## miR-141-3p靶向调控KLF9对前列腺癌细胞 血管生成拟态形成的影响及其机制探究

刘彼得 王书恒 李循 靳宏勇 张小安 董强 李九智\* (新疆维吾尔自治区人民医院泌尿中心,泌尿外科研究室,乌鲁木齐 830001)

摘要 该文探讨了miR-141-3p对前列腺癌(prostate cancer, PCa)细胞血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)形成的作用及其机制。培养人正常前列腺上皮细胞(RWPE-1)和PCa细胞系(PC-3、LNCaP、DU145),采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测细胞中miR-141-3p的表达情况,Western blot检测细胞中KLF9蛋白质的表达情况,根据检测结果及该研究的目的,选择LNCaP和DU145细胞 系进行后续实验。将两种细胞均分为miR-141-3p抑制组、miR-141-3p对照组、KLF9过表达组和 KLF9对照组,采用miR-141-3p抑制剂下调PCa细胞miR-141-3p的表达,或采用过表达质粒上调PCa 细胞KLF9的表达后,通过三维培养实验、CCK-8实验、划痕实验、Transwell实验检测细胞的VM 形成、增殖、迁移及侵袭能力;通过Western blot检测干细胞标志蛋白的表达情况,平板克隆形成 实验检测细胞克隆形成能力,流式细胞术检测CD133<sup>+</sup>细胞比例,以评估PCa细胞的干细胞特性。双 荧光素酶报告实验和功能回复实验验证miR-141-3p和KLF9的靶向关系。结果显示,下调miR-141-3p或上调KLF9的表达均能显著抑制PCa细胞的VM形成及干细胞特性,并能显著抑制PCa细胞的增 殖、迁移、侵袭;miR-141-3p能够通过靶向抑制KLF9的表达,从而促进PCa细胞的VM形成及增强 干细胞特性。该研究得出,miR-141-3p通过靶向调控KLF9调节PCa细胞的VM形成,该调节作用可 能是通过调控PCa细胞的千细胞特性实现的。

关键词 miR-141-3p; KLF9; 前列腺癌; 血管生成拟态; 肿瘤干细胞

## The Effect and Mechanism of miR-141-3p on Vasculogenic Mimicry in Human Prostate Cancer Cells by Targeted Regulating the KLF9 Expression

LIU Bide, WANG Shuheng, LI Xun, JIN Hongyong, ZHANG Xiao'an, DONG Qiang, LI Jiuzhi\* (Laboratory of Urology, Department of Urology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

**Abstract** This study aimed to investigate the role of miR-141-3p in the VM (vasculogenic mimicry) of PCa (prostate cancer) cells and its mechanism. Normal human gastric epithelial cell lines (RWPE-1) and human PCa cell lines (PC-3, LNCaP and DU145) were cultured. The expression of miR-141-3p was detected using RTqPCR. Western blot was used to detect the protein expression of KLF9. According to the expression difference of miR-141-3p and KLF9 in different PCa cell lines, as well as the purpose of the study, LNCaP and DU145 cell lines were selected for subsequent experiments. LNCaP and DU145 cells were divided into miR-141-3p control group,

收稿日期: 2024-09-29 接受日期: 2024-12-28

新疆维吾尔自治区科学技术厅自治区自然科学基金(批准号: 2020D01C121)和新疆维吾尔自治区人民医院院内科研项目(批准号: 20190110、20200309、20210105)资助的课题

<sup>\*</sup>通信作者。Tel: 13999278509, E-mail: xjlijiuzhi@163.com

Received: September 29, 2024 Accepted: December 28, 2024

This work was supported by the Xinjiang Uygur Autonomous Region Natural Science Foundation (Grant No.2020D01C121), and the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region Natural Science Foundation (Grant No.20190110, 20200309, 20210105)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-13999278509, E-mail: xjlijiuzhi@163.com

miR-141-3p inhibitor group, KLF9 overexpression group and KLF9 control group, respectively. miR-141-3p inhibitor was used to downregulate the expression of miR-141-3p, and KLF9 overexpression plasmid was used to upregulate the expression of KLF9. Vasculogenic mimicry was detected by Three-Dimensional culture. Cell proliferation activity was detected by CCK-8 assay. Wound-healing assay and Transwell assay were used to detect cell migration and invasion abilities. To evaluate the stemness of PCa cells, Western blot was conducted to detect the expression of stem cell markers, colony formation assay was used to evaluate cell colony formation ability, and flow cytometry was used to detect the proportion of CD133<sup>+</sup> cells. Next, dual luciferase reporting assay and recue assay verified

was used to detect the proportion of CD133<sup>+</sup> cells. Next, dual luciferase reporting assay and recue assay verified the targeting relationship between miR-141-3p and *KLF9*. The results showed that down-regulation of miR-141-3p or up-regulation of KLF9 could significantly inhibit the VM formation and stemness of PCa cells, and inhibit the proliferation, migration and invasion ability of PCa cells remarkably. The ability of miR-141-3p on promoting VM formation and stemness of PCa cells was achieved through targeting inhibit KLF9 expression. In conclusion, miR-141-3p regulates the VM formation ability of PCa cells by target regulating KLF9, which may be achieved by regulating the stemness of PCa cells.

Keywords miR-141-3p; *KLF9*; prostate cancer; vasculogenic mimicry; cancer stem cell

我国前列腺癌(prostate cancer, PCa)的发病率呈 上升态势,且具有确诊晚、恶性程度高的特点,故 其年龄标化5年生存率明显低于欧美大多数国家<sup>[1]</sup>。 对于晚期或转移性前列腺癌,内分泌治疗为标准治 疗方案,但绝大多数PCa在接受内分泌治疗后会进 展为预后不良的去势抵抗性PCa(castration resistant prostate cancer, CRPC), 目前尚无药物能彻底抑制 PCa的进展。血管作为维持肿瘤生长必需的营养通 道,在肿瘤的发生及进展中起重要作用,但临床研 究发现抗血管生成的靶向药物并未使PCa患者获益, 肿瘤微环境缺氧及血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)的激活可能为其原因<sup>[2-4]</sup>。VM是由肿瘤细 胞围成的具有内皮性血管功能的管状结构,能够促 进肿瘤的生长及进展,已有研究表明VM与前列腺癌 的恶性程度及不良预后相关,我们的前期研究也证 实VM与前列腺癌的恶性程度、侵袭及转移呈正相 关[5-7]。因此,进一步研究PCa中VM的形成机制,对 探寻新的治疗靶点具有重要意义。

微小RNA(microRNAs, miRNAs)是一种短链非 编码RNA,已有综述表明miRNAs能够调控PCa的 进展及耐药<sup>[8]</sup>。作为miRNA-200家族的重要一员, miR-141在多种癌症中发挥调控作用,关于PCa方面 的研究显示miR-141在PCa组织及细胞系中高表达, 并参与调控PCa的进展、转移及放疗抵抗<sup>[9-11]</sup>。近年 的研究表明miR-141在不同肿瘤中对内皮细胞血管 的形成起不同作用,如抑制结肠癌的血管形成,促进 小细胞肺癌的血管形成;而在VM方面有研究发现 miR-141能够抑制胶质瘤VM的形成<sup>[12-14]</sup>。我们的 前期研究证实miR-141-3p能够促进PCa细胞的增殖、 侵袭,但尚无研究分析其对PCa细胞VM形成的调控 作用及机制<sup>[9,15]</sup>。VM的形成与肿瘤细胞向间皮特性 细胞的转化密切相关,Krüppel样因子9(Krüppel like factor 9, KLF9)为一种分化相关转录因子,有研究显 示其参与神经母细胞瘤细胞、脂肪细胞、牙源性干 细胞的分化,我们前期的研究证实*KLF9*为miR-141-3p调控PCa细胞增殖、侵袭能力的下游靶基因,但 KLF9对血管生成拟态的调控作用尚不清楚<sup>[15-18]</sup>。因 此,本研究在细胞水平探究了miR-141-3p对PCa细胞 VM形成的影响,并进一步分析了miR-141-3p是否能 通过靶向调控KLF9进而调控VM的形成,旨在发现 治疗PCa的新靶点。

### 1 材料和方法

## 1.1 材料

1.1.1 细胞 人前列腺正常上皮细胞株 RWPE-1和 PCa细胞系PC-3、LNCaP、DU145由新疆维吾尔自治 区人民医院保存。使用含10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和100 mg/mL链霉素的 DMEM培养基培养细 胞,培养环境: 37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱。

 1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM培养基(货号为 11965092)、胎牛血清(货号为A5669701)购自美 国Gibco公司;反转录试剂盒(货号为RR047A)购 自日本TaKaRa公司;荧光定量PCR试剂盒(货号 为QR0100)购自瑞士Roche公司;PCR引物由上海 生工生物工程有限公司合成; RIPA裂解液(货号为 P0013B)、BCA试剂盒(货号为P0012S)、CCK-8试剂 盒(货号为C0037)、ECL化学发光液(货号为P0018S) 购自上海碧云天生物技术有限公司; miR-141-3p inhibitor、miR-141-3p mimic及阴性对照(inhibitor-NC、miR-NC)、KLF9过表达慢病毒载体、si-KLF9 及阴性对照(Vector、si-NC),以及KLF9野生型和突 变型的荧光素酶报告基因质粒载体均由苏州吉玛 生物科技有限公司合成; 双荧光素酶活性检测试剂 盒(货号为E1910)购自美国Promega公司; TRIzol试 剂(货号为15596026CN)、Lipofectamine<sup>™</sup> 2000转染 试剂盒(货号为11668019)购自美国Invitrogen公司; Matrigel基质胶(货号为354234)、Transwell小室(货 号为3414)购自美国Corning公司; 兔抗人KLF9抗体 (货号为ab313447)、小鼠抗人DAPDH抗体(货号为 ab8245)、兔抗人VE-cadherin抗体(货号为ab313632)、 兔抗人CD133抗体(货号为ab278053)均购自Abcam 英国公司; 兔抗人 Nanog(货号为14295-1-AP)、兔抗 人Sox2(货号为11064-1-AP)、小鼠抗人Oct4(货号为 60242-1-Ig)均购自美国Proteintech公司; 辣根酶标记 山羊抗兔IgG(货号为ZB-2301)和山羊抗小鼠IgG(货 号为ZB-5305)购自北京中杉金桥生物技术有限公 司。

### 1.2 方法

 1.2.1 细胞分组及转染 将PCa细胞分为miR-141-3p抑制组(miR-141-3p-in组)、miR-141-3p对照组 (NC组)、KLF9过表达组(KLF9-oe组)、KLF9对照 组(Vector组)。取对数期生长的细胞,以每孔0.8×10<sup>6</sup> 个细胞铺于6孔板,待细胞密度达到70%时,使用 Lipofectamine<sup>™</sup> 2000转染试剂盒对细胞进行转染, miR-141-3p-in组转染miR-141-3p-inhibitor、NC组转 染阴性对照物、KLF9-oe组转染KLF9过表达质粒、 Vector组转染空白质粒。转染48 h后,收集细胞,RTqPCR检测各组细胞miR-141-3p和*KLF9*的mRNA表 达。

1.2.2 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测 收集各 组细胞, TRIzol法提取细胞总RNA, 将RNA逆转录为 cDNA,参照荧光定量PCR试剂盒说明书进行扩增检 测miR-141-3p及多个因子mRNA的表达, miR-141-3p 以U6为内参, mRNA以GAPDH为内参, 采用2-44Ct法 计算各基因mRNA的相对表达量。引物序列见表1。 1.2.3 Western blot实验 收集各组细胞,使用RIPA裂 解液提取细胞蛋白质, BCA法定量蛋白质浓度, 10% SDS/PAGE凝胶电泳分离后转膜, 5%脱脂奶 粉室温下封闭1h,再与一抗「稀释比例为KLF9(1:2000)、 VE-cadhehin(1:1 000), CD133(1:1 000), Nanog(1:1 000), Sox2(1:1 000), Oct4(1:5 000), DAPDH(1:5 000)] 4 °C摇床孵育过夜, 洗膜后二抗 (抗体稀释比例为1:10 000)室温摇床孵育1h, ECL显 色,用化学发光凝胶成像系统成像。GAPDH蛋白作 为内参,以蛋白质条带灰度值代表目的蛋白质的相 对表达量。

1.2.4 三维培养(Three-Dimensional culture)实验 预先解冻Matrigel基质胶,将预冷的无血清培养基与 Matrigel基质胶1:1混合,向96孔板中加入500 μL混合液, 37 °C凝固2 h。取对数期生长的细胞,以1×10<sup>7</sup>个/mL 浓度,向每孔加入细胞悬液100 μL,继续在37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱培中养24 h,显微镜下观察管状结 构排列情况和完整程度。取上、中、下、左、右 等5个视野进行拍照并记数管状结构的数量,取平 均值。

1.2.5 细胞增殖CCK-8实验 取对数期生长的细

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
Gene	Forward sequence $(5' \rightarrow 3')$	Reverse sequence $(5' \rightarrow 3')$
miR-141-3p	TCC CAC CCA GTG CGA TTT GTC	GTT GCT GGG AGG CTA AGA TGA G
VE-cadherin	TTG GAA CCA GAT GCA CAT TGA T	TCT TGC GAC TCA CGC TTG AC
CD133	AGT CGG AAA CTG GCA GAT AGC	GGT AGT GTT GTA CTG GGC CAA T
Nanog	TTT GTG GGC CTG AAG AAA ACT	AGG GCT GTC CTG AAT AAG CAG
Sox2	GCC GAG TGG AAA CTT TTG TCG	GGC AGC GTG TAC TTA TCC TTC T
Oct4	CTG GGT TGA TCC TCG GAC CT	CCA TCG GAG TTG CTC TCC A
<i>U6</i>	CTC GCT TCG GCA GCA GCA CAT ATA	AAA TAT GGA ACG CTT CAC GA
GAPDH	TCA ACC CTA CAA GTC CAG CT	TCC AGT CAC CAA GTA GCG ATC T

表1 RT-qPCR引物序列

胞,以每孔1×10<sup>4</sup>个细胞铺于96孔板,置于37°C培 养箱中培养12、24、48、72、96 h后,向每孔加入 10 μL的CCK-8试剂,37°C孵育1 h后使用酶标仪测 定波长为450 nm处的吸光度(D)值。

1.2.6 细胞划痕实验 取对数生长期的细胞,以每 孔1×10<sup>5</sup>个细胞铺于6孔板,在37°C、5% CO<sub>2</sub>恒温培 养箱中培养12~24 h,待细胞生长汇合至80%左右时, 用10μL枪头均匀在孔中央划痕,PBS浸洗2次后进 行拍照,加入无血清培养基,同前培养方法继续培养 24 h,再次对相同位置进行拍照。测量划痕之间的 距离,并进行对比分析。

1.2.7 Transwell实验 取对数生长期的细胞,以每 孔1×10<sup>5</sup>个细胞接种于Transwell小室上层(细胞悬液 200 μL),向下室加入600 μL含有5%血清的培养基。 培养24 h后,弃去上室和下室的多余培养液,室温 下,4%多聚甲醛固定细胞15 min,0.5%结晶紫染色 20 min,PBS清洗小室3次。显微镜下随机选取5个 视野观察细胞并拍照,计数侵袭的细胞数,取平均 值。

1.2.8 平板克隆形成实验 取对数生长期的细胞, 制备成单细胞悬液,按照500个细胞/孔的浓度接种 1 mL细胞悬液至24孔板中,轻晃培养皿使细胞分散 均匀。培养箱中常规培养2~3周,其间适时更换新鲜 培养液,PBS液小心浸洗2次,空气干燥。室温下使 用甲醇固定细胞15 min,弃甲醇后空气干燥。室温 下使用结晶紫染液染色10 min,流水缓慢洗去染液, 空气干燥。显微镜下观察,取10个随机视野,计数直 径>50 μm的细胞克隆数,取平均值。

1.2.9 流式细胞术 取对数生长期的细胞,4°C以 800 r/min离心5 min,留取细胞沉淀,再用 PBS清洗 细胞,再次4°C以800 r/min离心5 min后收集细胞沉 淀,加入CD133抗体,总体积100 μL(抗体稀释比例为 1:500)。轻柔混匀后4°C冰箱中放置30 min,采用流 式细胞仪检测CD133<sup>+</sup>细胞比例。

1.2.10 双荧光素酶报告实验 通过TargetScan预 测发现,miR-141-3p和*KLF9*的3'-UTR有连续的结合 位点。采用荧光素酶报告基因实验验证miR-141-3p与*KLF9*的靶向关系。构建*KLF9*的野生型(KLF9-WT)和突变型(KLF9-MUT)荧光素酶报告基因质粒, 将PCa细胞株分为A、B、C、D、E、F、G、H组: A组先后转染KLF9-WT、mimic-NC,B组先后转染 KLF9-WT、miR-141-3p-mimic,C组先后转染KLF9-WT、inhibitor-NC,D组先后转染KLF9-WT、miR-141-3p-inhibitor,E组先后转染KLF9-MUT、miR-141-3p-mimic, NC,F组先后转染KLF9-MUT、miR-141-3p-mimic,G组先后转染KLF9-MUT、inhibitor-NC,H组先后转染KLF9-MUT、inhibitor-NC,H组先后转 染KLF9-MUT、miR-141-3p-inhibitor。转染48 h后 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶 的活性。萤火虫荧光素酶活性值与海肾荧光素酶活 性值的比值为校正后的荧光素酶活性。

1.2.11 统计学分析 采用SPSS 22.0软件和Graph-Pad Prism 8.0软件进行数据分析及制图。采用K-S 正态检验法检测数据是否服从正态分布,本实验所 有实验数据均符合正态分布,故数据用x±s表示。两 组比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组间两两比较采用LSD-t检验。以P<0.05为 差异有统计学意义,所有实验均重复3次。

## 2 结果

## 2.1 miR-141-3p在PCa细胞系中高表达, KLF9在 PCa细胞系中低表达

使用 RT-qPCR检测 miR-141-3p在前列腺正常 上皮细胞系 (RWPE-1)及 PCa细胞系 (PC-3、LNCaP、 DU145)中的表达情况,使用 Western blot检测 KLF9 的表达情况,结果发现,与 RWPE-1细胞相较,miR-141-3p在PCa细胞中显著高表达,在DU145细胞中相 对表达量最高,在LNCaP细胞中相对表达量最低(图 1A);而KLF9蛋白质在PCa细胞中的表达水平显著低 于 RWPE-1细胞(图1B)。故选择雄激素不敏感且相 对高表达miR-141-3p的 DU145细胞系和雄激素敏感 且相对低表达miR-141-3p的 LNCaP细胞系进行后续 实验。

## 2.2 下调miR-141-3p或上调KLF9均抑制PCa细 胞VM的形成

三维培养法检测显示,与NC组相比,miR-141-3p-in组管腔结构数量明显减少(P<0.05);与 Vector组相比,KLF9-oe组管腔结构数量明显减少 (P<0.05);详见图2A。进一步通过RT-qPCR和Western blot检测了VM标志基因VE-cadherin的表达,结 果显示与NC组相比,miR-141-3p-in组VE-cadherin 表达显著下调(P<0.05),与Vector组相比,KLF9-oe 组VE-cadherin表达显著下调(P<0.05);详见图3A~ 图3D。



A: RT-qPCR检测miR-141-3p在前列腺正常上皮细胞系及PCa细胞系中的表达情况。B: Western blot检测KLF9在前列腺正常上皮细胞系及PCa细胞系中的表达情况。\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, 与RWPE-1组比较。

A: the expression of miR-141-3p in normal prostate epithelial cell line and prostate cancer cell lines was detected using RT-qPCR. B: the expression of KLF9 in normal prostate epithelial cell line and prostate cancer cell lines was detected using Western blot. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with RWPE-1 group.

## 图1 miR-141-3p在PCa细胞系中高表达, KLF9在PCa细胞系中低表达 Fig.1 miR-141-3p expression was upregulated in prostate cancer cell lines, and KLF9 expression was downregulated in prostate cancer cell lines

## 2.3 下调miR-141-3p或上调KLF9均抑制PCa细 胞增殖、迁移和侵袭

采用CCK-8实验检测细胞增殖能力,结果表明, 在培养细胞48、72、96 h时,与NC组相比,miR-141-3p-in组细胞增殖能力显著降低(P<0.05),与Vector组 相比,KLF9-oe组细胞增殖能力显著降低(P<0.05), 详见图2B。通过划痕实验检测细胞迁移能力,结果 见图2C:与NC组相比,miR-141-3p-in组细胞迁移能 力显著降低(P<0.05);与Vector组相比,KLF9-oe组 细胞迁移能力显著降低(P<0.05)。采用Transwell实 验评估细胞侵袭能力,结果见图2D:与NC组相比, miR-141-3p-in组细胞侵袭能力显著降低(P<0.05); 与Vector组相比,KLF9-oe组细胞侵袭能力显著降低(P<0.05);

# 2.4 下调miR-141-3p或上调KLF9均抑制PCa干 细胞特性

VM的形成涉及肿瘤细胞可塑性及模拟内皮细胞的过程,这与肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)特性密切相关。为分析miR-141-3p和KLF9对PCa细胞VM的调控作用是否与CSCs特性相关,首先检测了miR-141-3p和KLF9对CSCs标志因子表达的影响,结果见图3A~图3D:与NC组相比,miR-141-3p-in组干细胞标志因子(CD133、Nanog、Sox2、Oct4)的表达显著下调(P<0.05);与Vector组相比,KLF9-oe组干细胞标志因子的表达显著下调(P<0.05)。接着通过平板克隆形成实验评估细胞克隆形成能力,结果见

图 3E所示,与NC组相比,miR-141-3p-in组形成克隆 数量显著减少(P<0.05);与Vector组相比,KLF9-oe组 形成克隆数量显著减少(P<0.05)。再通过流式细胞 术检测CD133<sup>+</sup>细胞比例,结果见图3F:与NC组相比, miR-141-3p-in组阳性细胞比例明显下降(P<0.05); 与Vector组相比,KLF9-oe组阳性细胞比例明显下降 (P<0.05)。最后,通过流式细胞术分选出的CD133<sup>+</sup> 细胞和CD133<sup>-</sup>细胞,分别检测其miR-141-3p和KLF9 的表达,结果见图3G和图3H:CD133<sup>+</sup>细胞miR-141-3p的表达水平明显高于CD133<sup>-</sup>细胞(P<0.05), CD133<sup>+</sup>细胞KLF9的表达水平显著低于CD133<sup>-</sup>细胞 (P<0.05)。

## 2.5 miR-141-3p通过靶向抑制 KLF9调控 PCa细 胞VM及干细胞特性

通过 Starbase在线数据库预测提示miR-141-3p与 KLF9存在靶向结合位点,miR-141-3p与 KLF9 3'-UTR的结合位点见图 4A。双荧光素酶报告基 因检测结果(图 4A)显示:与mimic-NC组相比,转染 miR-141-3p-mimic,可显著降低含 KLF9-WT质粒 细胞的相对荧光素酶活性(P<0.05);与inhibitor-NC 组相比,转染miR-141-3p-inhibitor,可显著提升含 KLF9-WT质粒细胞的相对荧光素酶活性(P<0.05), 而对含 KLF9-MUT质粒的细胞的相对荧光素酶活性 无显著影响(P>0.05)。

为进一步验证miR-141-3p靶向抑制KLF9的表达对PCa细胞VM形成的影响,功能回复实验结果



A: 三维培养实验检测细胞VM形成能力。B: CCK-8实验检测细胞增殖能力。C: 划痕实验检测细胞迁移能力。D: Transwell实验检测细胞侵袭能力。\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, 与NC组比较; \*P<0.05, \*\*\*P<0.001, 与Vector组比较。

A: VM formation was detected by Three-Dimensional culture. B: cell viability was detected using CCK-8 assay. C: cell migration ability was detected using wound-healing assay. D: cell invasiveness was detected by Transwell assay. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with NC group. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 compared with Vector group.

## 图2 下调miR-141-3p或上调KLF9均抑制PCa细胞VM形成、增殖、迁移、侵袭 Fig.2 Downregulation of miR-141-3p or upregulation of KLF9 inhibited the VM formation, proliferation, migration and invasion of PCa cells

(图4F)显示:在KLF9表达水平不变的前提下,转染miR-141-3p-inhibitor可显著抑制PCa细胞VM的形成(P<0.05),但下调KLF9表达后,再转染miR-141-3p-inhibitor不会影响PCa细胞VM的形成能力(P>0.05)。通过CCK-8实验、划痕实验及侵袭实验(图4B、图4D、图4G)进一步证实:在KLF9表达水平不变的前提下,转染miR-141-3p-inhibitor可显著抑制PCa细胞的增殖、迁移及侵袭(P<0.05),但下调KLF9表达后,再转染miR-141-3p-inhibitor不会影响PCa细胞的上述功能(P>0.05)。

为探究miR-141-3p/KLF9通路对VM形成的影响是否与CSCs相关,功能回复实验结果(图4C、图4E、图4H和图4I)显示:在KLF9表达不变的前提下,

转染miR-141-3p-inhibitor可显著抑制PCa细胞CSCs标志因子的表达及克隆形成,并显著下调CD133<sup>+</sup>细胞比例(P<0.05),但下调KLF9表达后,再转染miR-141-3p-inhibitor不会影响PCa细胞CSCs标志因子的表达、克隆形成能力及CD133<sup>+</sup>细胞比例(P>0.05)。

## 3 讨论

PCa进展的机制涉及两大方面,一方面涉及雄激素受体机制,已得到深入探究,但尚无法从该途径抑制前列腺癌的进展;另一方面涉及CSCs及肿瘤微环境等,已成为近年来的研究热点<sup>[19-20]</sup>。研究表明肿瘤微环境与PCa的治疗耐受及进展密切相关,因此针对肿瘤微环境的研究可能是改善进展性PCa治



A、C: RT-qPCR检测VM及CSCs标志因子在PCa细胞中的表达情况。B、D: Western blot检测VM及CSCs标志因子在PCa细胞中的表达情况。E: 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力。F: 流式细胞术检测CD133<sup>+</sup>细胞比例。G: RT-qPCR检测miR-141-3p在CD133<sup>-</sup>和CD133<sup>+</sup>细胞中的表达。H: Western blot检测KLF9在CD133<sup>-</sup>和CD133<sup>+</sup>细胞中的表达。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01, 与NC组比较; \*P<0.05, \*\*P<0.01, ##P<0.001, 与Vector组比较; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01, 5Vector组比较; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01, \*\*

A,C: the expression of VM and CSCs markers in PCa cells were detected by RT-qPCR. B,D: the expression of VM and CSCs markers in PCa cells were detected by Western blot. E: the ability of cell clonogenesis was detected using colony formation assay. F: the proportion of CD133<sup>+</sup> cells was detected by flow cytometry. G: the expression of miR-141-3p in CD133<sup>-</sup> and CD133<sup>+</sup> PCa cells was detected using RT-qPCR. H: the expression of KLF9 in CD133<sup>-</sup> and CD133<sup>+</sup> PCa cells was detected using Western blot. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with NC group. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with Vector group; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with CD133<sup>-</sup> group.

#### 图3 下调miR-141-3p或上调KLF9均抑制PCa干细胞特性

#### Fig.3 Downregulation of miR-141-3p or upregulation of KLF9 inhibited stemness of PCa cells



A:miR-141-3p与*KLF9*结合位点预测及双荧光素酶报告基因检测实验验证二者靶向关系(标红碱基为miR-141-3p与*KLF9*基因的结合部位,标绿碱基为将*KLF9*基因上与miR-141-3p结合部位突变后的碱基)。B:划痕实验检测细胞迁移能力。C:RT-qPCR检测CSCs标志因子在PCa细胞中的表达情况。D:CCK-8实验检测细胞增殖能力。E:Western blot检测CSCs标志因子在PCa细胞中的表达情况。F:三维培养实验检测细胞VM形成能力。G:Transwell实验检测细胞侵袭能力。H:平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力。I:流式细胞术检测CD133\*细胞比例。\**P*<0.05,\*\**P*<0.01, 与si-Ctl+NC组比较;<sup>###</sup>P<0.001, 与mimic-NC组比较;<sup>&&&</sup>P<0.001, 与inhibitor-NC组比较。

A: prediction of binding sites of miR-141-3p and *KLF9*, and verification the targeting relationship by dual luciferase reporter gene assay (the red bases are the binding sites of miR-141-3p and *KLF9*. The bases highlighted in green are those mutated at the miR-141-3p binding site with *KLF9*. B: cell migration ability was detected using wound-healing assay. C: the expression of CSCs markers in PCa cells was detected by RT-qPCR. D: cell viability was detected using CCK-8 assay. E: the expression of CSCs markers in PCa cells was detected by Western blot. F: VM formation was detected by Three-Dimensional culture. G: cell invasiveness was detected by Transwell assay. H: the ability of cell clonogenesis was detected using colony formation assay. I: the proportion of CD133<sup>+</sup> cells was detected by flow cytometry. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.001 compared with si-Ctl+NC group; \*\*\*P<0.001 compared with inhibitor-NC group.

图4 miR-141-3p通过靶向抑制KLF9调控PCa细胞VM及干细胞特性

Fig.4 miR-141-3p regulated VM and stem cell properties of PCa cells through targeted inhibition of KLF9

疗现状的关键<sup>[21]</sup>。在肿瘤快速生长或接受抗肿瘤治 疗时,肿瘤细胞呈现缺氧微环境,内皮细胞血管无法 及时生成,肿瘤细胞在此状态下形成VM结构并与内 皮细胞血管连通进行自救,故VM是肿瘤微环境的重 要调节因素<sup>[2-4]</sup>。VM的临床意义已在多种肿瘤中得 到证实,并有研究在PCa细胞实验水平证实一些有 机化合物(如白藜芦醇、表没食子儿茶素没食子酸酯、 山奈酚及菊花素)能够抑制VM的形成<sup>[5-7,22-25]</sup>。以上 研究结果提示,VM在PCa治疗方面具有良好的研究 价值,然而VM在PCa进展中的确切作用和潜在的分 子机制仍未被充分阐明。本研究探讨了miR-141-3p 对PCa细胞VM形成的调控作用,并证实miR-141-3p 通过靶向抑制KLF9表达来调节PCa细胞VM形成、 增殖、迁移和侵袭。

近年的研究发现miRNA在VM形成过程中发 挥重要作用,如EB病毒编码的miR-BART1-5p能够 促进鼻咽癌VM的形成,miR-7-5p通过靶向下调VEcadherin和Notch4,抑制肝癌VM的形成,miR-374b-5p/MMP14通路抑制胶质瘤VM形成,miR-204/DVL3 通路通过抑制胰腺癌细胞的干细胞特性从而抑制 VM形成,miRNA-34a/AXL信号通路通过调控EMT 抑制乳腺癌VM的形成<sup>[26-30]</sup>。我们的研究结果表明 miR-141-3p在PCa细胞中高表达,并能够增强PCa细 胞的增殖、侵袭能力,这与我们的前期研究结果一 致;重要的是,我们首次证实miR-141-3p能促进PCa 细胞VM标志因子(VE-cadherin)的表达及VM的形 成<sup>[9,15]</sup>。因此,我们推测miR-141-3p可能是通过促进 VM形成来增强PCa细胞增殖和侵袭能力的。

为探寻miR-141-3p的下游分子通路,我们通过 Starbase数据库预测发现,*KLF9*与miR-141-3p存在 结合位点。KLF9是KLF家族成员之一,具有肿瘤抑 制作用<sup>[31]</sup>。已有研究报道KLF9在PCa细胞系低表 达,并能够抑制PCa细胞的增殖,我们的前期研究已 证实miR-141-3p能够靶向抑制KLF9的蛋白表达,然 而尚无研究分析miR-141-3p/KLF9通路对PCa细胞 VM形成的调控作用<sup>[32]</sup>。本研究结果证实,miR-141-3p能通过靶向抑制KLF9从而促进PCa细胞的VM形 成。

VM的形成涉及肿瘤细胞可塑性及模拟内皮 细胞的过程,与CSCs特性密切相关<sup>[5]</sup>。为分析miR-141-3p/KLF9信号通路调控VM的机制是否涉及 CSCs,我们通过检测干细胞标志因子的表达、克隆 形成能力以及CD133<sup>+</sup>细胞(可视为PCa干细胞样细胞)的比例,发现miR-141-3p通过抑制KLF9的表达能够提高PCa细胞的干细胞特性。此外,通过检测CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>细胞中miR-141-3p、KLF9的表达,结果发现miR-141-3p在CD133<sup>+</sup>细胞中表达水平显著高于CD133<sup>-</sup>细胞,而KLF9则相反。我们的实验结果在细胞水平证实miR-141-3p/KLF9通路能够促进PCa细胞获得干细胞特性,而该作用可能是促进VM形成的机制。

PCa最重要的进展标志为去势抵抗,为了更好 地反映miR-141-3p/KLF9通路在PCa进展中的作用, 我们使用了雄激素敏感状态的LNCaP细胞株和去 势抵抗状态的DU145细胞株进行实验。结果可见, DU145细胞相对高表达miR-141-3p而低表达KLF9, LNCaP细胞则相反,这提示miR-141-3p可能对PCa 的去势抵抗起促进作用,而KLF9起抑制作用;进一 步的功能实验显示DU145细胞的VM形成能力、干 细胞特性均强于LNCaP细胞;在此基础上,通过改 变细胞内miR-141-3p和KLF9的表达可见,miR-141-3p/KLF9通路对两种状态PCa细胞的VM形成能力及 CSCs特性均具有调控作用。以上结果表明miR-141-3p可能是通过调控VM形成及CSCs特性从而促进 PCa进展的。

综上,本研究首次证明了miR-141-3p/KLF9 通路在前列腺癌VM形成中的调控功能,并证实了 miR-141-3p/KLF9通路对前列腺癌干细胞特性的上 调作用,这为前列腺癌进展的调控机制提供了新的思 路。然而,有待进一步的研究去证实,miR-141-3p/KLF9 通路促进VM形成的作用是否是通过上调前列腺癌 干细胞特性来实现的。

### 参考文献 (References)

- HE H, LIANG L, HAN D, et al. Different trends in the incidence and mortality rates of prostate cancer between China and the USA: a joinpoint and age-period-cohort analysis [J]. Front Med, 2022, 9: 824464.
- [2] MOHAMED O, TESEN H, HANY M, et al. The role of hypoxia on prostate cancer progression and metastasis [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(4): 3873-84.
- [3] IOANNIDOU E, MOSCHETTA M, SHAH S, et al. Angiogenesis and anti-angiogenic treatment in prostate cancer: mechanisms of action and molecular targets [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9926.
- [4] MA X, GENG Z, WANG S, et al. The driving mechanism and targeting value of mimicry between vascular endothelial cells

and tumor cells in tumor progression [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 165: 115029.

- [5] LUO Q, WANG J, ZHAO W, et al. Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 19.
- [6] GRIZZI F, HEGAZI M, ZANONI M, et al. Prostate cancer microvascular routes: exploration and measurement strategies [J]. Life, 2023, 13(10): 2034.
- [7] 刘彼得,李循,王书恒,等.前列腺癌组织中Wnt5a的表达与血管生成拟态的相关性[J]. 肿瘤防治研究(LIU B D, LI X, WANG S H, et al. Correlation between Wnt5a expression and vasculogenic mimicry in prostate cancer tissues [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment), 2024, 51(1): 43-8.
- [8] URABE F, YAMAMOTO Y, KIMURA T. miRNAs in prostate cancer: intercellular and extracellular communications [J]. Int J Urol, 2022, 29(12): 1429-38.
- [9] LI X, LIU B, WANG S, et al. MiR-141-3p promotes malignant progression in prostate cancer through AlkB homolog 5-mediated mA modification of protein arginine methyltransferase 6 [J]. Chin J Physiol, 2023, 66(1): 43-51.
- [10] OH-HOHENHORST S, LANGE T J C. Role of metastasisrelated micrornas in prostate cancer progression and treatment [J]. Cancers, 2021, 13(17): 4492.
- [11] CHEN D, CHOU F, CHEN Y, et al. Targeting the radiationinduced TR4 nuclear receptor-mediated QKI/circZEB1/miR-141-3p/ZEB1 signaling increases prostate cancer radiosensitivity [J]. Cancer Lett, 2020, 495: 100-11.
- [12] WENG C, DONG H, BAI R, et al. Angiogenin promotes angiogenesis via the endonucleolytic decay of miR-141 in colorectal cancer [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 27: 1010-22.
- [13] MAO S, LU Z, ZHENG S, et al. Exosomal miR-141 promotes tumor angiogenesis via KLF12 in small cell lung cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 193.
- [14] LI G, HUANG M, CAI Y, et al. miR-141 inhibits glioma vasculogenic mimicry by controlling EphA2 expression [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(2): 1395-404.
- [15] LI J, LI J, WANG H, et al. MiR-141-3p promotes prostate cancer cell proliferation through inhibiting Krüppel-like factor-9 expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(4): 1381-6.
- [16] ZHAO X, MAI Z, LU Y, et al. KLF9 promotes osteogenic differentiation of dental stem cells by negatively regulating notch1 mediated signaling pathway [J]. Front Biosci, 2023, 28(5): 85.
- [17] CHEN S, GU S, XU M, et al. Krüppel-like factor 9 promotes neuroblastoma differentiation via targeting the sonic hedgehog signaling pathway [J]. Pediatr Blood Cancer, 2020, 67(3): e28108.
- [18] WEI Z, QIN X, KANG X, et al. MiR-142-3p inhibits adipogenic differentiation and autophagy in obesity through targeting KLF9 [J]. Mol Cell Endocrinol, 2020, 518: 111028.
- [19] WASIM S, LEE S, KIM J J, et al. Complexities of prostate cancer [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 14257.

- [20] AMBROSINI G, CORDANI M, ZARRABI A, et al. Transcending frontiers in prostate cancer: the role of oncometabolites on epigenetic regulation, CSCs, and tumor microenvironment to identify new therapeutic strategies [J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 36.
- [21] LI D, XU W, CHANG Y, et al. Advances in landscape and related therapeutic targets of the prostate tumor microenvironment [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2023, 55(6): 956-73.
- [22] HAN D, LEE H, LEE E J Resveratrol suppresses serum-induced vasculogenic mimicry through impairing the EphA2/twist-VEcadherin/AKT pathway in human prostate cancer PC-3 cells [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 20125.
- [23] HAN H, LEE S, XU Y, et al. SPHK/HIF-1α signaling pathway has a critical role in chrysin-induced anticancer activity in hypoxia-induced PC-3 cells [J]. Cells, 2022, 11(18): 2787.
- [24] YEO C, HAN D, LEE H, et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses vasculogenic mimicry through inhibiting the Twist/VEcadherin/AKT pathway in human prostate cancer PC-3 cells [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(2): 439.
- [25] DA J, XU M, WANG Y, et al. Kaempferol promotes apoptosis while inhibiting cell proliferation via androgen-dependent pathway and suppressing vasculogenic mimicry and invasion in prostate cancer [J]. Anal Cell Pathol, 2019, 2019: 1907698.
- [26] WANG J, LIU Y, ZHANG Y, et al. Targeting exosomes enveloped EBV-miR-BART1-5p-antagomiRs for NPC therapy through both anti-vasculogenic mimicry and anti-angiogenesis [J]. Cancer Med, 2023, 12(11): 12608-21.
- [27] BAO S, JIN S, WANG C, et al. Androgen receptor suppresses vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma via circRNA7/miRNA7-5p/VE-cadherin/Notch4 signalling [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(23): 14110-20.
- [28] CAI X, WANG Z, LIN S, et al. Ginsenoside Rg3 suppresses vasculogenic mimicry by impairing DVL3-maintained stemness via PAAD cell-derived exosomal miR-204 in pancreatic adenocarcinoma [J]. Phytomedicine, 2024, 126: 155402.
- [29] LIM D, CHO J, YUN E, et al. microRNA 34a-AXL axis regulates vasculogenic mimicry formation in breast cancer cells [J]. Genes, 2020, 12(1): 9.
- [30] YI B, LI H, CAI H, et al. LOXL1-AS1 communicating with TIAR modulates vasculogenic mimicry in glioma via regulation of the miR-374b-5p/MMP14 axis [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(2): 475-90.
- [31] SIMMEN F, ALHALLAK I, SIMMEN R J C. Krüppel-like factor-9 and Krüppel-like factor-13: highly related, multi-functional, transcriptional repressors and activators of oncogenesis [J]. Cancers, 2023, 15(23): 5667.
- [32] SHEN P, CAO X, SUN L, et al. KLF9 suppresses cell growth and induces apoptosis via the AR pathway in androgen-dependent prostate cancer cells [J]. Biochem Biophys Rep, 2021, 28: 101151.