

LncRNA NORAD调节miR-363-3p/BTG2轴 对前列腺癌细胞增殖、迁移的影响

胡寻 胡传清*

(黄石市第二医院泌尿外科, 黄石 435000)

摘要 本研究探究长链非编码RNA(lncRNA) NORAD调节miR-363-3p/B细胞易位基因2(BTG2)轴对前列腺癌(PC)细胞增殖、迁移和上皮-间质转化的影响。该研究收集2023年8月至2024年7月在黄石市第二医院行手术的PC患者的癌组织及其癌旁组织样本, 利用qRT-PCR检测lncRNA NORAD、miR-363-3p、BTG2在PC组织及细胞中的表达情况。Pearson相关分析用于分析基因表达之间的相关性, 将PC细胞(LNCaP)分为Blank组、sh-NC组、sh-NORAD组、sh-NORAD+inhibitor(抑制剂)-NC组、sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor组。MTT和平板克隆形成实验检测细胞增殖; 细胞划痕实验以及Transwell实验测定细胞迁移能力; Western blot检测BTG2和上皮-间质转化(EMT)标志蛋白的表达情况; 荧光素酶报告基因实验测定NORAD与miR-363-3p及miR-363-3p与BTG2的靶向关系。该研究得出PC组织中lncRNA NORAD和BTG2 mRNA表达量显著高于癌旁正常组织($P<0.05$), 而miR-363-3p的表达量显著低于癌旁正常组织($P<0.05$)。在腺泡腺癌组织中, lncRNA NORAD与miR-363-3p的表达呈负相关($r=-0.765$, $P<0.05$)。miR-363-3p与BTG2的表达呈负相关($r=-0.518$, $P<0.05$)。lncRNA NORAD与BTG2的表达呈正相关($r=0.649$, $P<0.05$)。与癌旁正常组织相比, PC患者癌组织腺泡结构被破坏, 细胞排列紊乱; 细胞形态异常, 细胞核增大且染色加深、形态不规则; 同时存在肿瘤细胞向间质浸润的现象, 伴随纤维组织增生。与sh-NC组比较, sh-NORAD组LNCaP细胞中lncRNA NORAD和BTG2 mRNA、细胞活力、细胞克隆数量、划痕愈合率、迁移细胞数、BTG2、N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平均降低, miR-363-3p和E-cadherin蛋白表达水平均升高($P<0.05$); sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor组细胞活力、细胞克隆数量、划痕愈合率、迁移细胞数、BTG2 mRNA以及BTG2、N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平显著高于sh-NORAD+inhibitor-NC组, lncRNA NORAD、miR-363-3p、E-cadherin蛋白表达水平显著低于sh-NORAD+inhibitor-NC组($P<0.05$)。lncRNA NORAD-WT或BTG2-WT和miR-363-3p mimics共转染后细胞相对荧光素酶相对活性均低于共转染miR-NC的细胞($P<0.05$)。该研究得出, miR-363-3p靶向抑制BTG2表达, lncRNA NORAD通过竞争性结合miR-363-3p, 促进PC细胞增殖、迁移和上皮-间质转化。

关键词 lncRNA NORAD; miR-363-3p/B细胞易位基因2; 前列腺癌; 增殖; 迁移

LncRNA NORAD Regulates the Effect of miR-363-3p/BTG2 on the Proliferation and Migration of Prostate Cancer Cells

HU Xun, HU Chuanqing*

(Department of Urology, Huangshi Second Hospital, Huangshi 435000, China)

收稿日期: 2025-06-10 接受日期: 2025-10-29

武汉市中医药科研项目(批准号: WZ24B67)资助的课题

*通信作者: Tel: 13177308761, E-mail: rr3tg3@163.com

Received: June 10, 2025

Accepted: October 29, 2025

This work was supported by the Wuhan Municipal Traditional Chinese Medicine Research Project (Grant No. WZ24B67)

*Corresponding author. Tel: +86-13177308761, E-mail: rr3tg3@163.com

Abstract This study investigated the role of lncRNA (long non-coding RNA) NORAD in regulating the miR-363-3p/BTG2 (B-cell translocation gene 2) axis and its impact on proliferation, migration, and EMT (epithelial-mesenchymal transition) in PC (prostate cancer) cells. Tumor tissues and adjacent non-tumor tissues were collected from PC patients who underwent surgical resection at the Second Hospital of Huangshi between August 2023 and July 2024. The expression levels of lncRNA NORAD, miR-363-3p, and *BTG2* in PC tissues and cells were measured by qRT-PCR (quantitative real-time PCR). Pearson correlation analysis was used to assess the relationships among gene expressions. LNCaP PC cells were divided into the following groups: Blank, sh-NC, sh-NORAD, sh-NORAD+inhibitor-NC, and sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor. Cell proliferation was evaluated using MTT and colony formation assays; cell migration was assessed via wound healing and Transwell assays; Western blot was performed to detect the protein levels of BTG2 and EMT markers; and dual-luciferase reporter assays were conducted to verify the targeting relationships between NORAD and miR-363-3p, as well as between miR-363-3p and BTG2. The results showed that the mRNA expression levels of lncRNA NORAD and *BTG2* were significantly higher in PC tissues than in adjacent normal tissues ($P<0.05$), whereas miR-363-3p expression was significantly lower ($P<0.05$). In acinar adenocarcinoma tissues, lncRNA NORAD expression was negatively correlated with miR-363-3p ($r=-0.765$, $P<0.05$); miR-363-3p expression was negatively correlated with BTG2 ($r=-0.518$, $P<0.05$); and lncRNA NORAD expression was positively correlated with BTG2 ($r=0.649$, $P<0.05$). Histopathological examination revealed that compared with adjacent normal tissues, PC tissues exhibited disrupted acinar architecture, disordered cellular arrangement, abnormal cell morphology, enlarged and hyperchromatic nuclei with irregular shapes, tumor cell infiltration into the stroma, and accompanying fibrous tissue proliferation. Compared with the sh-NC group, the sh-NORAD group showed significant downregulation of lncRNA NORAD, BTG2 mRNA, and proteins (BTG2, N-cadherin, and Vimentin). Concurrently, miR-363-3p expression and E-cadherin protein levels were upregulated. Functionally, cell viability, colony formation, wound healing, and cell migration were all significantly impaired (all $P<0.05$). In contrast, the sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor group showed significantly higher cell viability, colony numbers, wound healing rates, numbers of migrated cells, *BTG2* mRNA levels, and protein expression of BTG2, N-cadherin, and Vimentin compared with the sh-NORAD+inhibitor-NC group; conversely, lncRNA NORAD, miR-363-3p expression and E-cadherin protein levels were significantly lower (all $P<0.05$). Furthermore, co-transfection of either NORAD-WT or BTG2-WT with miR-363-3p mimics resulted in significantly lower relative luciferase activity compared to co-transfection with miR-NC ($P<0.05$). In conclusion, miR-363-3p directly targets and suppresses BTG2 expression, while lncRNA NORAD acts as a ceRNA (competing endogenous RNA) by sponging miR-363-3p, thereby promoting PC cell proliferation, migration, and EMT.

Keywords lncRNA NORAD; miR-363-3p/B-cell translocation gene 2; prostate cancer; proliferation; migration

前列腺癌(prostate cancer, PC)是影响男性健康的常见恶性肿瘤之一,也是导致全球男性死亡率增加的重要原因^[1]。PC患者表现为局部或晚期疾病,PC可用的治疗方法包括主动监测、化疗、放射疗法、激素疗法、手术和冷冻疗法。治疗方案需综合考量肿瘤的性质、前列腺特异抗原水平、分级和分期以及可能的复发等多方面因素^[2]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA) NORAD在癌症发生发展中至关重要,敲低lncRNA NORAD

可显著抑制甲状腺癌细胞系的增殖、迁移和侵袭^[3]。WANG等^[4]证实了lncRNA NORAD在非小细胞癌中表达上调,在晚期或伴有淋巴转移的患者病灶组织中表达水平显著升高,预后更差。微小RNA(microRNA, miRNA)也与肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭有关。研究发现,上调miR-363-3p对PC、结直肠癌等多种癌症具有肿瘤抑制作用,其在PC患者血清及癌组织中均显著下调^[5-6]。XU等^[7]研究发现lncRNA NORAD通过海绵化miR-363-3p,降低

其在细胞内的有效活性,解除miR-363-3p对靶基因PEAK1(pseudopodium-enriched atypical kinase 1)的表达抑制,导致PEAK1蛋白水平上调,而PEAK1可进一步激活ERK(extracellular regulated protein kinases)信号通路,促进非小细胞肺癌的发展。B细胞易位基因2(B-cell translocation gene 2, BTG2)是负责细胞分化、增殖、凋亡和其他细胞功能的肿瘤抑制因子。据报道,BTG2通过诱导肿瘤相关的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)而促进肺癌和PC发生发展^[8]。另有研究显示,BTG2是miR-363-3p结合的下游基因,过表达miR-363-3p可通过下调BTG2减弱膀胱癌细胞的迁移能力^[9]。基于以上研究背景,本实验探究lncRNA NORAD、miR-363-3p与BTG2在PC发生发展中的核心调控机制及功能作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2023年8月至2024年7月在黄石市第二医院泌尿外科行腹腔镜或开放性前列腺癌根治术治疗的PC患者术中切除的腺泡型腺癌组织(肿瘤细胞浸润密集且纯度≥80%的区域)及癌旁组织(距离癌组织边缘≥2 cm的前列腺组织,经病理证实无肿瘤细胞浸润)样本,共54例,平均体质量分数(22.65±2.52) kg/m²,平均年龄(68.57±10.25)岁,年龄≥70岁23例,年龄<70岁31例。所有纳入患者术前均接受经直肠超声引导下前列腺系统性穿刺活检,穿刺标本经病理确诊为PC腺癌后纳入研究。本研究经黄石市第二医院伦理审查委员会批准通过(批号: 2023-07419),所有PC患者均签署知情同意书。

1.2 细胞株和主要试剂

人PC细胞系LNCaP细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;苏木精-伊红(H&E)染色

试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;MTT检测试剂盒购自上海酶联生物有限公司;RPMI 1640培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司;Lipofectamine™ 2000转染试剂、Trizol试剂、miR-363-3p抑制剂(inhibitor)、sh-NORAD、miR-363-3p模拟物(mimics)及阴性对照购自美国ThermoFisher Scientific公司;PCR引物购自上海生工生物工程股份有限公司;逆转录试剂盒及实时荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;结晶紫购自美国Sigma公司;Transwell小室购自美国Corning公司;RIPA裂解缓冲液购自Solarbio Biotechnology公司;兔抗BTG2、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)和GAPDH购自英国Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量PCR 使用Trizol试剂分离组织及细胞总RNA,并根据制造商的说明使用含gDNA Eraser的PrimeScript RT试剂盒进行逆转录。然后,使用SYBR® Premix Ex Taq™ II实时PCR系统进行qPCR反应,具体程序为: 95 °C预变性2 min; 95 °C变性15 s, 61 °C退火/延伸20 s,共40次循环。以GAPDH和U6为内参,通过2^{-ΔΔCt}方法检测基因的相对表达,见表1。

1.3.2 双荧光素酶测定 构建NORAD-WT(野生型)或NORAD-MUT(突变型)报告基因质粒。利用Lipofectamine™ 2000转染试剂将NORAD-WT和NORAD-MUT分别与miR-NC和miR-363-3p模拟物共转染于LNCaP细胞中,转染48 h后评估荧光素酶的活性。

1.3.3 细胞培养及转染分组 将LNCaP细胞接种于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及100 μg/L链霉素的RPMI-1640培养基,置于37 °C、5% CO₂培养箱中常规培养。将生长至对数期的LNCaP细胞分为Blank组(空白对照组)、sh-NC组(转染阴性对照质粒)、sh-NORAD组(转染lncRNA NORAD的干扰

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
NORAD	TGA TAG GAT ACA TCT TGG ACA TGG A	AAC CTA ATG AAC AAG TCC TGA CAT ACA
miR-363-3p	AAT TGC ACG GTA TCC ATC TGT A	CTC AAC TGG TGT CGT GGA
BTG2	CATCATCAGCAGGGTGCC	CCC AAT GCG GTA GGA CAC
U6	ATA CAG AGA AAG TTA GCA CGG	GGA ATG CTT CAA AGA GTT GTG
GAPDH	GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT	GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG

质粒)、sh-NORAD+inhibitor-NC组(共转染lncRNA NORAD的干扰质粒和对miR-363-3p无抑制作用的对照物质)、sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor组(共转染lncRNA NORAD的干扰质粒和miR-363-3p的抑制物),除Blank组外,其余组细胞均利用Lipofectamine™ 2000转染试剂转染相应质粒,48 h后,按1.3.1方法检测各组细胞中lncRNA NORAD、miR-363-3p、BTG2 mRNA表达情况。

1.3.4 H&E染色 使用生理盐水清洗PC患者术中切除的PC组织及癌旁组织样本,并将其置于10%中性福尔马林溶液37℃固定24 h,依次经70%、80%、95%、100%乙醇梯度脱水,再经二甲苯透明,用石蜡包埋,凝固后切片(5 μm),进行H&E染色。

1.3.5 MTT检测细胞增殖情况 将LNCaP细胞以 2×10^3 /孔接种在96孔板中,24 h后按1.3.2进行转染处理,向每个孔中加入10 μL MTT(5 mg/mL),将96孔板置于37℃培养箱中孵育4 h。之后,弃去生长培养基,并引入150 μL DMSO来分散甲臞晶体。在ELX 800酶标仪上检测490 nm处的吸光度值。

1.3.6 平板克隆形成实验 将各转染组的LNCaP细胞在37℃、5% CO₂下培养10天。用多聚甲醛于室温固定30 min LNCaP细胞,结晶紫染液染色后进行计数,记录>50个细胞的克隆数。

1.3.7 细胞划痕实验 将LNCaP细胞以 5×10^5 /孔接种在6孔板中。在细胞接种之前,使用标记在孔板底部每0.5 cm画一条线,并在每个孔中画四条线。第二天,使用移液器吸头抵住尺子,在垂直于孔的位置划出划痕,拍照记录0 h划痕宽度。用PBS洗涤细胞,并向孔中加入培养基,在24 h后拍摄照片并测量划痕宽度,以计算划痕愈合率。

1.3.8 Transwell迁移实验 将每组 2×10^4 个LNCaP细胞重悬于200 mL无血清培养基,并将其接种在上腔室(8.0 mm 孔径)中,再将600 mL含10% FBS的适当培养基加入下腔室。将Transwell小室置于37℃、5% CO₂及饱和湿度培养箱中孵育24 h后,除去上腔室残留培养基。将下部贴壁细胞用预冷的4%聚甲醛于室温下固定15 min,再用0.1%结晶紫染色30 min。对迁移到上腔室背面的细胞进行了拍照。使用5个随机显微视野来评估LNCaP细胞迁移数量。所有检测均重复至少3次。

1.3.9 Western blot检测LNCaP细胞中BTG2及EMT相关蛋白表达情况 RIPA裂解缓冲液裂解每组

LNCaP细胞,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白质,然后将其转印到PVDF膜上,将膜与5%干燥的脱脂牛奶缓冲液室温下孵育1 h,然后将其在4℃下用抗BTG2(1:1 000)、N-cadherin(1:2 000)、E-cadherin(1:750)、Vimentin(1:2 000)和GAPDH(1:5 000)的一抗接种膜过夜,再将膜与特异性二抗(1:5 000)室温下孵育1 h。通过增强化学发光检测试剂检测膜中的蛋白质条带,并用ImageJ进行分析。

1.4 统计学分析

使用SPSS 19.0处理结果。数据显示为($\bar{x} \pm s$)。 t 检验分析两组数据间差异,多组间差异通过单因素方差分析进行检验,组间两两比较采用Tukey事后检验。Pearson相关分析用于分析基因表达之间的相关性, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA NORAD、miR-363-3p、BTG2在PC组织中的表达水平

与癌旁正常组织比较,PC患者腺泡腺癌组织中lncRNA NORAD和BTG2 mRNA表达量均增加,而miR-363-3p的表达量降低($P < 0.05$),见表2。Pearson相关分析结果显示,在腺泡腺癌组织中,lncRNA NORAD与miR-363-3p的表达呈负相关($r = -0.765$, $P < 0.05$)。

miR-363-3p与BTG2的表达呈负相关($r = -0.518$, $P < 0.05$)。lncRNA NORAD与BTG2的表达呈正相关($r = 0.649$, $P < 0.05$)。与癌旁正常组织相比,PC患者腺泡腺癌组织腺泡结构被破坏,细胞排列紊乱;细胞形态异常,细胞核增大且染色加深、形态不规则;同时存在肿瘤细胞向间质浸润的现象,伴随纤维组织增生,见图1。

2.2 miR-363-3p靶向lncRNA NORAD、BTG2

通过生物信息学预测到miR-363-3p和lncRNA NORAD、BTG2均存在靶向结合位点,miR-363-3p可以结合lncRNA NORAD和BTG2的3'UTR,见图2。双荧光素酶报告基因实验表明,lncRNA NORAD-WT或BTG2-WT和miR-363-3p mimics共转染后LNCaP细胞相对荧光素酶相对活性均显著降低($P < 0.05$),见表3。

2.3 各组LNCaP细胞中lncRNA NORAD、miR-363-3p和BTG2 mRNA表达情况

sh-NORAD组LNCaP细胞中lncRNA NORAD

表2 LncRNA NORAD、miR-363-3p、BTG2在PC组织中的表达水平
Table 2 Expression levels of lncRNA NORAD, miR-363-3p and BTG2 in PC tissues

组别 Group	LncRNA NORAD	miR-363-3p	BTG2
Non-tumor tissues	1.03±0.08	1.02±0.09	1.00±0.11
Pancreatic acinar cell carcinoma tissues	1.51±0.16*	0.43±0.04*	1.62±0.17*
<i>t</i>	19.718	44.021	22.501
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

$\bar{x}\pm s$, $n=54$ 。* $P<0.05$, 与癌旁正常组织比较。
 $\bar{x}\pm s$, $n=54$ 。* $P<0.05$ compared with non-tumor tissues.

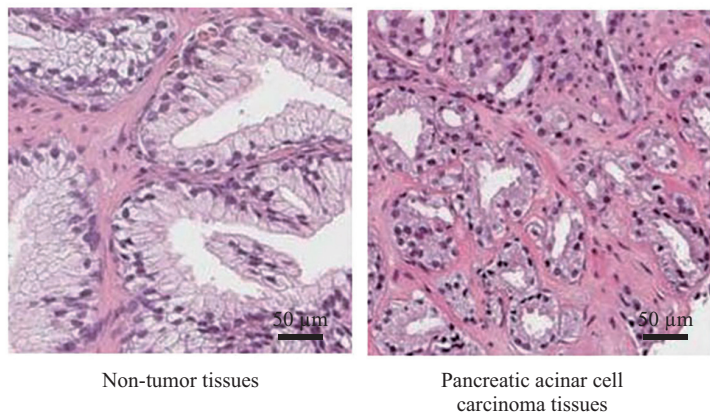
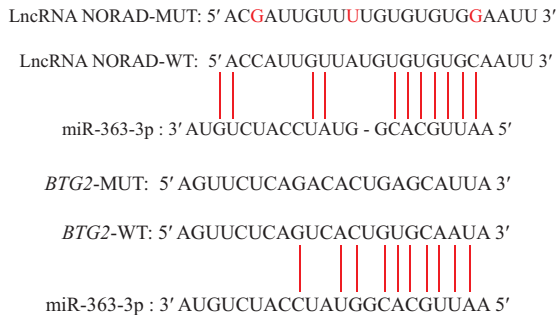


图1 H&E染色
Fig.1 H&E staining



标红字母表示野生型(WT)序列中与miR-363-3p互补结合的区域。
The red letters indicate the region in the WT (wild-type) sequence that complementary binds to miR-363-3p.

图2 LncRNA NORAD和BTG2在miR-363-3p中的结合位点
Fig.2 Binding sites of lncRNA NORAD and BTG2 within miR-363-3p

和BTG2 mRNA表达水平显著低于sh-NC组, miR-363-3p表达水平显著高于sh-NC组 ($P<0.05$)。sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor组细胞中BTG2 mRNA表达水平显著高于sh-NORAD+inhibitor-NC组, lncRNA NORAD和miR-363-3p表达水平显著低于sh-NORAD+inhibitor-NC组($P<0.05$), 见表4。

2.4 各组LNCaP细胞增殖情况

sh-NORAD组LNCaP细胞活力和克隆细胞数

显著低于sh-NC组 ($P<0.05$), sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor组细胞活力和克隆细胞数显著高于sh-NORAD+inhibitor-NC组($P<0.05$), 见图3和表5。

2.5 各组LNCaP细胞迁移情况

sh-NORAD组LNCaP细胞划痕愈合率和细胞迁移数量显著低于sh-NC组 ($P<0.05$), sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor组细胞划痕愈合率和细胞迁移数量显著高于sh-NORAD+inhibitor-NC组

表3 过表达miR-363-3p对转染细胞双荧光素酶活性的影响

Table 3 Effect of miR-363-3p overexpression on dual-luciferase activity in transfected cells

组别 Group	LncRNA NORAD-WT	LncRNA NORAD-MUT	BTG2-WT	BTG2-MUT
miR-NC	1.03±0.05	1.00±0.04	1.05±0.05	1.02±0.05
miR-363-3p mimics	0.46±0.05*	0.98±0.03	0.48±0.04*	0.97±0.04
<i>t</i>	19.745	0.980	21.805	1.913
<i>P</i>	0.000	0.350	0.000	0.085

$\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$, 与miR-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$ compared with miR-NC group.

表4 各组LNCaP细胞中lncRNA NORAD、miR-363-3p和BTG2 mRNA表达水平

Table 4 Expression levels of lncRNA NORAD, miR-363-3p and BTG2 mRNA in LNCaP cells across different treatment groups

组别 Group	LncRNA NORAD	miR-363-3p	BTG2
Blank group	1.28±0.11	0.48±0.05	0.65±0.06
sh-NC group	1.26±0.12	0.49±0.05	0.63±0.06
sh-NORAD group	0.49±0.05* [#]	0.82±0.08* [#]	0.51±0.05* [#]
sh-NORAD+inhibitor-NC group	0.51±0.05	0.80±0.07	0.50±0.04
sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor group	0.36±0.03 [@]	0.65±0.06 [@]	0.72±0.07 [@]
<i>F</i>	188.380	39.905	16.611
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

$\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$, 与Blank组比较; [#] $P<0.05$, 与sh-NC组比较; [@] $P<0.05$ 与sh-NORAD+inhibitor-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$ compared with Blank group; [#] $P<0.05$ compared with sh-NC group; [@] $P<0.05$ compared with sh-NORAD+inhibitor-NC group.

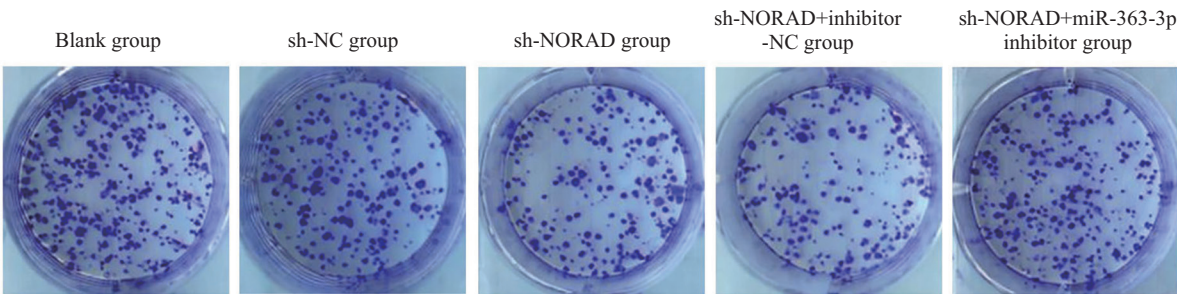


图3 平板克隆形成实验测定LNCaP细胞克隆形成数量

Fig. 3 Colony formation assay assessing the number of LNCaP cell colonies

($P<0.05$), 见图4、图5和表6。

2.6 各组LNCaP细胞中BTG2及EMT相关蛋白的表达情况

蛋白质印迹实验显示, sh-NORAD组 LNCaP 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平高于 sh-NC 组, BTG2、N-cadherin 和 Vimentin 表达水平均低于 sh-NC 组 ($P<0.05$)。sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor 组细胞中 BTG2、N-cadherin 和 Vimentin 表达水平均高于 sh-NORAD+inhibitor-NC 组, E-cadherin 表达水平低于 sh-NORAD+inhibitor-NC

组($P<0.05$), 见图6和表7。

3 讨论

在全球范围内, PC 是第二常见的癌症, 在北美和南美、欧洲、澳大利亚和加勒比地区的发病率最高, 是男性癌症相关死亡的最常见原因^[10]。当前, 各类治疗方案在控制肿瘤发生与进展方面效果欠佳, 且大多伴有显著副作用, 这极大地影响了多数患者的生活质量^[11]。前列腺内可出现多个肿瘤病灶, 且不同病灶间可能具有遗传差异^[12]。肿瘤转移是癌症

表5 各组LNCaP细胞细胞活力及克隆细胞数

Table 5 Cell viability and number of colonies in LNCaP cells among experimental groups

组别	细胞活力/%	克隆细胞数
Group	Cell viability /%	Number of colonies
Blank group	100.00±0.00	131.29±11.50
sh-NC group	96.21±9.29	129.67±12.70
sh-NORAD group	74.33±7.40 ^{*#}	82.36±9.15 ^{*#}
sh-NORAD+inhibitor-NC group	73.88±7.24	83.18±9.20
sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor group	87.36±9.40 [@]	113.86±12.22 [@]
<i>F</i>	15.555	28.464
<i>P</i>	0.000	0.000

$\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$, 与Blank组比较; # $P<0.05$, 与sh-NC组比较; @ $P<0.05$, 与sh-NORAD+inhibitor-NC组比较。

$\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$ compared with Blank group; # $P<0.05$ compared with sh-NC group; @ $P<0.05$ compared with sh-NORAD+inhibitor-NC group.

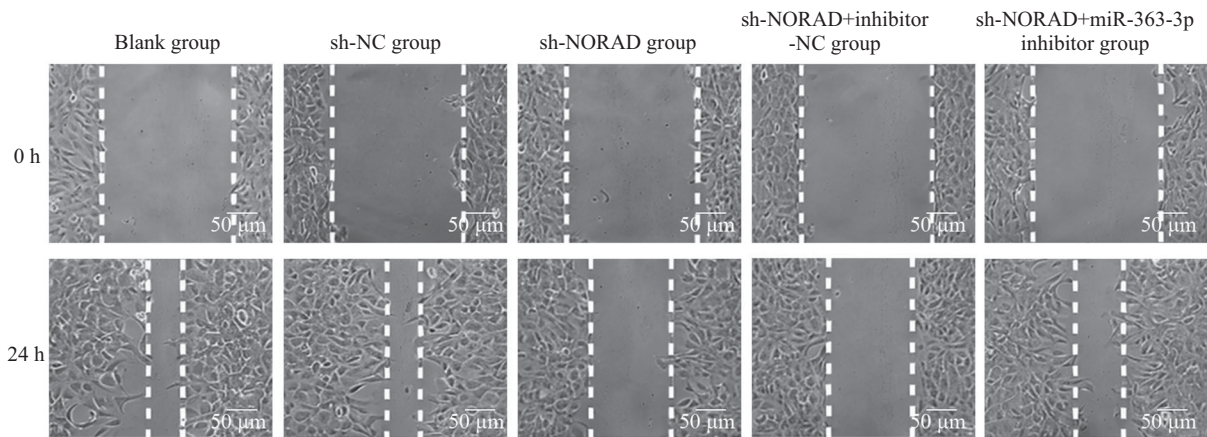


图4 伤口愈合试验测定LNCaP细胞划痕愈合率

Fig.4 Wound healing assay assessing the scratch closure rate of LNCaP cells

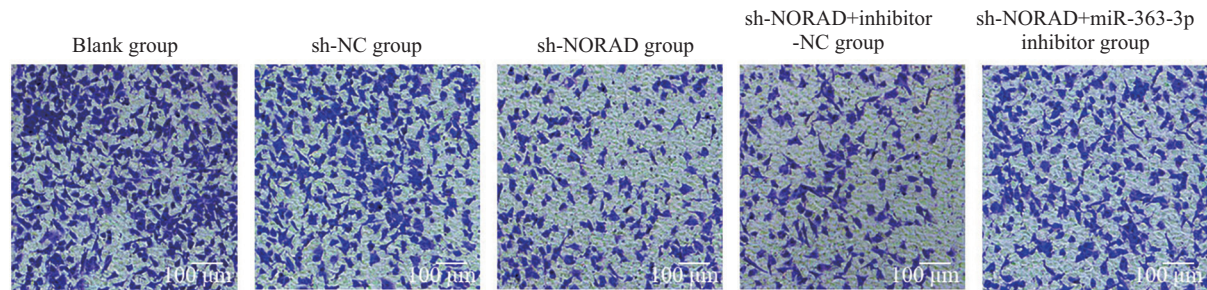


图5 Transwell小室实验测定LNCaP细胞迁移数量

Fig.5 Quantification of LNCaP cell migration using Transwell chambers

患者死亡的主要原因, 是一个多步骤过程, 涉及肿瘤细胞通过EMT等机制脱离原发灶、降解细胞外基质、侵袭周围组织, 并最终在远端器官定植和增殖。EMT的异常激活会导致癌症转移, 其典型表现为E-cadherin下调, 以及N-cadherin和Vimentin的上调^[13]。因此, 探索PC中与EMT通路相关的有效生物标志物

和潜在的分子机制对改善PC的治疗方案至关重要。

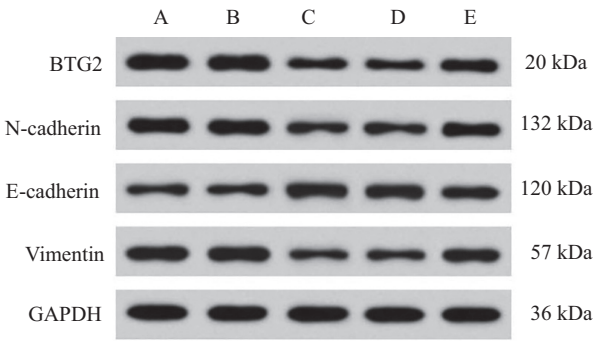
在过去十年间, 研究者逐步揭示lncRNA在人类癌症发病机制中发挥着重要调节作用, 是一类关键的调控因子^[14]。研究表明, lncRNA NORAD在非小细胞肺癌、乳腺癌、肝细胞癌等多种癌症中异常高表达, 可通过多种途径促进癌细胞迁移、侵袭和

表6 各组LNCaP细胞划痕愈合率和迁移数量

Table 6 Wound healing rate and migration numbers of LNCaP cells across different treatment groups

组别 Group	划痕愈合率/% Wound healing rate /%	细胞迁移数量 Number of migrated cells
Blank group	78.37±8.05	132.19±13.40
sh-NC group	77.14±7.96	130.80±11.77
sh-NORAD group	40.72±4.46* [#]	82.28±9.66* [#]
sh-NORAD+inhibitor-NC group	42.51±4.81	81.82±10.35
sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor group	65.63±7.24 [@]	113.50±11.12 [@]
<i>F</i>	44.834	28.987
<i>P</i>	0.000	0.000

$\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$, 与Blank组比较; [#] $P<0.05$, 与sh-NC组比较; [@] $P<0.05$ 与sh-NORAD+inhibitor-NC组比较。
 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$ compared with Blank group; [#] $P<0.05$ compared with sh-NC group; [@] $P<0.05$ compared with sh-NORAD+inhibitor-NC group.



A: Blank组; B: sh-NC组; C: sh-NORAD组; D: sh-NORAD+inhibitor-NC组; E: sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor组。
A: Blank group; B: sh-NC group; C: sh-NORAD group; D: sh-NORAD+inhibitor-NC group; E: sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor group.

图6 BTG2及EMT相关蛋白表达条带

Fig.6 Western blot analysis of BTG2 and EMT-related proteins

表7 BTG2及EMT标志蛋白的表达情况

Table 7 Expression of BTG2 and EMT marker proteins

组别 Group	N-cadherin/GAPDH	Vimentin/GAPDH	E-cadherin/GAPDH	BTG2/GAPDH
Blank group	0.99±0.09	0.98±0.08	0.65±0.06	0.88±0.08
sh-NC group	0.98±0.09	0.98±0.09	0.66±0.07	0.89±0.09
sh-NORAD group	0.69±0.07* [#]	0.62±0.06* [#]	0.90±0.08* [#]	0.51±0.05* [#]
sh-NORAD+inhibitor-NC group	0.68±0.06	0.64±0.07	0.91±0.09	0.52±0.06
sh-NORAD+miR-363-3p inhibitor group	0.84±0.08 [@]	0.87±0.09 [@]	0.75±0.07 [@]	0.77±0.08 [@]
<i>F</i>	21.733	30.405	17.022	39.144
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

$\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$, 与Blank组比较; [#] $P<0.05$, 与sh-NC组比较; [@] $P<0.05$ 与sh-NORAD+inhibitor-NC组比较。
 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$ compared with Blank group; [#] $P<0.05$ compared with sh-NC group; [@] $P<0.05$ compared with sh-NORAD+inhibitor-NC group.

增殖, 导致患者总生存率降低^[15-17]。最近的研究证实了lncRNA NORAD与PC之间存在关联, lncRNA NORAD可能在PC的发病机制中发挥致癌作用^[18]。本研究结果显示, 与癌旁正常组织相比, PC肿瘤组织中lncRNA NORAD表达水平显著上调, 而沉默In-

cRNA NORAD后, PC细胞增殖和迁移能力降低, E-cadherin表达水平升高, Vimentin和N-cadherin表达水平均降低。这提示lncRNA NORAD可促进PC细胞增殖、迁移及加快EMT进程, 在PC中作为促癌基因发挥作用。

众所周知, lncRNA通过与miRNA结合来调节靶mRNA的表达, 以调节细胞的生物学特性。miRNA是小的非编码RNA, 在调节转录后基因表达中起重要作用。不同的研究表明, miRNA参与细胞生长、细胞凋亡和分化等生物过程^[19]。多项研究已经证明miR-363-3p在各种癌症中异常表达, 例如, lncRNA HNF1A-AS1通过充当miR-363-3p海绵诱导MAP2K4上调以激活JNK信号通路, 从而促进胶质瘤细胞生长^[20]; lncRNA RNA NR2F1-AS1通过海绵miR-363-3p增加SOX4(SRY-box 4)来促进非小细胞肺癌细胞的致瘤行为^[21]。最近一项研究表明, miR-363-3p通过结合其靶基因的3'UTR来抑制蛋白质翻译或mRNA降解, 其异常表达与PC的发生有关^[7]; 且LI等^[8]研究证实了miR-363-3p与BTG2之间的靶向关系。BTG2属于抗增殖基因家族, 是一种早期生长反应基因, 通过调控转录与转录后等多个生物学步骤, 参与细胞增殖、凋亡和生长的调节^[22]。本研究结果发现, 与癌旁正常组织相比, PC患者癌组织腺泡结构被破坏, 细胞排列紊乱; 细胞形态异常, 肿瘤细胞向间质浸润, 纤维组织增生; 在腺泡腺癌组织中, miR-363-3p与BTG2的表达呈负相关, miR-363-3p水平显著降低, 而BTG2 mRNA水平显著上调。LncRNA NORAD与miR-363-3p的表达呈负相关, 与BTG2的表达呈正相关。沉默LncRNA NORAD后发现, PC细胞中的miR-363-3p水平上调, 而BTG2 mRNA及蛋白表达下调。由此推测, lncRNA NORAD可能靶向调控miR-363-3p/BTG2轴。为证实该推测, 本研究在PC细胞中同时干扰lncRNA NORAD和miR-363-3p表达, 结果证实miR-363-3p抑制剂消除了lncRNA NORAD沉默对PC细胞增殖和迁移的抑制作用。另外, 本研究运用荧光素酶报告基因实验, 进一步验证分子间的靶向互作关系。荧光素酶报告基因也证实了NORAD与miR-363-3p及miR-363-3p与BTG2之间均存在靶向关系, 这一结果表明沉默lncRNA NORAD对PC细胞增殖、迁移和EMT过程的抑制作用可能是通过靶向调控miR-363-3p/BTG2轴实现的。

综上所述, miR-363-3p靶向抑制BTG2表达, lncRNA NORAD通过竞争性结合miR-363-3p, 促进PC细胞增殖、迁移和加快EMT过程。本研究结果可能有助于更好地了解PC中lncRNA NORAD的调节机制, 从而为PC患者的治疗提供潜在的靶点。后续研究可着重在构建动物模型上发力, 进一步验证lncRNA NORAD在体内环境下对PC发展进程的影响。

深入剖析lncRNA NORAD、miR-363-3p、BTG2之间复杂的分子调控网络, 以及该通路与PC相关其他信号通路的串扰机制, 有助于全面揭示PC发病的分子机制。

参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] SEKHACHA M, RIET K, MOTLOUNG P, et al. Prostate cancer review: genetics, diagnosis, treatment options, and alternative approaches [J]. Molecules, 2022, 27(17): 5730-63.
- [3] SHI L, CONG Y Z, WANG Z J. LncRNA NORAD promotes thyroid carcinoma progression by targeting miR-451 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(20): 6187-95.
- [4] WANG C, WU D, HE M, et al. LncRNA NORAD accelerates the progression of non-small cell lung cancer via targeting miRNA-455/CDK14 axis [J]. Minerva Med, 2022, 113(5): 817-24.
- [5] MANOJ A, KALEEM AHMAD M, KUMAR M, et al. Comprehensive cataloging of miR-363 as a therapeutic & non-invasive biomarker of prostate cancer [J]. Indian J Med Res, 2024, 160(2): 236-45.
- [6] YANG W, YANG X, ZHANG Y, et al. MiR-363 restrain the proliferation, migration and invasion of colorectal carcinoma cell by targeting E2F3 [J]. J Cancer, 2023, 14(8): 1362-70.
- [7] GENG Q, LI Z, LI X, et al. LncRNA NORAD, sponging miR-363-3p, promotes invasion and EMT by upregulating PEAK1 and activating the ERK signaling pathway in NSCLC cells [J]. J Bioenerg Biomembr, 2021, 53(3): 321-32.
- [8] DAN HU Q, WANG H L, LIU J, et al. Btg2 promotes focal segmental glomerulosclerosis via smad3-dependent podocyte-mesenchymal transition [J]. Adv Sci, 2023, 10(32): e2304360-76.
- [9] LI P, YU Y, WANG X, et al. Biological functions of miR-363-3p/BTG2 in the metastasis of bladder cancer [J]. J BUON, 2021, 26(4): 1498-503.
- [10] BERGENGREN O, PEKALA KR, MATSOUKAS K, et al. 2022 Update on prostate cancer epidemiology and risk factors-a systematic review [J]. Eur Urol, 2023, 84(2): 191-206.
- [11] REBELLO RJ, OING C, KNUDSEN K E, et al. Prostate cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 9.
- [12] VIETRI MT, D'ELIA G, CALIENDO G, et al. Hereditary prostate cancer: genes related, target therapy and prevention [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3753-70.
- [13] BAKIR B, CHIARELLA A M, PITARRRESI J R, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis [J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(10): 764-76.
- [14] BHAT A A, AFZAL M, MOGLAD E, et al. LncRNAs as prognostic markers and therapeutic targets in cuproptosis-mediated cancer [J]. Clin Exp Med, 2024, 24(1): 226-50.
- [15] ZHAO Q, LI B, ZHANG X, et al. M2 macrophage-derived lncRNA NORAD in EVs promotes NSCLC progression via miR-520g-3p/SMIM22/GALE axis [J]. NPJ Precis Oncol, 2024, 8(1): 185-99.
- [16] CAPELA A M, TAVARES-MARCOS C, ESTIMA-AREDE H

- F, et al. NORAD-regulated signaling pathways in breast cancer progression [J]. *Cancers*, 2024, 16(3): 636-57.
- [17] TIAN Q, YAN X, YANG L, et al. LncRNA NORAD promotes hepatocellular carcinoma progression via regulating miR-144-3p/SEPT2 [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5): 2257-66.
- [18] ZHANG Y, LI Y. Long non-coding RNA NORAD contributes to the proliferation, invasion and EMT progression of prostate cancer via the miR-30a-5p/RAB11A/WNT/ β -catenin pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 571-85.
- [19] KHAN M M, SHARMA V, SERAJUDDIN M. Emerging role of miRNA in prostate cancer: a future era of diagnostic and therapeutics [J]. *Gene*, 2023, 888: 147761-80.
- [20] BI Y, MAO Y, SU Z, et al. Long noncoding RNA HNF1A-AS1 regulates proliferation and apoptosis of glioma through activation of the JNK signaling pathway via miR-363-3p/MAP2K4 [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(2): 1068-82.
- [21] JIN L, CHEN C, HUANG L, et al. Long noncoding RNA NR2F1-AS1 stimulates the tumorigenic behavior of non-small cell lung cancer cells by sponging miR-363-3p to increase SOX4 [J]. *Open Med*, 2021, 17(1): 87-95.
- [22] KIM S H, JUNG I R, HWANG S S. Emerging role of anti-proliferative protein BTG1 and BTG2 [J]. *BMB Rep*, 2022, 55(8): 380-88.