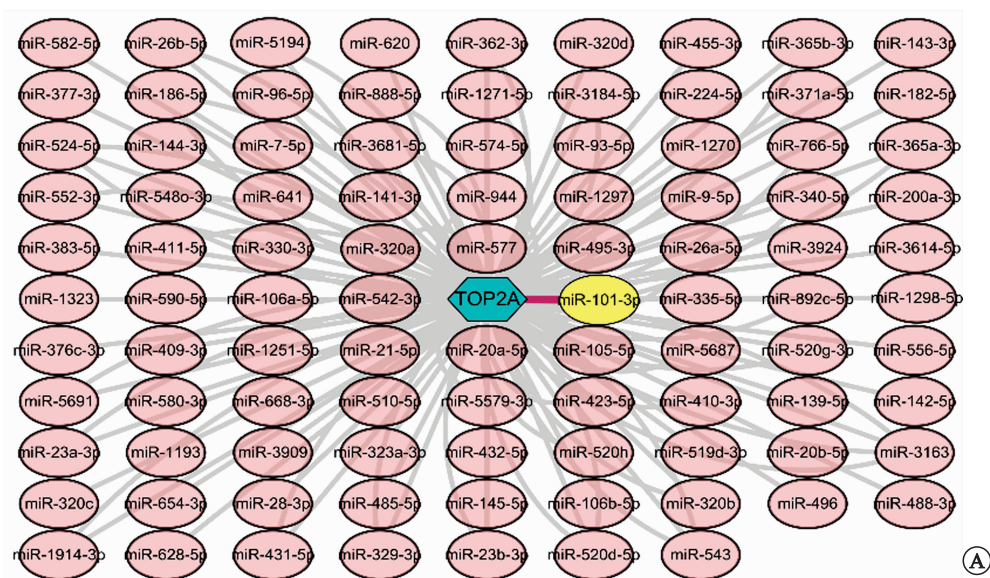
上层细胞,而下层细胞使用4%多聚甲醛溶液固定细胞,随后用0.4%的结晶紫染料染色细胞。在显微镜下随机选取5个非重复区域进行染色细胞的计数分析。

**1.8 双荧光素酶报告实验** 我们将包含TOP2A野生型和突变型(潜在和miR-101-3p结合位点突变)的荧光素酶质粒导入膀胱癌细胞,同时共转染miR-101-3p mimics到膀胱癌细胞。转染48h后,通过双荧光素酶报告基因系统(Promega, USA)测定荧光素酶的活性情况。

**1.9 统计学分析** 使用GraphPad Prism 8软件进行实验数据分析。*t*检验用于分析两组数据间差异性,多组数据之间使用单因素方差分析。两组数据之间相关性分析时使用的是Pearson相关性分析。数据统计时记录为 $\bar{x} \pm s$ ,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 miR-101-3p是TOP2A潜在的调控基因且与膀胱癌的预后相关** 我们采用starBase数据库对TOP2A基因的潜在调节基因进行预测,得到具有结合位点的潜在目标miRNAs(图1A);随后,我们根据starBase数据库网站提供的TCGA数据库挖掘功能,在所有预测得到的miRNAs中,按照和TOP2A基因的表达相关系数进行排序,发现miR-101-3p基因处于领先位置。具体来说,在所有203例肿瘤组织中,miR-101-3p和TOP2A基因的表达相关性最高, Pearson法计算相关系数为-0.274(图1B);同时,我们对miR-101-3p和膀胱癌的生存预后进行分析,发现低表达miR-101-3p的膀胱癌患者总生存期减少,  $Log\text{-rank} < 0.05$ (图1C)。这些结果提示miR-101-3p是膀胱癌中的重要调控基因。

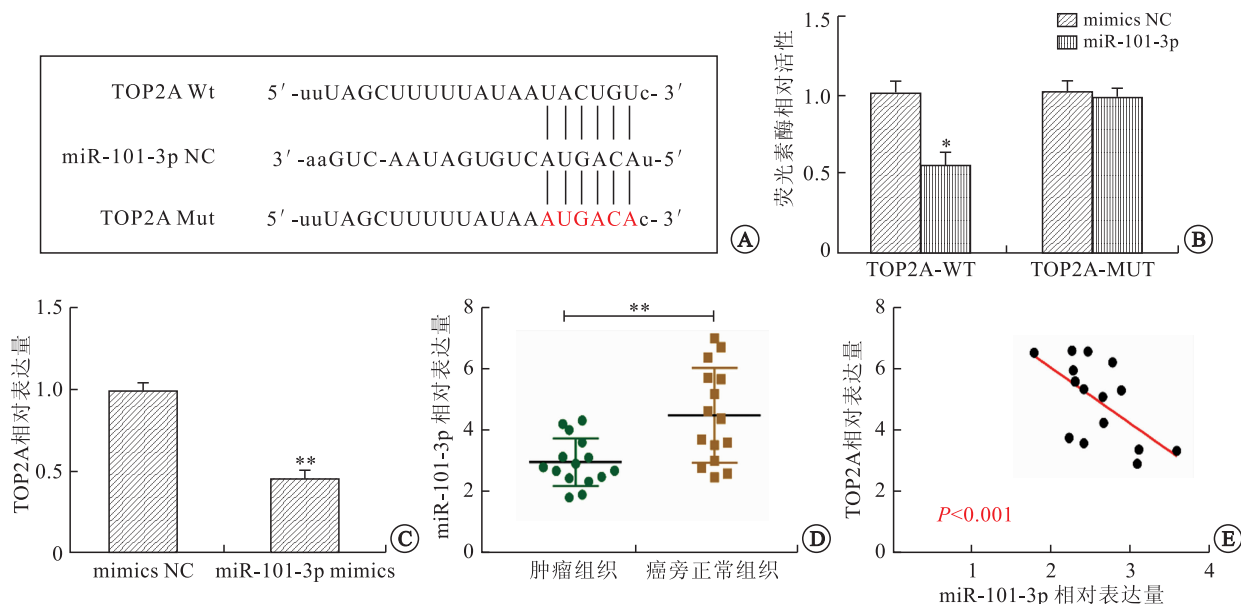


A:运用starBase网站对miRNAs预测结果;B:miR-101-3p与靶基因TOP2A表达的相关性;C:根据TCGA数据库,miR-101-3p与膀胱癌预后具有相关性。

**图1 TOP2A的调控基因miR-101-3p与膀胱癌预后的相关性**

**2.2 miR-101-3p 能够直接结合靶基因 TOP2A 且负调控靶基因的表达** 根据预测结果, 我们发现在 TOP2A 的 3'UTR 区域存在和 miR-101-3p 结合的位点(图 2A); 据此, 我们设计了荧光素酶报告基因实验, 通过构建 TOP2A 基因的野生型和突变型基因, 并同时导入含有荧光素酶活性的 miR-101-3p mimics 类似物进入膀胱癌细胞系 T24 中, 随后测定荧光素酶的活性以判断两者的结合关系, 发现野生型中荧光素酶活性减退, 而突变型中未见明显变化, 这说明两者在预测区域存在结合关系(图 2B); 同时, 我们设计

的干扰实验更进一步说明两者表达的相关性, 在膀胱癌细胞系中分别转染 mimics NC 和 miR-101-3p mimics, 并测定 TOP2A 基因的表达情况, 发现 miR-101-3p mimics 组细胞中的 TOP2A 基因表达下调(图 2C); 随后, 我们测定临床组织标本中 miR-101-3p 的表达数据并和 TOP2A 进行 Pearson 相关性分析, 结果发现在膀胱癌中 miR-101-3p 表达下调, 同时两者的表达水平具有负相关的关系(图 2D、E); 这说明在膀胱癌中, miR-101-3p 能够直接结合靶基因 TOP2A 且负调控靶基因的表达。

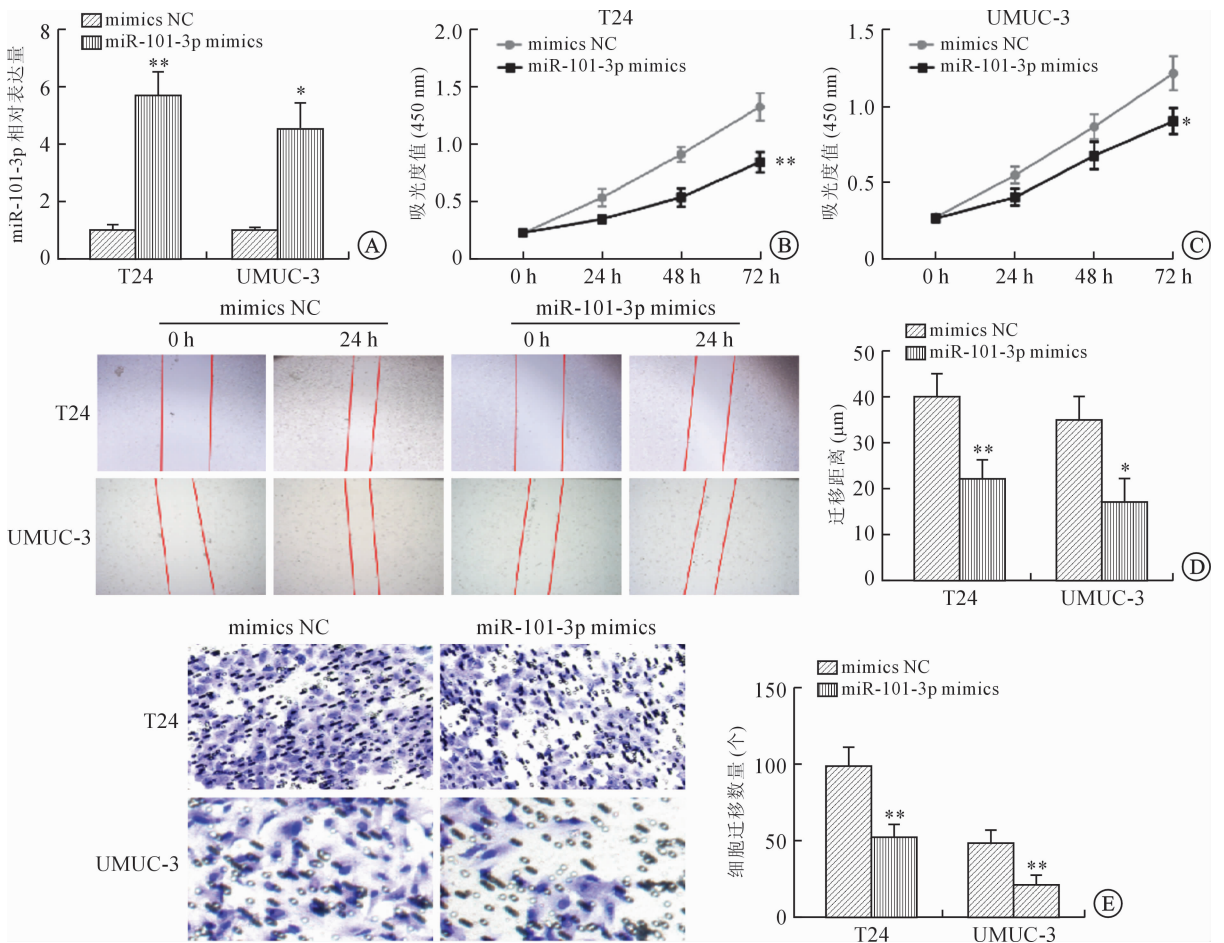


A: TOP2A 基因 3'UTR 区域存在和 miR-101-3p 结合的位点; B: TOP2A 和 miR-101-3p 的结合可以抑制荧光素酶的活性; C: 在膀胱癌细胞系中过表达 miR-101-3p, 测定发现 TOP2A 基因表达随之下调; D: 肿瘤组织标本 miR-101-3p 表达值低于癌旁正常组织; E: Pearson 相关性分析显示 TOP2A 和 miR-101-3p 在膀胱癌中具有负相关关系 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )。

图 2 miR-101-3p 是膀胱癌致癌基因 TOP2A 的调控基因

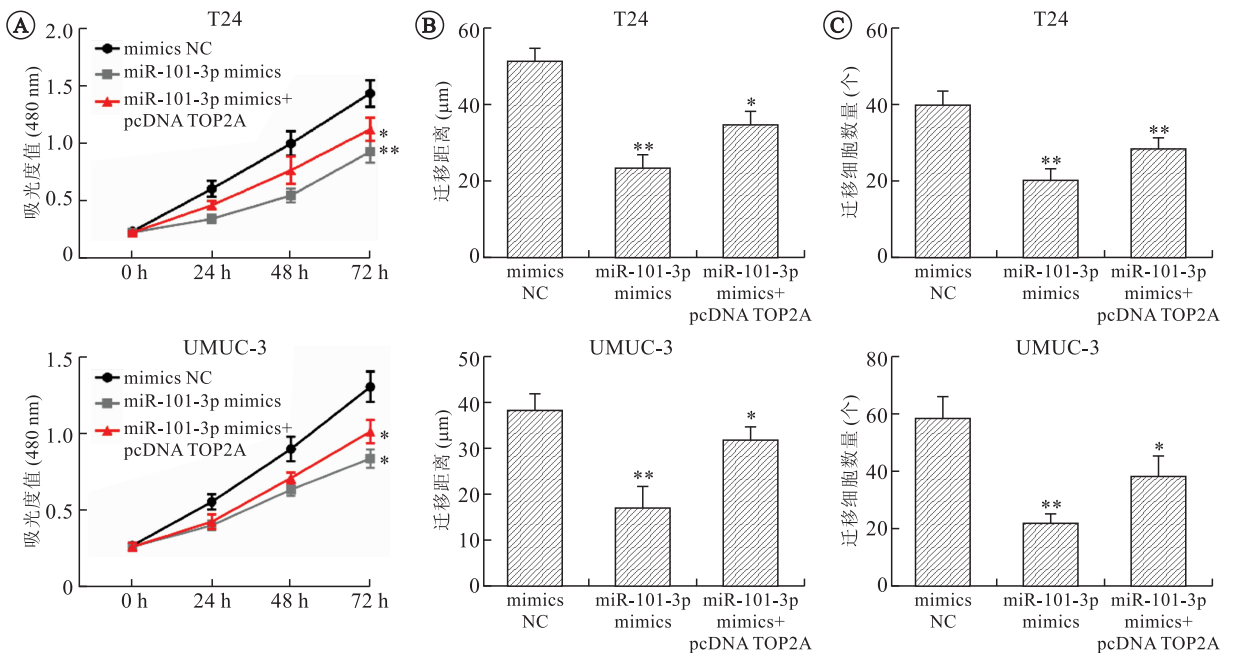
**2.3 上调 miR-101-3p 表达能够抑制膀胱癌的增殖和迁移能力** 为了研究 miR-101-3p 在膀胱癌中的实际作用, 我们进行细胞功能实验。首先在膀胱癌细胞系中分别转染 mimics NC 和 miR-101-3p mimics 进行干扰实验, 采用 qRT-PCR 测定 miR-101-3p 表达水平明显上调(图 3A); 按照细胞转染后分组比较, CCK-8 实验测定结果发现上调 miR-101-3p 表达后, 肿瘤细胞的增殖能力出现明显限制情况(图 3B); 划痕愈合实验测定结果发现上调 miR-101-3p 表达后, 肿瘤细胞的迁移能力出现明显限制情况(图 3C); 运用 Transwell 实验测定结果发现上调 miR-101-3p 表达后, 肿瘤细胞的侵袭能力出现明显限制情况(图 3D)。以上实验说明, 在膀胱癌细胞中, miR-101-3p 可以抑制肿瘤的恶性进展, 发挥抑癌基因的作用。

**2.4 miR-101-3p 通过调控 TOP2A 表达发挥抑制膀胱肿瘤进展的作用** 我们为了确认在膀胱癌中 miR-101-3p/TOP2A 信号轴对膀胱癌细胞生物学功能的影响, 设计了功能回复实验。我们运用细胞共转染技术, 在膀胱癌细胞系中分别转染 miR-101-3p NC、miR-101-3p mimics 和 miR-101-3p mimics + pcDNA3.0 TOP2A, 并运用 CCK-8 实验测定结果发现上调 TOP2A 基因表达后, 可以恢复肿瘤细胞的增殖能力(图 4A); 运用划痕愈合实验测定结果发现上调 TOP2A 基因表达, 肿瘤细胞的迁移能力受限制情况变弱(图 4B); 运用 Transwell 实验测定结果发现上调 miR-101-3p 表达后, 肿瘤细胞的侵袭能力出现部分恢复(图 4C)。综上, miR-101-3p 在膀胱癌细胞中是通过下调 TOP2A 基因的表达发挥抑制肿瘤恶性进展的作用。



A: 在膀胱癌细胞系中分别转染 mimics NC 和 miR-101-3p mimics 后测定 miR-101-3p 表达水平; B, C: CCK-8 测定细胞增殖活性结果; D: 细胞划痕愈合实验测定细胞横向迁移能力结果; E: Transwell 实验测定细胞纵向迁移能力结果 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ) (结晶紫染色,  $\times 200$ )。

图3 过表达 miR-101-3p 抑制膀胱癌细胞的增殖和迁移能力



A: CCK-8 细胞增殖实验结果; B: 细胞划痕愈合实验结果; C: Transwell 细胞迁移实验结果 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )。

图4 高表达 TOP2A 可以恢复膀胱癌细胞的增殖和迁移能力

### 3 讨论

膀胱癌是膀胱尿路上皮来源的恶性肿瘤,是泌尿系统常见的恶性肿瘤<sup>[12]</sup>。目前初诊确诊为进展期膀胱癌的患者逐年增多,同时面对治疗抵抗和丧失治疗机会的问题<sup>[13]</sup>。探索新的精准的膀胱癌预测标志物对膀胱癌的治疗具有深刻的意义。越来越多的证据表明 miRNAs 在生物学进程中参与调控多种信号通路<sup>[14]</sup>。miRNAs 通过锚定靶基因的 3' UTR 区域负向调控靶基因的表达水平,介导靶基因的降解过程或者是转录活性<sup>[15]</sup>。值得注意的是,大量证据表明,miRNAs 在肿瘤的发生和进展中扮演重要的角色<sup>[16]</sup>。因此,探究肿瘤进展中 miRNA 的调节作用和调控机制对肿瘤的临床治疗和预后具有积极的作用。如我们所知, TOP2A 在多种肿瘤中存在异常的高表达情况,并且广泛参与肿瘤的增殖,迁移和侵袭等恶性生物学功能,被认为是一个明星致癌基因<sup>[17-18]</sup>,此外,多种方式的生物信息学研究同样发现 TOP2A 在胰腺癌<sup>[19]</sup>、乳腺癌<sup>[20]</sup>和食管癌<sup>[21]</sup>中可以作为参与肿瘤进展的重要作用靶基因。同样地,在膀胱癌中, TOP2A 同样被发现和证实可以作为诱导肿瘤进展的关键靶点,参与肿瘤细胞的增殖和迁移功能<sup>[22]</sup>。我们的实验预测和验证了 TOP2A 在膀胱癌中调控的分子机制,证实 miR-101-3p 可以和 TOP2A 靶向结合,并下调其表达水平。既往研究中 miR-101-3p 可以调节 HDAC9、组蛋白脱乙酰酶 9<sup>[23]</sup>、PTGS2、前列腺素内过氧化物合酶 2<sup>[24]</sup>。在肝癌中, miR-101-3p 还被发现可以调控 wnt/b-catenin 信号通路,发挥抑制肝癌进展的作用<sup>[25]</sup>;而在胃癌中发现 miR-101-3p 参与调节 AMPK 通路抑制肿瘤发生<sup>[26]</sup>。生物信息学预测结果显示, miR-101-3p 和 TOP2A 基因在 403 例膀胱癌组织中具有较高的表达相关性。此外,临床数据分析表明 miR-101-3p 低表达的膀胱癌患者总生存期短于 miR-101-3p 高表达的膀胱癌患者,提示 miR-101-3p 在肿瘤进程中发挥保护作用。我们采用细胞实验来进一步验证 miR-101-3p 发挥的具体作用,通过细胞转染计数构建失基因调控的肿瘤细胞模型,并运用 CCK-8、细胞划痕愈合实验和 Transwell 实验测定细胞增殖和迁移能力的变化,结果发现过表达 miR-101-3p 后,膀胱癌细胞的增殖能力和迁移能力均受到限制,这表明 miR-101-3p 主要参与调控膀胱癌细胞的增殖和迁移能力,发挥保护机体的作用。最后,我们为了确认 TOP2A 是 miR-101-3p 发挥作用的下游分子靶点,设计了细胞功能回复实

验。我们利用细胞共转染技术,在膀胱癌细胞系中同时 pcDNATOP2A 和 miR-101-3p mimics,并与转染 miR-101-3p mimics 分组进行组间比较,发现回复 TOP2A 基因表达后,可以减少 miR-101-3p mimics 对膀胱癌细胞增殖和迁移能力的抑制情况,细胞增殖活性和迁移活性均得到恢复,这说明 miR-101-3p 发挥作用的确通过 miR-101-3p/TOP2A 信号轴。综上所述,我们的实验首次发现并证实了膀胱癌中 miR-101-3p 参与调节关键致癌基因 TOP2A 的表达情况,并参与调控膀胱癌细胞的增殖和迁移能力,导致肿瘤的恶性进展。

miR-101-3p 在膀胱癌中诱导 TOP2A 基因的异常的高表达,且促进膀胱癌细胞的增殖和迁移改变,导致肿瘤预后不良。

#### 参考文献:

- [1] HYUN AH SEO, SOKVISETH MOENG, SEOKMIN SIM, et al. MicroRNA-based combinatorial cancer therapy: effects of microRNAs on the efficacy of anti-cancer therapies[J]. *Cells*, 2019, 9(1):29.
- [2] CHEN Q, ZHANG J, ZHENG T, et al. The role of microRNAs in the pathogenesis, grading and treatment of hepatic fibrosis in schistosomiasis[J]. *Parasit Vectors*, 2019, 12(1):611.
- [3] HANDA H, MURAKAMI Y, ISHIHARA R, et al. The role and function of microRNA in the pathogenesis of multiple myeloma [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11):1738.
- [4] ERGUN S, GÜNEY S, TEMİZ E, et al. Significance of miR-15a-5p and CNKSR3 as novel prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18(12):1695-1701.
- [5] LIU M, MA T, YANG Y, et al. MiR-1/GOLPH3/Foxo1 signaling pathway regulates proliferation of bladder cancer[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2019, 18:1533033819886897.
- [6] CAI HM, LIN H, CAO WY, et al. Downregulation of miR-519a predicts poor prognosis and contributes to tumor progression in gastric cancer[J]. *Oncol Res Treat*, 2020, 43(12):19-26.
- [7] GROBBELAAR C, FORD AM. The role of microRNA in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: challenges for diagnosis and therapy[J]. *J Oncol*, 2019, 2019:8941471.
- [8] NUNCIA-CANTARERO M, MARTINEZ-CANALES S, ANDRÉS-PRETEL F, et al. Functional transcriptomic annotation and protein-protein interaction network analysis identify NEK2, BIRC5, and TOP2A as potential targets in obese patients with luminal a breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 169(3):613-623.
- [9] ZHANG R, XU J, ZHAO J, et al. Proliferation and invasion of colon cancer cells are suppressed by knockdown of TOP2A[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(9):7256-7263.
- [10] LABBÉ DP, SWEENEY CJ, BROWN M, et al. TOP2A and

- EZH2 provide early detection of an aggressive prostate cancer subgroup[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(22):7072-7083.
- [11] ZENG S, LIU A, DAI L, et al. Prognostic value of TOP2A in bladder urothelial carcinoma and potential molecular mechanisms [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):604.
- [12] WU P, ZHANG GH, ZHAO J, et al. Profiling the urinary microbiota in male patients with bladder cancer in China[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8:167.
- [13] ROUPRÊT M. Words of wisdom. Re: finasteride reduces the risk of bladder cancer in a large prospective screening study[J]. *Eur Urol*, 2016, 69(3):537.
- [14] MATSUYAMA H, SUZUKI HI. Systems and Synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1):132.
- [15] MOHR AM, MOTT JL. Overview of microRNA biology[J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(1):3-11.
- [16] AVGERIS M, PANOUTSOPOULOU K, PAPADIMITRIOU MA, et al. Circulating exosomal miRNAs: clinical significance in human cancers[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2019, 19(11):979-995.
- [17] LIU T, ZHANG HL, YI S, et al. Mutual regulation of MDM4 and TOP2A in cancer cell proliferation[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(5):1047-1058.
- [18] MA W, WANG B, ZHANG Y, et al. Prognostic significance of TOP2A in non-small cell lung cancer revealed by bioinformatic analysis[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:239.
- [19] CHEN Q, YU D, ZHAO Y, et al. Screening and identification of hub genes in pancreatic cancer by integrated bioinformatics analysis[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(12):19496-19508.
- [20] DENG JL, XU YH, WANG G. Identification of potential crucial genes and key pathways in breast cancer using bioinformatic analysis[J]. *Front Genet*, 2019, 10:695.
- [21] ZHONG X, HUANG G, MA Q, et al. Identification of crucial miRNAs and genes in esophageal squamous cell carcinoma by miRNA-mRNA integrated analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(27):e16269.
- [22] ZENG S, LIU A, DAI L, et al. Prognostic value of TOP2A in bladder urothelial carcinoma and potential molecular mechanisms [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):604.
- [23] SUN H, GUO F, XU L. Downregulation of microRNA-101-3p participates in systemic lupus erythematosus progression via negatively regulating HDAC9[J]. *J Cell Biochem*, 2020.
- [24] WEI Q, LV F, ZHANG H, et al. MicroRNA-101-3p inhibits fibroblast-like synoviocyte proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis by targeting PTGS2 [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(1):BSR20191136.
- [25] SHAO Q, XU J, DENG R, et al. SNHG 6 promotes the progression of colon and rectal adenocarcinoma via miR-101-3p and Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *BMC Gastroenterol*, 2019, 19(1):163.
- [26] CAO S, LIN L, XIA X, et al. lncRNA SPRY4-IT1 regulates cell proliferation and migration by sponging mir-101-3p and regulating ampk expression in gastric cancer [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 17:455-464.

(编辑 杨婉婉)

(上接第 726 页)

#### 参考文献:

- [1] MATEO J, PORTA N, BIANCHINI D, et al. Olaparib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair gene aberrations (TOPARP-B): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(1):162-174.
- [2] DIAMOND JR, BORGES VF, ECKHARDT SG, et al. BRCA in breast cancer: from risk assessment to therapeutic prediction[J]. *Drug News Perspect*, 2009, 22(10):603-608.
- [3] QUIGLEY D, ALUMKAL JJ, WYATT AW, et al. Analysis of circulating cell-free DNA identifies multiclonal heterogeneity of BRCA2 reversion mutations associated with resistance to PARP Inhibitors[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(9):999-1005.
- [4] TONG D, GILLICK L, HENDRICKSON FR. The palliation of symptomatic osseous metastases: final results of the study by the radiation therapy oncology group[J]. *Cancer*, 1982, 50(5):893-899.
- [5] ASIM M, TARISH F, ZECCHINI HI, et al. Synthetic lethality between androgen receptor signalling and the PARP pathway in prostate cancer[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):374.
- [6] CLARKE N, WIECHNO P, ALEKSEEV B, et al. Olaparib combined with abiraterone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(7):975-986.
- [7] DU J, YANG Q, CHEN XS, et al. Changes in fPSA level could discriminate tPSA flare-up from tPSA progression in patients with castration-refractory prostate cancer during the initial phase of docetaxel-based chemotherapy [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72(5):1055-1061.
- [8] SILVER DA, PELLICER I, FAIR WR, et al. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues[J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(1):81-85.
- [9] DORFF TB, TSAO-WEI DD, GROSHEN S, et al. Efficacy of oxaliplatin plus pemetrexed in chemotherapy pretreated metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2013, 11(4):416-422.

(编辑 郭楚君)