

miR-194-5p/UBA2在肾透明细胞癌进展中的作用及机制研究

廖云峰^{1#}, 杨龙飞^{2#}, 朱功亮^{1#}, 周 仪³, 吴玉婷¹, 刘林伟¹, 邹军荣⁴, 张国玺¹

(1. 赣南医科大学第一附属医院泌尿外科, 江西 赣州 341000; 2. 河南大学第一附属医院泌尿外科, 河南 开封 475000; 3. 赣南医科大学第一附属医院肿瘤科; 4. 赣南医科大学第一附属医院泌尿外科研究所, 江西 赣州 341000)

摘要:目的:探讨 miR-194-5p 在肾透明细胞癌(Clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)中的表达特征及其对肿瘤细胞发展的影响,并验证 miR-194-5p 与 UBA2 之间的靶向调控关系。方法:实时 RT-PCR 检测 ccRCC 组织与正常组织及细胞系中 miR-194-5p 表达。将 miR-194-5p agomir、miR-194-5p antagomir 及相应阴性对照转染至 786-O 与 Caki-1 细胞,检测 UBA2 蛋白及 mRNA 表达变化。通过 CCK-8、Transwell、流式细胞术分别评估细胞增殖、迁移/侵袭与凋亡。采用双荧光素酶报告实验验证 miR-194-5p 与 UBA2 3'UTR 的直接结合。结果:miR-194-5p 在 ccRCC 组织及 ccRCC 细胞系中的表达显著下调;上调 miR-194-5p 可降低 UBA2 蛋白及 mRNA 的表达,并抑制细胞增殖、迁移与侵袭,促进细胞凋亡;双荧光素酶报告提示 miR-194-5p 可特异性抑制携带 UBA2 野生型 3'UTR 的报告活性,而对 UBA2 3'UTR 5'-UGUUACA-3'序列的突变型载体无显著抑制。结论:miR-194-5p 可通过直接靶向 UBA2 的 3'UTR 从而抑制其表达,进而抑制 ccRCC 细胞发展。

关键词:肾透明细胞癌;miR-194-5p;UBA2;增殖;迁移;侵袭

中图分类号:R737.11 **文献标志码:**A **文章编号:**2097-7174(2026)02-0118-07

DOI:10.3969/j.issn.2097-7174.2026.02.003

Role and mechanistic study of the miR-194-5p/UBA2 in the progression of clear cell renal cell carcinoma

LIAO Yunfeng^{1#}, YANG Longfei^{2#}, ZHU Gongliang^{1#}, ZHOU Yi³,
WU Yuting¹, LIU Linwei¹, ZOU Junrong⁴, ZHANG Guoxi¹

(1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000; 2. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng, Henan 475000; 3. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University; 4. Institute of Urology, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000)

Abstract: Objective: To investigate the expression pattern of miR-194-5p in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and its effects on malignant biological behaviors of tumor cells, and to validate the targeted regulatory relationship between miR-194-5p and UBA2. **Methods:** The expression of miR-194-5p in ccRCC tissues and cell lines was measured by real time RT-PCR. miR-194-5p agomir, miR-194-5p antagomir and corresponding negative control were transfected into 786-O and Caki-1 cells, and the expression of UBA2 protein and mRNA was detected. Cell proliferation, migration/invasion, and apoptosis were evaluated using CCK-8 assays, transwell assays, and flow cytometry, respectively. A dual-luciferase reporter assay was performed to verify the direct binding between miR-194-5p and the 3'UTR of UBA2. **Results:** miR-194-5p was significantly downregulated in ccRCC tissues and ccRCC cell lines. Up-regulation of miR-194-5p could

基金项目:江西省主要学科学术和技术带头人培养计划领军人才项目(20213BCJL22038)

作者简介:廖云峰,男,硕士,副主任医师,研究方向:泌尿系肿瘤的发病机制。E-mail:lyf130@126.com

通信作者:邹军荣,男,博士,助理研究员,硕士生导师,研究方向:结石的致病机制研究。E-mail:ydzjr@gmu.edu.cn

张国玺,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:肾癌发病机制研究。E-mail:zgx8778@gmu.edu.cn

#共同第一作者

reduce the expression of UBA2 protein and mRNA, inhibit cell proliferation, migration and invasion, and promote apoptosis. The dual-luciferase reporter assay showed that miR-194-5p specifically suppressed the reporter activity of constructs containing the wild-type UBA2 3'UTR, whereas no significant suppression was observed in UBA2 3'UTR 5'-UGUACA-3' mutant constructs. **Conclusion:** Restoration of miR-194-5p expression can suppress the malignant biological behaviors of ccRCC cells by directly targeting and inhibiting UBA2.

Key words: Clear cell renal cell carcinoma; miR-194-5p; UBA2; Proliferation; Migration; Invasion

肾细胞癌(Renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系统最常见且最具侵袭性的恶性肿瘤之一,其组织学亚型以肾透明细胞癌(Clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)为主,约占全部病例的70%~80%^[1]。尽管近年来影像学分层不断细化,手术技术日益精准,以靶向治疗和免疫治疗为代表的系统治疗策略也取得了显著进展,但仍有20%~40%的患者在3年内出现复发或转移,其5年生存率不到10%^[2],成为导致治疗失败和患者死亡的主要原因。这一临床困境提示,肾癌发生发展的分子机制,特别是与侵袭、转移相关的关键调控网络,仍有待深入阐明。值得注意的是,近年来研究发现,多种小分子非编码RNA,特别是微小RNA(microRNA, miRNA),在肾癌转移进程中发挥关键调控作用^[3-4]。这些miRNA可能通过调节与上皮-间质转化、血管生成、免疫逃逸及细胞外基质重塑相关的信号通路,影响肿瘤细胞的侵袭能力和远处定植潜能^[5-8]。深入揭示miRNA在肾癌转移中的功能与机制,不仅有助于阐明其复发转移的分子基础,也可能为开发新型生物标志物及靶向治疗策略提供理论依据。

miRNA是一类长度18~25 nt的非编码RNA,主要通过与其靶mRNA 3'非翻译区(3'UTR)互补结合,引起mRNA降解或翻译抑制,从而参与肿瘤发生发展过程中的多环节调控^[3]。既往研究表明,miR-194-5p在多种肿瘤中与细胞增殖、迁移/侵袭能力及细胞命运调控相关,且在部分肾癌研究中呈现表达下调趋势,这可能与肿瘤的进展过程密切相关^[9-11]。

UBA2作为SUMO E1激活酶复合体的关键亚基,在SUMO化级联反应起始步骤中发挥核心作用^[12]。前期研究已经证实UBA2在ccRCC中高表达,并且可以促进ccRCC增殖^[13],然而其上游的潜在调控机制尚不清楚。经过TargetScan的分析,团队找到了一些可能参与UBA2调控的miRNAs,其中与miR-194-5p具有较佳的结合特性。然而,miR-194-5p是否通过直接靶向UBA2并进一步影响ccRCC恶性表型,仍缺乏系统证据支持。

本研究聚焦miR-194-5p在ccRCC中的表达变化

及其对UBA2的调控作用,系统评估miR-194-5p表达改变后肾癌细胞的增殖、迁移/侵袭及凋亡变化,以期阐明miR-194-5p/UBA2轴在ccRCC进展中的潜在作用与机制。

1 材料与方法

1.1 临床标本 收集2018年12月至2021年1月在赣南医科大学第一附属医院泌尿外科手术切除并经病理确诊为肾透明细胞癌患者的肿瘤组织及配对癌旁组织共20例。所有患者术前未接受放疗、化疗或靶向/免疫治疗。标本取材后立即液氮速冻并转入-80℃保存,相关临床资料同步登记。研究经医院医学伦理委员会批准(伦理编号:临2025-278)并取得患者知情同意。

1.2 免疫组化分析与阳性率统计 肿瘤组织与配对癌旁组织石蜡包埋切片(4 μm)经70℃烤片后脱蜡复水。切片用3% H₂O₂室温孵育8~10 min封闭内源性过氧化物酶,随后采用柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)微波抗原修复(间隔10 min重复1~2次),自然冷却后PBS洗涤。室温封闭20 min后加入UBA2一抗(Proteintech, 15347-1-AP),4℃孵育过夜;次日PBS洗涤后加入HRP标记二抗(中山金桥, PV6000)室温孵育约30 min,并按试剂盒流程进行DAB显色,苏木素复染,脱水透明后用中性树脂封片。阴性对照以PBS替代一抗,其余步骤相同。

在光学显微镜下以200×高倍镜观察切片,避开坏死、出血及褶皱区域;每例标本随机选取≥5个视野拍照。以细胞核出现明确棕黄色颗粒为阳性判定标准,分别计数每个视野UBA2阳性细胞数与总细胞数,计算阳性细胞率(%)=(阳性细胞数/总细胞数)×100%。每例取各视野阳性率的均值作为该样本最终阳性率,由2名观察者在未知分组条件下独立计数,差异较大时复核后达成一致。

1.3 细胞培养 786-O、Caki-1、HK-2及293T细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。细胞置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,培养基按细胞系特性选用RPMI-1640或DMEM并补充10%胎牛血清与

1%青链霉素。所有实验均使用对数生长期细胞并定期进行支原体检测。

1.4 miR-194-5p 转染与分组 采用 TransIntro™ EL Transfection Reagent 进行瞬时转染。实验设置 miR-194-5p miRNA 模拟物的阴性对照组 (agomirNC)、miR-194-5p miRNA 模拟物组 (agomir)、敲低 miR-194-5p miRNA 的阴性对照组 (antagomirNC)、miR-194-5p miRNA 敲低组 (antagomir) 4组。细胞达 70%~80% 融合度时弃旧培养基, PBS 清洗 3 次后更换血清培养基。将 miRNA 与转染试剂混匀并室温静置 20 min 后加入细胞, 使 miR-194-5p agomir 终浓度为 100 nmol/L, miR-194-5p antagomir 终浓度为 150 nmol/L, 对应阴性对照保持相同终浓度。转染 6 h 后更换完全培养基, 并在转染 48 h 后开展实时 RT-PCR、Western blot 及功能实验。除特别说明外, 所有细胞学实验均至少进行 3 次独立生物学重复; CCK-8 每组每时间点设置 ≥ 3 个技术复孔; 实时 RT-PCR 与双荧光素酶每组设置 3 个平行孔并取均值用于统计。

1.5 实时 RT-PCR 检测 miR-194-5p 与 UBA2 表达 miRNA 提取采用 EasyPure® miRNA Kit, 组织经液氮研磨后裂解, 细胞 PBS 清洗后裂解, 按试剂盒完成相分离、上柱纯化与洗脱。miR-194-5p 与 U6 分别逆转录并进行实时 PCR 扩增, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。miR-194-5p 与 U6 引物序列分别为: miR-194-5p 正向特异性引物: 5'-GCCGTCTGTAACAGCAACTCCA-3'; miR-194-5p 反向特异性引物: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'; U6 正向特异性引物: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACT-3'; U6 反向特异性引物: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'。

UBA2 检测采用总 RNA 逆转录后实时 PCR 扩增, ACTB 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。ACTB 与 UBA2 引物序列分别为: UBA2 正向特异性引物: 5'-GCAGTTGGCCTTTGTTGAGA-3'; UBA2 反向特异性引物: 5'-GGGACAACCCAGACAAACAC-3'; ACTB 正向特异性引物: 5'-GACGTGGACATCCGCAAAG-3'; ACTB 反向特异性引物: 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'。

1.6 Western blot 检测 UBA2 蛋白表达 转染 48 h 后收集细胞, RIPA 裂解蛋白并 BCA 定量, 等量上样进行 10% SDS-PAGE 电泳并转膜至 PVDF 膜。5% BSA 室温封闭 2 h 后加入 UBA2 (Proteintech, 15347-1-AP) 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后

加入二抗室温孵育 1 h, 再次洗膜后 ECL 显色。

1.7 CCK-8 检测细胞增殖 786-O 与 Caki-1 细胞接种于 96 孔板, 铺板密度为 4 000 个细胞/孔 (100 μ L), 按分组完成转染。分别于 24、36、48、72、96 h 加入 10 μ L CCK-8 工作液, 37 °C 孵育 100 min 后于 450 nm 测定 OD 值并绘制增殖曲线。

1.8 Transwell 迁移与侵袭 采用 24 孔 Transwell 小室进行迁移与侵袭实验, 插入膜孔径为 8 μ m (常用规格)。迁移实验中, 转染后细胞消化计数, 以无血清培养基重悬后加入上室, 每孔 2 000 个细胞/200 μ L, 下室加入 600 μ L 含 20% FBS 完全培养基, 37 °C 孵育 12 h。孵育结束后 PBS 清洗 2~3 次, 棉签轻拭去未穿膜细胞, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.1% 草酸铵结晶紫染色 5 min, PBS 洗涤后倒置晾干。每孔随机选择不少于 10 个视野计数穿膜细胞数并取均值。侵袭实验在上室预铺 Matrigel, 使用无血清且不含双抗培养基按 8:1 (培养基: 基质胶) 稀释, 向上室加入 100 μ L, 37 °C 孵育 2 h 待凝固后加入细胞 (2 000 个细胞/200 μ L), 下室同样加入 600 μ L 含 20% FBS 完全培养基, 37 °C 孵育 24 h 后固定、染色与计数步骤与迁移实验一致。

1.9 流式细胞术检测凋亡 凋亡检测采用 Annexin V-PE/7-AAD 双染。转染后用 0.125% 未含 EDTA 胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤计数后取 5×10^5 个细胞, 300 g、4 °C 离心 5 min 弃上清, 以 500 μ L 1 \times Annexin V binding buffer 重悬并加入 Annexin V-PE 与 7-AAD, 室温避光孵育 20 min 后立即上机检测。数据分析时先以 FSC-A/SSC-A 排除碎片, 以未染与单染样本完成补偿与象限设定, 在 Annexin V-PE 与 7-AAD 散点图中判读存活、早期凋亡、晚期凋亡/继发坏死与坏死细胞比例。

1.10 双荧光素酶报告实验 293T 细胞接种于 24 孔板, 融合度约 70% 时进行共转染。分别将含 UBA2 野生型 3'UTR 或突变型 3'UTR 的 psiCHECK-2 报告质粒 Luciferase 转录本的 TAA 终止密码子后的多克隆位点区域, 并与 miR-194-5p agomir 共同转染, 每孔质粒用量 0.8 μ g, miR-194-5p agomir 终浓度 100 nmol/L。转染 24 h 后检测荧光素酶活性, 每组设置 3 个复孔并以萤火虫/海肾荧光素酶比值表示相对活性。

1.11 TargetScan 网站结合位点预测 访问 TargetScan 网站: https://www.targetscan.org/vert_80/。在“Enter a gene symbol”框中, 输入基因名 UBA2。

在“Or enter an mRNA accession number”下方,选择物种 Human。点击 Submit。导出与 UBA2 结合的 miRNA 列表。根据列表中总评分值、总评分值百分数、加权分值以及物种间进化评分值评估 UBA2 与 miR-194-5p 结合的强弱。

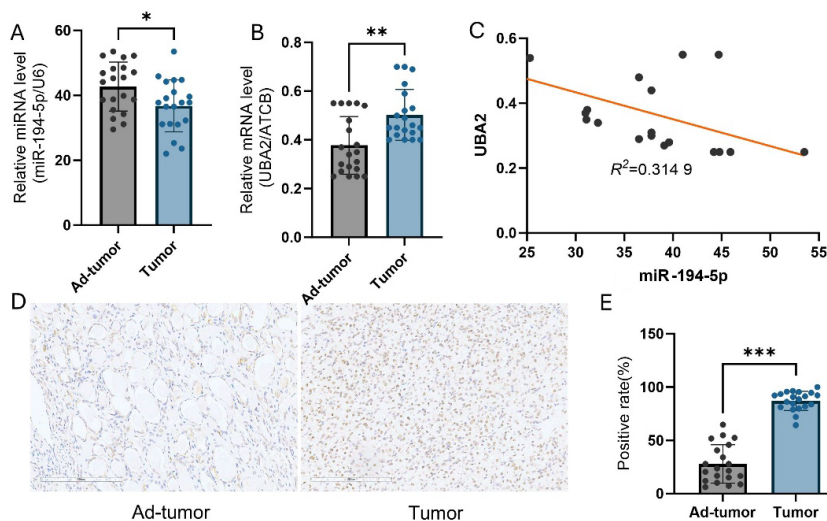
1.12 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析,增殖曲线采用 two-way ANOVA 分析。采用 Pearson 相关系数分析 UBA2 和 miR-194-5p 表达的相关性。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ccRCC 组织中 miR-194-5p 的表达下调

表1 TargetScan 分析 UBA2 与 miR-194-5p 的结合位点及评分

预测目标区域(顶部)与 miRNA(底部)的潜在配对关系	在 UTR 中的结合位点	总评分值	总评分值百分数	加权分值	保守分支长度	物种间进化评分值
UBA2 基因 3' 非翻译区第 576~582 位 5'... CCAAUUUUUGUGUAU UGUUACAG ...	7mer-A1 位点	-0.13	83.00	-0.13	10.07	0.54
hsa-miR-194-5p 3'AGGUGUACCUCAACG ACAAUGU						



A: 20 例肿瘤组织及配对癌旁组织中 miR-194-5p 相对表达量; B: 20 例肿瘤组织及配对癌旁组织中 UBA2 相对表达量; C: UBA2 和 miR194-5p 表达的相关性分析; D: 免疫组化检测 UBA2 在 ccRCC 组织中表达情况代表图(200 \times); E: UBA2 阳性细胞数统计结果。Tumor: 肿瘤组织; Ad-tumor: 配对癌旁组织; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

图1 miR-194-5p、UBA2 在 ccRCC 组织中的表达变化

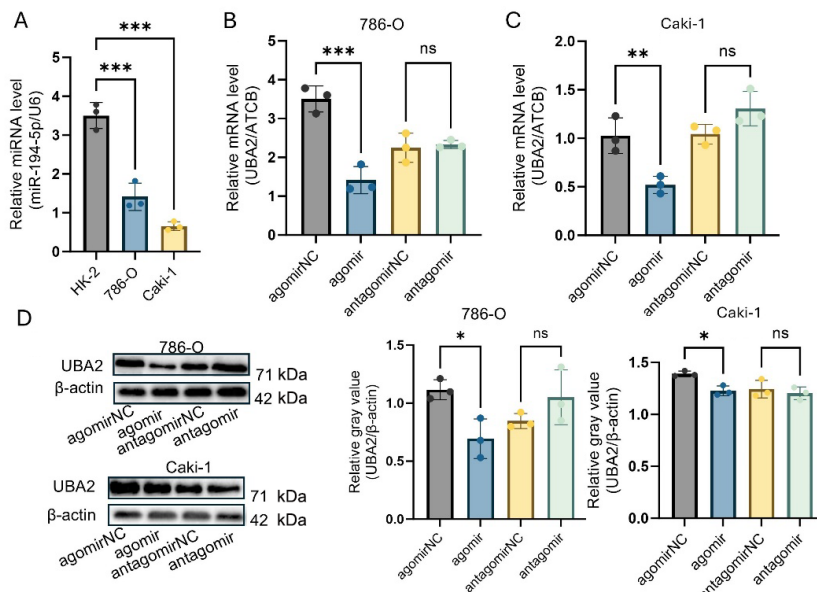
2.2 miR-194-5p 可负向调控 ccRCC 细胞中 UBA2 表达 本研究检测了常见的肾小管上皮细胞 HK-2 和常见的肾透明细胞癌患者来源的 786-O 与 Caki-1 细胞中 miR-194-5p 的表达情况。实时 RT-PCR 结果显示癌细胞的 miR-194-5p 的表达水平亦明显低于 HK-2 细胞(图 2A)。在此基础上,为明确 miR-194-5p 是否调控 UBA2,在 786-O 与 Caki-1 细胞中分别转染

TargetScan 数据库结果显示 UBA2 与 miR-194-5p 具有较佳的结合特性(表 1)。为明确 miR-194-5p 在 ccRCC 的表达情况,本研究采集了 20 例 ccRCC 组织。实时 RT-PCR 结果显示,肿瘤组织中 miR-194-5p 表达水平较配对癌旁组织显著降低(图 1A),同时我们还检测了 UBA2 的 mRNA 表达水平,提示 UBA2 在肿瘤组织表达水平高于配对的癌旁组织(图 1B)。两者表达水平的相关性分析结果显示,UBA2 和 miR-194-5p 在肿瘤组织中的表达呈负相关($R^2=0.3149$,图 1C)。这 20 例样本的组织学检测验证了 UBA2 在肿瘤组织表达高于癌旁组织(图 1D),肿瘤组织的 UBA2 阳性率为 86.7%,远高于癌旁组织的 28.3%(图 1E)。

miR-194-5p agomir、antagomir 及相应阴性对照。实时 RT-PCR 结果显示,与 agomirNC 组相比,agomir 组可显著降低 UBA2 转录水平;而与 antagomirNC 组相比,antagomir 组 UBA2 转录水平无明显变化(图 2B~2C)。Western blot 结果显示,与 agomirNC 组相比,agomir 组 UBA2 蛋白下降;与 antagomirNC 组相比,antagomir 组 UBA2 蛋白无明显变化(图 2D)。

我们推测,可能是由于786-O和Caki-1细胞内源性表达的miR-194-5p量不高,从而导致antagomir发挥的

阻断效应有限。上述结果表明miR-194-5p对UBA2转录与蛋白层面都存在稳定负向调控。



A: 实时 RT-PCR 检测细胞株表达 miR-194-5p 情况; B: 786-O 细胞在转染 agomir 与 antagomir 后, UBA2 的转录水平表达情况; C: Caki-1 细胞在转染 agomir 与 antagomir 后, UBA2 的转录水平表达情况; D: UBA2 的蛋白表达变化及灰度值比较。ns: 差异无统计学意义; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

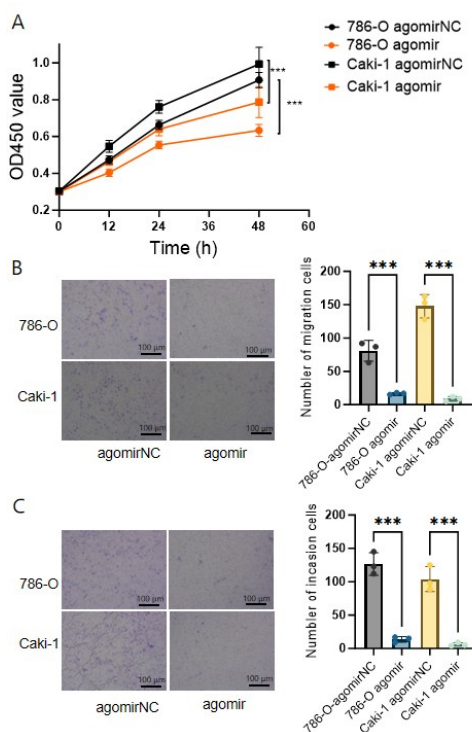
图2 miR-194-5p可负向调控ccRCC细胞中UBA2表达

2.3 miR-194-5p 抑制 ccRCC 细胞增殖并降低迁移/侵袭能力 鉴于 antagomir 的效果不如预期, 后续实验主要采用 miR-194-5p mRNA 模拟物组 (agomir) 进行验证实验。与阴性对照组相比, miR-194-5p agomir 组的 786-O 和 Caki-1 细胞在培养 48、72、96 h 均表现为增殖能力显著下降 (P 均 < 0.05) (图 3A)。

此外, Transwell 实验结果显示, miR-194-5p 上调显著减少 2 种细胞株的迁移穿膜细胞数 (图 3B); 在 Matrigel 预包被条件下, 同样观察到相比于 agomirNC 组, agomir 组侵袭穿膜细胞数显著减少 (图 3C)。上调 miR-194-5p 的水平可使细胞迁移与侵袭能力相应减弱, 提示 miR-194-5p 的抑癌作用可延伸至肿瘤运动与侵袭过程。上述结果表明 miR-194-5p 对转移相关表型也具有稳定的抑制效应。

2.4 miR-194-5p 促进 ccRCC 细胞凋亡 前期研究提示 UBA2 在抑制 ccRCC 细胞凋亡中发挥重要作用^[13]。CCK-8 结果显示, miR-194-5p 能够削弱肿瘤细胞生存优势。Annexin V-PE/7-AAD 流式细胞术结果显示, miR-194-5p 上调后 2 种细胞株总凋亡率显著升高, 提示 miR-194-5p 可通过促进凋亡过程进一步抑制肿瘤细胞扩增 (图 4)。

2.5 双荧光素酶报告实验验证 miR-194-5p 可直接靶向 UBA2 3'UTR 通过 TargetScan 预测结果



A: 细胞增殖曲线; B: Transwell 迁移代表性图像与定量; C: Matrigel 侵袭代表性图像与定量。*** $P < 0.001$ 。

图3 miR-194-5p抑制ccRCC细胞增殖并降低迁移/侵袭能力

可见, miR-194-5p 可与 UBA2 mRNA 的 3'UTR 5'-UGUUACA-3'片段存在结合关系。为从因果层面

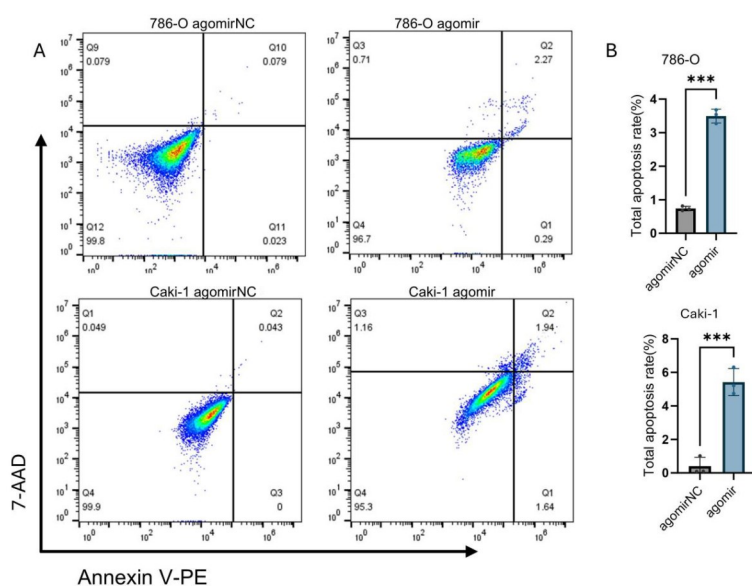
验证两者是否存在直接靶向关系,将 UBA2 3'UTR 野生型(WT)与突变型(MUT)序列的荧光素酶报告载体 psiCHECK2(图 5A)与 miR-194-5p agomir 在 293T 细胞中共转染。结果显示,与单转染野生型质粒相比,agomir 可显著降低荧光素酶活性($P < 0.01$)。与之对应的是,当结合位点突变后,agomir 抑制效应明显减弱,2 组差异无统计学意义(图 5B),提示 miR-194-5p 可与 UBA2 mRNA 3'UTR 发生直接结合并抑制其表达,两者结合的关键序列可能为 5'-UGUACA-3'。

3 讨论

RCC 是一种典型的肾脏恶性肿瘤,约占所有恶性肿瘤的 3%,复发率高,死亡率超过 40%^[14-15]。ccRCC 是最常见的肾脏恶性肿瘤,约占所有肾脏恶性肿瘤的 90%^[1]。随着腹腔镜和机器人手术系统的普及,生物反应调节剂已应用于转移性 RCC 患者。然而,晚期癌症的预后仍然很差,5 年生存率为 5%~10%^[16]。因此,亟须探索 ccRCC 早期诊断标志物与治疗新靶点。miR-194-5p 作为一类短链非编码 RNA,参与调控多种肿瘤细胞的凋亡、侵袭和转移,但其在 ccRCC 中的作用机制尚不明确。因此,本研究聚焦于 miR-194-5p 在肾透明细胞癌中的表达模式及其对 UBA2 的靶向调控机制,探讨 miR-194-5p 作为潜在生物标志物的临床应用前景及其在肿瘤免疫微环境中的作用机制,以期对 ccRCC 诊疗提供新思路。

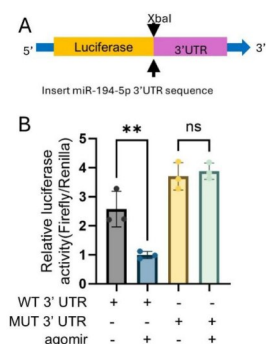
本研究首先在组织样本和细胞模型中验证 miR-194-5p 和 UBA2 的表达情况。结果显示,miR-194-5p 在 ccRCC 组织及细胞系中均显著低表达,提示其可能作为抑癌 miRNA 参与肿瘤发生发展^[9-11]。这与 Wang Y 等^[17]和 Wang M^[18]等研究结果一致,他们发现 miR-194-5p 在消化系统肿瘤中低表达并与不良预后相关。基于此表达特征,我们进一步在功能层面验证了恢复 miR-194-5p 表达可显著抑制 ccRCC 细胞的恶性行为,进一步支持其作为潜在抑癌分子的生物学基础。

在机制层面,通过 agomir 与 antagomir 干预实验,证实 miR-194-5p 可负向调控 UBA2 在 mRNA 和蛋白水平的表达。进一步利用双荧光素酶报告基因系统,证实 miR-194-5p 通过结合 UBA2 3'UTR 的特定位点直接抑制其表达。此外,功能实验表明,恢复 miR-194-5p 表达可显著抑制 ccRCC 细胞的增殖能力,并诱导细胞凋亡,提示其可通过调控细胞存活与死亡平衡抑制肿瘤生长。同时,迁移与侵袭实验也显示其可显著抑制细胞的运动与侵袭能力,表明 miR-194-5p 在调控肿瘤生长与转移 2 个关键恶性表型中均发挥重要作用。值得注意的是,UBA2 作为 SUMO 化修饰途径中 E1 激活酶的关键亚基,其表达异常可能通过影响全局 SUMO 化水平,进而干扰包括凋亡调控、上皮-间质转化等在内的多条信号通路^[19-21]。本研究观察到的“miR-194-5p 上调—UBA2 下调—抑癌表型”的一致性变化,提示 miR-194-5p/UBA2 轴可能作为连接 miRNA 调控与



A: Annexin V-PE/7-AAD 代表性散点图; B: 凋亡比例统计(总凋亡:早期、晚期及死亡细胞比例)。*** $P < 0.001$ 。

图 4 miR-194-5p 促进 ccRCC 细胞凋亡



A: UBA2 3'UTR WT与MUT插入位点示意图; B: 双荧光素酶相对活性(N=3)。ns: 差异无统计学意义; **P<0.01。

图5 miR-194-5p直接靶向UBA2 3'UTR的双荧光素酶验证蛋白质SUMO化修饰的重要分子桥梁,在ccRCC进展中具有枢纽性作用。

尽管本研究初步建立了miR-194-5p/UBA2调控轴,并揭示了其在ccRCC中的抑癌功能,但仍存在可进一步深化的方向:(1)在机制闭环验证方面,需进一步确立UBA2在介导miR-194-5p功能中的必要性,例如在miR-194-5p过表达背景下,外源性表达不携带3'UTR的UBA2编码区,观察其是否可逆转miR-194-5p诱导的抑癌表型;同时,可结合UBA2敲低实验,模拟miR-194-5p过表达的表型,从而增强机制链条的完整性。(2)在信号通路层面,未来可进一步探讨UBA2下调所影响的SUMO化下游底物及其介导的信号网络,特别是与凋亡执行、EMT进程等相关的关键蛋白及其修饰状态,从而构建从miRNA调控到蛋白质修饰再到表型输出的完整信号轴。(3)开展体内动物模型实验,验证该轴在肿瘤生长、转移及微环境调控中的作用,将具有重要转化意义。

综上所述,本研究系统阐明了miR-194-5p在ccRCC中作为抑癌miRNA的功能,并初步揭示其通过靶向UBA2抑制肿瘤恶性进展的分子机制,为ccRCC的分子靶向治疗提供了新的潜在靶点与实验依据。

4 结论

miR-194-5p在肾透明细胞癌组织与细胞系中显著低表达。恢复miR-194-5p表达可降低UBA2水平,并抑制肾癌细胞增殖、迁移与侵袭,促进细胞凋亡。双荧光素酶报告证实miR-194-5p可直接

靶向UBA2 3'UTR并发挥转录后抑制作用,表明miR-194-5p可通过直接靶向UBA2的3'UTR从而抑制其表达,进而抑制ccRCC细胞的发展。

所有作者均声明不存在利益冲突关系。

参考文献:

- [1] Bex A, Ghanem Yabu, Albiges L, et al. European association of urology guidelines on renal cell carcinoma: the 2025 update[J]. Eur Urol, 2025, 87(6): 683-696.
- [2] Huang J, Dahl D M, Dong L, et al. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio and neutrophilia are independent predictors of recurrence in patients with localized papillary renal cell carcinoma[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 891045.
- [3] Catto J W F, Alcaraz A, Bjartell A S, et al. microRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review[J]. Eur Urol, 2011, 59(5): 671-681.
- [4] Croce C M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(10): 704-714.
- [5] Peng F, Fan H, Li S, et al. microRNAs in epithelial-mesenchymal transition process of cancer: potential targets for chemotherapy[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(14):7526.
- [6] Chu X, Yang Y, Tian X. Crosstalk between pancreatic cancer cells and cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment mediated by exosomal microRNAs[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9512.
- [7] Muhammad S, Kaur K, Huang R, et al. microRNAs in colorectal cancer: role in metastasis and clinical perspectives[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(45): 17011-17019.
- [8] Fanoodi A, Maharati A, Akhlaghipour I, et al. microRNAs as the critical regulators of tumor angiogenesis in liver cancer[J]. Pathol Res Pract, 2023, 251: 154913.
- [9] Khella H W Z, Bakhet M, Allo G, et al. miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(10): 2231-2239.
- [10] Nofech-Mozes R, Khella H W Z, Scorilas A, et al. microRNA-194 is a marker for good prognosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. Cancer Med, 2016, 5(4): 656-664.

(下转第137页)