

• 论 著 •

miR-152 通过调控 FOXR2 表达抑制人前列腺癌细胞增殖的研究

李阳波, 李 健[△], 贾志刚, 许亚宏, 刘 琼, 莫 非, 李戈戈

西部战区空军医院泌尿外科, 四川成都 610021

摘 要:目的 探讨人前列腺癌 PC-3 细胞中 miR-152 调控叉头框蛋白 R2(FOXR2)对细胞增殖的影响。方法 采用实时荧光定量 PCR 检测人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 和前列腺癌 PC-3 细胞中 miR-152、FOXR2 mRNA 的相对表达水平, Western blot 检测 FOXR2 蛋白水平。miR-152 mimics、miR-152 inhibitor 或 FOXR2-siRNA 转染 PC-3 细胞后, 观察细胞增殖能力的变化。miR-152 mimics、miR-152 inhibitor 分别与 FOXR2 3'UTR 双荧光素报告基因质粒共转染 PC-3 细胞, 检测荧光素酶活性。miR-152 mimics 和 miR-152 inhibitor 转染 PC-3 细胞后, 检测 miR-152、FOXR2 mRNA 的相对表达水平及 FOXR2 蛋白水平。结果 与 RWPE-1 细胞比较, PC-3 细胞中 miR-152 的相对表达水平显著降低($P=0.001$), 而 FOXR2 mRNA 的相对表达水平及蛋白水平显著升高($P=0.003, 0.003$)。miR-152 mimics、miR-152 inhibitor 或 FOXR2-siRNA 转染 PC-3 细胞后, 细胞增殖能力分别显著降低、升高、降低($P=0.022, 0.029, 0.006$)。miR-152 mimics 和 FOXR2 3'UTR 野生型质粒共转染后荧光素酶活性被显著抑制($P=0.001$), 而共转染 miR-152 inhibitor 可显著增加荧光素酶活性($P=0.001$)。与对照组比较, miR-152 mimics 转染 PC-3 细胞后, miR-152 的相对表达水平显著升高($P<0.001$), 而 FOXR2 mRNA 的相对表达水平及蛋白水平显著降低($P<0.001, 0.001$), 细胞活性显著降低($P=0.013$); miR-152 inhibitor 转染 PC-3 细胞后, miR-152 的相对表达水平显著降低($P<0.001$), 而 FOXR2 mRNA 的相对表达水平及蛋白水平显著升高($P<0.001, P=0.007$), 细胞活性显著升高($P=0.018$)。结论 miR-152 可通过负调控 FOXR2 表达发挥抑制人前列腺癌 PC-3 细胞增殖的作用。

关键词:前列腺癌; miR-152; 叉头框蛋白 R2; PC-3 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.09.021

中图法分类号:R737.25

文章编号:1673-4130(2021)09-1113-04

文献标志码:A

miR-152 inhibiting the proliferation of human prostate cancer cells by regulating the expression of FOXR2

LI Yangbo, LI Jian[△], JIA Zhigang, XU Yahong, LIU Qiong, MO Fei, LI Yige

Department of Urology, Air Force Hospital of Western Theater, Chengdu, Sichuan 610021, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of microRNA (miR)-152 on cell proliferation via regulating fork-head box R2 (FOXR2) in PC-3 cells of human prostate cancer cells. **Methods** The relative expression levels of miR-152 and FOXR2 mRNA in human normal prostate epithelial cell RWPE-1 cells and PC-3 cells were detected by qPCR, and the level of FOXR2 protein was detected by Western blot. After transfection of PC-3 cells with miR-152 mimics, miR-152 inhibitor or FOXR2-siRNA, the cell proliferation ability was observed. miR-152 mimics, miR-152 inhibitor and FOXR2 3'UTR double fluorescent reporter gene plasmid were co-transfected with PC-3 cells, and the luciferase activity was detected. After transfection of PC-3 cells with miR-152 mimics and miR-152 inhibitor, the relative expression levels of miR-152, FOXR2 mRNA and the level of FOXR2 protein were detected. **Results** Compared with RWPE-1 cells, the relative expression level of miR-152 in PC-3 cells was significantly decreased ($P=0.001$), while the relative expression level of FOXR2 mRNA and protein level was significantly increased ($P=0.003, 0.003$). After transfection of PC-3 cells with miR-152 mimics, miR-152 inhibitor or FOXR2-siRNA, cell proliferation ability was significantly decreased, increased and decreased respectively ($P=0.022, 0.029, 0.006$). Co-transfection of miR-152 mimics and FOXR2 3'UTR wild type plasmids significantly inhibited the luciferase activity ($P=0.001$), while Co-transfection of miR-152 inhibitor significantly increased the luciferase activity ($P=0.001$). Compared with the control group, the relative expression level of miR-152 was significantly increased after miR-152 mimics transfected into PC-3 cells ($P<0.001$), while the relative expression level of FOXR2 mRNA and protein level was significantly decreased ($P<0.001, 0.001$) and the cell viability was significantly decreased ($P=0.013$). The rela-

作者简介:李阳波,男,主治医师,主要从事泌尿系统疾病、男科研究。 [△] 通信作者, E-mail:apollo99101@126.com。

本文引用格式:李阳波,李健,贾志刚,等. miR-152 通过调控 FOXR2 表达抑制人前列腺癌细胞增殖的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42 (9):1113-1116.

tive expression level of miR-152 was significantly decreased ($P < 0.001$) after miR-152 inhibitor transfected into PC-3 cells, while the relative expression level of FOXR2 mRNA and protein was significantly increased ($P < 0.001, P = 0.007$) and the cell viability was significantly increased ($P = 0.018$). **Conclusion** miR-152 can inhibit the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells by negatively regulating FOXR2 expression.

Key words: prostate cancer; miR-152; fork-head box R2; PC-3 cells

前列腺癌是男性最为常见的恶性肿瘤之一,也是全球男性癌症患者的主要死因。随着人口老龄化程度加深,前列腺癌的发病率呈逐年上升趋势,而前列腺癌的发病机制至今未明^[1]。微小 RNA(miRNA)是哺乳动物体内广泛存在的一种内源性调节性保守的非编码 RNA(ncRNA),其大小为 18~25 nt,可以通过转录后调控模式调控靶基因的表达^[2]。ncRNA 可通过多种途径影响转化生长因子 β 、表皮生长因子和肿瘤坏死因子的表达,参与前列腺癌的发生、发展^[3-4]。有研究指出,miR-200 家族(miR-200a/b、miR-141 和 miR-429)可通过靶向调控 Zeb2 抑制前列腺癌的侵袭和转移,上调下游靶基因的表达从而抑制前列腺癌的进程^[5]。此外,miR-410-3p 可作用于磷酸酶及张力蛋白同源基因,调控 AKT/mTOR 信号通路,在前列腺癌发展过程中发挥促进作用^[6]; miR-141-3p 可通过激活核因子- κ B 信号通路促进前列腺癌的远端转移^[7]。研究发现,前列腺癌组织中 miR-152 的相对表达水平显著低于正常癌旁组织,随着肿瘤恶性程度的升高,前列腺癌组织中 miR-152 的相对表达水平越低^[8]。生物信息学法预测叉头框蛋白 R2 (FOXR2)可能为 miR-152 的直接靶基因。因此,本文研究 miR-152 和 FOXR2 之间的调控作用,并探讨二者对前列腺癌细胞增殖的影响,为前列腺癌的发生机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株来源 人前列腺癌细胞株 PC-3(前列腺癌细胞组)和前列腺上皮细胞株 RWPE-1(对照组)购自美国标准菌库(ATCC)。

1.1.2 细胞培养 PC-3 和 RWPE-1 细胞于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,37 °C 5% CO₂,待细胞生长至 70%~80%时,0.25%胰酶消化后以 1:3 传代。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。Trizol 试剂、lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。RIPA 裂解液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂、BCA 蛋白检测试剂盒、蛋白上样缓冲液购自中国碧云天公司。FOXR2 抗体和 GAPDH 内参抗体购自英国 Abcam 公司。引物由上海恒斐公司合成,TaqMan® Universal PCR Master Mix、TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit 购自美国 ABI 公司,miR-152 mimics、miR-152 inhibitor 和 FOXR2-siRNA 由上海

吉玛公司合成。双荧光素酶检测试剂盒、pmir-GLO 载体购自美国 Promega 公司。

1.2.2 Western blot 检测 FOXR2 蛋白水平 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒进行蛋白浓度检测后,加入蛋白上样缓冲液,SDS-PAGE 凝胶 70 V 转 120 V 电泳分离蛋白,250 mA 转膜 1.0 h,室温封闭 1.5 h,FOXR2 一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜,二抗(1:5 000)室温孵育 2.0 h,超敏发光液显色,胶片曝光后,以 GAPDH 为内参,使用 Image 软件计算 FOXR2 蛋白水平,实验重复 5 次。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 miR-152 和 FOXR2 mRNA 的表达 Trizol 试剂提取细胞总 RNA 后,将其进行反转录,然后使用美国 Bio-rad 公司的 CFX96 qPCR 仪进行基因扩增,SYBR Green 染料标记产物,以 GAPDH 为内参,根据荧光强度计算目的基因的相对表达水平,实验重复 5 次。

1.2.4 细胞转染 6 孔板中接种 10⁶ 个 PC-3 细胞,无血清饥饿培养 24 h。将转染物(miR-152 mimics、miR-152 inhibitor、FOXR2-siRNA)和 lipofectamine 2000 分别加入到等体积无血清培养基中,室温孵育 5 min,然后将二者混匀后,继续室温孵育 20 min,将混合液加入到已倾去培养基的 6 孔板中,培养箱中孵育 6 h,然后更换为含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,继续培养 48 h,再进行检测。

1.2.5 MTT 法检测细胞活性 细胞转染后接种于 96 孔板,细胞培养箱中孵育 48 h,每孔加入 20 μ L 的 MTT 溶液,4 h 后弃去上清液,每孔加入 200 μ L 的二甲基亚砷,37 °C 摇晃 10 min 后,490 nm 处测定吸光度值(A_{490}),评价细胞活性,用以反映细胞增殖能力。

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测 miRanda、NBmiR-Tar 等数据库预测 miR-152 与 FOXR2 3' UTR 可能的基因结合序列。将克隆的 FOXR2 3'UTR 区及其突变体分别插入到 pmir-GLO 载体,以此构建 FOXR2 3'UTR 野生型和突变型质粒。将 miR-152 mimics、miR-152 inhibitor 和 miR-152 scramble 分别与融合 FOXR2 3'UTR 区及其突变体的质粒共转染 PC-3 细胞。转染结束后,培养箱中孵育 48 h,弃去液体后加入裂解液,室温放置 10 min,−80 °C 冻融 1 次,离心收集上清液,加入荧光素底物,充分混匀 10 s 后,检测荧光强度,再加入海参荧光素酶底物,混匀 10 s 后再次检测荧光素酶活性,计算相对荧光强度,实验重复 5 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RWPE-1 和 PC-3 细胞中 miR-152、FOXR2 mRNA 的相对表达水平及 FOXR2 蛋白水平 PC-3 细胞中 miR-152 的相对表达水平为 RWPE-1 细胞的 40.91%($P=0.001$);而 PC-3 细胞中 FOXR2 蛋白水平及 mRNA 的相对表达水平分别为 RWPE-1 细胞中 FOXR2 蛋白及 mRNA 的 205.75%和 167.61%($P=0.003$ 、 0.003)。见表 1、图 1。

表 1 RWPE-1 和 PC-3 细胞中 miR-152 和 FOXR2 mRNA 的相对表达水平及 FOXR2 蛋白水平($\bar{x}\pm s$)

细胞	miR-152	FOXR2 蛋白	FOXR2 mRNA
RWPE-1 细胞	1.32±0.28	0.87±0.21	1.42±0.31
PC-3 细胞	0.54±0.11 ^a	1.79±0.45 ^a	2.38±0.42 ^a

注:与 RWPE-1 细胞比较,^a $P<0.05$ 。

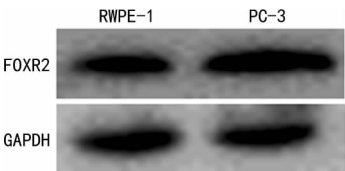


图 1 RWPE-1 和 PC-3 细胞中 FOXR2 蛋白表达的 Western blot 图

2.2 miR-152 和 FOXR2 对 PC-3 细胞增殖能力的影响 miR-152 mimics、miR-152 inhibitor 和 FOXR2-siRNA 分别转染 PC-3 细胞后,通过 MTT 法评价细胞增殖活性,以各组 A_{490} 值为计算依据,对照组 A_{490}

值为 0.91 ± 0.18 ,miR-152 mimics、miR-152 inhibitor 和 FOXR2-siRNA 组 A_{490} 值的分别为 0.66 ± 0.88 、 1.18 ± 0.14 和 0.59 ± 0.06 ,该 3 组的细胞增殖效率与对照组相比,分别降低 27.47%、升高 29.67%和降低 35.16%,差异均有统计学意义($P=0.022$ 、 0.029 、 0.006)。

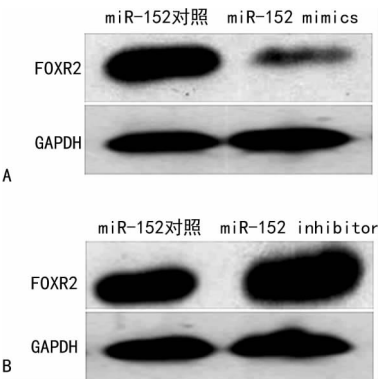
2.3 miR-152 对 PC-3 细胞 FOXR2 3'UTR 区的影响 分别共转染 miR-152 mimics、miR-152 inhibitor、miR-152 scramble 和 FOXR2 3'UTR 突变型质粒后,荧光素酶活性均无显著变化($P=0.542$)。miR-152 mimics、miR-152 inhibitor、miR-152 scramble 分别与 FOXR2 3'UTR 野生型质粒共转染 PC-3 细胞后,荧光素酶活性分别显著降低、升高、无显著变化($P=0.001$ 、 0.001 、 0.428)。

2.4 转染 miR-152 对 PC-3 细胞中 FOXR2 mRNA 相对表达水平及蛋白水平的影响 与对照组比较,转染 miR-152 mimics 后,miR-152 mRNA 的相对表达水平升高 10 倍以上($P<0.001$),而 FOXR2 mRNA 的相对表达水平及蛋白水平分别降低 42.40%和 29.73%($P<0.001$ 、 0.001),细胞活性降低 28.74%($P=0.013$)。转染 miR-152 inhibitor 后,miR-152 的相对表达水平下降 18.64%($P<0.001$),而 FOXR2 mRNA 的相对表达水平及蛋白水平上升 61.60%和 54.05%($P<0.001$ 、 $P=0.007$),细胞活性增加 37.93%($P=0.018$)。见表 2、图 2。

表 2 转染 miR-152 对 PC-3 细胞中 FOXR2 mRNA 相对表达水平及蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	miR-152 mRNA	FOXR2 蛋白	FOXR2 mRNA	细胞活性
对照组	0.59±0.13	1.85±0.31	2.50±0.37	0.87±0.15
miR-152 mimics 组	6.73±1.13 ^a	0.55±0.09 ^a	1.06±0.18 ^a	0.62±0.09 ^a
miR-152 inhibitor 组	0.11±0.02 ^a	2.85±0.52 ^a	4.04±0.45 ^a	1.20±0.15 ^a

注:miR-152 mimics 组和 miR-152 inhibitor 组分别与对照组相比,^a $P<0.05$ 。



注:A 表示转染 miR-152 mimics 对 FOXR2 蛋白的影响;B 表示转染 miR-152 inhibitor 对 FOXR2 蛋白的影响。

图 2 转染 miR-152 对 PC-3 细胞 FOXR2 蛋白影响的 Western blot 图

3 讨 论

前列腺癌是一种男性泌尿生殖系统恶性肿瘤,全

球发病率较高,且缺乏公认的治疗方法^[9]。随着分子生物学的快速发展,以 miRNA 为靶标治疗肿瘤成为研究热点,miRNA 通过结合靶基因 3'UTR 区在转录后水平调控靶基因的表达,与多种肿瘤的发生、发展、转移和预后等密切相关^[10]。目前,已有多种 miRNA 被发现在前列腺癌患者血清或癌组织中异常表达,并且 miRNA 的相对表达水平与前列腺癌患者临床分级、化疗敏感性和骨转移等显著相关^[11]。如 miR-618 可通过负调控 FOXP2 抑制前列腺癌的迁移和侵袭能力^[12];miR-199a-3p 可通过靶向调控 Smad1 抑制前列腺癌细胞的增殖和侵袭能力^[13]。miR-152 在其他肿瘤细胞中的作用已有报道,如 miR-152-3p 在非小细胞肺癌中抑制肿瘤细胞增殖,在子宫内膜癌中抑制肿瘤细胞形成、转移和侵袭^[14]。研究表明,前列腺癌细胞中 miR-152 启动子序列呈高度甲基化,而 miR-152

异位表达可抑制前列腺癌细胞的增殖、转移和侵袭,且 miR-152 的相对表达水平降低可导致肿瘤转移增加等不良临床结果^[15]。

生物信息学软件预测结果表明,FOXR2 可能为 miR-152 的直接靶基因。FOX 属于保守的转录因子家族,能够调控细胞增殖、分化、生长等关键生物学过程,其表达异常与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[16]。FOXR2 是最新发现的一个致癌基因,可促进胶质瘤^[17]、结直肠癌^[18]、肝细胞癌^[19]等多种肿瘤细胞增殖,成为治疗肿瘤的最新研究靶点。研究发现,FOXR2 在前列腺癌细胞中过表达,降低 FOXR2 mRNA 的相对表达水平可显著抑制前列腺癌细胞增殖,有望成为治疗前列腺癌的新靶标^[20]。

本研究结果表明,在 PC-3 细胞系中,miR-152 的相对表达水平显著低于 RWPE-1 细胞系,而 FOXR2 mRNA 的相对表达水平及蛋白水平显著升高,表明 miR-152 和 FOXR2 对于前列腺癌的发生、发展具有重要作用。本研究结果显示,miR-152 mimics 和 FOXR2-siRNA 分别转染 PC-3 细胞后,细胞增殖均显著降低,而 miR-152 inhibitor 转染 PC-3 细胞可使细胞增殖能力升高,该结果说明 miR-152 和 FOXR2 能够调控 PC-3 细胞增殖能力,甚至二者之间可能存在某些调控关系。生物信息学软件预测结果表明,FOXR2 可能为 miR-152 的直接靶基因,而本研究双荧光素报告基因实验证实,miR-152 可从基因水平直接负调控 FOXR2 基因表达。转染实验结果表明,转染 miR-152 mimics 后可下调 FOXR2 mRNA 的表达,继而抑制 FOXR2 蛋白翻译,降低 FOXR2 蛋白表达;转染 miR-152 inhibitor 可上调 FOXR2 mRNA 表达,最终增强 FOXR2 蛋白翻译能力,表明 miR-152 可通过直接负调控 FOXR2 基因转录,继而影响 FOXR2 蛋白翻译水平。以上结果提示可尝试通过增强前列腺癌细胞中 miR-152 基因表达,抑制 FOXR2 基因和蛋白表达,继而抑制细胞增殖,达到缓解前列腺癌的治疗目标。

综上所述,本研究发现上调 miR-152 表达能够抑制前列腺癌细胞增殖能力,该作用可能与其负调控 FOXR2 表达有关。

参考文献

- [1] 王亮,李黎明,牟睿宇,等.化疗在去势抵抗性前列腺癌中应用的现状[J].吉林医学,2021,42(2):475-477.
- [2] 张文,曹志国.miR-205 在肿瘤中的研究进展[J].国际检验医学杂志,2020,41(12):1512-1515.
- [3] 张志潜.ncRNA 在乳腺癌和前列腺癌发生发展过程中的表达和作用研究[D].天津:南开大学,2014.
- [4] 张亚龙,万学超,傅方求,等.非编码 RNA(ncRNA)在前列腺癌发生发展中的作用机制[J].中国科学(生命科学),2016,46(4):385-391.
- [5] LIU C, HU W, LI L L, et al. Roles of miR-200family members in lung cancer: more than tumor suppressors

- [J]. Future Oncol, 2018, 14(27): 2875-2886.
- [6] ZHANG Y, ZHANG D, LV J, et al. miR-410-3p promotes prostate cancer progression via regulating PTEN/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 2459-2465.
- [7] HUANG S, WA Q, PAN J, et al. Downregulation of miR-141-3p promotes bone metastasis via activating NF- κ B signaling in prostate cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 173
- [8] ZHU C, LI J, DING Q, et al. miR-152 controls migration and invasive potential by targeting TGF α in prostate cancer cell lines[J]. Prostate, 2013, 73(10): 10829-10839.
- [9] 贺子秋, 牡丹, 李新宇. 长链非编码 RNA 在前列腺癌诊断中的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2020, 40(3): 557-560.
- [10] 姚凯, 刘帅. miRNA 在前列腺癌中的作用及应用进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2020, 40(3): 561-564.
- [11] WASEEM M, AHMAD M K, SRIVATAVA V K, et al. Evaluation of miR-711 as novel biomarker in prostate cancer progression[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(8): 2185-2191.
- [12] SONG X L, TANG Y, LEI X H, et al. miR-618 inhibits prostate cancer migration and invasion by targeting FOXP2[J]. J Cancer, 2017, 8(13): 2501-2510.
- [13] QU F, ZHENG J, GAN W, et al. miR-199a-3p suppresses proliferation and invasion of prostate cancer cells by targeting Smad1[J]. Oncotarget, 2017, 8(32): 52465-52473.
- [14] SU Y, WANG Y, ZHOU H, et al. microRNA-152 targets ADAM17 to suppress NSCLC progression [J]. FEBS Lett, 2014, 588: 1983-1988.
- [15] THEODORE S C, DAVIS M, ZHAO F, et al. microRNA profiling of novel African American and caucasian prostate cancer cell lines reveals a reciprocal regulatory relationship of miR-152 and DNA methyltransferase 1 [J]. Oncotarget, 2014, 5(11): 3512-3525.
- [16] LI X, WANG W, XI Y, et al. FOXR2 interacts with MYC to promote its transcriptional activities and tumorigenesis [J]. Cell Rep, 2016, 16(2): 487-497.
- [17] LIU X, LIU N, YUE C, et al. FoxR2 promotes glioma proliferation by suppression of the p27 pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(34): 56255-56266.
- [18] LU S Q, QIU Y, DAI W J, et al. FOXR2 promotes the proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells [J]. Oncol Res, 2017, 25(5): 681-689.
- [19] WANG X, HE B, GAO Y, et al. FOXR2 contributes to cell proliferation and malignancy in human hepatocellular carcinoma[J]. Tumour Biol, 2016, 37(8): 10459-10467.
- [20] XU W, CHANG J, LIU G, et al. Knockdown of FOXR2 suppresses the tumorigenesis, growth and metastasis of prostate cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 87(3): 471-475.