

## miR-30c-5p对前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用及其机制

赵斌<sup>1</sup>, 杨金叶<sup>1</sup>, 李支尧<sup>2</sup>, 毕城伟<sup>1</sup>, 杨李波<sup>1</sup>, 施致裕<sup>1</sup>, 李心<sup>1</sup>, 张建朋<sup>1</sup>, 施远龙<sup>1</sup>, 杨勇<sup>1</sup>, 张国颖<sup>1</sup>  
(1. 云南省肿瘤医院 昆明医科大学第三附属医院 北京大学肿瘤医院云南医院泌尿外科, 云南昆明 650118; 2. 云南省肿瘤医院 昆明医科大学第三附属医院 北京大学肿瘤医院云南医院超声医学科, 云南昆明 650118)

**[摘要]** **目的:** 探讨微小RNA (miR) -30c-5p对人前列腺癌细胞 (LNCap) 增殖、迁移和侵袭的影响, 并阐明其可能的机制。**方法:** LNCap细胞根据转染质粒不同分为LNCap组(无转染质粒)、miR-30c-5p mimic组(转染miR-30c-5p mimic)、mimic NC组(转染miR-30c-5p mimic NC)、sh-DNA损伤诱导转录因子4 (DDIT4)组(转染sh-DDIT4)、sh-NC组(转染sh-DDIT4 NC)、miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-NC组(共转染miR-30c-5p mimic和pc-DNA3.1-DDIT4空载质粒)和miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4组(共转染miR-30c-5p mimic和pc-DNA3.1-DDIT4过表达质粒), RWPE-1细胞正常培养。实时荧光定量PCR (RT-qPCR)法检测各组细胞中miR-30c-5p和DDIT4 mRNA表达水平, Western blotting法检测各组细胞中DDIT4蛋白表达水平, CCK-8法检测各组LNCap细胞增殖率, Transwell小室实验检测各组LNCap细胞侵袭细胞数, 划痕实验检测各组LNCap细胞划痕愈合率, 双荧光素酶报告基因实验验证miR-30c-5p与DDIT4的靶向关系。体内裸鼠成瘤实验, 18只雄性BALB/c裸鼠随机分为空白组、agomiR-NC组(转染agomiR-30c-5p NC)和agomiR-30c-5p组(转染agomiR-30c-5p), 每组6只。agomiR-NC组和agomiR-30c-5p组裸鼠皮下注射LNCap细胞, 空白组裸鼠注射等量生理盐水, 检测各组小鼠肿瘤体积。HE染色观察各组小鼠前列腺癌组织形态表现, RT-qPCR法和免疫荧光染色法检测各组小鼠前列腺癌组织中miR-30c-5p和DDIT4 mRNA表达水平及DDIT4蛋白荧光强度。**结果:** 体外前列腺癌细胞实验, 与人正常前列腺上皮RWPE-1细胞比较, 前列腺癌LNCap细胞中miR-30c-5p表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), DDIT4 mRNA和蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ); 转染48 h后, 与LNCap组和mimic NC组比较, miR-30c-5p mimic组LNCap细胞中miR-30c-5p表达水平明显升高 ( $P<0.01$ )。与LNCap组和sh-NC组比较, sh-DDIT4组LNCap细胞中DDIT4 mRNA表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ); 与miR-30c-5p mimic组和miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC组比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4组LNCap细胞中miR-30c-5p表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ); 与miR-30c-5p mimic组和miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC组比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4组LNCap细胞中DDIT4 mRNA表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与miR-30c-5p mimic组和miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC组比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4组LNCap细胞中DDIT4蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ )。CCK-8法检测, 与LNCap组和mimic NC组比较, miR-30c-5p mimic组LNCap细胞增殖率明显降低 ( $P<0.01$ ); 与LNCap组和sh-NC组比较, sh-DDIT4组LNCap细胞增殖率明显降低 ( $P<0.01$ ); 与miR-30c-5p mimic组和miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC组比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4组LNCap细胞增殖率明显升高 ( $P<0.01$ )。Transwell小室实验检测, 与LNCap组和mimic NC组比较,

[收稿日期] 2023-07-03

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(202001AY070001-069); 云南省教育厅科学研究项目(2020J0207); 昆明医科大学第三附属医院2023年教学联盟本科教育教学研究项目(JXYJ20230211); 昆明医科大学2024年研究生教育创新基金(2024S341, 2024S342)

[作者简介] 赵斌(1976-), 男, 云南省蒙自市人, 副教授, 医学硕士, 主要从事泌尿外科肿瘤基础和临床方面的研究。

[通信作者] 张国颖, 副教授 (E-mail: zgyxch@sina.com)

miR-30c-5p mimic 组 LNCap 细胞侵袭细胞数明显减少 ( $P < 0.01$ ); 与 LNCap 组和 sh-NC 组比较, sh-DDIT4 组 LNCap 细胞侵袭细胞数明显减少 ( $P < 0.01$ ); 与 miR-30c-5p mimic 组和 miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC 组比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 组 LNCap 细胞侵袭细胞数明显增加 ( $P < 0.01$ )。划痕实验检测, 与 LNCap 组和 mimic NC 组比较, miR-30c-5p mimic 组 LNCap 细胞划痕愈合率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 LNCap 组和 sh-NC 组比较, sh-DDIT4 组细胞划痕愈合率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 miR-30c-5p mimic 组和 miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC 组比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 组细胞划痕愈合率明显升高 ( $P < 0.01$ )。双荧光素酶实验检测, 与共转染 WT-DDIT4 和 mimic NC 的 LNCap 细胞比较, 共转染 WT-DDIT4 和 miR-30c-5p mimic 的 LNCap 细胞中荧光素酶活性明显降低 ( $P < 0.01$ )。体内裸鼠成瘤实验, 细胞注射后第 3、6、9、12 和 15 天, 与空白组和 agomiR-NC 组比较, agomiR-30c-5p 组裸鼠肿瘤体积明显减小 ( $P < 0.05$ )。HE 染色观察, 空白组和 agomiR-NC 组小鼠前列腺癌组织中细胞核增大, 核仁突出且畸形; agomiR-30c-5p 组小鼠前列腺癌组织部分区域细胞排列整齐, 细胞核恢复正常形态。RT-qPCR 法和免疫荧光染色法检测, 与 agomiR-NC 组比较, agomiR-30c-5p 组小鼠前列腺癌组织中 miR-30c-5p 表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与空白组和 agomiR-NC 组比较, agomiR-30c-5p 组小鼠前列腺癌组织中 DDIT4 mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ); DDIT4 蛋白主要在细胞质表达, 与空白组和 agomiR-NC 组比较, agomiR-30c-5p 组小鼠前列腺癌组织中 DDIT4 蛋白荧光强度明显降低 ( $P < 0.01$ )。**结论:** miR-30c-5p 在前列腺癌 LNCap 细胞中表达水平明显降低, 其可通过靶向下调 DDIT4 抑制前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭, 从而参与前列腺癌的发生发展。

**[关键词]** 前列腺肿瘤; 微小 RNA-30c-5p; DNA 损伤诱导转录因子 4; 细胞增殖; 细胞迁移

**[中图分类号]** R737.25 **[文献标志码]** A

## Inhibitory effect of miR-30c-5p on proliferation, migration, and invasion of prostate cancer cells and its mechanism

ZHAO Bin<sup>1</sup>, YANG Jinye<sup>1</sup>, LI Zhiyao<sup>2</sup>, BI Chengwei<sup>1</sup>, YANG Libo<sup>1</sup>, SHI Zhiyu<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>,  
ZHANG Jianpeng<sup>1</sup>, SHI Yuanlong<sup>1</sup>, YANG Yong<sup>1</sup>, ZHANG Guoying<sup>1</sup>

(1. Department of Urology, Yunnan Cancer Hospital, Third Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Peking University Cancer Hospital Yunnan Hospital, Yunnan Province, Kunming 650118, China; 2. Department of Ultrasound Medicine, Yunnan Cancer Hospital, Third Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Peking University Cancer Hospital Yunnan Hospital, Yunnan Province, Kunming 650118, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effect of microRNA (miR)-30c-5p on the proliferation, migration, and invasion of the human prostate cancer cells (LNCap), and to clarify its possible mechanism. **Methods:** The LNCap cells were divided into LNCap group (without plasmid transfection), miR-30c-5p mimic group (transfected with miR-30c-5p mimic), mimic NC group (transfected with miR-30c-5p mimic NC), sh-DNA damage inducible transcript 4 (DDIT4) group (transfected with sh-DDIT4), sh-NC group (transfected with sh-DDIT4 NC), miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-NC group (co-transfected with miR-30c-5p mimic and pc-DNA3.1 empty vector), and miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 group (co-transfected with miR-30c-5p mimic and pc-DNA3.1-DDIT4 over-expression plasmid). The RWPE-1 cells were cultured normally. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of miR-30c-5p and DDIT4 mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of DDIT4 protein in the cells in various groups; CCK-8 method was used to detect the proliferation rates of the LNCap cells in various groups; Transwell assay was used to detect the numbers of the invasion LNCap cells in various groups; Scratch assay was used

to detect the scratch healing rates of LNCap cells in various groups; dual-luciferase reporter assay was used to detect the targeting relationship between miR-30c-5p and DDIT4. In the *in vivo* tumor formation experiment, 18 male BALB/c nude mice were divided randomly into blank group, agomiR-NC group (transfected with agomiR-30c-5p NC), and agomiR-30c-5p group (transfected with agomiR-30c-5p); there were six mice in each group. The mice in agomiR-NC group and agomiR-30c-5p group were subcutaneously injected with LNCap cells, while the mice in blank group were given an equal volume of physiological saline. The volumes of tumor of the mice in various groups were detected. HE staining was used to observe the morphology of prostate cancer tissue the mice of in various groups; RT-qPCR method and immunofluorescence staining were used to detect the expression levels of miR-30c-5p and DDIT4 mRNA and the fluorescence intensities of DDIT4 protein in prostate cancer tissue of the mice in various groups.

**Results:** The *In vitro* prostate cancer cell experiment results showed that compared with RWPE-1 cells, the expression level of miR-30c-5p in the prostate cancer LNCap cells was decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression levels of DDIT4 mRNA and protein were increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). After 48 of transfection, compared with LNCap group and mimic NC group, the expression level of miR-30c-5p in the LNCap cells in miR-30c-5p mimic group was increased ( $P < 0.01$ ). Compared with LNCap group and sh-NC group, the expression level of DDIT4 mRNA in the LNCap cells in sh-DDIT4 group was decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with miR-30c-5p mimic group and miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC group, the expression level of miR-30c-5p in The LNCap cells in miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 group was decreased ( $P < 0.01$ ); compared with miR-30c-5p mimic group and miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC group, the expression level of DDIT4 mRNA in the LNCap cells in miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 group was increased ( $P < 0.01$ ); compared with miR-30c-5p mimic group and miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC group, the expression level of DDIT4 protein in the LNCap cells in miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 group was increased ( $P < 0.05$ ). The CCK-8 method results showed that compared with LNCap group and mimic NC group, the proliferation rate of the LNCap cells in miR-30c-5p mimic group was decreased ( $P < 0.01$ ); compared with LNCap group and sh-NC group, the proliferation rate of the LNCap cells in sh-DDIT4 group was decreased ( $P < 0.01$ ); compared with miR-30c-5p mimic group and miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC group, the proliferation rate of the LNCap cells in miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 group was increased ( $P < 0.01$ ). The Transwell assay results showed that compared with LNCap group and mimic NC group, the number of the invasion LNCap cells in miR-30c-5p mimic group was decreased ( $P < 0.01$ ); compared with LNCap group and sh-NC group, the number of invasion LNCap cells in sh-DDIT4 group was decreased ( $P < 0.01$ ); compared with miR-30c-5p mimic group and miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC group, the number of the invasion LNCap cells in miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 group was increased ( $P < 0.01$ ). The scratch assay results showed that compared with LNCap group and mimic NC group, the scratch healing rate of the LNCap cells in miR-30c-5p mimic group was decreased ( $P < 0.01$ ); compared with LNCap group and sh-NC group, the scratch healing rate of the LNCap cells in sh-DDIT4 group was decreased ( $P < 0.01$ ); compared with miR-30c-5p mimic group and miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC group, the scratch healing rate of the LNCap cells in miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 group was increased ( $P < 0.01$ ). The dual-luciferase reporter assay results showed that compared with the LNCap cells co-transfected with WT-DDIT4 and mimic NC, the luciferase activity of the LNCap cells co-transfected with WT-DDIT4 and miR-30c-5p mimic was decreased ( $P < 0.01$ ). The *in vivo* nude mouse tumor formation experiment results showed that on the 3rd, 6th, 9th, 12th, and 15th days after cell injection, compared with blank group and agomiR-NC group, the tumor volumes of the nude mice in agomiR-30c-5p group were decreased ( $P < 0.05$ ). The HE staining results showed that in prostate cancer tissue of the mice in blank group and agomiR-NC group, the cell nuclei were enlarged, and nucleoli were prominent and deformed. In the mice in agomiR-30c-5p

group, some regions of prostate cancer tissues results showed neatly arranged cells with normally shaped nuclei. The RT-qPCR and immunofluorescence staining showed that compared with agomiR-NC group, the expression level of miR-30c-5p in prostate cancer tissue of the mice in agomiR-30c-5p group was increased ( $P < 0.01$ ). Compared with blank group and agomiR-NC group, the expression level of DDIT4 mRNA in prostate cancer tissue of the mice in agomiR-30c-5p group was decreased ( $P < 0.01$ ). DDIT4 protein was mainly expressed in the cytoplasm. Compared with blank group and agomiR-NC group, the fluorescence intensity of DDIT4 protein in prostate cancer tissue of the mice in agomiR-30c-5p group was decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The expression level of miR-30c-5p in the prostate cancer LNCap cells is decreased, and it inhibits the proliferation, migration, and invasion of the prostate cancer cells by targeting downregulation of DDIT4, thereby participating in the occurrence and development of prostate cancer.

**KEYWORDS** Prostate tumor; Micro RNA-30c-5p; DNA damage-inducible transcript 4; Cell proliferation; Cell migration

前列腺癌是全世界男性中常见的癌症, 每年约160万例患者发病, 其中36.6万例患者死亡, 大多数患者最终会进展为去势抵抗性前列腺癌, 目前临床尚无有效的治疗手段<sup>[1]</sup>。因此, 寻找新的更有效的前列腺癌治疗靶点尤为关键。创新型诊断性生物标志物可以避免对患者进行不必要的活检和过度治疗, 目前已发现前列腺癌基因3 (prostate cancer antigen 3, PCA3) 等多种生物标志物<sup>[2]</sup>, 但是前列腺癌的病因及其发展机制尚不明确, 因此, 需要进一步探讨前列腺癌的发病机制, 以发现更加有效的诊断和治疗方法。

微小RNA (micro RNAs, miRNAs) 是一类高度保守且具有组织特异性的非编码小片段RNA<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>发现: miR-34a是一种可用于治疗前列腺癌的miRNA, 肿瘤蛋白P53 (tumor protein P53, TP53) 活化miR-34a的启动子区域, 其表达上调导致细胞周期停滞。BONAFÉ等<sup>[5]</sup>发现: 过表达miR-30c-5p能够下调丝氨酸或苏氨酸激酶通路中蛋白激酶B (protein kinase B, Akt) 和P53-B细胞淋巴瘤2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 通路活性, 进一步调控胶质母细胞瘤的发生发展。研究<sup>[6]</sup>发现: 过表达的miR-30c-5p会阻碍膀胱癌细胞的生长、迁移和侵袭能力并导致细胞周期停滞。DNA损伤诱导转录因子4 (DNA damage inducing transcription factor 4, DDIT4) 是一种线粒体和肿瘤相关蛋白, 参与肿瘤耐药、增殖和侵袭, StarBase数据库预测DDIT4是miR-30c-5p的潜在靶向基因<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明: DNA损伤诱导转录因子4反义RNA1 (DNA damage inducible transcript 4 antisense RNA1, DDIT4-AS1) 在三阴性乳腺癌 (triple-negative

breast cancer, TNBC) 细胞系和组织中高表达, 并通过激活自噬促进TNBC细胞的增殖、迁移和侵袭。尽管在前列腺癌的鉴别诊断中已发现多种具有临床意义的长链非编码RNA分子, 但因其研究中的一致性问题而一直存在争议, miRNAs等短链非编码RNA分子因其稳定性而在疾病鉴别诊断中具有潜在的价值<sup>[9]</sup>。目前有关miR-30c-5p与靶标共同调控前列腺癌的作用机制尚未完全阐明。本研究采用体外细胞实验联合体内动物实验, 探讨miR-30c-5p对前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 并初步阐明其作用机制, 旨在为前列腺癌的治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 动物、细胞、主要试剂和仪器** 雄性BALB/c裸鼠18只, 体质量19~20 g, 购自中国科学院昆明动物所, 实验动物生产许可合格证号: SCXK (湘) 2019-0004。人正常前列腺上皮RWPE-1细胞 (货号: tings-1618238) 购自合肥万物生物科技有限公司, 人前列腺癌LNCap细胞 (货号: C6515) 购自上海碧云天生物科技有限公司。RPMI-1640培养基、Defined K-SFM培养基、1%青-链霉素溶液和总RNA提取试剂盒均购自中国上海赛默飞世尔科技有限公司, pcDNA3.1载体购自上海酶研生物科技有限公司, psiCHECK-2荧光素酶报告基因载体购自美国Promega公司, CCK-8试剂盒购自北京索莱宝公司, 抗DDIT4 (货号: ab191871)、抗GAPDH (货号: ab8245) 和山羊抗兔二抗抗体 (货号: ab205718) 购自英国Abcam公司, RIPA蛋白裂解液购自上海碧云天生物科技有限公司, Transwell

小室购自美国康宁公司。倒置荧光显微镜(型号: DP74)购自日本 OLYMPUS 公司, -20 °C 冰柜(型号: BCD-200)购自合肥美菱公司, 单孔水浴锅(型号: 尚光)购自上海尚道仪器制造有限公司, 低速离心机(型号: TD5B)购自长沙湘智离心机仪器有限公司, 细胞培养箱(型号: CI-191C)购自美国精骐有限公司。

**1.2 细胞培养、转染和分组** LNCap 细胞和 RWPE-1 细胞接种于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 青-链霉素溶液的 RPMI-1640 培养基中, 将培养基置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。当细胞融合度达 60% 时, 调整细胞密度为  $1.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ , 将 LNCap 细胞根据转染质粒不同分为 LNCap 组 (无转染质粒)、miR-30c-5p mimic 组 (转染 miR-30c-5p mimic)、mimic NC 组 (转染 miR-30c-5p mimic NC)、sh-DDIT4 组 (转染 sh-DDIT4)、sh-NC 组 (转染 sh-DDIT4 NC)、miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-NC 组 (共转染 miR-30c-5p mimic 和 pc DNA3.1-DDIT4 空载质粒) 及 miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 组 (共转染 miR-30c-5p mimic 和 pc-DNA3.1-DDIT4 过表达质粒), RWPE-1 细胞正常培养。按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书操作, 混匀后放入 37 °C 培养箱中, 采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法和 Western blotting 法验证细胞转染效率。细胞转染效率 = 转染细胞数 / 细胞总数  $\times 100\%$ 。

**1.3 RT-qPCR 法检测各组细胞中 miR-30c-5p 和 DDIT4 mRNA 表达水平** 选取对数生长期 LNCap 细胞, 采用 TRIzol 试剂提取各组 LNCap 细胞总 RNA。经反转录试剂盒逆转录为 cDNA, 进行 PCR 扩增。扩增条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 伸长 34 s, 共循环 30 次。以 U6 和 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因表达水平。引物序列见表 1。

**1.4 Western blotting 法检测各组细胞中 DDIT4 蛋白表达水平** 细胞转染 48 h 后, 采用 RIPA 裂解液裂解各组细胞, BCA 试剂盒检测蛋白质浓度。将提取的蛋白质用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后转移至聚偏二氟乙烯膜上, 采用 5% 牛血清白蛋白密封 1 h。将膜与一抗 DDIT4 (1:1 000) 及相应的山羊抗兔二抗 (1:2 000) 于 4 °C 混合过夜。采用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline,

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PCR

Gene	Primer sequence
miR-30c-5p	F 5'-GGGAGAGGGGACCCCG-3'
	R 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'
DDIT4	F 5'-CTGTCCCTCACCATGCCTAGC-3'
	R 5'-TCCCAGATGGGATAGGAAGCC-3'
U6	F 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	R 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
GAPDH	F 5'-TTGCCCTCAACGACCACTTT-3'
	R 5'-TGGTCCAGGGTCTTACTCC-3'

PBS) 洗膜后, 化学发光试剂进行显影, 以 GAPDH (1:1 000) 为内参, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算 DDIT4 蛋白表达水平。DDIT4 蛋白表达水平 = DDIT4 蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。

**1.5 CCK-8 法检测各组 LNCap 细胞增殖率** 选取对数生长期 LNCap 细胞进行计数, 细胞消化、重悬和离心后, 将细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 孵育 0、24 和 48 h, 并在对应时间点分别加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 将培养基更换为细胞活性检测液, 继续孵育 1~2 h。采用分光光度计于波长 450 nm 处检测各孔吸光度 (A) 值, 重复 3 次, 取平均值, 计算各组细胞增殖率。细胞增殖率 = (实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 空白孔 A 值)  $\times 100\%$ 。

**1.6 Transwell 小室实验检测各组 LNCap 细胞侵袭细胞数** 将无血清培养基与 Matrigel 溶液配比, 将其平铺于 Transwell 小室上室, 放入培养箱静置至凝固。选取对数生长期 LNCap 细胞株进行消化、重悬和离心后, 采用无血清培养基将细胞稀释至  $3.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ , 取 100  $\mu\text{L}$  细胞溶液加入 Transwell 小室的 Matrigel 基质胶上, 在 Transwell 小室的下室加入完全培养基。培养 24 h 后, 用棉签擦拭上室细胞, 甲醇固定 30 min, 双蒸馏水洗涤 2~3 次, 然后用 0.5% 结晶紫染色, 光学显微镜下观察并拍照, 随机选取 5 个视野计数各组穿膜细胞数, 并取其平均值即为侵袭细胞数, 以侵袭细胞数代表各组 LNCap 细胞侵袭能力。实验重复 3 次。

**1.7 划痕实验检测各组 LNCap 细胞划痕愈合率** 将各组 LNCap 细胞接种于 12 孔细胞培养板中, 37 °C 条件下培养 24 h。采用移液枪枪头进行划痕, PBS 缓冲液洗涤。加入 RPMI-1640 培养基进行培

养, 分别于0和24 h拍摄细胞, 计算各组细胞划痕愈合率, 以代表各组细胞迁移能力。细胞划痕愈合率 = (0 h划痕宽度 - 24 h划痕宽度) / 0 h划痕宽度  $\times$  100%。实验重复3次。

**1.8 双荧光素酶标记检测各组细胞荧光素酶活性** 采用双荧光素酶报告基因实验检测 miR-30c-5p 与 DDIT4 之间的靶向关系。构建 DDIT4 的 3'-UTR 区的突变型 (MUT-DDIT4) 和野生型 (WT-DDIT4) 质粒。将 LNCap 细胞消化和离心, 采用不含血清 RPMI-1640 培养基进行重悬和培养, 培养 12 h 后将 mimic NC 和 miR-30c-5p mimic 分别与 MUT-DDIT4 及 WT-DDIT4 共转染至 LNCap 细胞中, 后更换为有血清的培养基培养, 培养 48 h 后, 采用报告基因测定系统试剂盒检测各组细胞荧光素酶活性。细胞荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性 / 海肾荧光素酶活性。

**1.9 裸鼠成瘤实验造模和分组** 采用皮下注射 LNCap 细胞和分别转染 agomir-NC 和 agomiR-30c-5p 的 LNCap 细胞构建肿瘤生长小鼠模型。将 18 只雄性 BALB/c 裸鼠随机分为空白组、agomiR-30c-5p 组 (转染 agomiR-30c-5p) 和 agomiR-NC 组 (转染 agomiR-30c-5p NC), 每组 6 只。将 LNCap 细胞通过皮下注射至小鼠构建体内肿瘤生长模型, 待瘤体生长后 2 周开始向瘤体注射 agomiR, 注射剂量为每只每次 5 nmol, 每周注射 2 次, 共注射 2 周, 空白组裸鼠注射等量生理盐水, 小鼠瘤体长出并饲养 4 周后进行取材。每隔 3 d 测量各组裸鼠肿瘤长径及短径, 计算肿瘤体积。肿瘤体积 = [长径  $\times$  短径<sup>2</sup>] / 2。注射后 30 d 对小鼠实施安乐死, 收集各组小鼠瘤体备用。本实验获得云南省肿瘤医院伦理委员会批准 (伦理审批号: KYLX2024-132)。

**1.10 HE 染色观察各组小鼠前列腺癌组织形态表现** 将小鼠瘤体组织于多聚甲醛溶液中固定, 进行脱水、透明和浸蜡处理, 石蜡包埋, 制备 5  $\mu$ m 厚度的切片, 再经脱蜡和苏木精-伊红染色, 二甲苯透明和中性树胶封片, 显微镜下观察各组小鼠前列腺癌组织形态表现, 拍照并记录。

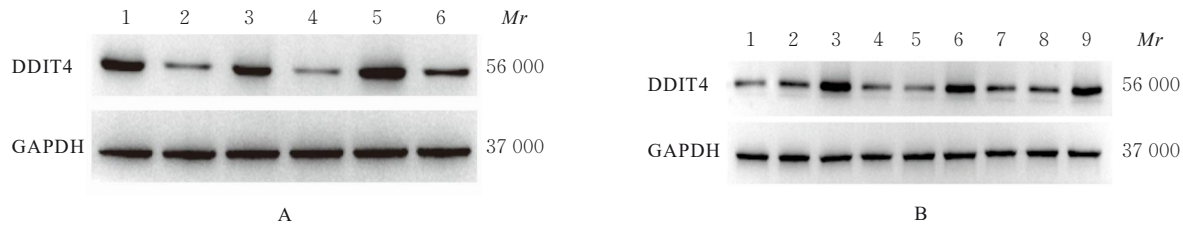
**1.11 RT-qPCR 法和免疫荧光染色法检测各组小鼠前列腺癌组织中 miR-30c-5p 和 DDIT4 mRNA 表达水平及 DDIT4 蛋白荧光强度** RT-qPCR 步骤同“1.3”, 采用 4% 多聚甲醛固定各组 LNCap 细胞 15 min, 0.3% Triton X-100 通透 10 min, 采用 5% 牛血清白蛋白于 PBS+0.1% Tween 20 溶液中阻断,

室温下 1 h。然后, 采用抗 DDIT4 抗体于 4  $^{\circ}$ C 下孵育细胞过夜。洗涤后, 羊抗兔二抗室温下孵育细胞 2 h。共聚焦显微镜观察各组细胞荧光强度并拍照。采用 Image J 软件进行平均荧光强度半定量分析。

**1.12 统计学分析** 采用 Graph-Pad Prism 8.3 统计软件进行统计学分析。各组细胞中 miR-30c-5p 表达水平和 DDIT4 mRNA 及蛋白表达水平, 各组细胞增殖率、侵袭细胞数和细胞划痕愈合率及各组细胞中荧光素酶活性, 各组小鼠前列腺癌组织中 miR-30c-5p 和 DDIT4 mRNA 表达水平及 DDIT4 蛋白荧光强度均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组细胞中 miR-30c-5p 表达水平和 DDIT4 mRNA 及蛋白表达水平** 与人正常前列腺上皮 RWPE-1 细胞 ( $6.07 \pm 0.62$ 、 $0.34 \pm 0.05$  和  $0.45 \pm 0.04$ ) 比较, 前列腺癌 LNCap 细胞中 miR-30c-5p 表达水平 ( $1.65 \pm 0.57$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ ), DDIT4 mRNA 和蛋白表达水平 ( $1.20 \pm 0.18$  和  $0.80 \pm 0.20$ ) 均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。转染 48 h 后, 与 LNCap 组和 mimic NC 组 ( $3.02 \pm 1.77$  和  $4.09 \pm 0.08$ ) 比较, miR-30c-5p mimic 组 LNCap 细胞中 miR-30c-5p 表达水平 ( $12.30 \pm 0.37$ ) 明显升高 ( $P < 0.01$ )。与 LNCap 组和 sh-NC 组 ( $1.15 \pm 0.14$  和  $1.14 \pm 0.13$ ) 比较, sh-DDIT4 组 LNCap 细胞中 DDIT4 mRNA 表达水平 ( $0.36 \pm 0.03$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ )。与 miR-30c-5p mimic 组和 miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC 组 ( $12.30 \pm 0.37$  和  $1.04 \pm 0.11$ ) 比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 组 LNCap 细胞中 miR-30c-5p 表达水平 ( $0.30 \pm 0.01$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 miR-30c-5p mimic 组和 miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC 组 ( $0.98 \pm 0.04$  和  $1.12 \pm 0.23$ ) 比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 组 LNCap 细胞中 DDIT4 mRNA 表达水平 ( $6.13 \pm 0.68$ ) 明显升高 ( $P < 0.01$ )。与 miR-30c-5p mimic 组和 miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC 组 ( $0.59 \pm 0.16$  和  $0.69 \pm 0.06$ ) 比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 组 LNCap 细胞中 DDIT4 蛋白表达水平 ( $1.04 \pm 0.08$ ) 明显升高 ( $P < 0.05$ )。见图 1。



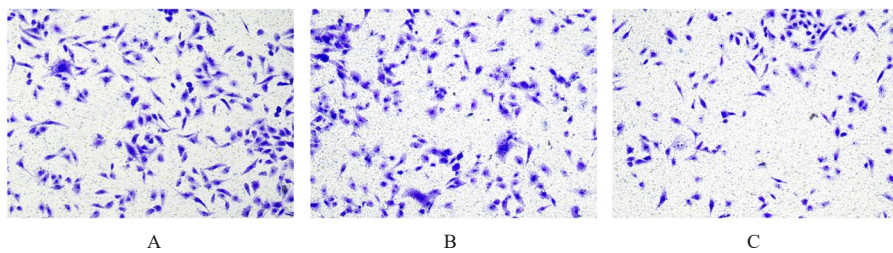
A: Expressions of DDIT4 protein(Lane 1, 3, and 5: LNCap group; Lane 2, 4, and 6: RWPE-1 group); B: Expressions of DDIT4 protein (Lane 1, 4, and 7: MiR-30c-5p mimic group; Lane 2, 5, and 8: MiR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC group; Lane 3, 6, and 9: MiR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4group).

图1 各组细胞中DDIT4蛋白表达电泳图

Fig. 1 Electrophoregrams of expressions of DDIT4 protein in cells in various groups

**2.2 各组LNCap细胞增殖率** 与LNCap组和mimic NC组 ( $125.54\% \pm 2.63\%$  和  $115.28\% \pm 4.73\%$ ) 比较, miR-30c-5p mimic组LNCap细胞增殖率 ( $85.40\% \pm 3.37\%$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ )。与LNCap组和sh-NC组 ( $125.53\% \pm 2.63\%$  和  $125.02\% \pm 0.38\%$ ) 比较, sh-DDIT4组LNCap细胞增殖率 ( $91.12\% \pm 1.72\%$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ )。与miR-30c-5p mimic组和miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC组 ( $85.40\% \pm 3.37\%$  和  $85.87\% \pm 6.73\%$ ) 比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4组LNCap细胞增殖率 ( $103.92\% \pm 4.10\%$ ) 明显升高 ( $P < 0.01$ )。

**2.3 各组LNCap细胞侵袭细胞数** 与LNCap组和mimic NC组比较 ( $200.33 \pm 4.51$  和  $192.00 \pm 5.29$ ), miR-30c-5p mimic组LNCap细胞侵袭细胞数 ( $128.33 \pm 6.66$ ) 明显减少 ( $P < 0.01$ )。与LNCap组和sh-NC组 ( $200.33 \pm 4.51$  和  $190.67 \pm 6.03$ ) 比较, sh-DDIT4组LNCap细胞侵袭细胞数 ( $85.67 \pm 4.51$ ) 明显减少 ( $P < 0.01$ )。与miR-30c-5p mimic组和miR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC组 ( $128.33 \pm 6.66$  和  $116.00 \pm 4.00$ ) 比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4组LNCap细胞侵袭细胞数 ( $225.00 \pm 5.00$ ) 明显增加 ( $P < 0.01$ )。见图2~4。



A: LNCap group; B: Mimic NC group; C: MiR-30c-5p mimic group.

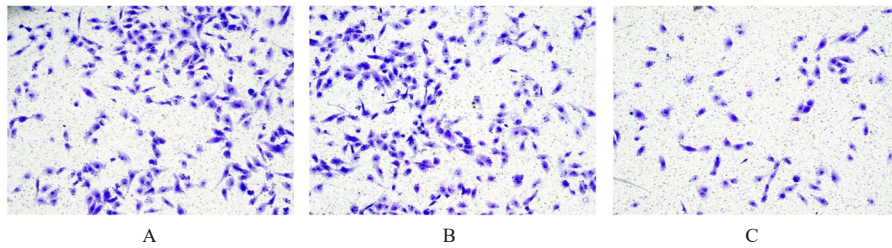
图2 Transwell小室实验检测转染miR-30c-5p后各组LNCap细胞侵袭细胞数(结晶紫,  $\times 100$ )

Fig. 2 Numbers of invasion LNCap cells in various groups after transfected with miR-30c-5p detected by Transwell chamber assay(Crystal violet,  $\times 100$ )

**2.4 各组LNCap细胞划痕愈合率** 与LNCap组和mimic NC组 ( $74.33\% \pm 1.30\%$  和  $57.30\% \pm 1.65\%$ ) 比较, miR-30c-5p mimic组LNCap细胞划痕愈合率 ( $44.50\% \pm 4.03\%$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ )。与LNCap组和sh-NC组 ( $74.33\% \pm 1.30\%$  和  $74.30\% \pm 1.05\%$ ) 比较, sh-DDIT4组细胞划痕愈合率 ( $41.07\% \pm 2.63\%$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ )。与miR-30c-5p mimic组和miR-30c-5p mimic+

pcDNA3.1 NC组 ( $44.50\% \pm 4.03\%$  和  $8.60\% \pm 0.82\%$ ) 比较, miR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4组细胞划痕愈合率 ( $69.67\% \pm 1.80\%$ ) 明显升高 ( $P < 0.01$ )。见图5。

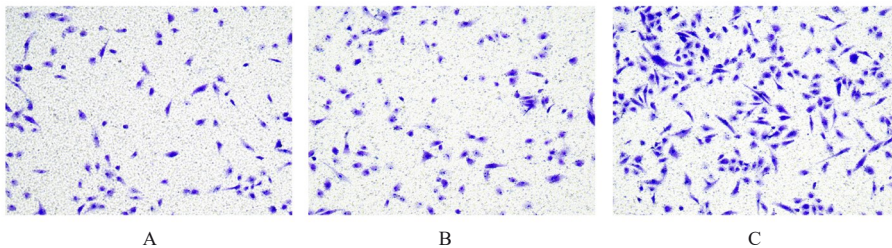
**2.5 DDIT4与miR-30c-5p的靶向关系和各组细胞中荧光素酶活性** StarBase数据库预测发现DDIT4和miR-30c-5p的潜在靶向基因, 二者之间的靶向结合序列见图6。双荧光素酶报告基因实验结果显



A: LNCap group; B: Sh-NC group; C: Sh-DDIT4 group.

图3 Transwell小室实验检测转染 sh-DDIT4后各组 LNCap 细胞侵袭细胞数(结晶紫, ×100)

Fig. 3 Numbers of invasion LNCap cells in various groups after transfected with sh-DDIT4 detected by Transwell chamber assay(Crystal violet, ×100)



A: MiR-30c-5p mimic group; B: MiR-30c-5p mimic+pcDNA3.1 NC group; C: MiR-30c-5p mimic+pc-DNA3.1-DDIT4 group.

图4 Transwell小室实验检测共转染后各组 LNCap 细胞侵袭细胞数(结晶紫, ×100)

Fig. 4 Numbers of invasion LNCap cells in various groups after co-transfected detected by Transwell chamber assay (Crystal violet, ×100)

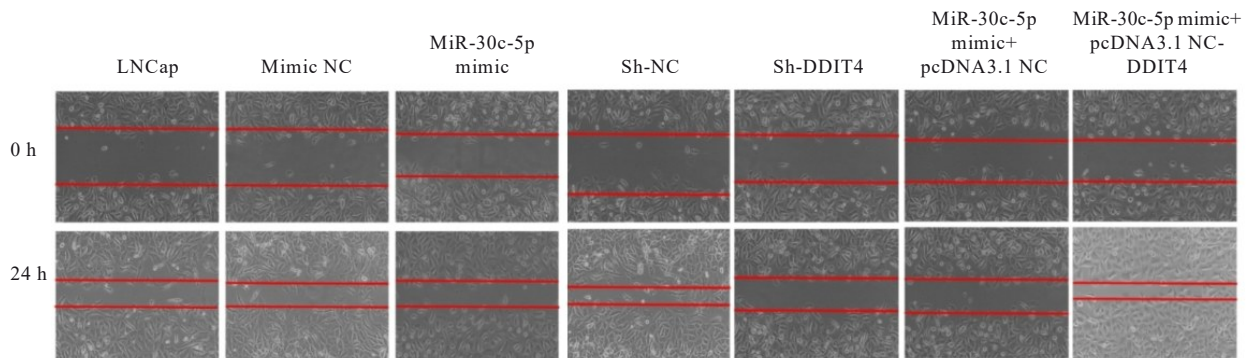


图5 各组 LNCap 细胞划痕愈合情况(×100)

Fig. 5 Scratch healing situations of LNCap cells in various groups(×100)

示: 与共转染 WT-DDIT4 和 mimic NC 的 LNCap 细胞 ( $0.95 \pm 0.04$ ) 比较, 共转染 WT-DDIT4 和 miR-30c-5p mimic 的 LNCap 细胞中荧光素酶活性 ( $0.31 \pm 0.03$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与共转染 MUT-DDIT4 和 mimic NC 的 LNCap 细胞 ( $1.14 \pm 0.04$ ) 比较, 共转染 MUT-DDIT4 和 miR-30c-5p mimic 的 LNCap 细胞中荧光素酶活性 ( $1.08 \pm 0.06$ ) 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

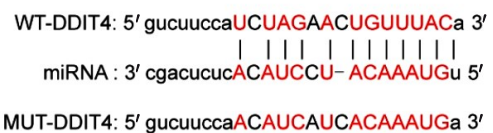


图6 DDIT4与 miR-30c-5p的靶向结合序列

Fig. 6 Target binding sequences of DDIT4 and miR-30c-5p

2.6 各组小鼠移植瘤生长情况 细胞注射后第3、6、9、12和15天,与空白组和 agomiR-NC 组比

较, agomiR-30c-5p 组裸鼠肿瘤体积明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图7和表2。

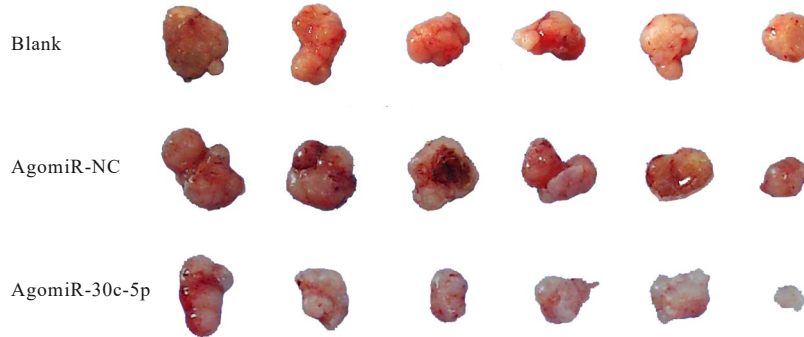


图7 LNCap 细胞注射第15天各组小鼠肿瘤大体形态表现

Fig. 7 General morphology of tumors of mice in various groups on 15th day after injected with LNCap cells

表2 各组小鼠肿瘤体积

Tab. 2 Tumor volumes of mice in various groups

( $n=6, \bar{x} \pm s, V/\text{mm}^3$ )

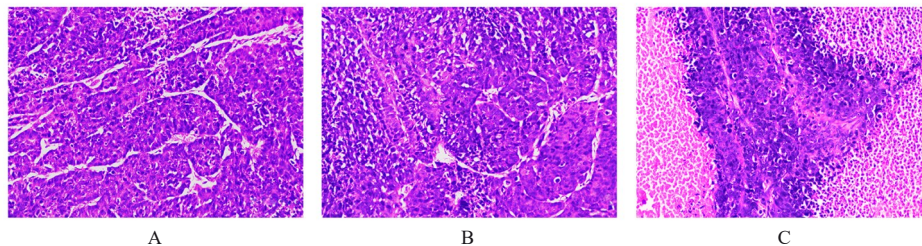
Group	Tumor volume					
	(t/d)	3	6	9	12	15
Blank		92.79±129.41	147.28±143.48	267.38±158.98	372.79±189.07	526.00±225.34
AgomiR-NC		120.50±170.32	170.91±232.65	311.53±359.14	247.31±155.29	465.56±350.72
AgomiR-30c-5p		8.99±4.89 <sup>△</sup>	17.94±19.06 <sup>△</sup>	34.54±26.11 <sup>△</sup>	59.61±42.68 <sup>△</sup>	119.90±63.97 <sup>△</sup>

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  compared with blank group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with agomiR-NC group.

2.7 各组小鼠前列腺癌组织形态表现 空白组和 agomiR-NC 组小鼠前列腺癌组织中细胞核增大,核仁突出且畸形; agomiR-30c-5p 组小鼠前列腺癌组织部分区域细胞排列整齐,细胞核恢复正常形态。见图8。

2.8 各组小鼠前列腺癌组织中 miR-30c-5p 和 DDIT4 mRNA 表达水平及蛋白荧光强度 与 agomiR-NC 组 ( $1.12 \pm 0.10$ ) 比较, agomiR-30c-5p 组小鼠前列腺癌组织中 miR-30c-5p 表达水平

( $4.67 \pm 0.56$ ) 明显升高 ( $P < 0.01$ )。与空白组和 agomiR-NC 组 ( $1.03 \pm 0.03$  和  $0.99 \pm 0.07$ ) 比较, agomiR-30c-5p 组小鼠前列腺癌组织中 DDIT4 mRNA 表达水平 ( $0.37 \pm 0.09$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ )。DDIT4 蛋白主要在细胞质表达,与空白组和 agomiR-NC 组 ( $73.76\% \pm 2.57\%$  和  $70.75\% \pm 2.40\%$ ) 比较, agomiR-30c-5p 组小鼠前列腺癌组织中 DDIT4 蛋白荧光强度 ( $41.00\% \pm 1.66\%$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图9。



A: Blank group; B: AgomiR-NC group; C: AgomiR-30c-5p group.

图8 各组小鼠前列腺癌组织形态表现(免疫组织化学, ×100)

Fig. 8 Morphology of prostate cancer tissue of mice in various groups (Immunohistochemistry, ×100)

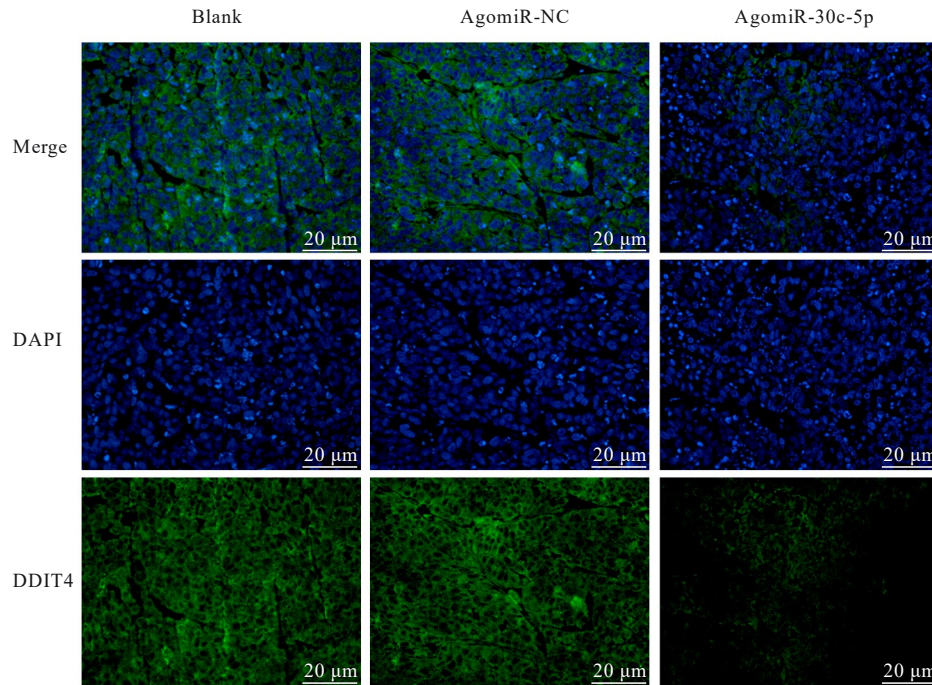


图9 免疫荧光染色观察各组小鼠前列腺癌组织中DDIT4蛋白荧光表达情况

Fig. 9 Fluorescence expressions of DDIT4 protein in prostate cancer tissue of mice in various groups observed by immunofluorescence staining

### 3 讨论

前列腺癌占全球癌症死亡人数的3.8%<sup>[10]</sup>。尽管部分患者病程较为缓慢,但大多数患者易发展为局部晚期或转移性癌症<sup>[11]</sup>。前列腺癌的风险因素包括预期寿命延长、高红肉饮食、前列腺癌易感基因的遗传和慢性炎症等<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13]</sup>显示:超过90%的癌症相关死亡是由转移引起的,大部分前列腺癌患者死于癌症转移。识别与前列腺癌失控生长有关的生物标志物和机制可以帮助制定治疗此类癌症的新策略。前列腺癌的风险分层或进展是在临床病理学数据的支持下进行的,如Gleason评分和血清前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)水平的总和,但目前关于PSA作为前列腺癌的诊断、预后和筛查工具存在争议,因此关注其他类型的分子标志物尤其重要<sup>[14]</sup>。截至2020年,在miRBase v22数据库中记录了超过4 800个人类成熟miRNA<sup>[15]</sup>。miR-375是前列腺癌中研究最多的miRNA,作为前列腺癌检测的候选生物标志物具有应用前景<sup>[16]</sup>。miRNA-182和miRNA-187为潜在的前列腺癌重要生物标志物,且miRNA-187可用于提高前列腺癌诊断和预后准确性<sup>[17]</sup>。

miRNA参与细胞增殖、迁移和凋亡等生物过程

的调节,根据其在癌症中所发挥的作用,miRNA可分为肿瘤促进剂和肿瘤抑制剂<sup>[18-19]</sup>。研究<sup>[20]</sup>显示:血小板中含有的miR-30a-5p、miR-30d-5p和miR-30c-5p可作为2型糖尿病并发症动脉粥样硬化的潜在生物标志物,参与凝血、血小板活化和葡萄糖代谢等过程。DU等<sup>[21]</sup>发现:DDIT4在胃癌组织和细胞中表达上调,而下调DDIT4表达可抑制体外和体内胃癌细胞增殖,并增加5-氟尿嘧啶诱导的细胞凋亡。烟酰胺核苷酸转氢酶反义RNA1(nicotinamide nucleotide transhydrogenase-antisense RNA1, NNT-AS1)通过靶向miR-496上调DDIT4表达,促进前列腺癌细胞的恶性表型<sup>[22]</sup>。本研究结果显示:与人正常前列腺上皮RWPE-1细胞比较,miR-30c-5p在前列腺癌LNCap细胞中低表达,DDIT4在LNCap细胞中高表达。转染miR-30c-5p mimic后,LNCap细胞中miR-30c-5p表达水平明显升高。转染sh-DDIT4后,LNCap中DDIT4 mRNA表达水平明显降低。过表达miR-30c-5p明显抑制DDIT4野生型质粒的荧光素酶活性,而在突变型质粒中,过表达miR-30c-5p组与mimic NC组荧光素酶活性比较无明显差异。过表达miR-30c-5p能够抑制LNCap的增殖、迁移和侵袭,而敲低DDIT4

也可抑制 LNCap 的增殖、迁移和侵袭。共转染 miR-30c-5p mimic 和 pcDNA3.1-DDIT4 后, LNCap 细胞中 DDIT4 mRNA 和蛋白均高表达, 能够促进 LNCap 的增殖、迁移和侵袭。体内裸鼠成瘤实验结果显示: 转染 agomiR-30c-5p 后, 小鼠肿瘤体积明显降低、部分 LNCap 细胞病理学形态改善、部分区域细胞排列整齐且细胞核恢复正常形态, DDIT4 mRNA 表达水平降低, miR-30c-5p 表达水平升高。过表达 miR-30c-5p 通过靶向下调 DDIT4 表达, 从而抑制 LNCap 的增殖、迁移和侵袭能力, 表明 DDIT4 具有作为前列腺癌临床诊断和治疗的生物标志物的潜力。

综上所述, 过表达 miR-30c-5p 可显著抑制前列腺癌 LNCap 细胞的增殖、转移和侵袭。DDIT4 是 miR-30c-5p 的靶基因, 过表达 DDIT4 可逆转过表达 miR-30c-5p 对 LNCap 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

赵斌参与实验设计、实施和论文撰写, 杨金叶、李支尧、毕城伟和杨李波参与部分实验操作、数据处理及统计学分析, 施致裕、李心、张建朋和施远龙参与文献检索及数据收集和整理, 杨勇和张国颖参与研究指导及论文审校。

#### [参考文献]

- [1] WANG G C, ZHAO D, SPRING D J, et al. Genetics and biology of prostate cancer[J]. *Genes Dev*, 2018, 32(17/18): 1105-1140.
- [2] KRETSCHMER A, TILKI D. Biomarkers in prostate cancer—Current clinical utility and future perspectives [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 120: 180-193.
- [3] SAARE M, REKKER K, LAISK-PODAR T, et al. Challenges in endometriosis miRNA studies—From tissue heterogeneity to disease specific miRNAs [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(9): 2282-2292.
- [4] FABRIS L, CEDER Y, CHINNAIYAN A M, et al. The potential of microRNAs as prostate cancer biomarkers[J]. *Eur Urol*, 2016, 70(2): 312-322.
- [5] BONAFÉ G A, BOSCHIERO M N, SODRÉ A R, et al. Natural plant compounds: does caffeine, dipotassium glycyrrhizinate, curcumin, and euphol play roles as antitumoral compounds in glioblastoma cell lines? [J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 784330.
- [6] HAO Y N, ZHU Y, SUN F K, et al. MicroRNA-30c-5p arrests bladder cancer G<sub>2</sub>/M phase and suppresses its progression by targeting PRC1-mediated blocking of CDK1/Cyclin B1 axis [J]. *Cell Signal*, 2023, 110: 110836.
- [7] DING F D, GAO F, ZHANG S, et al. A review of the mechanism of DDIT4 serve as a mitochondrial related protein in tumor regulation[J]. *Sci Prog*, 2021, 104(1): 36850421997273.
- [8] JIANG T, ZHU J J, JIANG S L, et al. Targeting lncRNA DDIT4-AS1 sensitizes triple negative breast cancer to chemotherapy via suppressing of autophagy[J]. *Adv Sci*, 2023, 10(17): e2207257.
- [9] BOZGEYIK E, CEYLAN O. Distinct expression signatures of miR-130a, miR-301a, miR-454 in formalin fixed paraffin embedded tissue samples of prostate cancer patients[J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 234: 153897.
- [10] BERNARDES J G B, FERNANDES M R, RODRIGUES J C G, et al. Association of androgenic regulation and microRNAs in acinar adenocarcinoma of prostate[J]. *Genes*, 2022, 13(4): 622.
- [11] TEO M Y, RATHKOPF D E, KANTOFF P. Treatment of advanced prostate cancer [J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 479-499.
- [12] 靳通通, 周川, 赵磊, 等. 前列腺癌免疫治疗中癌症疫苗的研究进展[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2023, 48(1): 148-156.
- [13] RYCAJ K, LI H W, ZHOU J J, et al. Cellular determinants and microenvironmental regulation of prostate cancer metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 44: 83-97.
- [14] ALARCÓN-ZENDEJAS A P, SCAVUZZO A, JIMÉNEZ-RÍOS M A, et al. The promising role of new molecular biomarkers in prostate cancer: from coding and non-coding genes to artificial intelligence approaches[J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2022, 25(3): 431-443.
- [15] MUNTEANU V C, MUNTEANU R A, ONACIU A, et al. MiRNA-based inspired approach in diagnosis of prostate cancer[J]. *Medicina*, 2020, 56(2): 94.
- [16] HE S M, SHI J C, MAO J, et al. The expression of miR-375 in prostate cancer: a study based on GEO, TCGA data and bioinformatics analysis[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(6): 152375.
- [17] NAYAK B, KHAN N, GARG H, et al. Role of miRNA-182 and miRNA-187 as potential biomarkers in prostate cancer and its correlation with the staging of prostate cancer[J]. *Int Braz J Urol*, 2020, 46(4):

- 614-623.
- [18] MISHRA S, YADAV T, RANI V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 98: 12-23.
- [19] CHEN W J, SONG J, BIAN H J, et al. The functions and targets of miR-212 as a potential biomarker of cancer diagnosis and therapy[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(4): 2392-2401.
- [20] PORDZIK J, JAKUBIK D, JAROSZ-POPEK J, et al. Significance of circulating microRNAs in diabetes mellitus type 2 and platelet reactivity: bioinformatic analysis and review [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1): 113.
- [21] DU F, SUN L N, CHU Y, et al. DDIT4 promotes gastric cancer proliferation and tumorigenesis through the p53 and MAPK pathways [J]. *Cancer Commun*, 2018, 38(1): 45.
- [22] YAO C L, CHENG X H, GUO X Q, et al. NNT-AS1 modulates prostate cancer cell proliferation, apoptosis and migration through miR-496/DDIT4 axis [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 463.