

· 基础研究 ·

miR-184 靶向 AGO2 调控 AKT/mTOR 信号通路对膀胱癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响

王 阳¹, 胡跃世¹, 李明林¹, 李 征¹, 刘 磊¹, 谷傲崢¹, 马慧利²

(南阳市中心医院: 1. 泌尿外科; 2. 肿瘤科; 河南南阳 473009)

Up regulation of miR-184 inhibitsthe proliferation, invasion and migration of bladder cancer cells by targeting AGO2 via AKT/mTOR signaling pathway

WANG Yang¹, HU Yue-shi¹, LI Ming-lin¹, LI Zheng¹, LIU Lei¹, GU Ao-zheng¹, MA Hui-li²

(1. Department of Urology; 2. Department of oncology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473009, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the role of miR-184 in the development of bladder cancer. Methods The expression of miR-184 in bladder cancer and adjacent tissues was detected by qRT-PCR in 87 cases of bladder cancer resected from Jan. 2015 to Jan. 2017 in Nanyang Central Hospital of Henan Province. Predicting the target gene of miR-184 by bioinformatics and verifying by double luciferase and immunofluorescence. miR-184 overexpression plasmid was transfected into human bladder cancer cell line T24. MTT, Transwell invasion and wound healing assay were used to detect cell proliferation, invasion and migration. Western blot was used to detect the expression of AKT/mTOR pathway protein. Results The relative expression level of miR-184 in bladder cancer tissues (1.238 ± 0.026) was significantly lower than that in adjacent tissues (2.601 ± 0.054), and the difference was statistically significant ($t=22.57, P<0.01$), and the expression level was significantly correlated with TNM stage, lymph node metastasis and histological grade of bladder cancer patients ($t=-5.61, P<0.001$; $t=-2.35, P=0.011$; $t=2.171, P=0.033$). Bioinformatics prediction and double luciferase reporter gene experiments confirmed that miR-184 could directly target AGO2 gene 3'-UTR. The results of in vitro experiments showed that the expression of AGO2 mRNA and protein in T24 cells decreased significantly, the proliferation, migration and invasion ability decreased, and the expression of p-mTOR and p-AKT protein decreased ($P<0.05$). Conclusion miR-184 is low expression in bladder cancer. Up regulation of miR-184 can inhibit cell proliferation, invasion and migration. The mechanism may be related to the regulation of AKT/mTOR signaling pathway.

KEY WORDS: bladder cancer; miR-184; AGO2; AKT/mTOR signaling pathway

摘要:目的 研究 miR-184 在膀胱癌发生、发展过程中的作用及其相关机制。方法 收集 2015 年 1 月至 2017 年 1 月南阳市中心医院 87 例膀胱癌患者的手术切除标本,采用 qRT-PCR 检测膀胱癌及癌旁组织中 miR-184 的表达;通过生物信息学方法预测 miR-184 的靶基因并采用双荧光素酶实验及免疫荧光进行验证。在人膀胱癌细胞系 T24 中转染 miR-184 过表达质粒,MTT、Transwell 侵袭和划痕实验检测细胞增殖、侵袭和迁移能力,Western blot 检测 AKT/mTOR 通路蛋白的表达。结果 miR-184 在膀胱癌组织中的相对表达水平 1.238 ± 0.026 明显低于癌旁组织 2.601 ± 0.054 ,差异有统计学意义($t=22.57, P<0.01$);且其表达水平与膀胱癌患者的 TNM 分期($t=-5.61, P<0.001$)、淋巴结转移($t=-2.35, P=0.011$)及组织学分级存在明显相关($t=2.171, P=0.033$)。生物信息学预测及双荧光素酶报告基因实验证实 miR-184 能直接靶向结合 AGO2 基因 3'-UTR。体外实验结果表明,转染 miR-184 模拟物后,膀胱癌细胞 T24 中 AGO2 mRNA 和蛋白的表达水平明显下调,细胞增殖、迁移及侵袭能力降低,p-mTOR、p-AKT 蛋白表达降低($P<0.05$)。结论 miR-184 在膀胱癌组织中低表达,上调 miR-184 表达可抑制细胞的增殖、侵袭和迁移能力,其作用机制可能与 AKT/mTOR 信号通路的调节有关。

关键词:膀胱癌;miR-184;AGO2;AKT/mTOR 信号通路

中图分类号:R494

文献标志码:A

DOI:10.3969/j.issn.1009-8291.2020.07.015

膀胱癌是泌尿系发病率最高的恶性肿瘤之一,早期症状不明显,多数患者就诊时已处于晚期,其具有易进展、易复发、易转移、预后差的特点^[1]。微小

RNA(microRNAs, miRNA)是由 20~25 个核苷酸组成的非编码单链小分子 RNA,广泛存在于植物、动物及人类细胞中,其可通过与 mRNA 的 5'端或 3'端翻译区(untranslated region, UTR)结合调控靶基因的表达,从而影响目的基因的表达翻译过程^[2-3]。有

收稿日期:2020-04-13

修回日期:2020-05-28

作者简介:王阳,主治医师。研究方向:泌尿外科临床疾病诊治。

E-mail:825598245@qq.com

研究报道 miRNAs 既可作为原癌基因,又可作为抑癌基因参与肿瘤的发生发展过程^[4]。研究发现 miR-184 在多种实体肿瘤的恶性进展中发挥类似“原癌基因”的作用^[5-6]。但 miR-184 在膀胱癌中的作用尚不明确,因此,本研究旨在研究 miR-184 在膀胱癌发生发展中的作用及相关机制,为膀胱癌的诊断和治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本及细胞株 选取南阳市中心医院 2015 年 1 月至 2017 年 1 月行根治性膀胱切除术的膀胱癌及癌旁组织标本各 87 例(癌旁组织选择距癌灶边缘 5 cm 以上),患者年龄为(56.62±11.58)岁,所有患者均经病理学证实为膀胱尿路上皮癌,术前均未行放疗及免疫治疗等治疗。采集组织样本后立即置于液氮中保存备用。本研究获我院伦理委员会批准,所有患者及其家属均知情同意。人膀胱癌 T24 细胞株购于中科院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640 细胞培养基及胎牛血清购自美国 HyClone 公司;磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)及胰酶细胞消化液(含 EDTA)0.25%购自北京索莱宝生物科技有限公司;Trizol ©试剂及 Lipofectamine © 2000 购自美国 Invitrogen 生物科技公司;miR-184 模拟物(mimic)、无义 miRNA 及其引物(miRNA-NC)均购自广州锐博生物公司;TaqMan © MicroRNA Reverse Transcription kit 及 TaqMan © Universal PCR Master Mix 购自美国 ABI 公司;兔单克隆抗体 AGO2、AKT、mTOR、p-AKT、p-mTOR 抗体购自英国 Abcom 公司;双荧光素酶报告基因系统试剂盒购自美国 Promega 公司;噻唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 生物公司;Transwell 小室及 Matrigel 基质胶购于美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养膀胱癌细胞 T24,并置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。进行常规细胞传代和细胞转染,采用 Lipofectamine 2000 转染 miR-184 模拟物(mimic)和无义 miRNA 至 T24 细胞中,收集细胞提取 RNA 及蛋白进行下一步实验。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 采用 Trizol 法分别提取细胞及组织的总 RNA 并通过紫外分光光度计法进行定量。按 TaqMan © MicroRNA

Reverse Transcription kit 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 并置于 4 °C 保存。以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 扩增,反应条件为:95 °C,5min 预变性;95 °C 10 s,60 °C 35 s,65 °C 30 s,扩增 35 个循环。引物序列详见表 1。以 U6 和 GAPDH 为内参,分别计算 miR-184 和 AGO2 相对表达量。

表 1 miR-184、miR-184、U6 及 GAPDH 的引物序列

引物	序列
miR-184	UACGCAUACGAAUCAGUAG CUACUGAUUCGUAUGCGUA
U6	AGGCAACAAAGUGAGACGU ACGUCUCACUUUGUUGCCU
AGO2	GGCTGTCCTGGGTTTCACT GGGTGCTTGTATTGCTTCATC
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC TGGTGAAGACGCCAGTGA

1.2.3 生物信息学预测 miR-184 的靶基因 利用 Target Scan 7.2、miRNADB、mirWalk2 和 starBase v2 共 4 种在线预测靶基因数据库预测 miR-184 的靶基因;然后将每个数据库预测靶基因的结果进行交集。

1.2.4 双荧光素酶报告实验 下载 miR-184 的预测靶基因 AGO2 3'-UTR 序列,将 AGO2 基因的野生型序列和突变型序列克隆至 pGL4.23[luc2/minP]质粒构建双荧光素酶报告基因质粒。取对数生长的 T24 细胞按 70%的汇合度接种到 24 孔板中,将该载体与 miR-184 模拟物共转染 24 孔板细胞,每个样品设置 6 个复孔,常规培养 24 h 后使用 Promega 的报告基因试剂盒检测荧光强度。

1.2.5 Western blot 检测 AGO2 及 AKT/mTOR 通路蛋白表达水平 收集各组膀胱癌细胞,提取细胞总蛋白,采用考马斯亮蓝法测蛋白质含量并进行定量分析;对蛋白煮沸变性处理,-20 °C 保存备用。配置 SDS-PAGE 电泳凝胶,依次进行电泳,然后采用湿转法转移到 PVDF 膜,室温 5%脱脂牛奶封闭 1 h。随后加入一抗于 4 °C 下摇床孵育过夜;次日吸去一抗后 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;二抗孵育 1 h;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;随后采用化学发光法(electrochemi luminescence, ECL)进行显影。以 β -actin 为内参计算目的蛋白的相对表达量,作图处理。

1.2.6 MTT 检测细胞增殖 收集转染后的各组细胞以每孔 1 000~10 000 个细胞分别接种于 96 孔板中,每孔每隔 24 h 加入 50 μ L MTT 溶液(5 mg/

mL),每个时间段均设置3个复孔,置于恒温箱孵育4 h后吸弃孔内上清液,每孔加入100 μ L 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide,DMSO),振荡10 min,使结晶物充分融解。酶标仪检测各孔570 nm处吸光度(A)值,绘制细胞增殖曲线。

1.2.7 划痕实验检测细胞迁移能力 取对数生长期的T24细胞,收集转染后的各组细胞并将细胞铺种在6孔板上,待细胞生长至70%左右,用200 μ L枪头垂直于孔板和线制造细胞划痕,尽量保证各个划痕宽度一致,PBS洗涤3次以去除漂浮的细胞,再加入无血清培养基。于划痕后0、12、24 h拍照。使用Image Pro Plus软件进行分析,计算划痕内细胞数和测量细胞迁移的距离。

1.2.8 Transwell实验检测细胞侵袭能力 将Matrigel胶与RPMI-1640培养基以1:4体积比混合,铺于Transwell侵袭小室,于上室加经过不同处理的200 μ L细胞悬液,下室加700 μ L含30%的胎牛血清培养基,置于恒温培养箱内继续培养12~24 h。用脱脂棉小心拭去基质胶及上室内细胞;以多聚甲醛固定10 min,1%结晶紫染色5 min,PBS洗涤3~5次,晾干,倒置显微镜下计数穿膜细胞数目,实验重复3次。

1.3 统计学方法 采用SPSS 21.0统计软件进行统计学分析并采用GraphPad Prism 7进行作图,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验或LSD- t 检验;计数资料采用 χ^2 检验分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-184在膀胱癌和癌旁组织中的表达及与临床病理特征的关系 qRT-PCR结果表明,miR-184在87例膀胱癌及癌旁组织中的相对表达水平分别为 1.238 ± 0.026 和 2.601 ± 0.054 ,两组比较差异有统计学意义($t=22.57, P<0.0001$,图1)。进一步分析miR-184表达与临床病理参数之间的关系,结果发现,miR-184相对表达水平与膀胱癌患者的TNM分期($t=-5.61, P<0.001$)、淋巴结转移($t=-2.35, P=0.011$)及组织学分级存在明显相关($t=2.171, P=0.033$),而与性别、年龄、远处转移无明显相关性。见表2。

2.2 miR-184靶基因的预测和验证 通过starBase v2.0、mirwalk2、TargetScan7.2、miRNADB 4大生物信息学软件预测miR-184的靶基因并取交集获取

共同的下游靶基因,结果显示,AGO2为miR-184的靶基因(图2A),并通过starBase v2.0和TargetScan7.2找到miR-184与AGO2的互作序列(图2B)。荧光素酶报告基因实验显示,在T24细胞中miR-184模拟物能够明显抑制AGO2-3'UTR报告载体的荧光素酶活性,而突变质粒AGO2荧光素酶活性没有被减弱(图2C, $P<0.05$),提示miR-184能直接靶向结合AGO2基因3'-UTR。

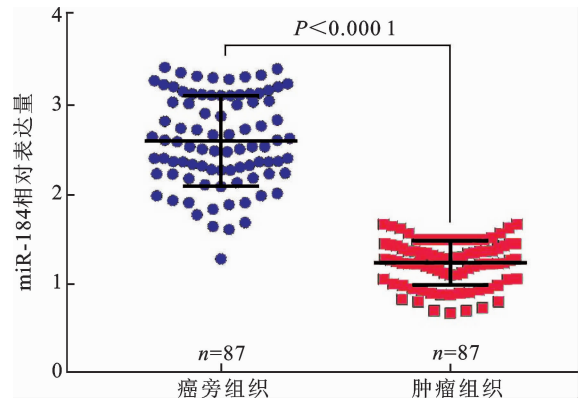
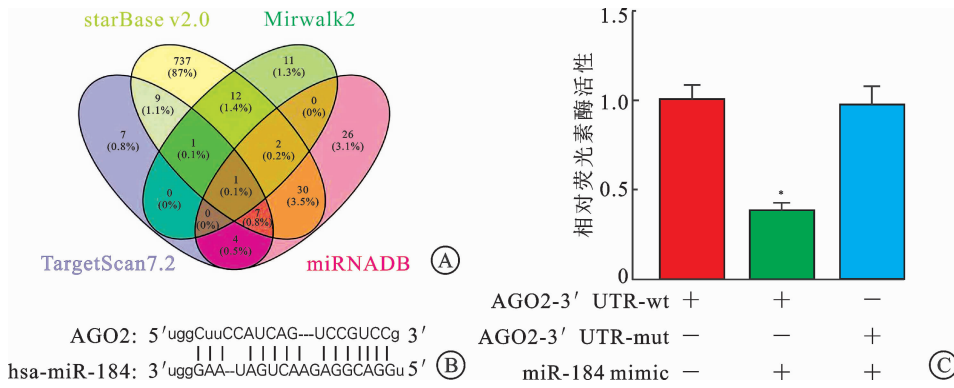


图1 miR-184在膀胱癌及癌旁组织中的表达水平

表2 miR-184表达与膀胱癌患者临床病理参数的关系

项目	n	miR-184 表达量	t 值	P 值
性别			0.303	0.762
男	63	2.65 ± 1.14		
女	24	2.57 ± 1.04		
年龄(岁)			0.479	0.633
<60	55	2.66 ± 1.25		
≥ 60	32	2.53 ± 1.17		
TNM分期			-5.61	0.000
T1~T2	54	1.86 ± 0.82		
T3~T4	33	3.31 ± 1.32		
淋巴结转移			-2.35	0.011
N0	61	2.54 ± 1.08		
N1~N2	26	3.16 ± 1.23		
远处转移			0.216	0.829
M0	71	2.72 ± 1.18		
M1	16	2.64 ± 1.12		
组织学分级			2.171	0.033
G1~G2	48	2.63 ± 1.12		
G3	29	3.24 ± 1.31		

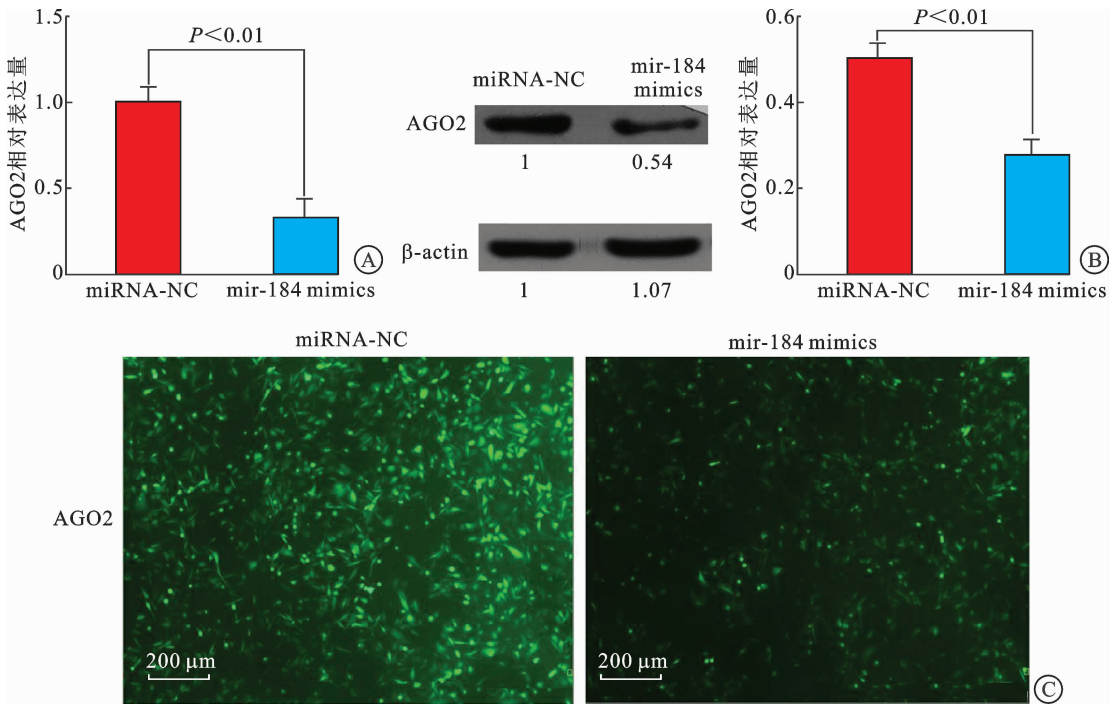


A、B:生物信息学软件预测 AGO2 是 miR-184 的靶基因;C:miR-184 mimic 抑制 AGO2 3'UTR 荧光素酶活性(* $P < 0.05$)。

图 2 miR-184 靶基因的预测和验证

2.3 miR-184 模拟物对 AGO2 mRNA 和蛋白表达的影响 如图 3 所示,将 miR-184 模拟物和 miRNA-NC 转染至膀胱癌细胞 T24 中,采用 qRT-PCR、Western blot 和免疫荧光检测 AGO2 mRNA 和蛋白的表达水平。结果发现,转染 miR-184 模拟物后 AGO2 mRNA (1.000 ± 0.041 vs. 0.327 ± 0.052) 和

蛋白(0.501 ± 0.012 vs. 0.273 ± 0.010)的表达水平较转染 miRNA-NC 显著降低,差异均有统计学意义($t = 10.13, P < 0.001$; $t = 14.64, P < 0.001$,图 3),表明 miR-184 可直接靶向膀胱癌细胞 T24 中 AGO2 3'UTR,抑制 AGO2 mRNA 和蛋白表达。



A:qRT-PCR 检测 AGO2 mRNA 表达水平;B: Western blot 检测 AGO2 蛋白表达水平;C:免疫荧光检测膀胱癌 T24 细胞中 AGO2 蛋白的表达情况。

图 3 miR-184 模拟物对 T24 细胞中 AGO2 mRNA 和蛋白的影响

2.4 miR-184 模拟物对膀胱癌 T24 细胞增殖、迁移及侵袭的影响 MTT 增殖实验结果显示,在 T24 细胞转染 miR-184 模拟物后,培养 24、48、72 h 时,miR-184 mimic 组 T24 细胞吸光度(A)值显著低于 NC 组(0.498 ± 0.014 vs. $0.691 \pm 0.049, t = 3.728, P = 0.0203$; 0.661 ± 0.037 vs. $1.25 \pm 0.069, t = 7.498, P = 0.0017$; 0.883 ± 0.052 vs. $1.548 \pm 0.058, t = 8.4, P = 0.0011$) (图 4A)。划痕实验结果表明,转染

miR-184 模拟物后,miR-184 mimic 组 T24 细胞的迁移率(44.010 ± 2.082)%,明显低于 NC 组(75.170 ± 1.453)%,差异具有统计学意义($t = 12.27, P = 0.003$) (图 4B)。Transwell 侵袭实验结果显示,miR-184 模拟物组的细胞侵袭数目(94.67 ± 10.14)个较 NC 组(203.70 ± 12.86)个明显减少,差异具有统计学意义($t = 6.655, P = 0.0026$) (图 4C)。以上实验结果表明 miR-184 过表达可抑制膀胱癌细胞的增殖、

迁移和侵袭能力。

2.5 miR-184 表达改变对 AKT/mTOR 信号通路的影响 为了证实 miR-184 是否通过 mTOR 信号通路影响膀胱癌的发生和发展。采用 Western blot 法检测 AKT/p-AKT 和 mTOR/p-mTOR 的表达水平，

结果显示：与阴性对照组 (NC) 相比，miR-184 mimic 组的 AKT、mTOR 蛋白表达水平未发生改变，而 miR-184 mimic 组细胞 p-AKT 及 p-mTOR 蛋白表达水平明显下调，见图 5。

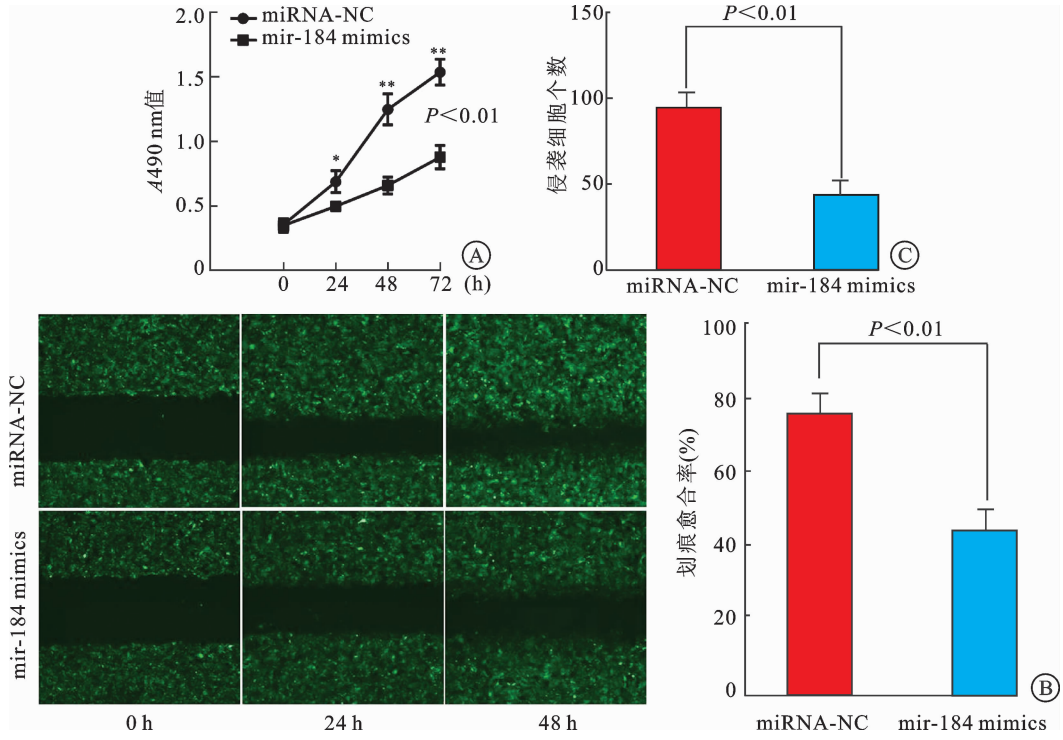


图 4 miR-184 模拟物对膀胱癌 T24 细胞增殖、迁移及侵袭的影响
A: MTT 实验检测 miR-184 模拟物对 T24 细胞增殖能力的影响; B: 划痕实验检测 miR-184 模拟物对 T24 细胞迁移能力的影响; C: Transwell 实验检测 miR-184 模拟物对 T24 细胞侵袭能力的影响。与 NC 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

图 4 miR-184 模拟物对膀胱癌 T24 细胞增殖、迁移及侵袭的影响

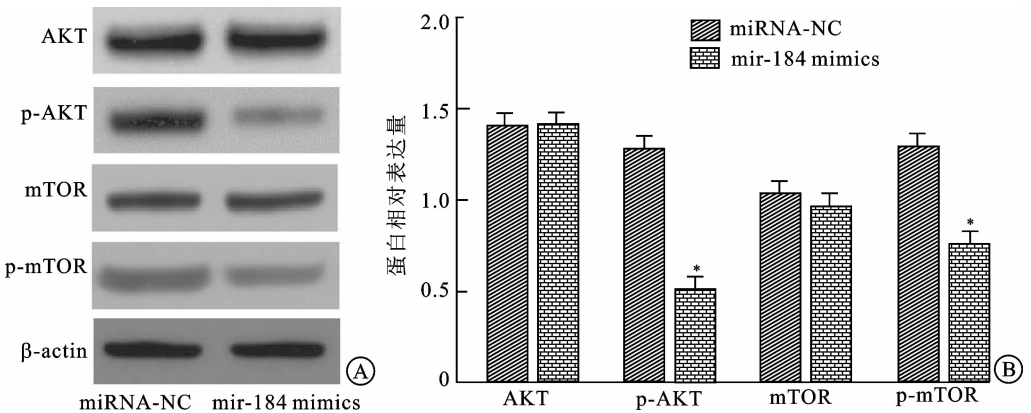


图 5 miR-184 对 T24 细胞中 mTOR 通路蛋白表达的影响
A: Western blot 法检测 AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 的蛋白表达水平; B: AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白相对表达水平。* $P < 0.01$ 。

图 5 miR-184 对 T24 细胞中 mTOR 通路蛋白表达的影响

3 讨论

膀胱癌是男性生殖系统常见恶性肿瘤之一，膀胱癌分为非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌。当膀胱癌进展成为肌层浸润性膀胱癌时，尽管经过根治性手术和放射治疗等治疗，约有 70% 的患者会发

生术后复发，预后差^[7]，这对临床上膀胱癌的治疗带来巨大挑战^[8]。在过去的 30 年中，膀胱癌新的治疗方式或早期诊断手段均未取得明显进展。而现有的诊断方法如膀胱镜检查 and 尿液细胞学检查存在诊断率低的缺点^[9]。因此，寻找膀胱癌更灵敏的诊断工具和有效的治疗方法显得尤为迫切^[10]。

miRNAs 是由约 22 个核苷酸组成的非编码的非编码小 RNA 分子,它们通过依赖于 miRNA 和靶基因的互补性的两种不同的机制反向调控靶基因的表达^[11]。许多研究表明,miRNAs 广泛参与真核生物细胞的增殖、分化、凋亡、信号传导等多种生物过程^[12]。这些小 miRNAs 的突变缺失或者异位表达可能与多种疾病密切相关,包括肿瘤^[13]。CALIN 等^[14]首先发现 miRNAs 可以起到肿瘤抑制基因作用。他们研究发现,患有一种成年型 B 细胞慢性淋巴型白血病患者常有 miR-15a 和 miR-16-1 基因簇的缺失或是表达下调。另有研究发现,miRNA 在肿瘤细胞扮演癌基因的功能,miR-21 在胶质母细胞瘤中表达量比正常组织高 5~100 倍,进一步研究发现 miR-21 通过抑制凋亡而并非影响细胞增殖控制肿瘤细胞生长^[15]。表明 miRNAs 在人类多种实体肿瘤中起着肿瘤抑制基因或者癌基因的作用,可能促进也可能抑制癌症的发生。

有研究发现,miR-184 在非小细胞肺癌 (non small cell lung cancer, NSCLC)^[16]、头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)^[17]、胶质瘤 (glioma, GBM)^[18]、肾癌 (renal carcinoma, RC)^[19]、人子宫内膜癌 (endometrial carcinoma, EC)^[20] 等多种肿瘤的异常表达,其在肿瘤的发生发展过程扮演重要作用。WONG 等^[21]报道使用实时定量 PCR 检测 4 例舌鳞状细胞癌和配对的正常组织中 156 个人类成熟 microRNA 的表达水平。结果显示供我们筛选并鉴定出包括 miR-184 在内的 24 个上调成熟 miRNA。进一步的实验发现,抑制舌鳞状细胞癌细胞系中 miR-184 的表达可明显降低细胞增殖率并且促进细胞凋亡。另外,研究发现舌鳞状细胞癌患者血浆中 miR-184 的表达水平明显高于正常人,并且手术切除原发肿瘤后血浆 miR-184 水平明显降低。提示 miR-184 在舌鳞状细胞癌高表达,其过表达可能在舌鳞状细胞癌的抗凋亡和增殖过程中起致癌作用。研究报道,与癌旁组织相比,miR-184 在肾癌组织中的表达明显升高,且随肾癌临床分期的升高而升高 ($P < 0.05$)。通过将 miR-184 模拟物转染人肾癌细胞 ACHN 后,miR-184 表达增加,细胞增殖、集落形成能力增强并抑制细胞凋亡 ($P < 0.05$)^[19]。而在 CHEN 等^[20]的研究发现,miR-184 在人子宫内膜癌组织中的表达明显低于正常子宫内膜组织,miR-184 的表达水平与子宫内膜癌患者的淋巴结转移和预后有关。通过体外实验表明 CDC25A 是 miR-184 在人子宫内膜癌细胞中的靶基因,miR-184 的表达降低是通过 CDC25A 依赖的 Notch 信号

通路从而抑制人子宫内膜癌细胞的生长和侵袭,提示 miR-184 可能是一个有希望的靶点,为人子宫内膜癌的治疗提供了新的途径。

鉴于 miR-184 在肿瘤特异性表达及重要的调控潜能,其在膀胱癌的诊断和治疗中可能起着至关重要的作用。近年来,随着高通量测序技术的迅速发展,膀胱癌患者与健康志愿者之间、膀胱癌组织与匹配的外周对照组织之间表达异常的 miRNAs 越来越多。而 miR-184 在膀胱癌中的作用及相关机制未见相关报道。为探寻 miR-184 在膀胱癌组织中的表达水平,本研究采用 qPCR 技术检测 miR-184 在膀胱癌组织及癌旁组织的表达情况,结果表明,miR-184 在膀胱癌组织中的表达水平明显低于其癌旁组织,差异有统计学意义 ($t = 22.57, P < 0.01$);且 miR-184 相对表达水平与膀胱癌患者的 TNM 分期、淋巴结转移及组织学分级存在明显相关,差异有统计学意义 (P 均 > 0.05)。提示 miR-184 在膀胱癌组织中低表达,并且参与了膀胱的恶性进程。为进一步研究 miR-184 在膀胱癌中的具体作用调控机制,我们通过多种生物信息学软件预测 miR-184 的靶基因并采用荧光素酶报告基因实验进行验证,结果显示,AGO2 是 miR-184 的靶基因。随后我们采用脂质体转染技术将 miR-184 模拟物和 miRNA-NC 转染至膀胱癌细胞 T24 中,qRT-PCR、Western blot 和免疫荧光检测 AGO2 mRNA 和蛋白的表达水平,结果表明,与转染 miRNA-NC 相比,转染 miR-184 模拟物后 AGO2 mRNA 和蛋白的表达明显降低 ($P < 0.01$,图 3)。为进一步探讨 miR-184 对膀胱癌生物学功能的影响,采用 MTT 增殖实验、划痕实验及 Transwell 侵袭实验检测 miR-184 过表达后对膀胱癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力,结果发现,在 T24 细胞转染 miR-184 模拟物后,miR-184 过表达显著抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明 miR-184 可能通过靶向 AGO2 促进膀胱癌细胞的增殖和侵袭。本研究结果显示,上调 miR-184 表达可降低 p-AKT 及 p-mTOR 蛋白表达水平,而总 AKT、总 mTOR 蛋白表达水平未发生明显变化,提示 miR-184 可能通过抑制膀胱癌细胞中 AGO2 的表达,从而激活 AKT/mTOR 信号通路,参与膀胱癌的进程。

综上所述,miR-184 在膀胱癌组织中显著低表达,上调 miR-184 表达可抑制细胞的增殖、侵袭和迁移,其作用机制可能与 AKT/mTOR 信号通路相关。提示 miR-184 在膀胱癌细胞生物学功能中发挥重要作用,有望为膀胱癌的诊断和治疗提供新的思路及理论依据。

参考文献:

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] THOMSON DW, DINGER ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(5): 272-279.
- [3] ZHANG BH, PAN XP, COBB GP, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. *Dev Biol*, 2007, 30(2): 1-12.
- [4] LÓPEZ-URRUTIA E, BUSTAMANTE MONTES LP, LADRÓN DE GUEVARA CERVANTES D, et al. Crosstalk between long non-coding RNAs, micro-RNAs and mRNAs: deciphering molecular mechanisms of master regulators in cancer[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 669.
- [5] WANG M, YU F, DING H, et al. Emerging function and clinical values of exosomal microRNAs in cancer[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 791-804.
- [6] SHIRJANG S, MANSOORI B, ASGHARI S, et al. MicroRNAs in cancer cell death pathways: apoptosis and necroptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 139: 1-15.
- [7] LOTAN Y, BLACK PC, CABA L, et al. Optimal trial design for studying urinary markers in bladder cancer: a collaborative review[J]. *Eur Urol Oncol*, 2018, 1(3): 223-230.
- [8] MIYAMOTO DT, MOUW KW, FENG FY, et al. Molecular biomarkers in bladder preservation therapy for muscle-invasive bladder cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(12): e683-e695.
- [9] HUMAYUN-ZAKARIA N, ARNOLD R, GOEL A, et al. tropomyosins: potential biomarkers for urothelial bladder cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1102.
- [10] LI Q, WANG H, PENG H, et al. MicroRNAs: Key players in bladder cancer[J]. *Mol Diagn Ther*, 2019, 23(5): 579-601.
- [11] CHO WC. OncomiRs: The discovery and progress of microRNAs in cancers[J]. *Molecular Cancer*, 2007, 6(1): 60.
- [12] LO RUSSO G, TESSARI A, CAPECE M, et al. MicroRNAs for

- the diagnosis and management of malignant pleural mesothelioma: A literature review[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 650.
- [13] MOLLAEI H, SAFARALIZADEH R, ROSTAMI Z. MicroRNA replacement therapy in cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12369-12384.
- [14] CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15524-15529.
- [15] CIAFRÈ SA, GALARDI S, MANGIOLA A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(4): 1351-1358.
- [16] LIU Z, MAI C, YANG H, et al. Candidate tumour suppressor CCDC19 regulates miR-184 direct targeting of C-Myc thereby suppressing cell growth in non-small cell lung cancers[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(8): 1667-1679.
- [17] LIU Z, WEI S, MA H, et al. A functional variant at the miR-184 binding site in TNFAIP2 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(11): 1668-1674.
- [18] YUAN Q, GAO W, LIU B, et al. Upregulation of miR-184 enhances the malignant biological behavior of human glioma cell line A172 by targeting FIH-1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(4): 1125-1136.
- [19] YANG J, LAI CC, XIAN ZM, et al. Preliminary results indicate increased expression of miR-184 in patients with renal carcinoma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(16): 6878-6887.
- [20] CHEN Z, ZHU Y, FAN X, et al. Decreased expression of miR-184 restrains the growth and invasion of endometrial carcinoma cells through CDC25A-dependent notch signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 755-764.
- [21] WONG TS, LIU XB, WONG BY, et al. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2588-2592.

(编辑 何宏灵)

(上接第 626 页)

用新型结构简单,能够使患者较容易地保持体位,降低了此种体位下长时间手术对患者损伤的风险,尤其是半侧卧截石位,进一步使得医生在患者的会阴部与腰背部同步手术更加从容。

通过本组资料证明,利用一种手术体位的固定支架将患者摆放成半侧卧截石位,“双镜联合”治疗肾及输尿管上端结石安全有效,值得临床上推广应用。

参考文献:

- [1] 刘迎,张铁庠,杨江根,等.经皮肾镜联合不同软镜治疗鹿角形肾结石的研究[J].*临床泌尿外科杂志*, 2011, 26(4): 278-279, 282.
- [2] 杨炜青,李逊,何永忠,等.输尿管软镜治疗鹿角状肾结石的疗效分析(附 43 例报告)? [J].*中国微创外科杂志*, 2016, (1): 35-37, 41.
- [3] XU C, SONG RJ, JIANG MJ, et al. Flexible ureteroscopy with

holmium laser lithotripsy: A new choice for intrarenal stone patients[J]. *Urol Int*, 2015, 94(1): 93-98.

- [4] 黄锡玺,王思齐,张方毅,等.半截石斜侧卧位的建立及在经皮肾镜碎石取石术中的临床研究[J].*实用医学杂志*, 2013, 29(9): 1453-1455.
- [5] VICENTINI FC, PERRELLA R, SOUZA VMG, et al. Impact of patient position on the outcomes of percutaneous nephrolithotomy for complex kidney stones[J]. *Int Braz J Urol*, 2018, 44(5): 965-971.
- [6] HOZNEK A, RODE J, OUZAID I, et al. Modified supine percutaneous nephrolithotomy for large kidney and ureteral stones: technique and results[J]. *Eur Urol*, 2012, 61(1): 164-170.
- [7] 金晓军,高峥岩,祁晓岭,等.反向经皮肾-B超定位下输尿管软镜钬激光逆行建立皮肾通道的应用[J].*现代泌尿外科杂志*, 2016, 21(11): 844-847.
- [8] 平秦榕,颜汝平,王剑松,等.双镜联合治疗复杂性肾结石[J].*中国微创外科杂志*, 2017, 17(4): 317-321.

(编辑 何宏灵)