

小鼠会出现空腹血糖和胰岛素水平的升高<sup>[6]</sup>。Caveolin-1通过提高胰岛素受体激酶的活性发挥正性调节的作用,与本实验中 Caveolin-1在慢性神经痛过程中表达量升高的研究结论一致,提示 Caveolin-1可能在更多的信号转导途径中发挥正性调节的作用<sup>[7]</sup>。

而以往的研究中 Caveolin-1多发挥负性调控作用,考虑 Caveolin-1的负性调控作用并非适用于所有的信号转导途径,除上述慢性神经痛过程和胰岛素信号传递通路之外,是否在更多的信号传递通路中发挥正性调节的作用有待进一步研究<sup>[8]</sup>。

综上所述,在本实验所建立的神经痛模型中,实验中对侧背根神经节和脊髓背角 Caveolin-1的表达各个时间点与对照组相比,均无明显变化,那么同侧 Caveolin-1在背根神经节和脊髓背角表达显著增加,则更进一步证实了慢性痛中 Caveolin-1介导信号转导的作用的存在,为以后疼痛分子水平的基础研究及临床上疼痛的治疗提供理论基础。

参考文献

1 Dietrich D, Bech H, Kral T, et al. Metabotropic glutamate receptors modulate synaptic transmission in the perforant path: pharmacology and localization of two distinct receptors [J]. Brain Res, 1997, 767(2): 220-227

2 Gaudreault SB, Dea D, Poirier J. Increased Caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain [J]. Neurobiol Aging, 2004, 25(6): 753-759

3 Takayasu Y, Takeuchi K, Kumari R, et al. Caveolin-1 knockout mice exhibit impaired induction of mGluR-dependent long-term depression at CA3-CA1 synapses [J]. PNAS, 2010, 107(50): 21778-21783

4 Bhatnagar A, Sheffler DJ, Kroeze WK. Caveolin-1 interacts with 5-HT2A serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected G-protein-coupled protein receptors [J]. Biol Chem, 2004, 279(33): 34614-34623

5 Stralfors P. Caveolins and caveolae, roles in insulin signalling and diabetes [M]. Springer US: Caveolins and Caveolae, 2012, 729(6): 111-126

6 Pojoga LH, Underwood PC, Goodarzi MO, et al. Variants of the caveolin-1 gene: a translational investigation linking insulin resistance and hypertension [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(8): 1288-1292

7 Hahn-Obercyger M, Graeve L, Madar Z. A high cholesterol diet increases the association between caveolae and insulin receptors in rat liver [J]. Lipid Res, 2009, 50(1): 98-107

8 Francesconi A, Kumari R, Zukin RS. Regulation of group I metabotropic glutamate receptor trafficking and signaling by the Caveolar/lipid raft pathway [J]. Neuroscience, 2009, 29(11): 3590-3602

(收稿日期: 2017-01-18)

(修回日期: 2017-03-06)

## miR-216a-5p 靶向作用于 PAK2 对膀胱癌细胞增殖和凋亡影响的体外研究

邵焕军 赵振伶 郝丽娜 朱家红 孙峰

**摘要** 目的 探讨 miR-216a-5p 在多种膀胱癌细胞系中表达及调控 p21 活化蛋白激酶 2 (PAK2) 基因对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 通过实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-216a-5p 在正常膀胱细胞系 SV-HUC-1 及膀胱癌细胞系 5637、J82、T24 和 EJ 中的表达, 选取其中两种表达 miR-216a-5p 最少的 5637 和 J82 为对象, 实验分两组: 对照组 (转染 miR-NC)、实验组 (转染 miR-216a-5p)。利用 qRT-PCR 法检测 PAK2 mRNA 的表达。Western blot 法检测 PAK2、p-Akt 和 p-ERK 蛋白的表达。Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 实验和克隆形成实验检测膀胱癌细胞活力和增殖能力。流式细胞术检测细胞凋亡情况。**结果** miR-216a-5p 在膀胱癌细胞系中的表达量均低。实验组 PAK2 基因 mRNA 及其蛋白的表达明显降低, PAK2 mRNA 在 5637 细胞中对照组和实验组表达量分别为  $1.01 \pm 0.15$  和  $0.40 \pm 0.11$  ( $P < 0.01$ ), 在 J82 细胞中对照组和实验组表达量分别为  $1.00 \pm 0.09$  和  $0.56 \pm 0.14$  ( $P < 0.01$ )。p-Akt 和 p-ERK 蛋白表达显著降低。实验组细胞活力明显被抑制, 增殖能力明显降低。实验组细胞凋亡显著增加 ( $P < 0.01$ )。**结论** miR-216a-5p 在多种膀胱癌细胞系中呈低表达, 可在体外靶向抑制 PAK2 基因, 抑制膀胱癌细胞系 5637 和 J82 的增殖能力, 促进细胞凋亡, 可能成为具有膀胱癌生物治疗意义的靶标分子。

作者单位: 236800 亳州市人民医院泌尿外科 (邵焕军、赵振伶、朱家红、孙峰); 650032 昆明医科大学第一附属医院泌尿外科 (郝丽娜)

通讯作者: 郝丽娜, 电子邮箱: haolina668@163.com

关键词 膀胱肿瘤 miR-216a-5p p21 活化蛋白激酶2 增殖 凋亡

中图分类号 R4 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.035

Effects of miR-216a-5p Targeting PAK2 on Proliferation and Apoptosis of Bladder Cancer Cells in vitro. Shao Huanjun, Zhao Zhenling, Hao Lina, et al. Department of Urology, Bozhou People's Hospital, Anhui 236800, China

**Abstract Objective** To investigate the expression of miR-216a-5p in various bladder cancer cell lines and regulation of PAK2 gene on the proliferation and apoptosis of bladder cancer cells. **Methods** The expression of miR-216a-5p in normal bladder cell line SV-HUC-1 and bladder cancer cell lines (5637, J82, T24 and EJ) was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Two of the least miR-216a-5p-expressed cell lines 5637 and J82 were selected as the experimental object. The experiment was divided into two groups: the control group (transfected with miR-NC) and the experimental group (transfected with miR-216a-5p). The expression of PAK2 mRNA was detected by qRT-PCR. The expression of PAK2, p-Akt and p-ERK protein was detected by Western blot. Cell counting kit-8 (CCK-8) and clone formation assay were used to detect the vitality and proliferation of bladder cancer cells. Flow cytometry was used to detect apoptosis. **Results** The expression levels of miR-216a-5p in bladder cancer cell lines were lower than normal bladder cells. The expression of PAK2 mRNA and protein was significantly decreased in the experimental group. The expression of PAK2 mRNA in the control and experimental groups were  $1.01 \pm 0.15$  and  $0.40 \pm 0.11$  ( $P < 0.01$ ) in 5637 cells. The expression of PAK2 mRNA in the control and experimental groups were  $1.00 \pm 0.09$  and  $0.56 \pm 0.14$  ( $P < 0.01$ ) in J82 cells. The expression of p-Akt and p-ERK protein was significantly decreased. The cell viability of the experimental group was significantly inhibited, and the proliferative ability was significantly decreased. The apoptosis of the experimental group was significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** miR-216a-5p is low-expressed in a variety of bladder cancer cell lines. It can inhibit PAK2 gene expression in vitro, inhibit the proliferation of bladder cancer cell lines 5637 and J82, promote cell apoptosis, and may become a target molecule with biotherapeutic significance.

**Key words** Bladder neoplasms; miR-216a-5p; PAK2; Proliferation; Apoptosis

膀胱癌是最常见的泌尿系恶性肿瘤, 针对膀胱癌治疗方法包括外科治疗和化学治疗, 然而由于治疗效果的局限性, 膀胱癌的生物治疗一直是近年来研究的热点<sup>[1, 2]</sup>。miRNA 是一类单链非编码 RNA, 属于内源性 RNA, miRNA 通过与信使 RNA (mRNA) 结合并促进其降解或抑制 mRNA 翻译, 调节基因的表达<sup>[3]</sup>。大量的研究证明 miRNA 在多种细胞功能如增殖和凋亡中具有调节作用<sup>[4, 5]</sup>。有研究表明, 在胰腺癌、口腔鳞状细胞癌等多种肿瘤中, miR-216a-5p 可通过干扰癌基因的表达, 抑制肿瘤的生长<sup>[6-8]</sup>。然而目前为止, miR-216a-5p 在膀胱癌细胞中的作用及机制尚未明了。本研究拟通过 qRT-PCR 筛选低表达 miR-216a-5p 的膀胱癌细胞系, 并进一步通过高表达 miR-216a-5p, 检测潜在的靶基因 PAK2 基因的表达量以及细胞增殖、凋亡情况的改变。探讨 miR-216a-5p 与 PAK2 基因可能的关系及在体外对膀胱癌细胞恶性表型的影响。

#### 材料与方 法

1. 实验材料: 正常膀胱细胞系 SV-HUC-1、膀胱癌细胞系 5637、J82、T24 和 EJ 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; DMEM 培养基、RPMI1640 培养基和胎牛血清购自美国 HyClone 公

司; miR-216a-5p mimics 及对照品 miR-NC 由上海吉玛制药技术有限公司合成; 转染试剂 Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司; qRT-PCR 相关试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 一抗 GAPDH、PAK2、p-Akt 和 p-ERK 购自美国 Abcam 公司; CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术研究; Annexin V-FITC/PI 双染色试剂盒购自美国 BD 公司。

2. 方法: (1) 细胞培养和转染: 在 37℃、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 使用 DMEM 培养基培养正常膀胱细胞系 SV-HUC-1, 使用 RPMI1640 培养基培养膀胱癌细胞系 5637、J82、T24 和 EJ。收集对数生长期的细胞进行转染实验。将目的膀胱癌细胞分为两组, 即对照组 (miR-NC)、实验组 (miR-216a-5p)。对照组转染 miR-NC, 实验组转染 miR-216a-5p, 参照说明书运用 Lipofectamine 3000 进行转染。转染后 2 天收集各组细胞用于后续实验。(2) qRT-PCR 筛选低表达 miR-216a-5p 的目的细胞系及检测各组细胞 miR-216a-5p 和 PAK2 mRNA 表达: 收集细胞, 按照试剂盒说明书建立反应体系和设定参数, 以 U6 为内参基因, qRT-PCR 检测各细胞系中 miR-216a-5p 的表达量, 筛选两种低表达 miR-216a-5p 的膀胱癌细胞系作为目的细胞系。qRT-PCR 检测



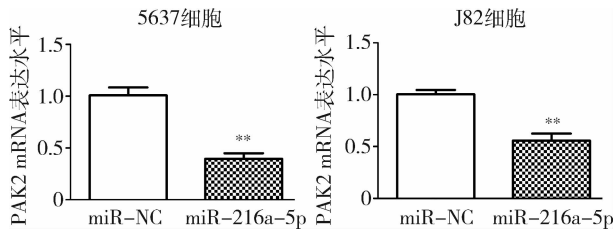


图4 qRT-PCR检测细胞中PAK2 mRNA表达改变  
与miR-NC组比较, \*\*  $P < 0.01$

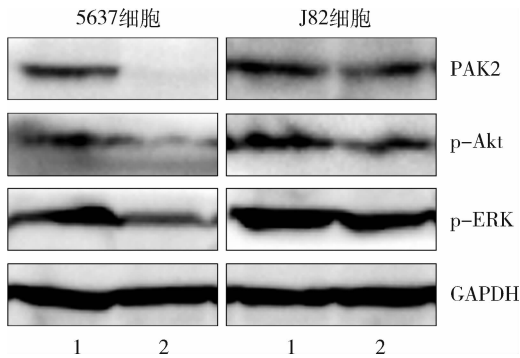


图5 Western blot法检测PAK2、p-Akt和  
p-ERK蛋白表达改变  
1. miR-NC组; 2. miR-216a-5p组

6. 转染 miR-216a-5p 后膀胱癌细胞活力:  
CCK-8 法连续检测 5d 两组细胞的细胞活力改变,  
绘制生长曲线(图6)。与对照组比较, 实验组 5637  
细胞和 J82 细胞均由第 5 天开始, 细胞活力开始受到  
抑制( $P < 0.05$ )。

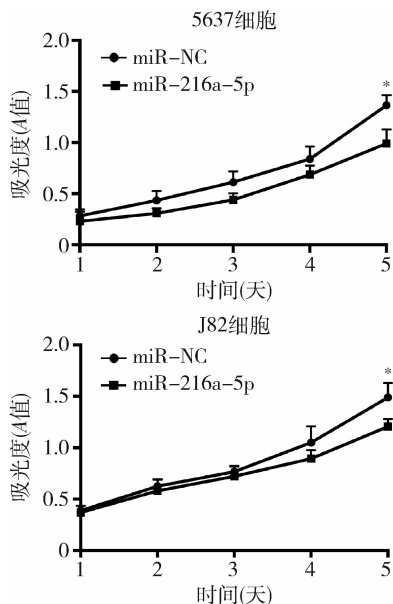


图6 CCK-8法检测各组细胞活力变化  
与miR-NC组比较, \*  $P < 0.05$

7. 转染 miR-216a-5p 后膀胱癌细胞增殖能力:  
5637 细胞在对照组和实验组形成的克隆数分别为  
 $246.83 \pm 85.45$  和  $126.69 \pm 41.72$  ( $t = 2.53, P < 0.05$ ), J82 在对照组和实验组形成的克隆数分别为  
 $165.73 \pm 39.89$  和  $86.61 \pm 32.65$  ( $t = 3.07, P < 0.05$ )。克隆形成实验表明, 与对照组比较, 实验组膀胱  
癌细胞增殖能力显著降低(图7)。

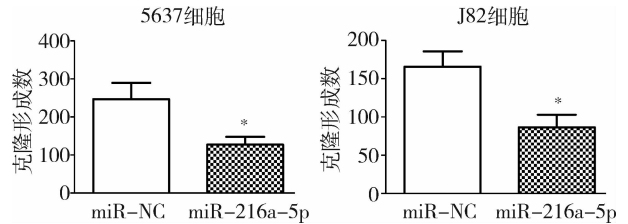


图7 克隆形成实验检测各组细胞增殖能力改变  
与miR-NC组比较, \*  $P < 0.05$

8. 转染 miR-216a-5p 后细胞凋亡情况: 5637  
细胞在对照组和实验组的凋亡率分别为  $2.32 \pm 0.17$   
和  $15.32 \pm 1.18$  ( $t = 21.83, P < 0.01$ ), J82 在对照组  
和实验组的凋亡率分别为  $2.22 \pm 0.41$  和  $18.42 \pm 1.57$   
( $t = 19.92, P < 0.01$ ), 与对照组比较, 实验组膀胱  
癌细胞凋亡率显著增加(图8)。

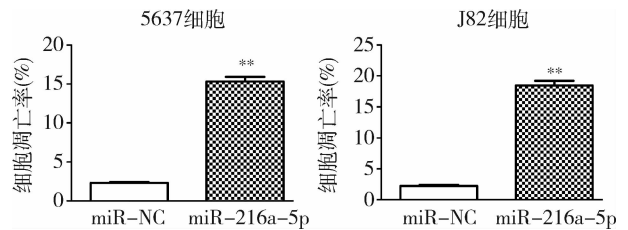


图8 流式细胞术检测两组细胞凋亡改变  
与miR-NC组比较, \*\*  $P < 0.01$

### 讨 论

miR-216a-5p 与多种疾病的发生过程有关。  
Menghini 等<sup>[9]</sup> 研究发现, miR-216a-5p 通过调节自  
噬相关基因 Beclin1 的表达水平来控制氧化低密度脂  
蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞中的自噬, 提示 miR-  
216a-5p 可能在心血管疾病和动脉粥样硬化的发病  
机制中具有相关作用。Endo 等<sup>[10]</sup> 研究发现, 在 L-  
精氨酸诱导的急性胰腺炎的大鼠模型中, miR-216a-  
5p 的血浆浓度显著增加, miR-216a-5p 可能是急  
性胰腺炎损伤的生物学标志物。Li 等<sup>[11]</sup> 研究表明,  
miR-216a-5p 通过调节 c-Cbl 介导的 PI<sub>3</sub>K/AKT  
途径, 干扰地塞米松抑制骨形成的作用, 促进成骨细  
胞分化并增强骨形成, miR-216a-5p 可能作为预防

和治疗骨质疏松症和其他骨代谢相关疾病的新型治疗剂。miR-216a-5p广泛参与肿瘤细胞生长的调节。miR-216a-5p可通过靶向真核翻译起始因子4B抑制口腔鳞状细胞癌的生长和转移<sup>[8]</sup>。miR-216a-5p能够减少长链非编码RNA MALAT1的表达,诱导胰腺癌细胞G<sub>2</sub>/M阻滞和细胞凋亡,抑制胰腺癌细胞的生长<sup>[7]</sup>。在miR-216a-5p对胰腺癌细胞的作用研究中,Hou等<sup>[6]</sup>发现miR-216a-5p在胰腺癌组织中的表达明显下调,miR-216a-5p通过靶向JAK/STAT通路抑制胰腺癌细胞的生长。miR-216a-5p在膀胱癌细胞中的研究未见报道,其对膀胱癌细胞生物学行为的影响及其作用机制值得研究。

p21活化蛋白激酶2(PAK2)属于丝氨酸苏氨酸蛋白激酶家族,参与调控细胞的增殖、凋亡、转移等活动<sup>[12,13]</sup>。PAK2可以通过活化Akt和ERK,促进细胞的增殖<sup>[14]</sup>。PAK2可活化生成PAK2-p34,PAK2-p34从细胞质转移到细胞核,诱导细胞凋亡的发生<sup>[15]</sup>。在多种肿瘤中均发现PAK2呈现高表达,PAK2是与肿瘤细胞的生长和转移有关联的重要因子<sup>[16,17]</sup>。PAK2基因在膀胱癌中的研究鲜有报道。本研究中笔者发现,miR-216a-5p可显著下调PAK2基因的表达,PAK2下游蛋白Akt和ERK活化程度显著降低。膀胱癌细胞的增殖能力被抑制,细胞凋亡显著增加。但miR-216a-5p是否直接导致PAK2基因表达下调有待后续实验进一步加以验证。下一步将通过双荧光素酶报告基因系统验证PAK2是否为miR-216a-5p的靶基因,并进一步通过动物实验验证miR-216a-5p在体内的抑癌作用。

综上所述,本研究中miR-216a-5p在膀胱癌细胞系呈现低表达。在膀胱癌细胞系5637和J82中,过表达miR-216a-5p后,癌基因PAK2表达下调,PAK2可能是miR-216a-5p靶基因之一。miR-216a-5p可在体外抑制细胞的增殖能力,促进细胞凋亡,为膀胱癌的诊疗提供了新思路。

参考文献

- 1 Black PC, Sridhar S. New research in bladder cancer, ASCO - GU 2017[J]. *Can Urol Assoc J*,2017,11(6S):S160 - S162
- 2 Pinto IG. Systemic therapy in bladder cancer[J]. *Indian J Urol*, 2017,33(2):118 - 126
- 3 Kotaki R, Koyama - Nasu R, Yamakawa N, *et al.* miRNAs in normal

- and malignant hematopoiesis[J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(7):E1495
- 4 Zhang J S, Zhao Y, Lv Y, *et al.* miR - 873 suppresses H9C2 cardiomyocyte proliferation by targeting GLI1[J]. *Gene*,2017, 626:426 - 432
- 5 Deb B, Uddin A, Chakraborty S. miRNAs and ovarian cancer: an overview[J]. *J Cell Physiol*,2018,233(5):3846 - 3854
- 6 Hou BH, Jian ZX, Cui P, *et al.* miR - 216a may inhibit pancreatic tumor growth by targeting JAK2[J]. *FEBS Lett*,2015,589(17): 2224 - 2232
- 7 Zhang Y, Tang X, Shi M, *et al.* MiR - 216a decreases MALAT1 expression, induces G<sub>2</sub>/M arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2017,483(2):816 - 822
- 8 Li L, Ma HQ. MicroRNA - 216a inhibits the growth and metastasis of oral squamous cell carcinoma by targeting eukaryotic translation initiation factor 4B[J]. *Mol Med Rep*,2015,12(2):3156 - 3162
- 9 Menghini R, Casagrande V, Marino A, *et al.* MiR - 216a: a link between endothelial dysfunction and autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2014,5:e1029
- 10 Endo K, Weng H, Kito N, *et al.* MiR - 216a and miR - 216b as markers for acute phased pancreatic injury[J]. *Biomed Res*,2013,34(4):179 - 188
- 11 Li H, Li T, Fan J, *et al.* miR - 216a rescues dexamethasone suppression of osteogenesis, promotes osteoblast differentiation and enhances bone formation, by regulating c - Cbl - mediated PI<sub>3</sub>K/AKT pathway[J]. *Cell Death Differ*,2015,22(12):1935 - 1945
- 12 Varshney P, Dey CS. Resveratrol regulates neuronal glucose uptake and insulin sensitivity via P21 - activated kinase 2 (PAK2)[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2017,485(2):372 - 378
- 13 Zeng Y, Broxmeyer HE, Staser K, *et al.* Pak2 regulates hematopoietic progenitor cell proliferation, survival, and differentiation[J]. *Stem Cells*,2015,33(5):1630 - 1641
- 14 Nuche - Berenguer B, Ramos - Alvarez I, Jensen RT. The p21 - activated kinase, PAK2, is important in the activation of numerous pancreatic acinar cell signaling cascades and in the onset of early pancreatitis events[J]. *Biochim Biophys Acta*,2016,1862(6):1122 - 1136
- 15 Hao S, Luo C, Abukiwan A, *et al.* miR - 137 inhibits proliferation of melanoma cells by targeting PAK2[J]. *Exp Dermatol*,2015,24(12): 947 - 952
- 16 Siu MK, Kong DS, Ngai SY, *et al.* p21 - activated kinases 1, 2 and 4 in endometrial cancers: effects on clinical outcomes and cell proliferation[J]. *PLoS One*,2015,10(7):e133467
- 17 Yan BX, Ma JX, Zhang J, *et al.* Prostatin may contribute to chemoresistance, repress cancer cells in ovarian cancer, and is involved in the signaling pathways of CASP/PAK2 - p34/actin[J]. *Cell Death Dis*,2014,5:e995

(收稿日期:2017 - 07 - 24)

(修回日期:2017 - 09 - 17)