

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.08.003

## miR-let-7c-5p 对膀胱癌细胞恶性行为、血管管腔形成及 HMGB2 的调控作用\*

刘辉勇,董 铮<sup>△</sup>,徐 涛,柳 琦

湖北省黄冈市中心医院泌尿外科,湖北黄冈 438000

**摘要:**目的 探讨 miR-let-7c-5p 对膀胱癌细胞恶性行为、血管管腔形成及高迁移率族蛋白(HMGB)2 的调控作用。方法 将人膀胱癌 UM-UC-3 细胞分别进行常规培养(空白组)、转染 mimics-NC(mimics-NC 组)、转染 miR-let-7c-5p-mimics(miR-let-7c-5p-mimics 组)、转染 inhibitor-NC(inhibitor-NC 组)及转染 miR-let-7c-5p-inhibitor(miR-let-7c-5p-inhibitor 组)。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测各组细胞 miR-let-7c-5p 转染成功率;采用 Transwell 法检测各组细胞侵袭能力;采用划痕试验检测各组细胞迁移能力;采用 Matrigel 胶小管形成试验检测各组细胞血管生成;采用免疫印迹法检测各组细胞 HMGB2、血管内皮生长因子(VEGF)及葡萄糖转运蛋白-1(GLUT-1)蛋白表达水平;采用荧光素酶试验验证 miR-let-7c-5p 对 HMGB2 的调控作用。结果 空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组 miR-let-7c-5p mRNA 表达水平、侵袭数目、划痕愈合率、血管管腔数目, HMGB2、VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达水平比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );与空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组比较, miR-let-7c-5p-mimics 组 miR-let-7c-5p mRNA 表达水平升高,侵袭数目、划痕愈合率、血管管腔数目, HMGB2、VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达水平均降低, miR-let-7c-5p-inhibitor 组 miR-let-7c-5p mRNA 表达水平降低,侵袭数目、划痕愈合率、血管管腔数目, HMGB2、VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达水平均升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。荧光素酶试验结果显示,与 mimics-NC 组比较, miR-let-7c-5p-mimics 组 HMGB2-Wt 水平降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 上调 miR-let-7c-5p 可明显抑制膀胱癌细胞侵袭、转移及血管生成,其机制与抑制 HMGB2 蛋白表达相关。

**关键词:**膀胱癌; 血管管腔; 高迁移率族蛋白 2; 侵袭; 转移; 荧光素酶试验

中图法分类号:R737.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)08-1035-06

## Regulation of miR-let-7c-5p on malignant behavior, vascular lumen formation and HMGB2 in bladder cancer cells\*

LIU Huiyong, DONG Zheng<sup>△</sup>, XU Tao, LIU Qi

Department of Urology, Huanggang Central Hospital, Huanggang, Hubei 438000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of miR-let-7c-5p on the malignant behavior, vascular lumen formation and high mobility group protein (HMGB) 2 in bladder cancer cells. **Methods** Human bladder cancer UM-UC-3 cells were divided into routine culture (blank group), transfected with mimics-NC (mimics-NC group), transfected with miR-let-7c-5p-mimics (miR-let-7c-5p-mimics group), transfected with inhibitor-NC (inhibitor-NC group) and transfected with miR-let-7c-5p-inhibitor (miR-let-7c-5p-inhibitor group). Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction was used to detect the transfection success rate of miR-let-7c-5p in each group. Transwell assay was used to detect cell invasion ability of each group. Migration ability of each group was detected by scratch test. Angiogenesis of cells in each group was detected by Matrigel tube formation test. The protein expression levels of HMGB2, vascular endothelial growth factor (VEGF) and glucose transporter-1 (GLUT-1) were detected by Western blot. Luciferase assay was used to verify the regulatory effect of miR-let-7c-5p on HMGB2. **Results** There was no significant difference in the expression level of miR-let-7c-5p mRNA, invasion number, scratch healing rate, number of vascular lumen, and protein levels of HMGB2, VEGF, and GLUT-1 among the blank group, mimics-NC group, and inhibitor-NC group ( $P>0.05$ ). Compared with the blank group, mimics-NC group and inhibitor-NC group, the miR-let-7c-5p mRNA expression level in the miR-let-7c-5p-mimics group was increased, the invasion number, scratch healing rate, the number of vascular lumen, and the protein expression levels of HMGB2, VEGF and GLUT-1 were decreased. In the miR-let-7c-5p-inhibitor group, the miR-let-7c-5p mRNA expression level was significantly decreased,

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81602221);湖北省自然科学基金项目(2022CFB799)。

作者简介:刘辉勇,男,主治医师,主要从事泌尿系肿瘤方面的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail:603360196@qq.com。

while the invasion number,scratch healing rate,the number of vascular lumen,and the protein expression levels of HMGB2,VEGF,and GLUT-1 were significantly increased ( $P<0.05$ ). Luciferase assay showed that the level of HMGB2-Wt in the miR-let-7c-5p-mimics group was significantly lower than that in the mimics-NC group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Up-regulation of miR-let-7c-5p can significantly inhibit the invasion,metastasis and angiogenesis of bladder cancer cells,and the mechanism is related to the inhibition of HMGB2 protein expression.

**Key words:** bladder cancer; vascular lumen; high mobility group box 2; invasion; metastasis; luciferase assay

膀胱癌(BC)是一种常见的泌尿系统恶性肿瘤,全球范围内每年有超过 40 万新发病例,且随着人口老龄化加剧,其发病率也逐渐升高,男性与女性的发病比例为 45 : 16<sup>[1-2]</sup>。BC 患者经一线治疗后,有 50%~70% 的患者 5 年内会复发,大大降低了患者的生存率,影响其预后<sup>[3]</sup>。BC 的发病机制与多种信号通路异常表达相关。高迁移率族蛋白(HMGB)是一种高度保守的 DNA 结合蛋白,HMGB2 是其家族成员之一,是染色质结合因子,可促进转录因子与相关靶点相结合。近年来有学者发现,HMGB2 在多种恶性肿瘤中存在过表达,例如乳腺癌<sup>[4]</sup>、宫颈癌<sup>[5]</sup>等,可加快肿瘤细胞的恶性行为,进一步促进肿瘤的发生和发展。在 BC 发展过程中随着肿瘤细胞的快速增殖和代谢需求增加,周围组织供血不足,肿瘤细胞可通过分泌促血管生成因子刺激周围血管内皮细胞的增殖和迁移,形成新的血管管腔,并且能够增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力<sup>[6]</sup>。因此,抑制血管新生可能成为 BC 治疗的重要策略之一。miRNA 是一类存在于真核生物由多个核苷酸组成的非编码单链小分子 RNA,通过靶基因的 3'非翻译区(3'UTR)结合参与多种生物学过程。let-7 miRNA 家族是最早发现的 miRNA 之一,miR-let-7c-5p 是其组成成员之一,其已被证实恶性肿瘤组织中呈低表达,且上调后可抑制细胞活性<sup>[7-8]</sup>。有研究表明,在 BC 细胞中上调 miR-let-7c-5p 可抑制肿瘤细胞的恶性行为,其机制与抑制 HMGA2 表达相关<sup>[9]</sup>,但对 HMGB2 是否具有调节作用及具体机制还有待进一步研究。因此,本文就 miR-let-7c-5p 对 BC 细胞恶性行为、血管管腔形成及 HMGB2 的调控作用进行研究,以期对相关研究提供参考依据,现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞、试剂与仪器** 人输尿管上皮永生化细胞 SV-HUC-1 细胞及人膀胱癌 T24、J82、UM-UC-3 细胞均购自上海中国科学院细胞库;miR-let-7c-5p、HMGB2 引物均由赛默飞世尔科技公司设计合成;mimics-NC、miR-let-7c-5p-mimics、inhibitor-NC、miR-let-7c-5p-inhibitor 均由上海吉玛公司设计合成;U6 抗体购自上海研谨生物科技有限公司,货号:ybs-19484R;HMGB2 抗体购自赛默飞世尔科技公司,货号:PA5-75228;血管内皮生长因子(VEGF)、葡萄糖转运蛋白-1(GLUT-1)抗体购自 Abcam 公司,货号:

ab10970、ab227805;RPMI-1640 培养基购自爱必信(上海)生物科技有限公司,货号:abs9484;Lipofectamine2000 转染试剂购自赛默飞世尔科技公司,货号:11668;胎牛血清、0.25%胰蛋白酶购自 Corning 公司,货号:35-015-CV、25-053-CL;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司,货号:RGA1040;山羊抗兔 IgG 二抗购自上海泽叶生物科技有限公司,货号:ZY140596;Transwell 小室购自(天津)健康科技有限公司,货号:430658;划痕试剂盒购自上海善然生物科技有限公司,货号:80209;基质胶购自 BD 公司,货号:356231;DYCZ-24DN 蛋白电泳仪购自北京六一仪器厂;JY-1000 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)仪购自重庆京因生物科技有限责任公司;ELX800 酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司;TDZ4-WS 台式低速离心机购自南京精塞玛科学仪器有限公司。

**1.2 细胞培养** J82 细胞置于 10% 胎牛血清的 EMEM 培养基,SV-HUC-1、T24、UM-UC-3 细胞置于 1640 培养基,培养环境均为 5%CO<sub>2</sub>、37℃ 饱和湿度,1 : 3 传代,取对数细胞进行试验。

**1.3 qRT-PCR 检测** miR-let-7c-5p 及 HMGB2 mRNA 表达 采用 TRIzol 试剂提取 SV-HUC-1、T24、J82、UM-UC-3 细胞总 RNA,采用反转录酶试剂盒将 2 μg 的 RNA 反转成 cDNA。采用 10 μL 的 SYBR Green PCR Master Mix 以 PCR 仪分析 miR-let-7c-5p 及 HMGB2 表达。数据分析比较采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法,引物序列见表 1。

| 表 1 基因引物序列    |    |                                |
|---------------|----|--------------------------------|
| 基因            | 方向 | 引物序列                           |
| miR-let-7c-5p | 正向 | 5'-GAGGTAGTAGGTTGTATGGTTG-3'   |
|               | 反向 | 5'-GCAGGGTCCCGAGGTTATTC-3'     |
| U6            | 正向 | 5'-AGAGAAGATTAGCATGGCCCCCTG-3' |
|               | 反向 | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'     |
| HMGB2         | 正向 | 5'-CGGGGCAAAATGTCTCTCGTA-3'    |
|               | 反向 | 5'-CGGAAGAGTCGGGTGTTT-3'       |
| GAPDH         | 正向 | 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'    |
|               | 反向 | 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'  |

**1.4 分组及转染方法** UM-UC-3 细胞重悬后,按照 1.5×10<sup>6</sup>/mL 接种于 96 孔版中,分为空白组、mimics-NC 组、miR-let-7c-5p-mimics 组、inhibitor-NC 组、miR-let-7c-5p-inhibitor 组,空白组常规培养,其余 4 组按照

脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000 说明书转染 mimics-NC、miR-let-7c-5p-mimics、inhibitor-NC、miR-let-7c-5p-inhibitor,采用 qRT-PCR 验证转染效率,方法同 1.3。

**1.5 Transwell 法检测 UM-UC-3 细胞的侵袭能力** 将各组 UM-UC-3 细胞密度调整为  $1\times 10^8$ /L,用 DMEM 稀释至  $0.25\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$  工作液放置于冰盒中,将  $100\text{ }\mu\text{L}$  基底膜基质平铺在 24 孔小室内,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中孵育,使基底膜基质凝固,上室中加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  细胞培养液,下室中加入少量胎牛血清培养基,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 24 h,取出小室,拭去残留细胞,冲洗,染色。计算细胞侵袭细胞数,试验 3 次,复孔 2 次。

**1.6 划痕试验检测 UM-UC-3 细胞的迁移能力** 将  $1\times 10^6$ /L 的 UM-UC-3 细胞接种于 6 孔板中,待贴壁生长整个底部时,采用  $200\text{ }\mu\text{L}$  移液枪头,垂直划一条划痕,磷酸盐缓冲液冲洗 2 次,分别在划痕 0 h 及 24 h 后在倒置显微镜下进行拍摄。划痕愈合率=(0 h 宽度-24 h 宽度) / 0 h 宽度 $\times 100\%$ ,试验 3 次,复孔 2 次。

**1.7 Matrigel 胶小管形成试验检测 UM-UC-3 细胞的血管生成** 接触 Matrigel™ 基质胶相关器材放置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中预冷,然后于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中解冻。基质胶呈液态加入 96 孔板,30 min 后加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  的  $2\times 10^4$  个/mL 单细胞悬液,再加入  $200\text{ }\mu\text{L}$  的细胞上清液,培养 24 h,使用显微镜观察血管结构,采用 Image-Pro Plus 软件分析血管管腔数目。

**1.8 免疫印迹法检测各组细胞 HMGB2、VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达水平** 取  $2.5\times 10^4$  个/mL 的 UM-UC-3 细胞放入  $1.5\text{ mL}$  离心管中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   $1\text{ }000\text{ r/min}$  离心 3 min,弃去上清液,加入  $150\text{ mL}$  RIPA 裂解液;冰上细胞超声裂解后,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   $12\text{ }000\text{ r/min}$  离心 5 min,取上清液检测。取 30 g 蛋白标本进行 PVDF 电泳分离,切胶后转膜,加入脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入 HMGB2(1 : 100)、VEGF(1 : 200) 及 GLUT-1(1 : 200) 抗体(1 : 200)和内参 GAPDH 抗体(1 : 1 000),TBS 缓冲液冲洗 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(1 : 5 000),杂交冲洗。将膜浸入化学发光法工作液,随后进行检测,获取图像。

**1.9 荧光素酶试验** 构建 HMGB2-Wt 和 HMGB2-Mut 质粒,将 UM-UC-3 细胞接种于 6 孔板中,分别转染 mimics-NC 和 miR-let-7c-5p-mimics,采用双荧光素酶报告基因试剂盒检测各组荧光素酶活性,按照试剂盒说明书进行。

**1.10 统计学处理** 采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 SV-HUC-1、T24、J82、UM-UC-3 细胞中 miR-**

let-7c-5p 及 HMGB2 mRNA 表达水平比较 与 SV-HUC-1 细胞比较,T24、J82、UM-UC-3 细胞中 miR-let-7c-5p mRNA 表达水平均升高,HMGB2 mRNA 表达水平均降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );T24、J82、UM-UC-3 细胞中 HMGB2 mRNA 表达水平比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );UM-UC-3 细胞中 miR-let-7c-5p mRNA 表达水平明显高于 T24、J82 细胞,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 2。

| 表 2 SV-HUC-1、T24、J82、UM-UC-3 细胞中 miR-let-7c-5p 及 HMGB2 mRNA 表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ ) |                  |                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------|
| 细胞种类                                                                                 | HMGB2 mRNA       | miR-let-7c-5p mRNA    |
| SV-HUC-1 细胞                                                                          | $1.00\pm 0.00$   | $1.00\pm 0.00$        |
| T24 细胞                                                                               | $0.49\pm 0.04^*$ | $1.50\pm 0.14^*$      |
| J82 细胞                                                                               | $0.57\pm 0.08^*$ | $1.42\pm 0.20^*$      |
| UM-UC-3 细胞                                                                           | $0.30\pm 0.03^*$ | $1.61\pm 0.04^{* \#}$ |
| <i>F</i>                                                                             | 236.000          | 27.880                |
| <i>P</i>                                                                             | $<0.001$         | $<0.001$              |

注:与 SV-HUC-1 细胞比较,\*  $P<0.05$ ;与 T24、J82 细胞比较,  $\#P<0.05$ 。

**2.2 各组 UM-UC-3 细胞 miR-let-7c-5p mRNA 表达水平比较** 空白组、mimics-NC 组、miR-let-7c-5p-mimics 组、inhibitor-NC 组、miR-let-7c-5p-inhibitor 组 miR-let-7c-5p mRNA 表达水平分别为  $1.00\pm 0.00$ 、 $1.02\pm 0.03$ 、 $1.67\pm 0.10$ 、 $0.96\pm 0.05$  及  $0.71\pm 0.06$ ,差异有统计学意义( $F=224.600,P<0.05$ )。空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组 miR-let-7c-5p mRNA 表达水平比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );miR-let-7c-5p-mimics 组 miR-let-7c-5p mRNA 表达水平明显高于空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3 各组 UM-UC-3 细胞侵袭数目、划痕愈合率及血管管腔数目比较** 空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组 UM-UC-3 细胞侵袭数目比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );miR-let-7c-5p-mimics 组 UM-UC-3 细胞侵袭数目明显少于空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组,miR-let-7c-5p-inhibitor 组 UM-UC-3 细胞侵袭数目明显多于空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组 UM-UC-3 细胞划痕愈合率比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );miR-let-7c-5p-mimics 组 UM-UC-3 细胞划痕愈合率明显低于空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组,miR-let-7c-5p-inhibitor 组 UM-UC-3 细胞划痕愈合率明显高于空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组 UM-UC-3 细胞血管

管腔数目比较, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ); miR-let-7c-5p-mimics 组 UM-UC-3 细胞血管管腔数目少于空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组, miR-let-7c-5p-inhibitor 组 UM-UC-3 细胞血管管腔数目多于空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 3、图 1、图 2、图 3。

2.4 各组 UM-UC-3 细胞 HMGB2、VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达水平比较 空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-

NC 组 HMGB2、VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达水平, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ); miR-let-7c-5p-mimics 组 HMGB2、VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达水平均低于空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组, miR-let-7c-5p-inhibitor 组 HMGB2、VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达水平均高于空白组、mimics-NC 组及 inhibitor-NC 组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 4、图 4。

表 3 各组 UM-UC-3 细胞侵袭数目、划痕愈合率及血管管腔数目比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别                        | 侵袭数目(个)                    | 划痕愈合率(%)                 | 血管管腔数目(个)                |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白组                       | 105.40±19.17               | 65.84±7.14               | 46.90±5.22               |
| mimics-NC 组               | 103.22±18.06               | 64.10±8.05               | 43.71±5.84               |
| miR-let-7c-5p-mimics 组    | 56.15±10.40 <sup>*</sup>   | 34.71±5.93 <sup>*</sup>  | 19.00±3.27 <sup>*</sup>  |
| inhibitor-NC 组            | 108.90±12.37 <sup>#</sup>  | 66.39±7.10 <sup>#</sup>  | 45.46±4.18 <sup>#</sup>  |
| miR-let-7c-5p-inhibitor 组 | 180.63±22.41 <sup>*#</sup> | 84.76±8.33 <sup>*#</sup> | 75.60±8.44 <sup>*#</sup> |
| F                         | 40.940                     | 35.860                   | 75.180                   |
| P                         | <0.001                     | <0.001                   | <0.001                   |

注:与空白组、mimics-NC 组、inhibitor-NC 组比较, <sup>\*</sup>  $P<0.05$ ;与 miR-let-7c-5p-mimics 组比较, <sup>#</sup>  $P<0.05$ 。

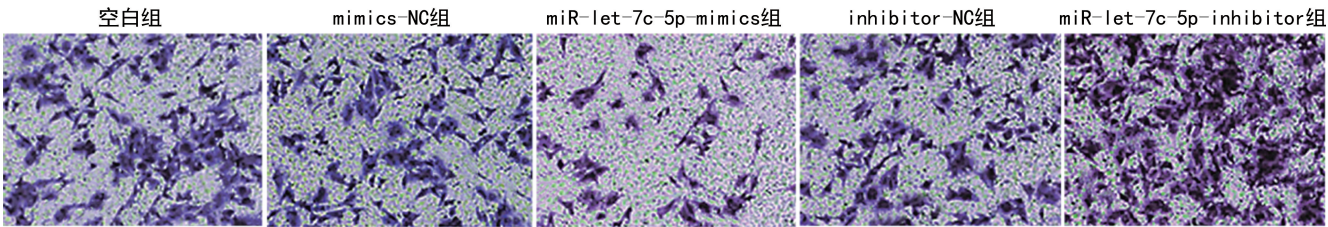


图 1 各组 UM-UC-3 细胞侵袭数目比较(结晶紫染色, ×200)

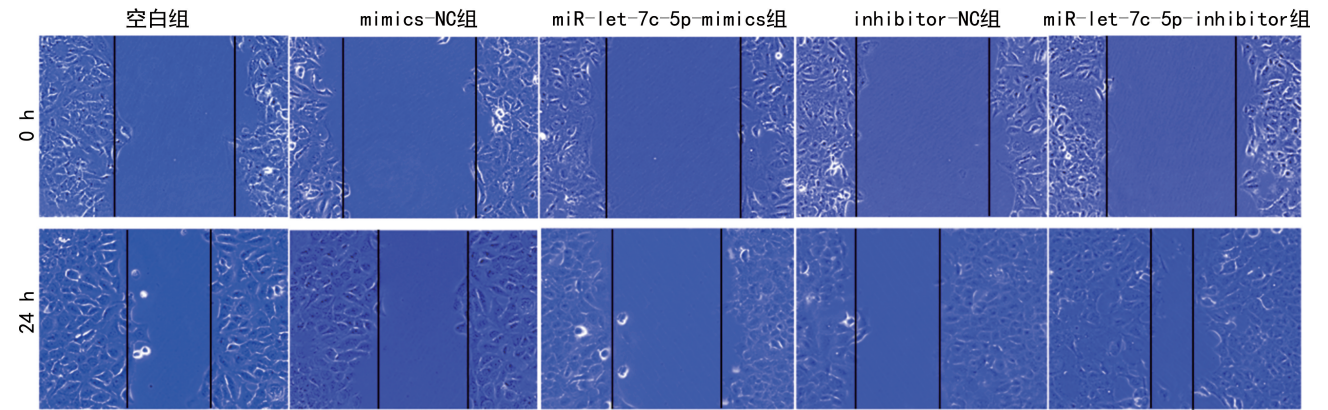


图 2 各组 UM-UC-3 细胞划痕愈合率比较(0 h ×100, 24 h ×200)

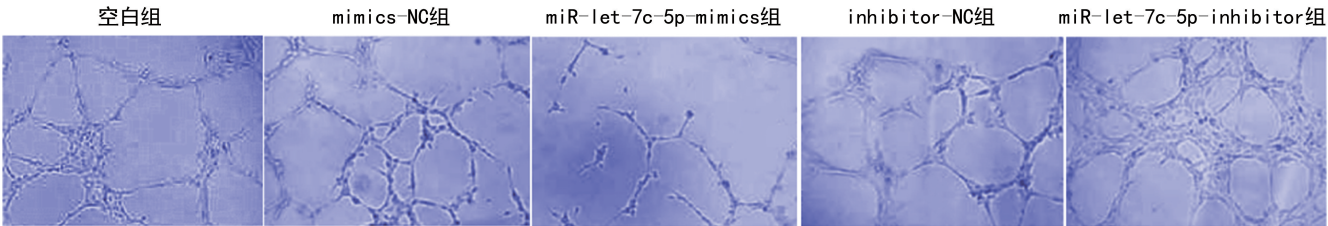


图 3 各组 UM-UC-3 细胞血管管腔数目比较(×200)

2.5 mimics-NC 组和 miR-let-7c-5p-mimics 组 HMGB2-Wt 和 HMGB2-Mut 水平比较 荧光素酶试验结果显示, mimics-NC 组和 miR-let-7c-5p-mimics

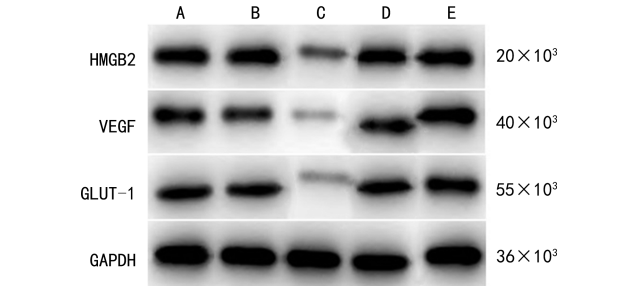
组 HMGB2-Mut 水平比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); miR-let-7c-5p-mimics 组 HMGB2-Wt 水平低于 mimics-NC 组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见

表 5、图 5。

表 4 各组 UM-UC-3 细胞 HMGB2、VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别                        | HMGB2                   | VEGF                    | GLUT-1                  |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组                       | 1.04±0.02               | 1.40±0.16               | 0.90±0.11               |
| mimics-NC 组               | 0.95±0.04               | 1.36±0.12               | 0.93±0.09               |
| miR-let-7c-5p-mimics 组    | 0.49±0.04 <sup>*</sup>  | 0.96±0.10 <sup>*</sup>  | 0.47±0.06 <sup>*</sup>  |
| inhibitor-NC 组            | 1.03±0.06 <sup>#</sup>  | 1.44±0.20 <sup>#</sup>  | 0.97±0.13 <sup>#</sup>  |
| miR-let-7c-5p-inhibitor 组 | 1.37±0.10 <sup>*#</sup> | 2.59±0.36 <sup>*#</sup> | 1.30±0.22 <sup>*#</sup> |
| <i>F</i>                  | 174.000                 | 51.240                  | 29.440                  |
| <i>P</i>                  | <0.001                  | <0.001                  | <0.001                  |

注：与空白组、mimics-NC 组、inhibitor-NC 组比较，<sup>\*</sup>*P*<0.05；与 miR-let-7c-5p-mimics 组比较，<sup>#</sup>*P*<0.05。



注：A 为空白组；B 为 mimics-NC 组；C 为 miR-let-7c-5p-mimics 组；D 为 inhibitor-NC 组；E 为 miR-let-7c-5p-inhibitor 组。

图 4 各组 HMGB2、VEGF 及 GLUT-1 蛋白电泳图

表 5 mimics-NC 组和 miR-let-7c-5p-mimics 组 HMGB2-Wt 和 HMGB2-Mut 水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别                     | HMGB2-Wt  | HMGB2-Mut |
|------------------------|-----------|-----------|
| mimics-NC 组            | 1.02±0.06 | 1.00±0.07 |
| miR-let-7c-5p-mimics 组 | 0.71±0.05 | 1.03±0.08 |
| <i>t</i>               | 9.722     | −0.691    |
| <i>P</i>               | <0.001    | 0.505     |

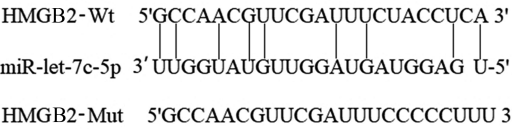


图 5 荧光素酶试验

3 讨 论

随着医疗技术的进步,BC 的临床疗效有所提高,但其发病率及病死率仍呈升高趋势,因此,了解发病机制对于改善患者预后具有重要意义。miR-let-7c-5p 是一种常见的 RNA,在 BC 中呈低表达状态,并且认为其表达水平上调可减少肿瘤细胞侵袭及转移等恶性行为。在 BC 发病过程中大量血管形成不仅增加了肿瘤细胞进入血液循环的机会,而且还可促进其发生转移。因此,抑制血管管腔形成对于减少恶性行为具有重要作用。HMGB2 在 BC 中呈过表达趋势,并且可促进肿瘤细胞侵袭及转移。本文探讨 miR-let-7c-5p 对 BC 细胞恶性行为、血管管腔形成及 HMGB2

调控的潜在作用,为 BC 的治疗提供新的靶点和策略。

本研究结果显示,在人 BC 细胞中 miR-let-7c-5p 呈低表达,而在人输尿管上皮永生化细胞 SV-HUC-1 细胞中升高,因而认为在 BC 发病过程中,miR-let-7c-5p 表达缺失对疾病的发生和发展具有促进作用。本研究还发现,上调 miR-let-7c-5p 后 UM-UC-3 细胞侵袭及转移数目均降低,说明上调 miR-let-7c-5p 可降低肿瘤细胞恶性行为。有研究采用 Trizol 法提取 BC 组织及癌旁组织总 RNA,分离并富集 miRNA,从差异性表达的 miRNA 中筛选出感兴趣的 let-7 基因,发现 let-7c-5p 表达下调,认为其在 BC 发生过程中可能发挥抑癌作用<sup>[10]</sup>。在 BC 组织中 let-7c-5p 表达下调,是患者无进展生存期的独立预测因子,评估其表达水平有利于改善患者预后<sup>[11]</sup>。let-7c-5p 具有抑制肿瘤细胞活性的作用,在食管癌细胞中上调后抑制侵袭及迁移,加快凋亡,其研究机制与调控蛋白激酶 B/细胞外信号调节激酶表达相关<sup>[12]</sup>。在 BC 细胞中 let-7c-5p 表达下调,而过表达后可改变细胞间质转化相关因子活性,钙黏蛋白 E 表达升高,而 N-钙黏蛋白、波形蛋白表达降低,由此表明上调 let-7c-5p 可抑制肿瘤细胞间质转化而抑制侵袭、迁移,降低恶性行为<sup>[13]</sup>,与本研究结果相似。

本研究结果显示,BC 细胞中血管管腔数目较多,而上调 let-7c-5p 后可明显降低血管管腔数目,其机制可能与降低 VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达水平相关。在肿瘤细胞血管生成过程中 VEGF 发挥促进作用,尤其是在缺氧环境中。BC 细胞中 VEGF 蛋白表达水平上调,并且可上调其受体 ras 基因,加快血管生成,导致肿瘤细胞侵袭及转移<sup>[14]</sup>。有学者认为,健康细胞依靠线粒体中的三羧酸循环途径产生三磷酸腺苷为自身供能,而肿瘤细胞即使在氧气充足的条件下仍然只使用产能效率相对较低的糖酵解提供能量,此现象称为 Warburg 效应<sup>[15]</sup>。葡萄糖依赖膜转运蛋白介导的跨膜扩散进入细胞,GLUT-1 在人体组织器官中广泛表达,肿瘤细胞中的 GLUT-1 异常活跃,消耗大量的葡萄糖,保持葡萄糖的高效跨膜运输是维持肿瘤细胞快速增殖的必要条件<sup>[16]</sup>。在糖尿病小鼠视网膜组织

中及高糖处理的内皮细胞中, VEGF 蛋白表达水平明显升高, 而过表达 let-7c 后可明显降低 VEGF 蛋白表达水平, 认为是通过调控 STAT3 后对反向靶基因 VEGFA 产生负调控, 进一步降低微血管生成<sup>[17]</sup>。乳腺癌细胞中 GLUT-12 表达上调, 并且能调节有氧糖酵解, 在体外和体内促进肿瘤的生长和转移, 但是当 let-7c-5p 过表达后可通过靶向 3'-UTR 来抑制 GLUT-12 的表达, 并抑制 GLUT-12 介导的肿瘤生长、转移及糖酵解功能, 包括葡萄糖摄取的改变, 乳酸的产生, 三磷酸腺苷的产生, 以及细胞外酸化和耗氧<sup>[18]</sup>。let-7c 家族成员同源性较高, 本研究认为, 上调 let-7c-5p 可抑制 VEGF 及 GLUT-1 蛋白表达, 进而降低肿瘤细胞的侵袭及转移, 其机制可能与抑制 HMGB2 蛋白表达相关。与正常组织比较, HMGB2 蛋白在 BC 组织中呈过表达, 并且与肿瘤的临床分期和病理分级相关。此外, HMGB2 与 VEGF 也存在关联, 认为 HMGB2 蛋白过表达可促进 BC 细胞血管生成, 加快疾病进展<sup>[19]</sup>。本研究结果显示, 上调 let-7c-5p 可抑制 HMGB2 蛋白表达, 并且通过荧光素酶试验证实 let-7c-5p 对 HMGB2 具有负性靶向调控作用。有研究表明, HMGB2 可促进 BC 细胞侵袭、转移, 并减少凋亡, 而上调 let-7g-3p 可有效逆转这一现象, 其机制与抑制 HMGB2 蛋白表达相关, 并且采用荧光素酶试验证实了 let-7g-3p 可靶向负性调控 HMGB2<sup>[20]</sup>, 与本研究结果相似。本研究结果表明, 上调 let-7c-5p 可靶向抑制 HMGB2 蛋白表达, 降低 VEGF 活性, 减少肿瘤细胞血管生成, 并且进一步抑制肿瘤细胞侵袭及转移等恶性行为。

综上所述, 上调 miR-let-7c-5p 可明显抑制 BC 细胞侵袭、转移及血管生成, 其机制与抑制 HMGB2 蛋白表达相关。miR-let-7c-5p 在 BC 的相关研究中具有较好的应用前景, 其可能作为靶向指标而控制疾病进展, 因此, 应同时评估 miR-let-7c-5p 作为 BC 治疗和预后标志物的潜力, 包括深入分析其在临床标本中的表达水平及其与患者临床特征和预后相关关系, 为 BC 的治疗策略提供新的方向和目标。

参考文献

[1] CUMBERBATCH M G, NOON A P. Epidemiology, aetiology and screening of bladder cancer[J]. Transl Androl Urol, 2019, 8(1): 5-11.

[2] DYRSKJØT L, HANSEL D E, EFSTATHIOU J A, et al. Bladder cancer[J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9(1): 58.

[3] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer Statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33.

[4] 刘爱蕙, 李秀楠, 王钢乐, 等. HMGB2 沉默对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡及侵袭转移的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017, 22(1): 1-5.

[5] TIAN R, LI H, REN S, et al. CircRNA THBS1 silencing

inhibits the malignant biological behavior of cervical cancer cells via the regulation of miR-543/HMGB2 axis[J]. Open Med (Wars), 2023, 18(1): 20230709.

[6] ALYUSUF Z, HASSAN A, MAKI R, et al. Intravesical urachal cyst masquerading as a bladder malignancy: a case report[J]. J Med Case Rep, 2023, 17(1): 364.

[7] 孙瑞婧, 王玉芳, 王朝喆, 等. miR-let-7c-5p 靶向 c-myc 在白血病细胞定向单核/巨噬细胞分化中的作用机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2023, 30(10): 577-586.

[8] WANG C, XUE H, ZHAO R, et al. RGS16 regulated by let-7c-5p promotes glioma progression by activating PI3K-AKT pathway[J]. Front Med, 2023, 17(1): 143-155.

[9] 姚越. miR-let-7c-5p 靶向 HMGA2 抑制膀胱癌细胞侵袭和迁移[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2022.

[10] 胡明, 林天歆, 黄健, 等. 微小 RNA let-7 基因表达在膀胱癌生物学行为中的作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2009, 30(12): 824-826.

[11] SPAGNUOLO M, COSTANTINI M, FERRIERO M, et al. Urinary expression of let-7c cluster as non-invasive tool to assess the risk of disease progression in patients with high grade non-muscle invasive bladder cancer: a pilot study[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 68.

[12] 郑雅心. Let-7c-5p 靶向调控 CTHRC1 抑制食管鳞状细胞癌进展的研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2021.

[13] 姚越, 张冲, 熊言骏, 等. miR-let-7c-5p 通过靶向 HMGA2 抑制膀胱癌细胞侵袭和迁移[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(7): 1022-1029.

[14] 黄一珂, 刁思军, 梁平, 等. 靶向沉默膀胱癌 T24 细胞系 VEGF 对树突状细胞分化成熟及免疫功能的影响[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(1): 57-62.

[15] DING Z, JIAO B, CHEN X, et al. The function of Foxp1 represses  $\beta$ -adrenergic receptor transcription in the occurrence and development of bladder cancer through STAT3 activity[J]. Open Med (Wars), 2023, 18(1): 20230647.

[16] 周舰, 张朝阳, 程耿, 等. 1, 25-二羟基维生素 D3 通过下调葡萄糖转运蛋白-1 表达抑制膀胱癌细胞增殖[J]. 重庆医科大学学报, 2022, 47(6): 693-699.

[17] 欧玉仑, 邝国平, 周小平. miRNA-let-7c 在逆转大鼠糖尿病视网膜病变中的作用[J]. 眼科新进展, 2020, 40(7): 619-624.

[18] SHI Y, ZHANG Y, RAN F, et al. Let-7a-5p inhibits triple-negative breast tumor growth and metastasis through GLUT12-mediated warburg effect[J]. Cancer Lett, 2020, 495: 53-65.

[19] 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): 884-888.

[20] 邹震海, 程琪, 李中, 等. miR-let-7g-3p 靶向 HMGB2 调控膀胱癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(9): 1335-1343.