

LncRNA SNHG25调节miR-6838-5p/FOXK1轴 对膀胱癌细胞增殖和迁移的影响

张双洋 姚俊 陈琛 邓继意 孙成亮*

(武汉市武昌医院, 泌尿外科, 武汉 430000)

摘要 该研究旨在探讨长链非编码RNA小核仁RNA宿主基因25(LncRNA SNHG25)调控微小RNA-6838-5p/叉头框K1(miR-6838-5p/FOXK1)轴对膀胱癌细胞增殖和迁移的影响。QRT-PCR检测组织和细胞(T24、5637及EJ)中LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和FOXK1 mRNA表达情况。将T24细胞分为阴性对照(NC)组、si-NC组、LncRNA SNHG25敲低(si-SNHG25)组、si-SNHG25+miR-6838-5p抑制剂(si-SNHG25+in-miR-6838-5p)组和si-SNHG25+FOXK1过表达(si-SNHG25+oe-FOXK1)组。采用QRT-PCR检测各组T24细胞转染效率; CCK-8法、BrdU法、集落形成实验、划痕实验以及Transwell实验检测细胞增殖和迁移情况; Western blot检测T24细胞中p53、FOXK1、Survivin、MMP9、Twist1和SOX9蛋白水平; 荧光素酶报告基因和RIP检测miR-6838-5p与LncRNA SNHG25以及FOXK1之间作用关系。体内实验检测LncRNA SNHG25对肿瘤生长的影响。结果显示, 膀胱癌组织或细胞(T24、5637及EJ)中LncRNA SNHG25和FOXK1 mRNA水平上调, miR-6838-5p水平下调($P<0.05$), 且T24细胞中三个因子表达趋势变化最明显。与si-NC组比较, si-SNHG25组T24细胞中LncRNA SNHG25水平、细胞活力、BrdU阳性率、集落形成数量、伤口愈合率、迁移细胞数量以及MMP9、Twist1、SOX9、FOXK1和Survivin水平均降低, miR-6838-5p、p53水平升高($P<0.05$)。与si-SNHG25组比较, si-SNHG25+in-miR-6838-5p组和si-SNHG25+oe-FOXK1组T24细胞中细胞活力、BrdU阳性率、集落形成数量、伤口愈合率、迁移细胞数量以及MMP9、Twist1、SOX9、FOXK1和Survivin水平均降低, p53水平升高($P<0.05$)。miR-6838-5p与LncRNA SNHG25或FOXK1之间存在相互作用关系, 且均在Ago2处富集($P<0.05$)。敲低LncRNA SNHG25可减少体内肿瘤组织体积、质量, 下调LncRNA SNHG25和FOXK1 mRNA表达, 上调miR-6838-5p表达($P<0.05$)。敲低LncRNA SNHG25可通过反向调节miR-6838-5p/FOXK1轴抑制膀胱癌细胞增殖和迁移。

关键词 LncRNA SNHG25; miR-6838-5p/FOXK1轴; 膀胱癌; 增殖; 迁移

Effects of LncRNA SNHG25 on Proliferation and Migration of Bladder Cancer Cells by Regulating miR-6838-5p/FOXK1 Axis

ZHANG Shuangyang, YAO Jun, CHEN Chen, DENG Jiyi, SUN Chengliang*

(Department of Urology, Wuhan Wuchang Hospital, Wuhan 430000, China)

Abstract This study aims to investigate the effect of LncRNA SNHG25 (long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 25) regulating the miR-6838-5p/FOXK1 (microRNA-6838-5p/forkhead box K1) axis

收稿日期: 2025-06-03

接受日期: 2025-07-18

武汉市卫生健康委员会科研项目(批准号: WZ24B67)资助的课题

*通信作者。Tel: 027-88118865, E-mail: 550369181@qq.com

Received: June 3, 2025

Accepted: July 18, 2025

This work was supported by the Wuhan Health Commission Scientific Research Project (Grant No. WZ24B67)

*Corresponding author. Tel: +86-27-88118865, E-mail: 550369181@qq.com

on the proliferation and migration of bladder cancer cells. QRT-PCR was used to measure the expression of LncRNA SNHG25, miR-6838-5p, and *FOXK1* mRNA in tissues and cells. T24 cells were grouped into NC (negative control) group, LncRNA SNHG25 knockdown negative control (si-NC) group, LncRNA SNHG25 knockdown (si-SNHG25) group, si-SNHG25+miR-6838-5p inhibitor (si-SNHG25+in-miR-6838-5p) group and si-SNHG25+FOXK1 overexpression (si-SNHG25+oe-FOXK1) group. QRT-PCR was used to measure the transfection efficiency of T24 cells in each group. CCK-8 method, BrdU method, colony formation assay, scratch assay, and Transwell assay were used to detect cell proliferation and migration. Western blot was used to measure the levels of p53, FOXK1, Survivin, MMP9, Twist1, and SOX9 proteins in T24 cells. The luciferase reporter gene and RIP were used to measure the interaction between LncRNA SNHG25 and miR-6838-5p, and between miR-6838-5p and *FOXK1*. *In vivo* experiments were used to detect the effect of LncRNA SNHG25 on tumor growth. LncRNA SNHG25 and *FOXK1* mRNA levels were up-regulated and miR-6838-5p was down-regulated in bladder cancer tissues or cells (T24, 5637 and EJ) ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the si-SNHG25 group had lower LncRNA SNHG25, cell viability, BrdU positive rate, colony formation, wound healing rate, number of migrating cells, MMP9, Twist1, SOX9, FOXK1, and Survivin in T24 cells, and higher miR-6838-5p and p53 ($P<0.05$). Compared with the si-SNHG25 group, the si-SNHG25+in-miR-6838-5p group and si-SNHG25+oe-FOXK1 group had lower viability, BrdU positive rate, colony formation number, wound healing rate, number of migrating cells, MMP9, Twist1, SOX9, FOXK1, and Survivin in T24 cells, and higher p53 ($P<0.05$). The result showed that LncRNA SNHG25 had a targeted relationship with miR-6838-5p, and miR-6838-5p had a targeted relationship with *FOXK1*. And all three components showed significant enrichment in Ago2 complexes ($P<0.05$). Knocking down LncRNA SNHG25 reduced tumor tissue volume and mass *in vivo*, downregulated LncRNA SNHG25 and *FOXK1* mRNA levels, and upregulated miR-6838-5p ($P<0.05$). Knockdown of LncRNA SNHG25 suppresses the proliferation and migration of bladder cancer cells through the miR-6838-5p/FOXK1 signaling axis.

Keywords LncRNA SNHG25; miR-6838-5p/FOXK1 axis; bladder cancer; proliferation; migration

膀胱癌(bladder cancer)是泌尿系统中常见的恶性肿瘤,占泌尿系统发生肿瘤的首位^[1]。膀胱癌肿瘤发病机制复杂,其发生、发展和演变常常与慢性泌尿系统感染、吸烟等因素有关^[2]。手术切除是临床治疗膀胱癌主要手段,随着医疗技术的发展,化疗和放疗以及免疫治疗等新治疗方案的兴起,晚期的膀胱癌治疗也取得了一定的进展。然而,仍有部分晚期膀胱癌患者的总生存率不令人满意^[3-4]。此外,多数膀胱癌患者在晚期被诊断出来。因此,有必要在分子水平对膀胱癌的发病机制进行探究,以诊断和筛选与膀胱癌相关的治疗标志物。

恶性肿瘤的演变与体内基因异常表达和微环境变化等诸多因素相关。随着全基因组测序技术的发展,异常基因表达与恶性肿瘤发展的关系已成为当前研究的热点^[5]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是一种超过200 nt的非编码RNA,在调节基因表达、生长及发育过

程中发挥关键作用。LncRNA和miRNA、mRNA之间的相互作用为肿瘤的诊断和治疗提供了新的靶点^[6]。长链非编码RNA小核仁RNA宿主基因25(long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 25, LncRNA SNHG25)作为新发现的LncRNA,已被证实存在于直肠癌、前列腺癌等恶性肿瘤中显著高表达,可明显促进肿瘤细胞的增殖和转移^[7-8]。但在膀胱癌中,LncRNA SNHG25是否也存在表达差异以及是否可对癌细胞的增殖和转移产生影响尚未见报道。

在这项研究中,本研究首次通过分析LncRNA SNHG25在膀胱癌组织和细胞中的表达特征,进而确定了一个新的LncRNA SNHG25介导的微小RNA-6838-5p/叉头框K1(miR-6838-5p/forkhead box K1, miR-6838-5p/FOXK1)轴,并通过一系列实验验证了LncRNA SNHG25通过miR-6838-5p/FOXK1轴对膀胱癌细胞增殖和迁移产生影响。

该结果可为LncRNA SNHG25作为膀胱癌治疗的潜在靶点提供坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

组织样本: 25例膀胱癌组织来源于武汉市武昌医院泌尿外科的患者, 癌旁正常组织选取至少距离癌组织边缘1 cm处的样本, 取材时保证样本的独立性。所有样本的获取均得到患者的知情同意以及武汉市武昌医院伦理委员会的批准, 编号: 2024-伦理审批-93号(审批时间: 2024年11月5日)。

细胞系: 人类膀胱癌T24(货号: AC-2412H)、5637(货号: CC-Y1016)、EJ(货号: CC-Y1153)细胞以及正常膀胱上皮细胞SV-HUC-1(货号: AC-2581H)均购自美国ATCC。

主要试剂: TRIzol试剂(货号: R401-01)、一步法定量试剂盒(货号: NQ107-01)、CCK-8(货号: A311-01)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; BrdU(货号: ST1056)、结晶紫(货号: C0121)购自上海碧云天生物科技股份有限公司; Transwell(货号: 3422)购自北京伊塔生物科技有限公司; p53(货号: 9282)、FOXK1(货号: 12025)、Survivin(货号: 2808)、MMP9(货号: 3852)、Twist1(货号: 90445)和SOX9(货号: 82630)均购自美国CST公司; 双荧光素酶检测试剂盒(货号: LF005)购自美国GeneCopoeia公司; RIP试剂盒(货号: abs50071)购自上海爱必信生物科技有限公司; Ago2(货号: ab186733)、IgG(货号: ab218427)均购自英国Abcam公司; TRIzol LS试剂盒(货号: B1901XL)购自上海雅吉生物科技有限公司。裸鼠购自北京唯尚立德生物科技有限公司, 许可证号: SCXK(京)2023-0004。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 T24、5637、EJ和SV-HUC-1细胞用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基于特定条件下(37 °C、5% CO₂)的培养箱中培养。培养至三代用于后续研究, 其间定期更换培养基。

1.2.2 QRT-PCR检测LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和FOXK1 mRNA表达情况 TRIzol提取组织和细胞总RNA, 按照试剂盒说明书进行QRT-PCR检测。通过2^{-ΔΔCt}检测LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和FOXK1 mRNA相对表达水平。引物序列如下。LncRNA SNHG25: 5'-GCA GGT TCC GGG AGG

TCA-3'(正向)和5'-CAA ACC ACT TTA TTG ACG GGA A-3'(反向); miR-6838-5p: 5'-GTA TGA GAA GCA GCA GTG GCA A-3'(正向)和5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA G-3'(反向); FOXK1: 5'-ACA CGT CTG GAG GAG ACA GC-3'(正向)和5'-GAG AGG TTG TGC CGG ATA GA-3'(反向); β-Actin: 5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3'(正向)和5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3'(反向); U6: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'(正向)和5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'(反向)。

1.2.3 细胞分组 将T24细胞依次分为阴性对照(NC)组(正常培养, 未转染)、LncRNA SNHG25敲低阴性对照(si-NC)组(转染si-NC)、LncRNA SNHG25敲低(si-SNHG25)组(转染si-SNHG25)、si-SNHG25+miR-6838-5p抑制剂(si-SNHG25+in-miR-6838-5p)组(转染si-SNHG25和in-miR-6838-5p)和si-SNHG25+FOXK1过表达(si-SNHG25+oe-FOXK1)组(转染si-SNHG25和oe-FOXK1)。按照Lipofectamine 3000试剂盒方法转染将相应的试剂转染到对应分组的细胞中, NC组细胞仅转染Lipofectamine 3000。培养24 h后收集细胞, 通过QRT-PCR检测LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和FOXK1 mRNA的表达水平。QRT-PCR实验步骤及引物序列见1.2.2。

1.2.4 细胞增殖实验 CCK-8法: 将1.2.3转染的各组T24细胞以2×10³/孔接种到96孔板中, 培养24 h后添加10 μL的CCK-8溶液, 37 °C继续孵育2 h, 在酶标仪中测定波长为450 nm处的吸光度值。

BrdU法: 将1.2.3转染的各组T24细胞以5×10⁴/孔接种到24孔板中, 24 h后添加10 μL的BrdU溶液, 37 °C继续孵育2 h, 通过显微镜观察BrdU染色情况, 并计算BrdU阳性细胞率。

集落形成实验: 将1.2.3转染的各组T24细胞以5×10²/孔接种到6孔板中, 培养14天后待观察到肉眼可见的集落形成时, 37 °C下使用4%多聚甲醛固定15 min, 而后用结晶紫在37 °C下染色10 min, 统计不少于5个视野下的集落形成数量。

1.2.5 Western blot检测蛋白表达情况 收集按照1.2.3转染的各组T24细胞。使用裂解液裂解后提取蛋白, 将等量的蛋白进行电泳分离后经过湿转法转移到PVDF膜上。一抗p53、FOXK1、Survivin、MMP9、Twist1、SOX9、β-actin(稀释浓度均为1:1 000)在4 °C过夜孵育后, 添加二抗(1:5 000)在

37 °C孵育 2 h, 显影后经过凝胶成像系统拍照并对条带的灰度值进行半定量。

1.2.6 细胞迁移实验 划痕实验: 将1.2.3转染的各组 T24细胞以 1×10^5 /孔接种到 6孔板中, 待细胞融合度达到 90%以上时, 通过移液器枪头对细胞表面进行垂直划痕, 清除多余细胞后使用无血清培养基培养 24 h, 分别对 0 h 和 24 h 后细胞的划痕情况进行拍照, 并计算伤口愈合率。

Transwell实验: 将 1.2.3转染的各组 T24细胞以 1×10^5 /孔接种到预先含有基质胶的 Transwell小室上室中, 使用无血清的培养基培养 24 h, 下室添加有血清的培养基培养 24 h。37 °C下使用 4%多聚甲醛固定 15 min, 而后用结晶紫在 37 °C下染色 10 min, 使用显微镜观察并记录不低于 5个视野下的细胞迁移数量。

1.2.7 miR-6838-5p与LncRNA SNHG25或FOXK1相互作用分析 荧光素酶报告基因检测: 将连接荧光素酶报告基因载体的 LncRNA SNHG25和 FOXK1 野生型 (SNHG25-WT和 FOXK1-WT)或者突变型 (SNHG25-MUT和 FOXK1-MUT)分别与 miR-6838-5p 模拟物 (mi-miR-6838-5p)或阴性对照 (miR-6838-5p NC)共转染至 T24细胞中。48 h后通过荧光素酶报告基因检测相对荧光素酶活性。

RIP检测: RIPA裂解物在冰浴中裂解 T24细胞提取蛋白。取适量蛋白添加抗体 Ago2(或 IgG), 旋转室温孵育后添加预洗的蛋白 A/G磁珠于 4 °C条件下结合 1 h。RIP缓冲液去除非特异性结合后添加 TRIzol LS提取总 RNA, 结合 1.2.2 QRT-PCR实验检测 LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和 FOXK1

mRNA表达情况。

1.2.8 动物实验 将转染 si-NC组或者 si-SNHG25 组的 T24细胞 (1×10^6 /100 μ L)接种于饲养 1周的裸鼠皮下组织, 同时设置常规培养的裸鼠作为 NC组, 每组 6只。4周后处死裸鼠, 取出肿瘤组织测量体积和质量, 提取 RNA用于 LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和 FOXK1 mRNA表达水平检测。本研究中的所有动物实验均经过本院伦理委员会批准, 批准号同 1.1。

1.3 统计分析

数据使用 SPSS 25.0进行分析, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间数据(仅组织样本和双荧光素酶实验结果)比较使用 *t*检验, 其余数据均使用 ANOVA 分析 (Tukey 检验), 以 $P<0.05$ 表示数据存在的差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和FOXK1 mRNA在膀胱癌细胞中的表达情况

结果 (表 1)显示, 与正常组织或 SV-HUC-1 细胞比较, 膀胱癌组织或细胞 (T24、5637及 EJ)中 LncRNA SNHG25和 FOXK1 mRNA水平上调, miR-6838-5p水平下调 ($P<0.05$), 且 T24细胞中三个因子表达趋势变化最明显, 后续选择该细胞为研究对象。

2.2 各组 T24细胞中 LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和FOXK1 mRNA表达水平

结果显示, 与 si-NC组比较, si-SNHG25组 T24细胞中 LncRNA SNHG25和 FOXK1 mRNA水平降低,

表1 QRT-PCR检测LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和FOXK1 mRNA表达水平
Table 1 Detection of LncRNA SNHG25, miR-6838-5p, and FOXK1 mRNA expression levels by QRT-PCR

样本类型 Sample type	类别 Category	LncRNA SNHG25	miR-6838-5p	FOXK1 mRNA
Tissue	Normal ($n=25$)	1.03 $\pm$ 0.35	0.95 $\pm$ 0.32	1.02 $\pm$ 0.33
	Cancer ($n=25$)	1.60 $\pm$ 0.42*	0.47 $\pm$ 0.15*	1.50 $\pm$ 0.36*
Cell	SV-HUC-1 ($n=6$)	1.03 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.02	0.98 $\pm$ 0.04
	T24 ($n=6$)	1.80 $\pm$ 0.15 [#]	0.41 $\pm$ 0.03 [#]	1.95 $\pm$ 0.16 [#]
	5637 ($n=6$)	1.48 $\pm$ 0.14 [#]	0.57 $\pm$ 0.04 [#]	1.68 $\pm$ 0.12 [#]
	EJ ($n=6$)	1.37 $\pm$ 0.11 [#]	0.70 $\pm$ 0.05 [#]	1.45 $\pm$ 0.04 [#]

$\bar{x}\pm s$; * $P<0.05$, 与正常组织, [#] $P<0.05$, 与SV-HUC-1细胞比较。

$\bar{x}\pm s$; * $P<0.05$ compared with normal tissues; [#] $P<0.05$ compared with SV-HUC-1 cells.

miR-6838-5p水平升高($P<0.05$)。与 si-SNHG25组比较, si-SNHG25+in-miR-6838-5p组 T24细胞中 *FOXK1* mRNA水平升高, miR-6838-5p水平降低($P<0.05$); si-SNHG25+oe-FOXK1组 T24细胞中 *FOXK1* mRNA水平升高($P<0.05$)。见表2。

2.3 敲低LncRNA SNHG25抑制T24细胞增殖

图1~图3和表3结果显示, 与 si-NC组比较, si-SNHG25组 T24细胞中细胞活力、BrdU阳性率、集落形成数量、FOXK1和 Survivin水平均降低, p53水平升高($P<0.05$); 与 si-SNHG25组比较, si-SNHG25+in-miR-6838-5p组和 si-SNHG25+oe-FOXK1组 T24细胞细胞中细胞活力、BrdU阳性率、集落形成数量、FOXK1和 Survivin水平均升高, p53

水平降低($P<0.05$)。

2.4 敲低LncRNA SNHG25抑制T24细胞迁移

图4~图6和表4结果显示, 与 si-NC组比较, si-SNHG25组 T24细胞中伤口愈合率、迁移细胞数量以及MMP9、Twist1、SOX9蛋白水平平均下调($P<0.05$); 与 si-SNHG25组比较, si-SNHG25+in-miR-6838-5p组和 si-SNHG25+oe-FOXK1组 T24细胞细胞中伤口愈合率、迁移细胞数量以及MMP9、Twist1、SOX9蛋白水平平均上调($P<0.05$)。

2.5 LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和FOXK1相互作用关系检测

数据表明, SNHG25-WT+mi-miR-6838-5p组 T24细胞中荧光素酶活性明显低于 SNHG25-

表2 QRT-PCR检测各组T24细胞中LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和FOXK1 mRNA表达水平
Table 2 Detection of LncRNA SNHG25, miR-6838-5p and FOXK1 mRNA expression levels in different groups of T24 cells by QRT-PCR

组别 Group	LncRNA SNHG25	miR-6838-5p	FOXK1 mRNA
NC	1.02±0.08	1.00±0.07	1.03±0.07
si-NC	0.98±0.06	1.01±0.10	1.02±0.06
si-SNHG25	0.42±0.03*	1.79±0.15*	0.45±0.04*
si-SNHG25+in-miR-6838-5p	0.45±0.05	1.39±0.11 [#]	0.68±0.05 [#]
si-SNHG25+oe-FOXK1	0.43±0.04	1.82±0.14 [#]	0.81±0.04 [#]

$n=6$, $\bar{x}\pm s$; * $P<0.05$, 与 si-NC组相比; [#] $P<0.05$, 与 si-SNHG25组相比。
 $n=6$, $\bar{x}\pm s$; * $P<0.05$ compared with si-NC group; [#] $P<0.05$ compared with si-SNHG25 group.

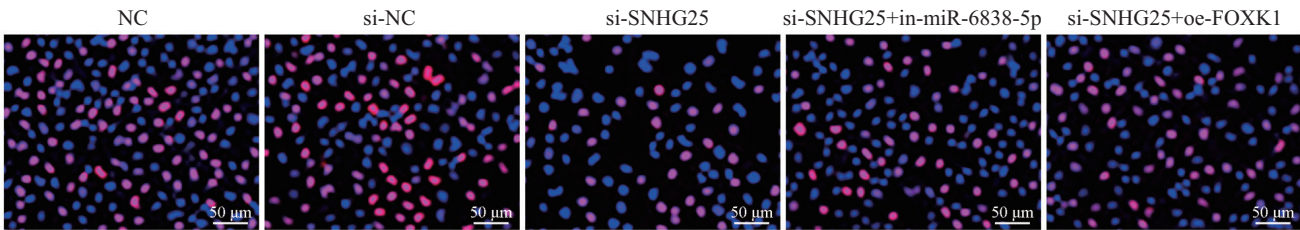


图1 BrdU检测各组T24细胞BrdU阳性率
Fig.1 BrdU assay detecting BrdU-positive rate of T24 cells in each group

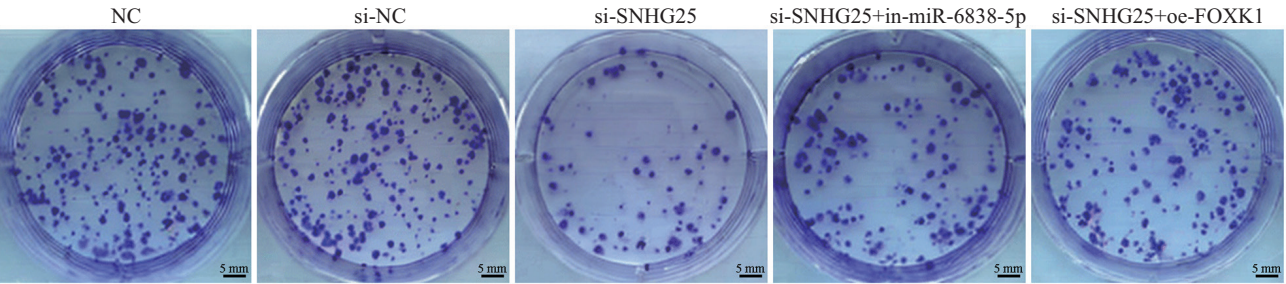
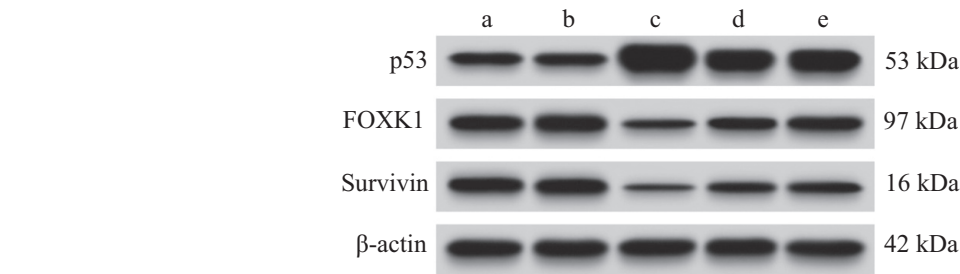


图2 集落形成实验检测各组T24细胞集落形成数量
Fig.2 Colony formation assay detecting colony formation number of T24 cells in each group



a: NC组; b: si-NC组; c: si-SNHG25组; d: si-SNHG25+in-miR-6838-5p组; e: si-SNHG25+oe-FOXK1组。
a: NC group; b: si-NC group; c: si-SNHG25 group; d: si-SNHG25+in-miR-6838-5p group; e: si-SNHG25+oe-FOXK1 group.

图3 Western blot检测各组T24细胞中p53、FOXK1和Survivin蛋白水平
Fig.3 Western blot detecting protein levels of p53, FOXK1 and Survivin of T24 cells in each group

表3 各组T24细胞增殖情况比较						
Table 3 Comparison of proliferative capacity of T24 cells in each group						
组别 Group	细胞活力(D_{450}) Cell viability (D_{450})	BrdU阳性率/% BrdU-positive rate /%	集落形成 Colony formation	p53	FOXK1	Survivin
NC	0.88±0.07	67.25±6.03	135.19±10.23	0.85±0.04	1.03±0.11	0.96±0.07
si-NC	0.85±0.05	63.12±3.29	130.27±8.52	0.80±0.07	1.08±0.12	0.98±0.04
si-SNHG25	0.40±0.04*	27.36±32.15*	41.28±5.13*	1.92±0.18*	0.56±0.04*	0.35±0.03*
si-SNHG25+in-miR-6838-5p	0.67±0.05 [#]	41.58±4.12 [#]	78.39±7.16 [#]	1.50±0.14 [#]	0.77±0.07 [#]	0.64±0.05 [#]
si-SNHG25+oe-FOXK1	0.72±0.06 [#]	44.87±5.13 [#]	85.33±7.25 [#]	1.55±0.13 [#]	0.85±0.05 [#]	0.69±0.06 [#]

$n=6$, $\bar{x}\pm s$; * $P<0.05$, 与si-NC组相比; [#] $P<0.05$, 与si-SNHG25组相比。
 $n=6$, $\bar{x}\pm s$; * $P<0.05$ compared with si-NC group; [#] $P<0.05$ compared with si-SNHG25 group.

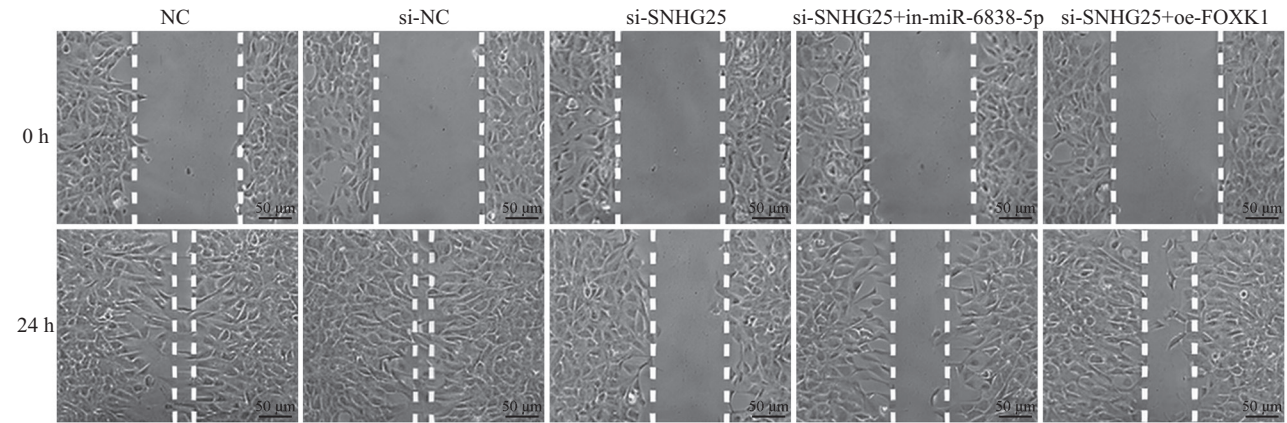


图4 划痕愈合实验检测各组T24细胞伤口愈合率
Fig.4 Wound healing assay detecting wound healing rate of T24 cells in each group

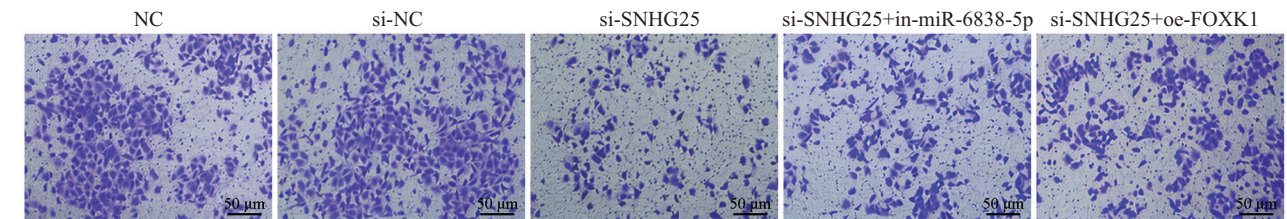
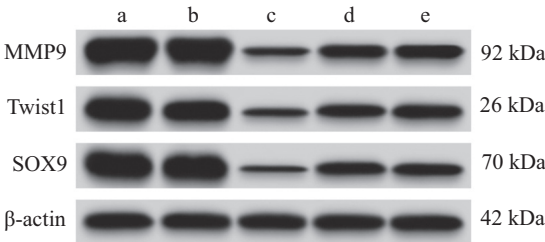


图5 Transwell实验检测各组T24细胞迁移细胞数量
Fig.5 Transwell assay detecting number of migrated T24 cells in each group

WT+miR-6838-5p NC组 (0.44 ± 0.02 vs 1.01 ± 0.03 , $P<0.05$), SNHG25-MUT+mi-miR-6838-5p组与 SNHG25-MUT+miR-6838-5p NC组之间活性变化无意义 (0.96 ± 0.04 vs 1.01 ± 0.02 , $P>0.05$); FOXK1-WT+mi-miR-6838-5p组中荧光素酶活性低于 FOXK1-WT+miR-6838-5p NC组 (0.33 ± 0.02 vs 1.02 ± 0.07 , $P<0.05$), FOXK1-MUT+mi-miR-6838-5p组与 FOXK1-

MUT+miR-6838-5p NC组之间活性变化无意义 (0.95 ± 0.06 vs 0.97 ± 0.07 , $P>0.05$)。见图 7。结果如表 5 显示, 与 IgG 比较, miR-6838-5p 与 LncRNA SNHG25(或 *FOXK1*) 均在 Ago2 处大量富集 ($P>0.05$)。

2.6 敲低 LncRNA SNHG25 抑制体内 T24 细胞生长
图 8、表 6 结果显示, 与 si-NC 组比较, si-SN-



a: NC组; b: si-NC组; c: si-SNHG25组; d: si-SNHG25+in-miR-6838-5p组; e: si-SNHG25+oe-FOXK1组。
a: NC group; b: si-NC group; c: si-SNHG25 group; d: si-SNHG25+in-miR-6838-5p group; e: si-SNHG25+oe-FOXK1 group.

图6 Western blot检测各组T24细胞中MMP9、Twist1和SOX9蛋白水平

Fig.6 Western blot detecting protein levels of MMP9, Twist1 and SOX9 of T24 cells in each group

表4 各组T24细胞侵袭情况比较

Table 4 Comparison of invasive capacity of T24 cells in each group

组别 Group	伤口愈合率/% Wound healing rate /%	迁移细胞数量 Number of migrated cells	MMP9	Twist1	SOX9
NC	85.69±8.12	228.33±20.19	1.82±0.08	1.69±0.12	1.74±0.13
si-NC	88.60±7.05	245.98±21.09	1.78±0.10	1.54±0.13	1.76±0.15
si-SNHG25	30.23±3.10*	69.87±6.19*	0.56±0.04*	0.60±0.05*	0.40±0.03*
si-SNHG25+in-miR-6838-5p	51.22±5.03 [#]	129.67±11.09 [#]	0.88±0.06 [#]	0.92±0.07 [#]	0.79±0.05 [#]
si-SNHG25+oe-FOXK1	56.87±5.19 [#]	143.95±13.80 [#]	0.96±0.05 [#]	0.97±0.06 [#]	0.82±0.06 [#]

$n=6$, $\bar{x}\pm s$; * $P<0.05$, 与 si-NC 组相比; [#] $P<0.05$, 与 si-SNHG25 组相比。
 $n=6$, $\bar{x}\pm s$; * $P<0.05$ compared with si-NC group; [#] $P<0.05$ compared with si-SNHG25 group.

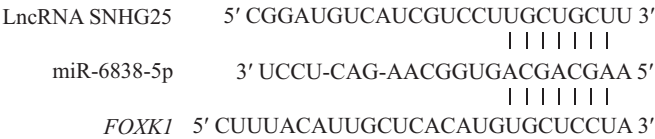


图7 miR-6838-5p与LncRNA SNHG25或FOXK1的碱基互补位点图

Fig.7 Base complementary sites between miR-6838-5p and LncRNA SNHG25 or FOXK1

表5 RIP实验检测miR-6838-5p与LncRNA SNHG25或FOXK1之间的靶向关系

Table 5 RIP assay detecting targeting relationship between miR-6838-5p and LncRNA SNHG25 or FOXK1

组别 Group	miR-6838-5p与LncRNA SNHG25 miR-6838-5p and LncRNA SNHG25		miR-6838-5p与FOXK1 miR-6838-5p and FOXK1	
	LncRNA SNHG25	miR-6838-5p	miR-6838-5p	FOXK1 mRNA
IgG	1.01±0.02	1.02±0.02	1.03±0.02	1.01±0.03
Ago2	8.11±0.85*	12.39±1.36*	14.48±1.45*	19.65±1.05*

$n=6$, $\bar{x}\pm s$; * $P<0.05$, 与 IgG 组相比。
 $n=6$, $\bar{x}\pm s$; * $P<0.05$ compared with IgG group.

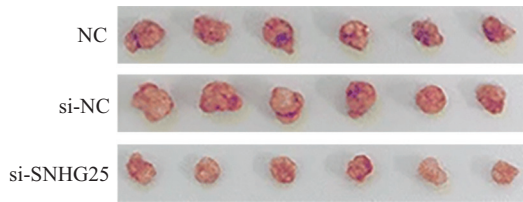


图8 裸鼠肿瘤组织代表性图片

Fig.8 Representative images of tumor tissues in nude mice

表6 各组裸鼠组织体积、质量以及LncRNA SNHG25、miR-6838-5p和FOXK1 mRNA表达情况

Table 6 Tumor volume, mass, and expression levels of LncRNA SNHG25, miR-6838-5p and FOXK1 mRNA in nude mice tissues of each group

组别 Group	肿瘤体积/mm ³ Tumor volume /mm ³	肿瘤重量/g Tumor mass /g	LncRNA SNHG25	miR-6838-5p	FOXK1 mRNA
NC group	857.23±85.12	0.84±0.07	1.02±0.02	1.03±0.05	1.03±0.04
si-NC group	879.36±75.12	0.86±0.05	1.06±0.04	1.07±0.03	1.05±0.06
si-SNHG25 group	354.67±40.39*	0.33±0.03*	0.50±0.03*	1.64±0.11*	0.43±0.04*

$n=6, \bar{x}\pm s; *P<0.05$, 与si-NC组相比。
 $n=6, \bar{x}\pm s; *P<0.05$ compared with si-NC group.

HG25组肿瘤组织体积、质量以及LncRNA SNHG25和FOXK1 mRNA水平均下调,miR-6838-5p水平上调($P<0.05$)。

3 讨论

膀胱癌是一种侵袭性极强的泌尿系统肿瘤。尽管随着手术联合放疗、化疗和靶向治疗的应用,患者的预后也得到不同程度的改善,但仍有部分患者存在远处转移和局部复发导致患者预后情况较差^[9]。因此,深入了解膀胱癌的发病机制并筛选敏感标志物对膀胱癌的治疗具有重要意义。

随着分子生物学和表观遗传学的不断发展,LncRNA在分子水平上对基因和蛋白质的表达及调控作用已得到了广泛的证实^[10]。有研究证实,LncRNA在膀胱癌的发展和演变过程中发挥不可替代的功能。比如:LncRNA GATA3-AS1在膀胱癌组织和细胞中显著上调,并且与病理分期、分级和不良预后有关,可通过与DDX5蛋白相结合激活Wnt/ β -catenin通路从而增强膀胱尿路上皮癌侵袭性,LncRNA GATA3-AS1是膀胱尿路上皮癌患者预后不良的新预测分子^[11]。李思杰等^[12]研究也表明,LncRNA MIR210HG在膀胱癌组织中高表达,不仅对膀胱癌肌层浸润和淋巴结转移有促进作用,而且可为患者的临床治疗和总生存率的提高提供帮助。与之类似,本研究发现,相较于正常的膀胱组织或SV-HUC-1细胞,LncRNA SNHG25在膀胱癌组织以

及T24、5637及EJ膀胱癌细胞系中均呈现高表达态势。然而,以往的研究并未证实LncRNA SNHG25在膀胱癌中的表达情况及其相关调控机制。因此,本研究将通过后续一系列研究,深入剖析LncRNA SNHG25在膀胱癌中的功能及相关的的作用机制。细胞功能实验结果显示,敲低LncRNA SNHG25能够显著抑制T24细胞增殖,具体表现为细胞活力下降、BrdU掺入量减少以及菌落形成数量降低;这一增殖抑制现象伴随有Survivin的表达下调和p53的表达上调。其中,Survivin可通过抑制细胞凋亡来维持细胞的增殖和存活,其表达上调往往意味着增殖进程的促进,与之相反,p53是一种肿瘤抑制蛋白,在细胞异常增殖时被激活进而抑制细胞增殖^[13]。此外,LncRNA SNHG25还可降低划痕愈合率以及迁移细胞数量,同时对MMP9、Twist1和SOX9蛋白表达也具有抑制作用。据报道,MMP9是一种机制金属蛋白酶,可通过创造利于迁移的微环境,间接辅助转录因子Twist1激活SOX9参与上皮-间质转化过程,促进癌细胞获得更强的迁移能力^[14-15]。另外体内结果显示,敲低LncRNA SNHG25可显著抑制裸鼠体内T24细胞的成瘤能力。上述结果揭示了敲低LncRNA SNHG25在膀胱癌中发挥抑癌功能的生物学过程。

众所周知,LncRNA通过海绵吸附miRNA,反向调控靶蛋白表达,进而参与生物学功能的调控^[16]。LncRNA SNHG25也不例外,研究证实,LncRNA

SNHG25在骨肉瘤细胞和组织中高表达,并且LncRNA SNHG25高表达患者的生存力低于LncRNA SNHG25低表达患者的生存率。功能性研究表明,敲低LncRNA SNHG25可通过miR-497-5p/SOX4轴抑制骨肉瘤细胞增殖和侵袭进而发挥抗癌作用^[17]。另外,科研人员在宫颈癌的研究中也证实LncRNA SNHG25的高表达,而敲除LncRNA SNHG25可通过竞争性结合miR-497-5p正向调控脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FASN)表达,进而抑制宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭从而抑制其致癌性^[18]。本研究采用双荧光素酶和RIP实验证实,LncRNA SNHG25可能充当miR-6838-5p的分子海绵。已有研究报道,miR-6838-5p在乳腺癌、宫颈癌等多种肿瘤细胞中低表达,可通过充当非编码RNA(circRNA或LncRNA)下游靶基因参与调控肿瘤细胞的增殖、侵袭以及血管生成等生物学行为^[19-20]。在膀胱癌组织和细胞中,miR-6838-5p低表达,与魏鑫^[21]博士论文中表述相一致。当敲低LncRNA SNHG25时,miR-6838-5p明显高表达,这提示二者之间存在反向调控作用。进一步研究表明,敲低LncRNA SNHG25的同时抑制miR-6838-5p的表达可明显减弱LncRNA SNHG25下调对膀胱癌细胞增殖和迁移的抑制作用。此外,通过进一步分析发现,FOXK1是miR-6838-5p的靶基因。研究显示,FOXK1是一种在细胞增殖、分化等多个生物学过程中发挥核心作用的转录因子。多项研究证实,其在膀胱癌组织和细胞中高表达,可作为多个miRNA的下游靶基因参与调控膀胱癌的增殖和迁移^[22-23]。另外研究显示,过表达FOXK1可明显减弱敲低LncRNA SNHG25对T24细胞增殖和迁移能力的抑制作用。上述结果提示,敲低LncRNA SNHG25通过上调miR-6838-5p的表达,从而抑制FOXK1表达;而抑制miR-6838-5p或过表达FOXK1可逆转该抑制效应,提示LncRNA SNHG25通过吸附miR-6838-5p调控FOXK1表达,进而影响膀胱癌的发生发展。

综上,敲低LncRNA SNHG25通过充当分子海绵吸附miR-6838-5p,从而解除其对靶基因FOXK1的抑制,进而抑制膀胱癌细胞的增殖和迁移;三者表达水平可能对膀胱癌的诊断和治疗具有重要价值。总体而言,本研究为膀胱癌的发病机制提供了新的见解,并且为开发新的治疗策略提供了潜在途径。然而本研究仍存在一定的不足,首先本研究未

通过三重回补实验完全验证LncRNA SNHG25/miR-6838-5p/FOXK1轴的闭环调控关系,后续将通过共转染实验进一步确认该竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)网络的分子互作机制。其次,体内实验目前主要聚焦于肿瘤体积和质量的表型观察,未来将结合IHC分析增殖(Ki-67)和凋亡(Caspase-3)标志物,以更全面评估LncRNA SNHG25的体内抑癌机制。此外,si-RNA或ASO靶向LncRNA SNHG25的递送需平衡效率、靶向性与安全性等多方面问题需要进一步研究去平衡更优的给药方式。这些研究的深入将为LncRNA SNHG25作为膀胱癌治疗靶点的临床转化提供更坚实的证据,推动其从基础研究迈向临床应用。

参考文献 (References)

- [1] LOPEZ-BELTRAN A, COOKSON M S, GUERCIO B J, et al. Advances in diagnosis and treatment of bladder cancer [J]. BMJ, 2024, 384(2): e076743.
- [2] 王晓寒, 杜鹏飞, 屈晓东, 等. 非肌层浸润性膀胱癌患者TURBT术后并发尿路感染危险因素及预测模型构建[J]. 中华医院感染学杂志(WANG X H, DU P F, QU X D, et al. Risk factors and prediction model of urinary tract infection after TURBT in patients with non-musculoinvasive bladder cancer [J]. Chinese Journal of Nosocomiology), 2023, 33(7): 1071-5.
- [3] HOLZBEIERLEIN J M, BIXLER B R, BUCKLEY D I, et al. Diagnosis and treatment of non-muscle invasive bladder cancer, AUA/SUO guideline: 2024 amendment [J]. J Urol, 2024, 211(4): 533-8.
- [4] ZHANG S, LIN T, XIONG X, et al. Targeting histone modifiers in bladder cancer therapy-preclinical and clinical evidence [J]. Nat Rev Urol, 2024, 21(8): 495-511.
- [5] LI F, ZHANG H, HUANG Y, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals the association between histone lactylation and cisplatin resistance in bladder cancer [J]. Drug Resist Updat, 2024, 73(12): 101059.
- [6] KONG Y L, WANG H D, GAO M, et al. LncRNA XIST promotes bladder cancer progression by modulating miR-129-5p/TNFSF10 axis [J]. Discov Oncol, 2024, 15(1): 65-72.
- [7] GONG T, LI Y, FENG L, et al. SNHG25 promotes colorectal cancer metastasis by regulating MMP2 [J]. Aging, 2023, 15(19): 10105-16.
- [8] LIU Z, KE S, WANG Q, et al. Analyzing roles of small nuclear RNA host gene 25 from clinical, molecular target and tumor formation in prostate cancer [J]. Exp Cell Res, 2023, 429(2): 113686.
- [9] TAYLOR J I, KAMAT A M, O'DONNELL M A, et al. Long-term outcomes of bladder-sparing therapy vs radical cystectomy in BCG-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer [J]. BJU Int, 2025, 135(2): 260-8.
- [10] LIU Q. Role of exercise on the reduction of cancer development: a mechanistic review from the lncRNA point of view [J]. Clin Exp Med, 2025, 25(1): 77-86.

- [11] DUAN Y, LIU Z, MA Y, et al. LncRNA GATA3-AS1 promotes bladder uroepithelial cancer progression by stabilizing DDX5 [J]. *J Cancer*, 2025, 16(3): 835-47.
- [12] 李思杰, 王浩源, 段亚涛, 等. LncRNA MIR210HG对膀胱癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. *中国肿瘤临床*(LI S J, WANG H Y, DUAN Y T, et al. Effect of LncRNA MIR210HG on malignant biological behavior of bladder cancer cells [J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*), 2023, 50(20): 1027-32.
- [13] GUO Q, WANG X Y, ZHAI Y C, et al. Oxaliplatin activates P53/miR-34a/survivin axis in inhibiting the progression of gastric cancer cells [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2024, 12(9): e70004.
- [14] GEISTER E, ARD D, PATEL H, et al. The role of Twist1 in chronic pancreatitis-associated pancreatic stellate cells [J]. *Am J Pathol*, 2024, 194(10): 1879-97.
- [15] KATO Y, FUKAZAWA T, TANIMOTO K, et al. Achaete-scute family bHLH transcription factor 2 activation promotes hepatoblastoma progression [J]. *Cancer Sci*, 2024, 115(3): 847-58.
- [16] PATEL D, THANKACHAN S, SREERAM S, et al. LncRNA-miRNA-mRNA regulatory axes as potential biomarkers in cervical cancer: a comprehensive overview [J]. *Mol Biol Rep*, 2025, 52(1): 110-9.
- [17] WAN N, LIU Q, SHI J, et al. LncRNA SNHG25 predicts poor prognosis and promotes progression in osteosarcoma via the miR-497-5p/SOX4 axis [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2024, 27(5): 725-44.
- [18] HE Y, XU S, QI Y, et al. Long noncoding RNA SNHG25 promotes the malignancy of endometrial cancer by sponging miRNA-497-5p and increasing FASN expression [J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14(1): 163-72.
- [19] YAN K, HU C, LIU C, et al. LncRNA CERS6-AS1, sponging miR-6838-5p, promotes proliferation and invasion in cervical carcinoma cells by upregulating FOXP2 [J]. *Histol Histopathol*, 2023, 38(7): 823-35.
- [20] ZHANG X, HUANG J, WANG J, et al. Circ_0001667 accelerates breast cancer proliferation and angiogenesis through regulating CXCL10 expression by sponging miR-6838-5p [J]. *Thorac Cancer*, 2023, 14(10): 881-92.
- [21] 魏鑫. miR-6838通过介导Rb通路促进膀胱癌生长和侵袭的能力及其机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2025.
- [22] CHEN L Q, YI C L, LIU D C, et al. Hsa_circ_0041103 induces proliferation, migration and invasion in bladder cancer via the miR-107/FOXK1 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(3): 1282-90.
- [23] LI J, HUANG S, ZHANG Y, et al. LINC00460 enhances bladder carcinoma cell proliferation and migration by modulating miR-612/FOXK1 axis [J]. *Pharmacology*, 2021, 106(1/2): 79-90.