

miR - 183 对前列腺癌细胞增殖的影响

戴研平¹, 杨建辉², 杨 喆³

(1. 岳阳职业技术学院医学院, 湖南 岳阳 414000; 2. 黔南民族医学高等专科学校, 贵州 都匀 558013;
3. 贵州医科大学基础医学院, 贵州 贵阳 550000)

【摘要】目的: 探讨 miR - 183 对人前列腺癌细胞增殖能力的影响。**方法:** 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT - qPCR) 检测分别用 miR - 183 - mimic 和 miR - 183 - inhibitor 过表达和抑制 miR - 183 后 LNCaP 细胞株和雄激素非依赖性前列腺癌 PC3 细胞株中 miR - 183 表达; 采用 CCK - 8 法检测前列腺癌细胞的增殖能力; Western blot 实验检测 PCa 人前列腺癌雄激素依赖性 LNCaP 中 TMP1 蛋白表达水平的变化。**结果:** RT - qPCR 结果表明过表达前列腺癌 miR - 183 后细胞中 miR - 183 表达显著升高, 反之 miR - 183 - inhibitor 处理后细胞中 miR - 183 表达下降, 说明外源转录的 miR - 183 - mimic 和 miR - 183 - inhibitor 能够增加或抑制 miR - 183 的表达水平; CCK - 8 实验结果显示, 与 NC 组相比, miR - 183 - mimic 组细胞增殖显著升高, miR - 183 - inhibitor 组细胞增殖显著降低 ($P < 0.01$)。Western blot 实验结果显示过表达 miR - 183 后, TMP1 的蛋白表达水平显著降低, 抑制 miR - 183 后, TMP1 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。**结论:** 过表达 miR - 183 可促进 PCa 细胞株 LNCaP 的增殖, 敲低 miR - 183 可抑制 PCa 细胞株 LNCaP 的增殖。

【关键词】 前列腺癌; miR - 183; 增殖; TMP1

【中图分类号】 R737.25 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008 - 4983 (2025) 01 - 0001 - 04

Effect of MiR - 183 on Proliferation of LNCaP Cells in Prostate Cancer

DAI Yan - ping¹, YANG Jian - Hui², YANG Zhe³

(1. *Yueyang Vocational Technical College Medical School, Yueyang, Hunan 414000, China*; 2. *Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun, Guizhou 558013, China*; 3. *Basic Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550000, China*)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of miR - 183 on the proliferation ability of human prostate cancer cells. **Methods:** Real - time quantitative polymerase chain reaction (RT - qPCR) was used to detect the expression of miR - 183 in LNCaP cell line and androgen - independent prostate cancer PC3 cell line after overexpression and inhibition of miR - 183 with miR - 183 - mimic and miR - 183 - inhibitor, respectively; The proliferation ability of prostate cancer cells was detected by CCK - 8 assay; Western blot was used to detect the changes in the expression level of TMP1 protein in androgen - dependent LNCaP cells of human prostate cancer. **Results:** The results of RT - qPCR showed that the expression of miR - 183 in cells overexpressing prostate cancer miR - 183 significantly increased, while the expression of miR - 183 in cells treated with miR - 183 - inhibitor decreased, indicating that exogenous transcription of miR - 183 - mimic and miR - 183 - inhibitor can increase or inhibit the expression level of miR - 183; The CCK - 8 assay results showed that the cell proliferation in the miR - 183 - mimic group was significantly higher than that in the NC group, while the cell proliferation in the miR - 183 - inhibitor group was significantly lower than that in the NC group ($P < 0.01$). Western blot analysis showed that the protein expression level of TMP1 significantly decreased after overexpression of miR - 183, and significantly increased after inhibition of miR - 183 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Overexpression of miR - 183 can promote the proliferation of PCa cell line LNCaP, while knockdown of miR - 183 can inhibit the proliferation of PCa cell line LNCaP.

【Key words】 Prostate cancer; MiR - 183; Proliferation; TMP1

前列腺癌 (Prostate cancer, PCa) 是常见的男性恶性肿瘤之一。它在所有的男性恶性肿瘤中发病率居第二位^[1]。其特征在于大部分发展较缓慢,但是一旦发生转移,病情进展迅速,可导致死亡^[2]。尽管已经采取了越来越多的治疗手段,包括手术切除,化学疗法和放射疗法,但患者预后不佳^[2]。因此,详细了解 PCa 的恶性肿瘤分子机制,能够为 PCa 建立新的生物标志物和治疗策略的发展提供依据,具有重要的意义。微小 RNA (miRNA) 是一类全长 19-25 nt 的单链小分子 RNA,它可以通过外泌体进行转移发挥基因沉默的功能。已有研究报道前列腺癌细胞转移与 miRNAs 存在相关性^[3]。越来越多的证据表明,miRNA 在多种细胞过程中起着至关重要的作用,如增殖,凋亡,发生、发展、侵袭、转移^[4-6]。miR-183 位于 7q32 染色体上,研究表明其在多种类型的癌症中参与肿瘤发生和转移^[6-8]。但关于 miR-183 在 PCa 中的相关功能及影响尚不清楚。原肌球蛋白 1 (tropomyosin-1, TPM1) 在多种恶性肿瘤发挥抑制癌症重要作用^[9-11]。我们推测 miR-183 可能通过靶向 TPM1 参与前列腺癌细胞的转移进程。本研究通过干扰 PCa 细胞株 LNCaP 中 TPM1 的表达,研究 miR-183 对 PCa 细胞增殖能力的影响,为 PCa 建立潜在的治疗靶点提供依据。

1 材料与与方法

1.1 材料 人前列腺癌雄激素依赖性 LNCaP 细胞株 (ATCC CRL-1740) 和 PC3 细胞株购自美国 ATCC 细胞库;胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司;逆转录试剂盒 (批号:TER010-1)、PCR 相关 SYBRP (批号:GR1201-1ML) 购自鼎国生物有限公司;CCK-8 试剂盒 (批号:CK04) 购自日本同仁化学研究所; β -Tubulin (ab210797, 1:1 000, Rabbit, abcam, UK)、TPM1 (ab155260, 1:1 000, Rabbit, Abcam, UK);Lipofectamine 2000 和相关转染试剂盒 (批号:11668019) 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 人前列腺癌雄激素依赖性 LNCaP 细胞株和雄激素非依赖性前列腺癌 PC3 细胞株 (ATCC CRL-1740) 培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,均放置于在 5% CO₂、37℃ 的培养箱中培养,根据 Lipofectamine 2000 操作说明分别用 miR-183-模拟物 (miR-183-mimic) 和抑制物 (miR-183-inhibitor) 转染 LNCaP 细胞。实验分组:分为模拟物阴性对照组 (mimic-NC group)、miR-183-模拟物组 (miR-183-mimic group)、抑制物阴性对照组 (inhibitor-NC group)、miR-183-抑制物组 (miR-183-inhibitor group),细胞转染 48 h 后,进行后续实验。

1.2.2 RT-qPCR 检测 mRNA 水平 收集各组转染 48 h 后的细胞,在 TRIzol 试剂,离心,萃取,加异丙醇沉淀,75% 乙醇洗涤,DEPC 水溶解,测 RNA 纯度和浓度。取 1 000 ng 的总 RNA,配制 RT 反应液,Takara 逆转录试剂盒进行逆转录反应。miR-183 和 GAPDH 引物由上海生工生物技术有限公司设计合成,引物序列设计如下:

miR-183: 5' - CGCGGTATGGCACTGCTAGA - 3';
5' - AGTGCAGGCTCCGAGGTATTC - 3'.
GAPDH: 5' - CCTGGCCAAGGTCATCCATG - 3';
5' - GGAAGCCATGCCAGTGAGC - 3'.

按说明书配好 PCR 反应液后,瞬时离心,实时荧光定量 PCR 仪扩增 TPM1 以及内参基因 GAPDH。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 Linc00152 的相对表达量。

1.2.3 CCK-8 实验检测细胞增殖 转染 48 h 后,胰酶消化 LNCaP 细胞株,终止消化并重悬细胞,以每孔 1×10^3 个细胞,接种到 96 孔培养板中。于 6 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 时,将 CCK-8 的溶液加入每个孔中,在 37℃ 下孵育 2 h。取出 96 孔培养板上酶标仪,在 450 nm 处检测 CCK-8 的吸光度。根据吸光度描绘曲线。

1.2.4 Western blot 检测干扰 miR-183 后 TPM1 的表达水平 取出转染了 48 h 后的各组前列腺癌 LNCaP 细胞株,加 RIPA 蛋白裂解液,低温离心,提取总蛋白。加入 BCA 显色剂,制作标准曲线。蛋白变性 10 min,按配方配制 SDS-PAGE 胶,电泳,转 PVDF 膜,室温封闭 2 h,加一抗 β -Tubulin (1:1 000)、TPM1 (1:1 000)。4℃ 孵育过夜。次日加二抗羊抗兔 IgG 抗体 (1:1 000,) 于摇床上室温孵育 2 h。加 ECL 化学发光混合液,曝光显影,ImageJ 软件用于分析蛋白质条带的灰度值,统计图分析蛋白表达量。

1.3 统计学方法 数据用 SPSS 17.0 统计软件处理,计数资料以均数 \pm 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-183 表达对前列腺癌细胞增殖的影响 为研究 miR-183 对前列腺癌细胞增殖的影响,用 RT-qPCR 检测进行过表达或抑制 miR-183 在前列腺癌细胞中的表达,结果发现过表达 miR-183 后细胞中 miR-183 表达显著升高,反之 miR-183-inhibitor 处理后细胞中 miR-183 表达下降,说明外源转录的 miR-183-mimic 和 inhibitor 能够增加或抑制 miR-183 的表达水平 ($P < 0.05$) (表 1)。在前列腺癌细胞中,过表达 miR-183 后前列腺癌细胞的活力升高,而干扰 miR-183 后,细胞活力下降 (图 1) ($P < 0.05$)。以上结果说明过表达 miR-183 促进前列腺癌细胞的增殖。

表1 RT-qPCR 实验检测 miR-183 的表达结果 ($n=3, \bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$)

组别	LNCaP	PC3
mimic-NC	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01
miR-183-mimic	2.14 ± 0.03*	2.56 ± 0.07*
inhibitor-NC	1.14 ± 0.02	0.93 ± 0.06
miR-183-inhibitor	0.40 ± 0.05#	0.35 ± 0.04#

注: LNCaP-人前列腺癌雄激素依赖性 LNCaP 细胞株; PC3-人雄激素非依赖性前列腺癌 PC3 细胞株。与模拟物阴性对照组相比, * $P < 0.05$; 与抑制物阴性对照组相比, # $P < 0.05$ 。

过表达 miR-183 显著提高了前列腺癌细胞的活力, 而 miR-183 抑制剂则显著降低了前列腺癌细胞的活力

($P < 0.05$, 表2)。因此, miR-183 可能在前列腺癌细胞的增殖中发挥作用。

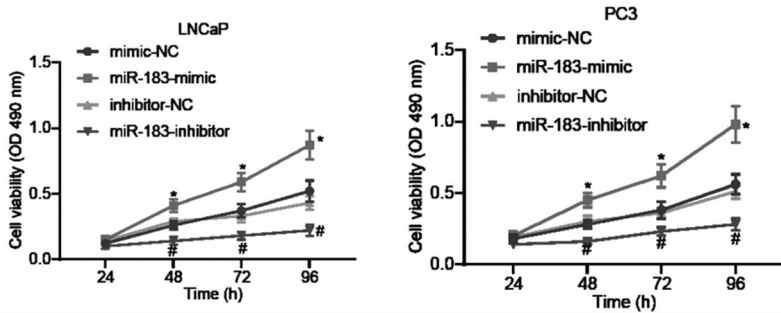


图1 CCK-8 法检测细胞活力

注: * $P < 0.05$ vs. mimic-NC 组, # $P < 0.05$ vs. inhibitor-NC 组。miR-183 mimic 组、miR-183 inhibitor 组、mimic-NC 组、inhibitor-NC 组分别是转染 miR-183 mimic、miR-183 inhibitor、mimic-NC、inhibitor-NC 的 LNCaP 或 PC3 细胞。实验重复3次。

2.2 Western blot 实验检测 TPM1 的表达 Western-blot 实验结果表明, 在前列腺癌细胞 LNCaP 中过表达 miR-183 后 TPM1 的表达显著降低, 抑制 miR-183 后 TPM1 的

表达显著升高 ($P < 0.05$) (表2)。说明细胞中 miR-183 能够靶向抑制 TPM1 的表达, TPM1 在前列腺癌中低表达。

表2 Western blot 实验检测 TPM1 的表达结果 ($n=3, \bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$)

组别	TPM1
mimic-NC	0.75 ± 0.04
miR-183-mimic	0.40 ± 0.02*
inhibitor-NC	0.72 ± 0.03
miR-183-inhibitor	1.53 ± 0.06#

注: TPM1-原肌球蛋白1。与模拟物阴性对照组相比, * $P < 0.05$; 与抑制物阴性对照组相比, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

研究表明 miRNAs 参与了前列腺癌的发展和进展^[12]。miR-183 在前列腺癌中发挥肿瘤促进作用, miR-183 的高表达与多种肿瘤状态进展、淋巴结转移呈正相关, 并且在体外和体内促进肿瘤进展^[13]。尽管 miR-183 逐步被证实为多参与了种人类恶性肿瘤形成, 但是其与前列腺癌的关系却尚不清楚。

本研究使用模拟物和抑制剂进行了功能增加和功能敲低实验, qRT-PCR 结果表明外源转录的 miR-183-mimic 和 inhibitor 能够增加或抑制 miR-183 的表达水平。许多国内外研究均表明, TPM1 具有抑癌作用^[14-15]。研

究发现 miRNA-183 可以通过靶向 PDCD4 抑制食管癌细胞的凋亡, 促进其细胞增殖^[16]。我们推测 miR-183 可能靶向 TPM1 基因在前列腺癌中发挥作用。本实验 CCK-8 实验结果显示过表达 miR-183 表达后前列腺癌细胞的增殖能力明显升高, 反之干扰 miR-183 表达后前列腺癌细胞的增殖能力明显降低。本 Western-blot 结果表明, 过表达 miR-183 后 TPM1 的表达下调, 促进了细胞的增殖从而加速前列腺癌的进展。反之, 则抑制前列腺癌的进展。

综上所述, 研究证实过表达 LNCaP 和 PC3 细胞中 miR-183 在体外促进前列腺癌细胞株的增殖。本实验显