

# miR-199b-3p通过靶向PLC $\epsilon$ 抑制前列腺癌细胞的恶性增殖

郑永波<sup>1</sup> 刘佳渝<sup>1</sup> 段李梅<sup>2</sup> 杨锦潇<sup>2</sup> 罗春丽<sup>2</sup> 吴小侯<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016;

<sup>2</sup>重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 该研究的目的是确定miR-199b-3p在前列腺癌(PCa)中的表达及其对PCa细胞增殖的影响及作用机制。通过实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测miR-199b-3p在PCa组织、良性前列腺增生(BPH)组织、PCa细胞及人正常前列腺上皮细胞(RWPE-1)中的表达, 并分析其表达与PCa临床病理特征的关系。蛋白质印迹法(Western blot)用于检测磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C epsilon(PLC $\epsilon$ )的表达。采用CCK-8法和克隆形成实验对其体外增殖进行评估。Edu测定法用于检测细胞对Edu的吸收。荧光素酶报告实验被用来验证miR-199b-3p和PLC $\epsilon$ 的靶向结合情况。结果显示, 在PCa组织中miR-199b-3p的表达水平明显低于BPH组织, 且与临床病理特征中的组织学分期相关。上调miR-199b-3p可以显著抑制PCa细胞的增殖和Edu的摄取能力, PLC $\epsilon$ 被鉴定为miR-199b-3p的下游靶基因, 且其表达量与miR-199b-3p的表达量呈负相关。此外, 补救实验结果显示, 上调PLC $\epsilon$ 能够逆转miR-199b-3p在PCa细胞增殖中的抑制作用。总之, miR-199b-3p可通过靶向PLC $\epsilon$  3'非编码区(3'-UTR)负性调控PLC $\epsilon$ 进而抑制PCa细胞的恶性增殖。

**关键词** 前列腺癌; 恶性增殖; miR-199b-3p; PLC $\epsilon$

## miR-199b-3p Suppresses Prostate Cancer Cells Malignant Proliferation by Targeting PLC $\epsilon$

ZHENG Yongbo<sup>1</sup>, LIU Jiayu<sup>1</sup>, DUAN Limei<sup>2</sup>, YANG Jinxiao<sup>2</sup>, LUO Chunli<sup>2</sup>, WU Xiaohou<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Diagnostics Medicine of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** The purpose of this study was to determine the expression of miR-199b-3p in PCa (prostate cancer) and its effect on PCa cells proliferation. The expression of miR-199b-3p in PCa tissues, BPH (benign prostatic hyperplasia) tissues, PCa cells and RWPE-1 were detected by RT-qPCR (real-time quantitative polymerase chain reaction). In addition, we examined the relationship between miR-199b-3p and the clinicopathological features of PCa in PCa tissues. Western blot analysis was used to detect the expression of PLC $\epsilon$  (phospholipase C epsilon). CCK-8 assay and colony-forming assay were applied to assess the proliferation *in vitro*. Edu assay was used to detect cell uptake of Edu. Luciferase reporter assay was used to confirm the binding of miR-199b-3p and PLC $\epsilon$ . The results showed that the expression level of miR-199b-3p in PCa tissues was significantly lower than

收稿日期: 2020-03-10 接受日期: 2020-04-16

国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 81802543)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-89012919, E-mail: wuxiaohou2019@163.com

Received: March 10, 2020 Accepted: April 16, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81802543)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-89012919, E-mail: wuxiaohou2019@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5243>

that in BPH tissues, and correlated with the histological stage in various clinicopathological characteristics. Up-regulation of miR-199b-3p can significantly inhibit the proliferation of PCa cells and the uptake capacity of Edu. *PLCε* was identified as the downstream target gene of miR-199b-3p. In addition, the expression of *PLCε* was negatively correlated with that of miR-199b-3p. Furthermore, rescue experiments showed that the overregulation of *PLCε* could rescue inhibitory effect of miR-199b-3p on cell proliferation. In a word, miR-199b-3p negatively regulates *PLCε* by targeting its 3'-UTR (3'-untranslated region), then inhibiting the malignant proliferation of PCa cells.

**Keywords** prostate cancer; malignant proliferation; miR-199b-3p; *PLCε*

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是西方国家男性恶性肿瘤死亡的第二大原因, 仅次于肺癌<sup>[1-3]</sup>。近年来, 随着人们生活方式的改变、人口老龄化和诊断水平的不断提高, 我国 PCa 的发病率呈明显上升趋势, 成为严重危害我国男性健康的最重要疾病之一<sup>[4]</sup>。PCa 在早期通常无症状, 随着癌症的发展, 会出现进行性排尿困难和恶性转移, 给患者和家属带来巨大的负担<sup>[5]</sup>。

大部分的 miRNAs (microRNAs) 是由单链 RNA 前体产生的, 具有发夹结构, 约 70 个碱基大小, 通过 Dicerase 加工处理<sup>[6-7]</sup>, 它们有 5' 端磷酸基和 3' 端羟基, 大小为 21~25 nt。microRNAs 通过与靶基因 mRNA 3' 非编码区 (3'-UTR) 的部分互补结合, 诱导 mRNA 翻译抑制或降解, 进而抑制蛋白合成<sup>[8-10]</sup>。重要的是, 据研究发现, miRNAs 与肿瘤的发生发展密切相关。尤其是具有抑癌作用的 miR-199 家族 (miR-199b-3p、miR-199b-5p、miR-199a-3p、miR-199a-5p) 在癌组织中显著降低<sup>[11]</sup>。miR-199 家族可以通过抑制 ITGA3 的表达来减少头颈部肿瘤的恶性迁移和侵袭<sup>[12]</sup>。有报道表明, miR-199a/b-3p 通过 ERK 抑制 HCC 细胞生长<sup>[13]</sup>。在乳腺癌的研究中, miR-199a/b-3p 通过下调 ERK 轴来减少迁移和侵袭<sup>[14]</sup>。此外还研究报道, miR-199b-3p 通过阻断 MAPK/ERK/EGR1 轴, 抑制 CMECs1 的凋亡, 对小鼠缺血性脑卒中有保护作用<sup>[15]</sup>。因此, 我们重点专注于 miR-199b-3p 在 PCa 中的作用的研究, 并进一步探讨 miR-199b-3p 是否也在 PCa 中发挥抑癌基因的作用。

在本研究中, 我们检测了 miR-199b-3p 在 PCa 中的表达, 并分析了其与各种临床病理特征的关系及作为 PCa 患者预后预测因子的潜力。此外, 我们还探讨了 miR-199b-3p 在 PCa 细胞恶性增殖中的确切作用。综上所述, 本研究旨在为探讨 miR-199b-3p 在前列腺癌中的作用提供科学依据, 为前列腺癌的靶向

治疗提供一些探索。

## 1 方法与材料

### 1.1 前列腺癌临床样本

本研究对 2017 年 3 月至 2019 年 4 月在重庆医科大学第一附属医院泌尿外科行活检或根治性前列腺切除术患者的 47 例 BPH 组织标本和 PCa 组织标本进行回顾性分析, 并由重庆医科大学第一附属医院病理档案科两位经验丰富的病理学家通过苏木精染色和伊红染色病理证实 BPH 和 PCa 诊断。所有样品在液氮中快速冷冻, 并进行 mRNA 和蛋白的鉴定。用于本研究的完整的临床记录和临床患者标本都获得了患者知情同意。本研究经重庆医科大学第一附属医院伦理审查委员会批准。

### 1.2 细胞培养及转染

本研究从中国科学院细胞库获得 3 株 PCa 细胞系 (PC3、DU145 和 LNCaP) 和 1 株正常人前列腺上皮细胞 (RWPE-1)。细胞在添加了 10% FBS (Gibco) 的 RPMI-1640 (Gibco) 培养基中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。细胞转染的 LV-PLCε (5'-GGT TCT CTC CTA GAA GCA ACC-3') 和 LV-NC (5'-TTC TCC AA CGT GTC ACG T-3') 慢病毒载体由 GenePharma 公司 (提供)。通过将 miR-199b-3p 模拟物 (miR-199b-3p) (5'-TGT CAT CAG ACG TGT AAC CAA T-3') 和 miR-199b-3p NC 序列 (5'-ACA GUA GUC UGC ACA UUG A-3') 转染细胞, 由此获得 miR-199b-3p 过表达的细胞。所有细胞按照制造商的说明书用 Lipofectamine 3000 (Invitrogen) 转染。

### 1.3 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

使用 TRIzol 试剂 (TaKaRa, 日本) 提取 BPH 组织、PCa 组织和细胞系的总 RNA。cDNA 逆转录采用 PrimeScript RT 试剂 (TaKaRa, 日本), 温度协议条件为: 37 °C 15 s, 85 °C 5 s。然后, 使用 SYBR Premix Ex Taq

II(TaKaRa, 日本)光循环系统(Roche)进行RT-qPCR, RT-qPCR的热循环条件如下: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, 58 °C退火延伸30 s, 共35个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行结果分析。*U6*作为microRNA的内参, *GAPDH*作为mRNA的内参。miR-199b-3p、*PLCε*、*U6*和*GAPDH*的引物序列见表1。

#### 1.4 蛋白质免疫印迹法(Western blot)

使用RIPA裂解液提取BPH组织、PCa组织和细胞系的总蛋白, 每孔加入等量(30 μg)的蛋白, 10%凝胶, SDS-PAGE解析。将蛋白转移到PVDF膜上, 用5%脱脂乳孵育2 h。膜在4 °C的温度下用抗体进行孵育过夜。使用的抗体为PLCε(Santa Cruz, sc28402 1:1 000)和anti-GAPDH(Abcam, ab181602 1:5 000)。随后, 将PVDF膜与辣根过氧化物酶标记的二抗在37 °C孵育1 h。蛋白检测采用增强型化学发光试剂盒(Beyotime)孵育。

#### 1.5 荧光素酶报告检测

首先在线miRNA数据库TargetScan (www.targetscan.org)被用于miR-199b-3p的下游靶基因预测。接着将包含miR-199b-3p的假定的寡核苷酸结合位点的野生型*PLCε*-3'-UTR(WT)和突变型*PLCε*-3'-UTR(MUT)插入到荧光素酶表达载体pMIR-REPORT(Obio Technology, 中国)中使之顺利构建。然后使用Lipofectamine 3000试剂(Invitrogen)将这些构建物与miR-199b-3p模拟物或miR-199b-3p NC共转染到指定的细胞中。最后使用双荧光素酶报告试剂盒(Promega)检测样品的荧光素酶活性。

#### 1.6 细胞计数Kit-8实验(CCK-8)

转染后的细胞接种于96孔板中。根据厂家说明, 在96孔板上添加CCK-8试剂。酶标法测定酶标在24 h、48 h和72 h时在450 nm波长处的吸光度(D)值。

#### 1.7 细胞克隆形成实验

将转染后的细胞接种到6孔板中, 每孔2 000个, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的孵箱中培养14天。然后取出

并用4%多聚甲醛和0.1%结晶紫对细胞增殖形成的菌落进行染色。最后用显微镜计数克隆细胞集落并拍照。

#### 1.8 5-乙炔-2-脱氧尿苷(Edu)检测

转染后的细胞接种于96孔板中。根据制造商的指示, 细胞在加有Edu(50 μmol/L)、1× ApolloR reaction cocktail(100 μL)和1× Hoechst 33342(100 μL)的试剂中共同孵化30 min。最后利用每个样本3个视野中细胞的平均数量来分析细胞增殖情况。

#### 1.9 统计学分析

采用SPSS 22.0版本软件和GraphPad Prism 6.0版本软件对实验数据进行统计分析。组间差异采用t检验和单因素方差分析, 然后采用Newman-Keuls检验。数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-199b-3p在PCa组织和细胞系中表达下调

为鉴定miR-199b-3p在PCa组织中的表达。采用RT-qPCR检测miR-199b-3p在BPH组织、PCa组织、PCa细胞系及RWPE-1中的表达。结果显示, 与BPH组织相比较, miR-199b-3p在PCa组织中表达下调(图1A), 另外在PCa细胞系(PC3、DU145和LNCaP)中也验证了同样的结果(图1B)。此外, 我们还进一步分析了miR-199b-3p与PCa患者的临床病理特征之间的关系。分析表明, miR-199b-3p低表达与组织学分期相关(\* $P<0.05$ , 表2)。

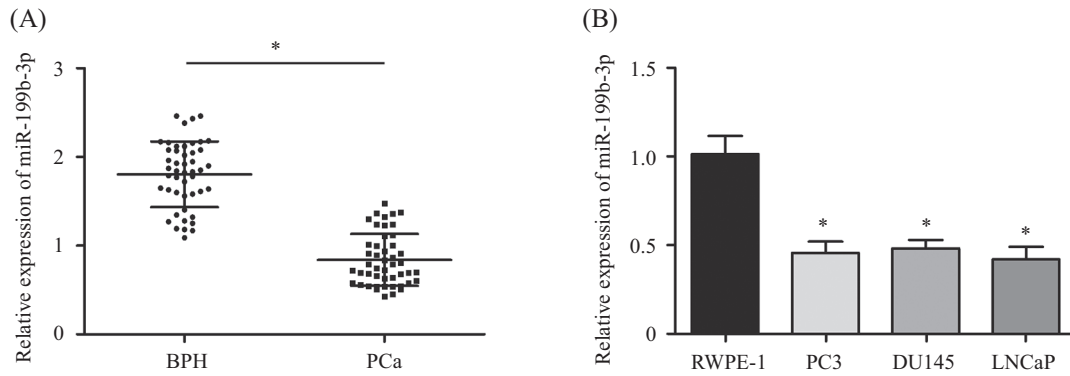
### 2.2 miR-199b-3p抑制PCa细胞的恶性增殖

为了进一步研究miR-199b-3p在PCa细胞中的生物学作用, 我们使用miR-199b-3p模拟物来增加miR-199b-3p在DU145和LNCaP细胞中的表达(图2A)。CCK-8检测显示, 增加miR-199b-3p的表达可显著抑制DU145和LNCaP细胞的增殖(图2B)。此外, 克隆形成实验也证明, 增加miR-199b-3p的表达可以

表1 RT-qPCR引物信息

Table 1 The sequence of primer for RT-qPCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>MiR-199b-3p</i>	GTC ACA GTA GTC TGC ACA T	GTG CAG GGT CCG AGG T
<i>PLCε</i>	CAT GGA AGG ATA AGC GTT GGT	CCC AAG TCC CGT GTT AAG A
<i>U6</i>	TCC GAC GCC GCC ATC TCT A	TAT CGC ACA TTA AGC CTC TA
<i>GAPDH</i>	GGA GAA GGC TGG GGC TCA TTT GC	CCC GTT CAG CTC AGG GAT GAC CT



A: miR-199b-3p在BPH组织和PCa组织中的相对表达; B: miR-199b-3p在PCa细胞系和RWPE-1细胞中的相对表达。\* $P < 0.05$ , 与RWPE-1相比。  
A: the relative expression of miR-199b-3p in BPH tissues and PCa tissues; B: the relative expression of miR-199b-3p in PCa cell lines and RWPE-1. \* $P < 0.05$  vs RWPE-1.

图1 miR-199b-3p在BPH组织、PCa组织、PCa细胞系及RWPE-1细胞中的表达

Fig.1 The expression of miR-199b-3p in BPH tissues, PCa tissues, PCa cell lines and RWPE-1 cell

表2 miR-199b-3p与前列腺癌患者临床病理特征的关系

Table 2 Association between miR-199b-3p and clinicopathological features of PCa patients

变量 Variables	病例 Cases	miR-199b-3p expression		P
		Low (n=29)	High (n=18)	
Age (year)				
<60	16	11	5	0.475
≥60	31	18	13	
Histological stage				
Ta-T1	19	8	11	0.023*
T2-T4	28	21	7	
Gleason score				
<7	21	12	9	0.563
≥7	26	17	9	

\* $P < 0.05$ , 在PCa患者组织学期中miR-199b-3p低表达患者与miR-199b-3p高表达患者的比较。

\* $P < 0.05$  comparison between patients with low expression of miR-199b-3p and those with high expression of miR-199b-3p in histological stage of PCa patients.

抑制DU145和LNCaP细胞的增殖(图2C和图2D)。另外, miR-199b-3p表达的增加显著抑制了DU145和LNCaP细胞对EdU的摄取, 说明PCa细胞的恶性增殖能力也被抑制(图2E和图2F)。

### 2.3 PLC $\epsilon$ 被鉴定为miR-199b-3p的直接靶基因

在线 miRNA 的数据库 TargetScan 预测显示, PLC $\epsilon$ 的 3'-UTR 包含 miR-199b-3p 的结合位点(图 3A)。生物信息学分析指出, miR-199b-3p 的互补序列能够和 PLC $\epsilon$ 的 3'-UTR 的 mRNA 相结合(图 3B)。正如图 3C 所示, 在共转染了 miR-199b-3p 和 PLC $\epsilon$  wt 3'-UTR 的 PCa 细胞中, 其荧光素酶活性显著受到抑制。此外, 在 PCa 细胞系中增加 miR-199b-3p 的表达能明显抑制 PLC $\epsilon$ 的 mRNA 及蛋白表达水平(图 3D 和图 3F)。

### 2.4 在 PCa 组织和细胞中 PLC $\epsilon$ 表达上调

为进一步分析 PLC $\epsilon$  在 PCa 中的表达情况, RT-

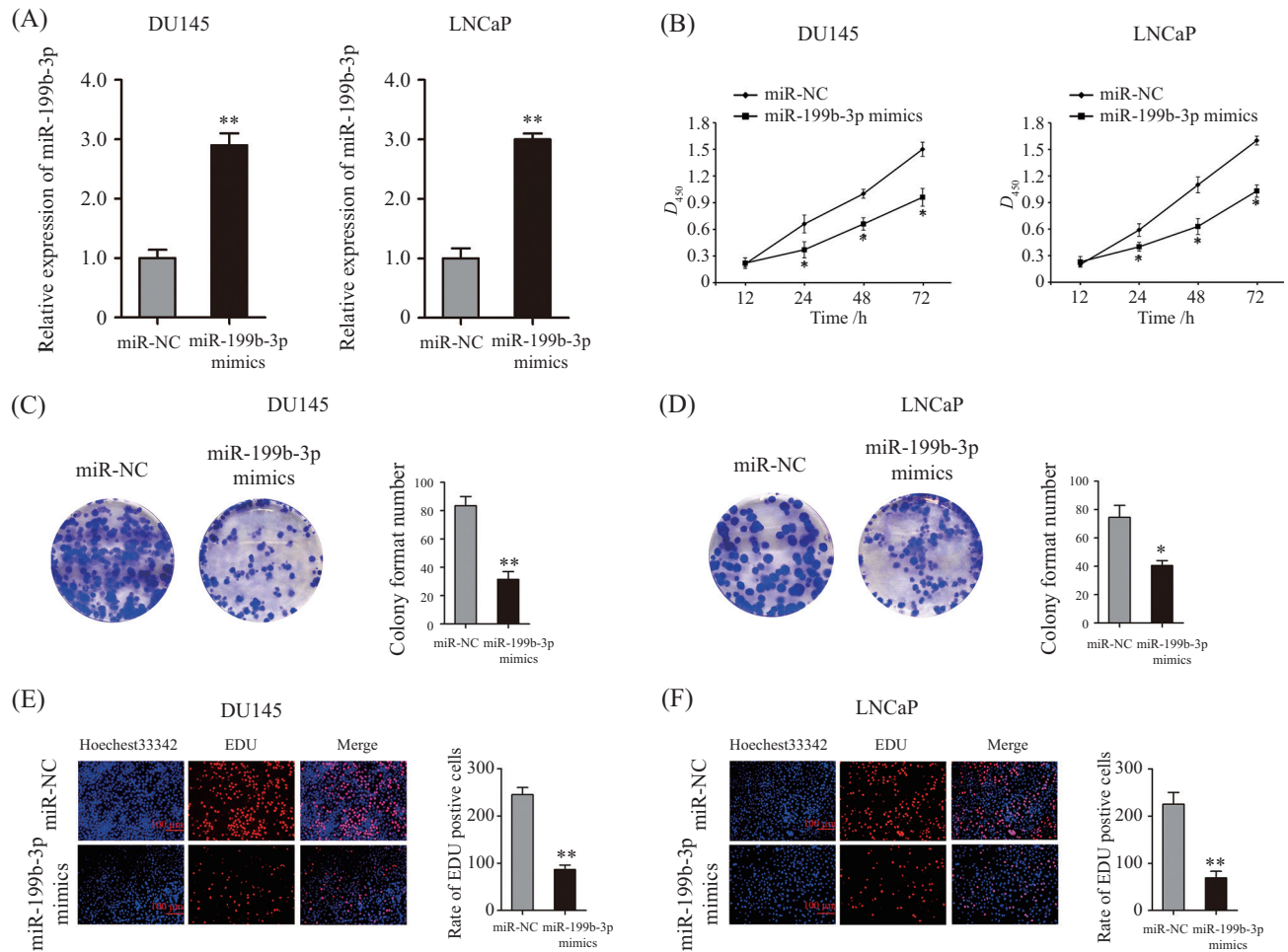
qPCR 和 Western blot 结果显示, 与 BPH 组织相比, PLC $\epsilon$  在 PCa 组织中表达上调(图 4A 和图 4B)。另外, 同样的结果也在 3 株 PCa 细胞系中得到验证(图 4C)。此外, 我们进一步分析发现, 在 PCa 组织中 miR-199b-3p 的表达与 PLC $\epsilon$  表达呈负相关(图 4D)。

### 2.5 在 PCa 细胞系中过表达 PLC $\epsilon$ 能逆转 miR-199b-3p 介导的效应

最后, 为了进一步研究 miR-199b-3p 是否通过 PLC $\epsilon$  发挥生物学作用, 我们在过表达 miR-199b-3p 的 LNCaP 和 DU145 细胞中, 使用 LV-PLC $\epsilon$  恢复 PLC $\epsilon$  的表达(图 5A)。实验结果分析显示, 上调 PLC $\epsilon$  的表达能解除 miR-199b-3p 对 PCa 细胞增殖的抑制作用(图 5B 和图 5F)。

## 3 讨论

随着人们生活方式、自然环境和社会环境的变化, 近年来 PCa 呈明显上升趋势。据统计, 我国每年



A: 通过RT-qPCR检测转染miR-199b-3p模拟物的DU145和LNCaP细胞中的miR-199b-3p表达; B: 采用CCK-8分析miR-199b-3p对PCa细胞增殖的影响; C、D: PCa细胞中miR-199b-3p表达增加后的克隆形成分析; E、F: 在miR-199b-3p表达增加后,用Edu检测PCa细胞的增殖。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ 与miR-NC组相比。NC: 阴性对照。

A: DU145 and LNCaP cells, which were transfected with miR-199b-3p mimics, were assessed for miR-199b-3p expression by RT-qPCR; B: effect of miR-199b-3p on PCa cell proliferation was analyzed using CCK-8 assays; C,D: colony formation assays in PCa cells after the increase expression of miR-199b-3p; E,F: cell proliferation was detected with Edu in PCa cells after the increase expression of miR-199b-3p.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  vs miR-NC. NC: negative control.

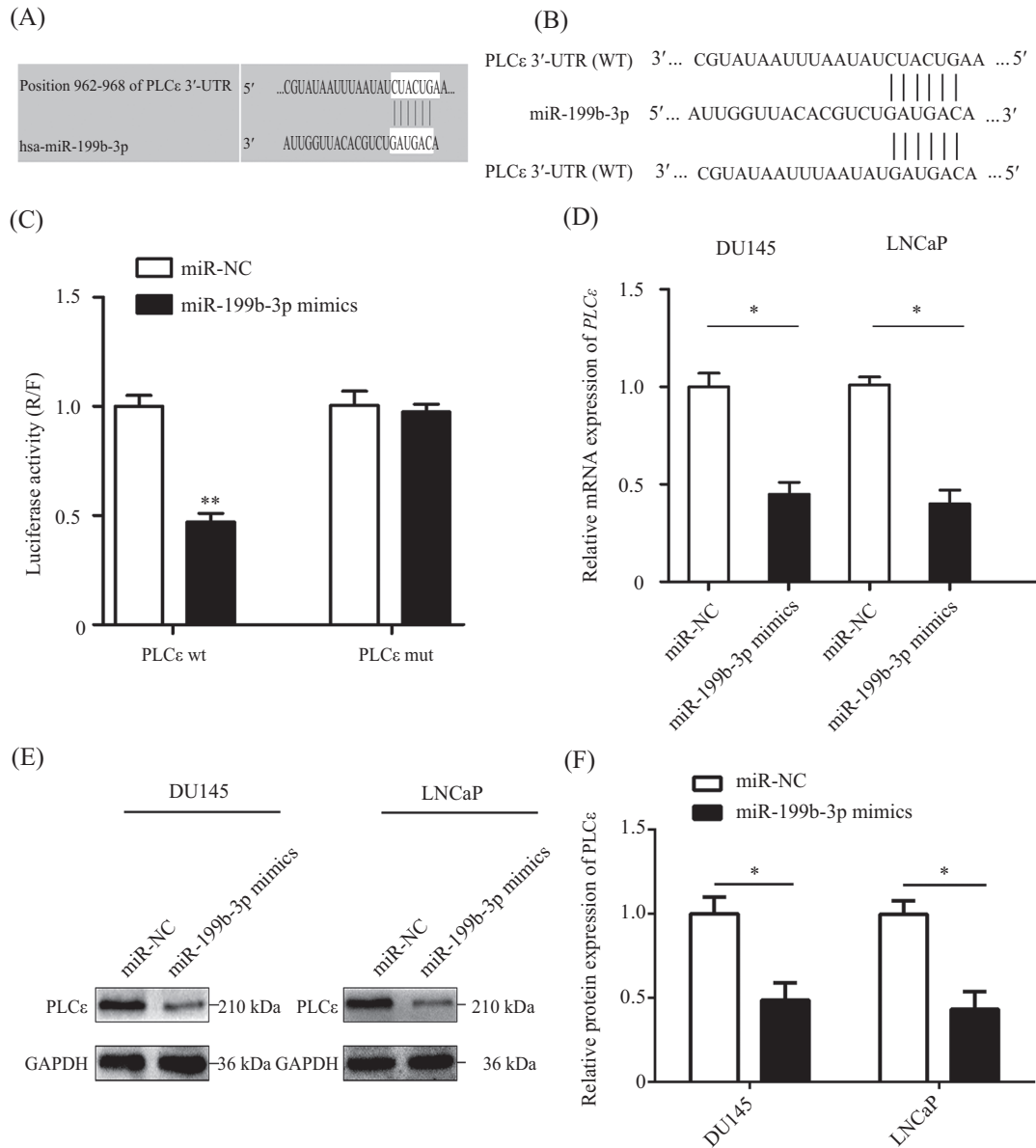
图2 miR-199b-3p表达上调可抑制PCa细胞系恶性增殖

Fig.2 Increased miR-199b-3p inhibits PCa cell lines malignant proliferation

新增PCa病例约8万例,主要集中在60岁以上的中老年人群<sup>[16-17]</sup>。由于PCa位置隐蔽,癌性部分多发生在后叶,早期不压迫尿路,不引起排尿困难。因此,在该病的早期和中期往往无症状,难以引起警惕;即使有不适,如排尿困难等,也常被误认为是老年表现或前列腺肥大,延误早期诊断和治疗<sup>[18-19]</sup>。因此,迫切需要找到PCa恶性发展的分子机制和潜在的精准治疗靶点。

已有研究表明,miRNA可以通过调控靶基因的表达参与肿瘤的恶性发展<sup>[20]</sup>。DU等<sup>[21]</sup>报道,miR-424-5p通过调控TRIM29抑制细胞增殖和侵袭。HAN等<sup>[22]</sup>报道,miR-183-5p可以抑制ITGB1的表达,

miR-183-5p/ITGB1轴是一种很有前途的宫颈癌抑癌基因。特别是具有抑癌作用的miR-199家族(miR-199a、miR-199b)在多种癌组织(例如:肝细胞癌、恶性睾丸肿瘤、结直肠癌、急性髓性白血病、成神经管细胞瘤等)中表达显著降低<sup>[23-28]</sup>。据文献报道,在前列腺癌中,miR-199a-5p/-3p的表达也明显下调<sup>[29-31]</sup>,然而作为miR-199家族的另一成员miR-199b-3p在PCa的研究中却报道甚少,特别是其在PCa中的潜在分子作用机制尚不完全清楚。显然,关于miR-199b-3p表达的调控还需要进一步的研究。为此,我们的研究发现,在PCa组织中miR-199b-3p的表达水平明显低于BPH组织。miR-199b-3p的低表达与PCa患者



A: 生物信息学网站(TargetScan)预测 $PLC\epsilon$ 的3'-UTR包含miR-199b-3p的结合位点; B: 示意图显示miR-199b-3p的假定结合位点和 $PLC\epsilon$ 相应的突变位点; C: 荧光素酶报告检测miR-199b-3p和 $PLC\epsilon$ 直接结合的效应; D-F: RT-qPCR和Western blot检测 $PLC\epsilon$ 在PCa细胞系中的mRNA及蛋白的表达。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 与miR-NC组相比。NC: 阴性对照。

A: bioinformatics websites (TargetScan) predicted that the 3'-UTR of  $PLC\epsilon$  contains the binding sites of miR-199b-3p; B: a schematic diagram of miR-199b-3p putative binding sites and the corresponding mutant sites of  $PLC\epsilon$ ; C: use luciferase activity to detect the direct effect of miR-199b-3p and  $PLC\epsilon$ ; D-F: RT-qPCR and Western blot were used to examine the expression of mRNA and protein of  $PLC\epsilon$  in PCa cells. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs miR-NC. NC: negative control.

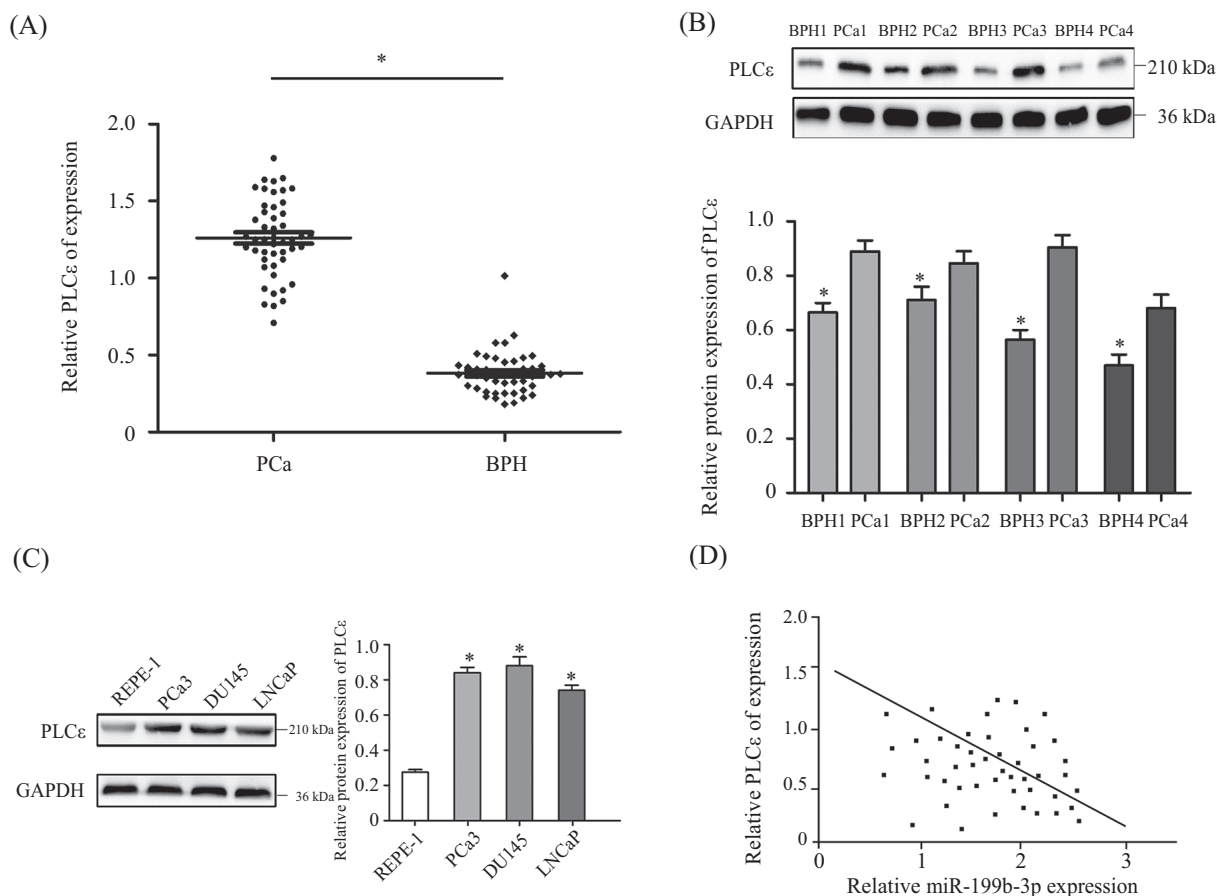
图3  $PLC\epsilon$ 是miR-199b-3p的直接靶基因

Fig.3  $PLC\epsilon$  was a direct target gene of miR-199b-3p

的组织学分期密切相关。上调miR-199b-3p可以显著抑制PCa细胞的增殖和Edu的摄取能力。因此,我们认为miR-199b-3p作为抑癌基因,在PCa中也具有潜在的抑癌作用。这些结果在某种程度上与其他类型癌症的发现相似。

众所周知,了解miRNA功能的最佳途径之一是阐明其功能靶点,这通常涉及到分析特定miRNA功

能的获得或缺失后靶蛋白的变化情况。因此,为了进一步探究miR-199b-3p在PCa中的分子作用机制,我们在PCa细胞中发现了miR-199b-3p的一个新靶点。在我们的研究中,首先利用生物信息学知识,通过在线miRNA的数据库TargetScan进行预测,结果分析显示,miR-199b-3p能与 $PLC\epsilon$ 的3'-UTR位点结合。接着通过荧光素酶报告实验来进一步验证,结果认



A: PLCε在BPH组织与PCa组织中的相对表达; B: PLCε在BPH组织和PCa组织中的蛋白表达; C: PLCε在RWPE-1和PCa细胞系中的蛋白表达; D: 在PCa组织中miR-199b-3p的表达与PLCε表达呈负相关。\* $P < 0.05$ , 与BPH/RWPE-1相比。

A: the relative expression of PLCε in BPH tissues and PCa tissues. B: the protein expression of PLCε in BPH tissues and PCa tissues. C: the protein expression of PLCε in PCa cell lines and RWPE-1. D: miR-199b-3p expression was negatively correlated with PLCε expression in PCa tissues. \* $P < 0.05$  vs BPH/RWPE-1.

图4 PLCε在BPH组织、PCa组织、PCa细胞系和RWPE-1细胞中的表达

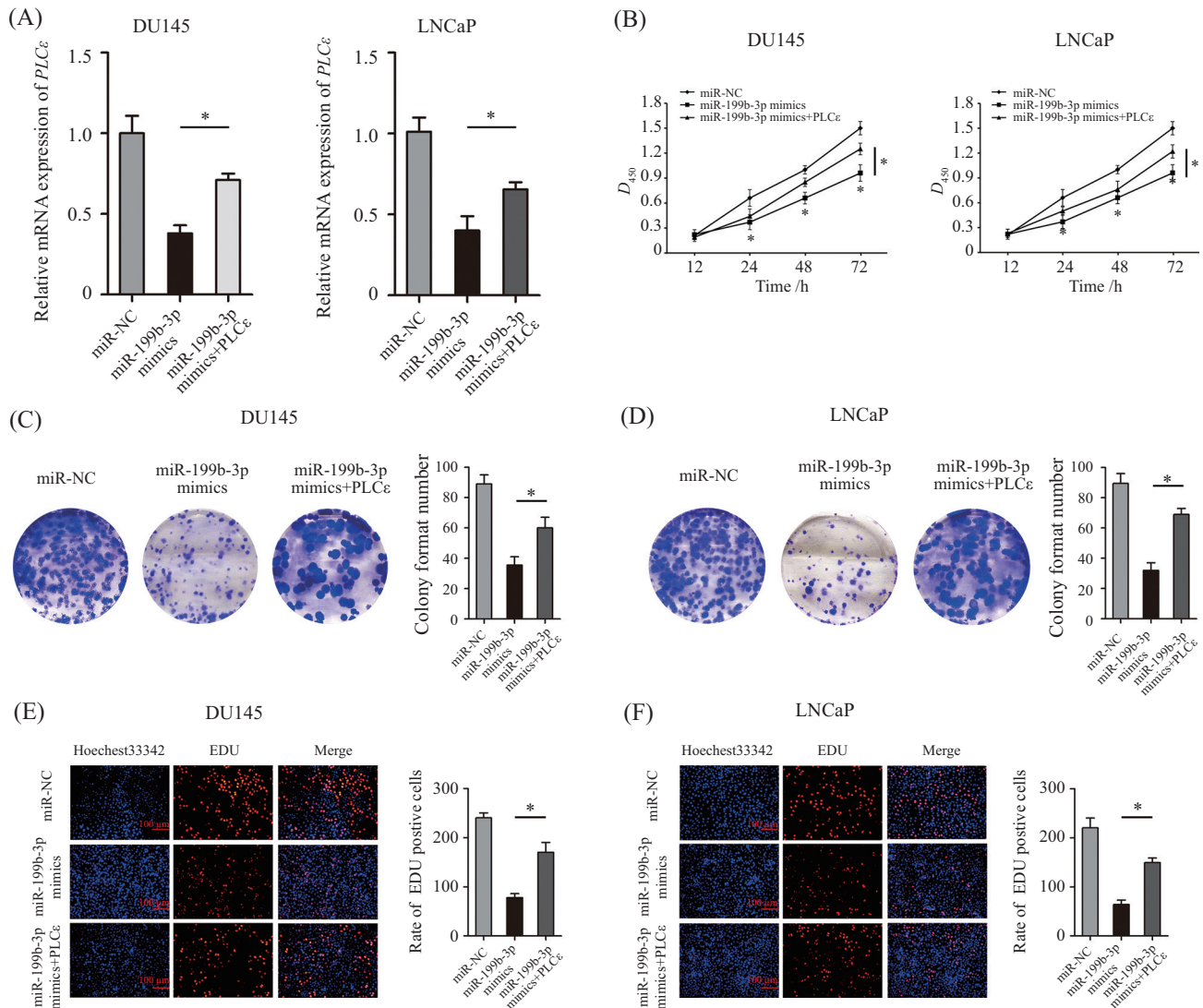
Fig.4 The expression of PLCε in BPH tissues, PCa tissues, PCa cell lines and RWPE-1 cells

为, miR-199b-3p可直接与PLCε的3'-UTR靶向结合。同时, 过表达miR-199b-3p能下调PLCε的mRNA及蛋白表达水平。重要的是, 当上调PLCε的表达后, 其能解除miR-199b-3p对PCa细胞增殖的抑制作用, 这进一步表明, 在PCa细胞中miR-199b-3p依赖于PLCε发挥其生物学功能。

PLCε是新发现的磷脂酶C的同工酶家族成员, 作为一种癌基因, 在许多肿瘤中高度表达。PLCε能调节细胞的生长、分化、凋亡和血管生成, 并与肿瘤的不良预后有关<sup>[31-32]</sup>。PLCε可以激活重要信号通路例如IP3/Ca<sup>2+</sup>、DG/PKC、ERK和MAPK, 并通过激活上游基因和改变下游基因的表达来调节细胞的生理和病理过程<sup>[33-36]</sup>。据报道, PLCε可通过STAT3/LDHA调节糖酵解途径和参与人类膀胱肿瘤的恶性发展<sup>[37]</sup>。PLCε DNA低甲基化诱导其激活并通过PI-

PLCε-NF-κB信号通路和VEGF-C/bcl-2的表达促进食管鳞状细胞癌的增殖和血管生成<sup>[38]</sup>。然而, 在PCa中miR-199b-3p和PLCε之间的作用目前尚无报道。通过上述研究, 我们首次发现, miR-199b-3p可以通过靶向结合PLCε 3'-UTR区域负性调控PLCε进而抑制PCa细胞的恶性增殖。

综上所述, 我们研究表明, miR-199b-3p可通过抑制PLCε进而抑制PCa细胞的恶性增殖, miR-199b-3p低表达与PCa的组织学分期密切相关。因此, 我们认为miR-199b-3p在非编码RNA水平上可能成为前列腺癌治疗的一个新的潜在靶点。过表达miR-199b-3p可能是治疗前列腺癌的一种新方法。总之, 本研究初步探索了miR-199b-3p和PLCε在前列腺癌中的作用, 并为前列腺癌的精确定疗提供科学的依据。



A: RT-qPCR显示在PCa细胞中 $PLC\epsilon$ 的mRNA表达; B: CCK-8实验分析上调 $PLC\epsilon$ 的表达对PCa细胞增殖的影响; C、D: 克隆形成实验分析 $PLC\epsilon$ 表达上调后对PCa细胞集落形成的影响; E、F: Edu实验检测过表达 $PLC\epsilon$ 后PCa细胞增殖情况。\* $P < 0.05$ , 与miR-199b-3p mimics组相比。NC: 阴性对照。

A: RT-qPCR showing the mRNA expression of  $PLC\epsilon$  in PCa cells; B: effect of overregulation of  $PLC\epsilon$  on PCa cell proliferation was analyzed using CCK-8 assays; C,D: colony formation assays in PCa cells after the increase expression of  $PLC\epsilon$ ; E,F: cell proliferation was detected with Edu in PCa cells after the increase expression of  $PLC\epsilon$ . \* $P < 0.05$  vs miR-199b-3p mimics. NC: negative control.

图5 在PCa细胞系中过表达 $PLC\epsilon$ 能逆转miR-199b-3p介导的效应

Fig.5 Overexpression of  $PLC\epsilon$  rescued the miR-199b-3p-mediated effects on PCa cell lines

### 参考文献 (References)

- DAVIDSON E, ARMSTRONG S A, COUSSENS L M, et al. AACR cancer progress report 2016 [J]. Clin Cancer Res 2016, 22(19 Supplement): S1-137.
- HE Z, ZHANG Y, MEHTA S K, et al. Expression profile of apoptosis related genes and radio-sensitivity of prostate cancer cells [J]. J Radiat Res, 2011, 52(6): 743-51.
- SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- WALLIS C J D, GLASER A, HU J C, et al. Survival and complications following surgery and radiation for localized prostate cancer: an international collaborative Review [J]. Eur Urol, 2018, 73(1): 11-20.
- CHEN W, ZHENG R, BAADA P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.
- BARTELD P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116 (2): 281-97.
- BARTELD P. Metazoan microRNAs [J]. Cell, 2018, 173(1): 20-51.
- LAI E C. Micro RNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation [J]. Nat Genet, 2002, 30(4): 363-4.
- DI L G, GROFALO M, CROCE C M. MicroRNAs in cancer [J]. Annu Rev Pathol Mech, 2014, 9: 287-314.
- WU H, ZHANG W, WU Z, et al. MiR-29c-3p regulates DNMT3B and LATS1 methylation to inhibit tumor progression in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 48.



- [11] SAKAGUCHI T, YOSHINO H, YONEMORI M, et al. Regulation of ITGA3 by the dual-stranded microRNA-199 family as a potential prognostic marker in bladder cancer [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(8): 1077-87.
- [12] KOSHIZUKA K, HANAZAWA T, KIKKAWA N, et al. Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(8): 1681-92.
- [13] HOU J, LIN L, ZHOU W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(2): 232-43.
- [14] LI S Q, WANG Z H, MI X G, et al. MiR-199a/b-3p suppresses migration and invasion of breast cancer cells by downregulating PAK4/MEK/ERK signaling pathway [J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(10): 768-77.
- [15] YONG Y X, YANG H, LIAN J, et al. Up-regulated microRNA-199b-3p represses the apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells in ischemic stroke through down-regulation of MAPK/ERK/EGR1 axis [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(16): 1868-81.
- [16] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29.
- [17] DU L B, LI H Z, WANG X H, et al. Analysis of cancer incidence in Zhejiang cancer registry in China during 2000 to 2009 [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(14): 5839-43.
- [18] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: globocan 2008 [J]. *In J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-917.
- [19] YUNG K W, YUNG T T, CHUNG C Y, et al. Principles of cancer staging [J]. *Asian Pac J Surg Oncol*, 2015, 1: 1-16.
- [20] SHIN V Y, CHU K M. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(30): 10432-39.
- [21] DU H, XU Q, XIAO S, et al. MicroRNA-424-5p acts as a potential biomarker and inhibits proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting TRIM29 [J]. *Life Sci*, 2019, 224: 1-11.
- [22] ZHANG W, ZHANG M, LIU L, et al. MicroRNA-183-5p inhibits aggressiveness of cervical cancer cells by targeting integrin subunit beta 1 (ITGB1) [J]. *Med Sci Monitor*, 2018, 24: 7137-45.
- [23] WANG W, ZHAO L J, TAN Y X, et al. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus associated hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18: 5442-53.
- [24] CHEUNG H H, DAVIS A J, LEE T L, et al. Methylation of an intronic region regulates miR-199a in testicular tumor malignancy [J]. *Oncogene*, 2011, 30: 3404-15.
- [25] KONG Y, BAI P S, SUN H, et al. The deoxycholic acid targets miRNA-dependent CAC1 gene expression in multidrug resistance of human colorectal cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44: 2321-32.
- [26] FAVREAU A J, CROSS E L, SATHYANARAYANA P. MiR-199b-5p directly targets PODXL and DDR1 and decreased levels of miR-199b-5p correlate with elevated expressions of PODXL and DDR1 in acute myeloid leukemia [J]. *Am J Hematol*, 2012, 87: 442-6.
- [27] GARZIA L, ANDOLFO I, CUSANELLI E, et al. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma [J]. *PLoS One*, 2009, 4: e4998.
- [28] WANG C, SONG B, SONG W, et al. Underexpressed microRNA-199b-5p targets hypoxia-inducible factor-1 alpha in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26: 1630-7.
- [29] PORKKA K P, PFEIFFER M J, WALTERING K K, et al. MicroRNA expression profiling in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 6130-5.
- [30] QU F, ZHENG J, GAN W, et al. MiR-199a-3p suppresses proliferation and invasion of prostate cancer cells by targeting Smad1 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 52465-73.
- [31] ZHONG J, HUANG R, SU Z, et al. Downregulation of miR-199a-5p promotes prostate adeno-carcinoma progression through loss of its inhibition of HIF-1 $\alpha$  [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(48): 83523-38.
- [32] DUSABAN S S, PURCELL N H, ROCKENSTEIN E, et al. Phospholipase C epsilon links G protein-coupled receptor activation to inflammatory astrocytic responses [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(9): 3609-14.
- [33] SONG C, HU C D, MASAGO M, et al. Regulation of a novel human phospholipase C, PLC $\epsilon$ , through membrane targeting by Ras [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 2752-7.
- [34] YANG Y R, FOLLO M Y, COCCO L, et al. The physiological roles of primary phospholipase C [J]. *Adv Biol Regul*, 2013, 53(3): 232-41.
- [35] LOPZE I, MAK E C, DING J, et al. A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(4): 2758-65.
- [36] LI Y, AN J, HUANG S, et al. PLCE1 suppresses p53 expression in esophageal cancer cells [J]. *Cancer Invest*, 2014, 32(6): 236-40.
- [37] CHENG H, HAO Y, GAO Y, et al. PLC $\epsilon$  promotes urinary bladder cancer cells proliferation through STAT3/LDHA pathway-mediated glycolysis [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(5): 2844-54.
- [38] CHEN Y, WANG D, PENG H, et al. Epigenetically upregulated oncoprotein PLCE1 drives esophageal carcinoma angiogenesis and proliferation via activating the PI-PLC $\epsilon$ -NF- $\kappa$ B signaling pathway and VEGF-C/Bcl-2 expression [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 1.