

LncRNA NNT-AS1 通过调控 miR-582-5p/NCKAP1 轴激活 Hippo-YAP/TAZ 信号通路促进膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭和干细胞干性影响

郎海雷, 曹雷涛, 贵英斌, 张天禹 (定州市人民医院, 河北定州 073000)

摘要: 目的 检测膀胱癌中长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 烟酰胺核苷酸转氢酶反义 RNA1 (nicotinamide nucleotide transhydrogenase antisense RNA 1, NNT-AS1) 表达情况, 研究其对膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭及肿瘤干细胞干性的影响及可能分子机制。方法 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 法检测膀胱癌组织标本及细胞中 LncRNA NNT-AS1 表达情况; 将膀胱癌细胞转染分为 sh-NC 组, sh-NNT-AS1 组, sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组和 sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 组。采用 CCK-8 法检测细胞增殖吸光度值 (*A* 值); Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭穿膜数; 细胞成球实验检测干细胞干性。检索 starBase 和 TargetScan 数据库, 并通过双荧光素酶报告基因实验预测验证 LncRNA NNT-AS1 和 miR-582-5p, miR-582-5p 与 NCKAP1 的靶向结合关系。Western blot 检测膀胱癌干细胞标志蛋白 (CD44, ALDH1A1, Oct4, Nanog) 及 Hippo-YAP/TAZ 信号通路相关蛋白表达灰度值。结果 与癌旁组织相比, 膀胱癌组织中 LncRNA NNT-AS1 表达水平 (0.34 ± 0.07 vs 1.15 ± 0.21) 明显升高, 差异有统计学意义 ($t=16.364$, $P < 0.001$)。与人正常膀胱上皮 SV-HUC-1 细胞 (1.00 ± 0.01) 相比, 膀胱癌细胞 T24, 5637, UM-UC-3 和 TCC-SUP 中 LncRNA NNT-AS1 表达 (6.03 ± 0.17 , 4.66 ± 0.36 , 5.47 ± 0.26 , 3.02 ± 0.20) 明显升高, 差异有统计学意义 ($t=17.472 \sim 51.160$, 均 $P < 0.001$)。与 sh-NC 组相比, 在 24, 48 和 72 h 时 sh-NNT-AS1 组细胞增值能力 (*A* 值) 均显著降低 (0.80 ± 0.01 vs 1.07 ± 0.06 , 1.18 ± 0.07 vs 1.83 ± 0.03 , 1.89 ± 0.07 vs 2.53 ± 0.06), 差异有统计学意义 ($t=7.688$, 14.783 , 12.024 , 均 $P < 0.05$); sh-NNT-AS1 组细胞迁移穿膜数 (55.00 ± 2.65 个 vs 354.30 ± 7.84 个)、细胞侵袭穿膜数 (45.67 ± 2.33 个 vs 303.00 ± 9.07 个) 及膀胱癌干细胞成球数 (20.85 ± 2.17 个 vs 41.35 ± 3.67 个) 显著降低, 差异具有统计学意义 ($t=-62.641$, -47.596 , 8.328 , 均 $P < 0.001$)。与 sh-NC 组相比, sh-NNT-AS1 组细胞中 CD44 (0.04 ± 0.01 vs 1.12 ± 0.02), ALDH1A1 (0.23 ± 0.01 vs 1.16 ± 0.05), Oct4 (0.17 ± 0.02 vs 1.10 ± 0.04), Nanog (0.49 ± 0.03 vs 1.24 ± 0.03) 的蛋白表达灰度值显著降低, 差异具有统计学意义 ($t=83.656$, 31.591 , 36.019 , 30.619 , 均 $P < 0.001$)。与 si-NC 组相比, sh-NNT-AS1 组 CD44+CD133+ 细胞比例 ($9.30\% \pm 0.79\%$ vs $88.50\% \pm 2.77\%$) 明显降低, 差异有统计学意义 ($t=-47.624$, $P < 0.001$)。双荧光素酶报告基因检测结果显示 miR-582-5p 为 LncRNA NNT-AS1 靶基因, NCKAP1 为 miR-582-5p 靶基因; LncRNA NNT-AS1 靶向调控 miR-582-5p/NCKAP1 轴。与 sh-NNT-AS1 组相比, 在 24, 48, 72 h 时 sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组细胞增值能力 (*A* 值) 均明显升高 (0.98 ± 0.03 vs 0.73 ± 0.06 , 1.74 ± 0.04 vs 1.22 ± 0.05 , 2.33 ± 0.16 vs 1.69 ± 0.14), 差异有统计学意义 ($t=5.977 \sim 11.628$, 均 $P < 0.001$)。与 sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组相比, 在 24, 48, 72 h 时 sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 组细胞增值能力 (*A* 值) 显著降低 (0.69 ± 0.04 , 1.01 ± 0.07 , 1.39 ± 0.08), 差异有统计学意义 ($t=7.877 \sim 16.323$, 均 $P < 0.001$)。与 sh-NNT-AS1 组相比, sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组细胞迁移穿膜数 (322.31 ± 28.45 个 vs 81.42 ± 13.22 个)、细胞侵袭穿膜数 (316.07 ± 30.21 个 vs 92.13 ± 12.65 个) 及膀胱癌干细胞成球数 (38.55 ± 2.20 个 vs 18.98 ± 1.16 个) 显著增加, 差异具有统计学意义 ($t=15.115$, 13.158 , 14.592 , 均 $P < 0.001$)。与 sh-NNT-AS1 组相比, sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组细胞 CD44 (1.05 ± 0.08 vs 0.10 ± 0.01), ALDH1A1 (1.20 ± 0.16 vs 0.22 ± 0.02), Oct4 (1.32 ± 0.14 vs 0.19 ± 0.03), Nanog (0.97 ± 0.12 vs 0.15 ± 0.04), YAP (1.29 ± 0.11 vs 0.42 ± 0.07) 和 TAZ (1.41 ± 0.16 vs 0.35 ± 0.05) 蛋白表达灰度值均显著增加, 差异具有统计学意义 ($t=10.650 \sim 21.243$, 均 $P < 0.001$)。与 sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组相比, sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 组细胞迁移穿膜数 (65.33 ± 12.60 个)、细胞侵袭穿膜数 (71.08 ± 15.19 个)、膀胱癌干细胞成球数 (11.36 ± 1.05 个) 均显著降低, 差异具有统计学意义 ($t=16.125$, 14.395 , 21.365 , 均 $P < 0.001$)。与 sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组相比, sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 组细胞 CD44 (0.25 ± 0.05), ALDH1A1 (0.61 ± 0.11), Oct4 (0.22 ± 0.08), Nanog (0.44 ± 0.07), YAP (0.25 ± 0.09) 和 TAZ (0.30 ± 0.04) 蛋白表达灰度值显著降低, 差异具有统计学意义 ($t=6.412 \sim 17.889$, 均 $P < 0.001$)。结论 膀胱癌中 LncRNA NNT-AS1 表达上调, 其对膀胱癌细胞增殖、侵袭及肿瘤干细胞干性的影响, 可能是通过调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴, 激活 Hippo-YAP/TAZ 信号通路完成。

基金项目: 2019 年河北省科技计划项目 (H2019-0638): LncRNA NNT-AS1 促进膀胱癌进展和肿瘤干细胞干性的作用机制研究。

作者简介: 郎海雷 (1982-), 男, 本科, 主治医师, 研究方向: 恶性肿瘤, E-mail: weqwss25@163.com, 电话: 15033728766。

关键词: 膀胱癌; 长链非编码核糖核酸烟酰胺核苷酸转氢酶反义 RNA 1; miR-582-5p/NCKAP1; Hippo-YAP/TAZ 通路; 增殖; 迁移; 侵袭; 肿瘤干细胞干性

中图分类号: R737.14; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 04-028-08

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.04.005

LncRNA NNT-AS1 Activates Hippo-YAP/TAZ Signaling Pathway by Regulating miR-582-5p/NCKAP1 Axis to Promote Bladder Cancer Cell Proliferation, Migration, Invasion and Stem Cell Stemness Effects

LANG Hailei, CAO Leitao, GUI Yingbin, ZHANG Tianyu (Dingzhou People's Hospital, Hebei Dingzhou 073000, China)

Abstract: Objective To detect the expression of long non coding RNA (LncRNA) nicotinamide nucleotide transhydrogenase antisense RNA1 (NNT-AS1) in bladder cancer, and investigate its effect on the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells and the stemness of tumor stem cells and its possible molecular mechanism. **Methods** LncRNA NNT-AS1 expression in bladder cancer tissues and cells was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Bladder cancer cells were transfected into sh-NC group, sh-NNT-AS1 group, sh-NNT-AS1+inh-582-5p group and sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 group. Cell proliferation absorbance (*A* value) was detected by CCK-8 method. Transwell assay was used to detect cell migration and invasion through membrane. The number of cell pellet formation was measured by tumor stem cell pellet formation assay. The starBase and TargetScan databases were searched, and the targeted binding relationship between LncRNA NNT-AS1 and miR-582-5p, miR-582-5p and NCKAP1 was predicted and verified by double luciferase reporter gene experiment. Western blot analysis was performed to detect the expression gray values of marker proteins (CD44, ALDH1A1, Oct4, Nanog) and Hippo-YAP/TAZ signaling pathways. **Results** LncRNA NNT-AS1 expression in bladder cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues (0.34 ± 0.07 vs 1.15 ± 0.21), and the difference was statistically significant ($t=16.364$, $P < 0.001$). LncRNA NNT-AS1 expression in bladder cancer cells T24, 5637, UM-UC-3 and TCC-SUP (6.03 ± 0.17 , 4.66 ± 0.36 , 5.47 ± 0.26 , 3.02 ± 0.20) were significantly higher than that in normal human bladder epithelial SV-HUC-1 cells (1.00 ± 0.01), and the differences were statistically significant ($t=17.472\sim 51.160$, all $P < 0.001$). Compared with sh-NC group, cell *A* value in sh-NNT-AS1 group (0.80 ± 0.01 vs 1.07 ± 0.06 , 1.18 ± 0.07 vs 1.83 ± 0.03 , 1.89 ± 0.07 vs 2.53 ± 0.06) was significantly decreased at 24, 48 and 72 h, and the differences were statistically significant ($t=7.688$, 14.783 , 12.024 , all $P < 0.05$). Compared with sh-NC group, the number of cell migration through the membrane (55.00 ± 2.65 vs 354.30 ± 7.84), the number of cell invasions through the membrane (45.67 ± 2.33 vs 303.00 ± 9.07), and the number of bladder cancer stem cells bulging (20.85 ± 2.17 vs 41.35 ± 3.67) were significantly reduced in sh-NNT-AS1 group ($t=-62.641$, -47.596 , 8.328 , all $P < 0.001$). Compared with sh-NC group, the expression gray values of CD44 (0.04 ± 0.01 vs 1.12 ± 0.02), ALDH1A1 (0.23 ± 0.01 vs 1.16 ± 0.05), Oct4 (0.17 ± 0.02 vs 1.10 ± 0.04) and Nanog (0.49 ± 0.03 vs 1.24 ± 0.03) protein in sh-NNT-AS1 group were significantly decreased, and the differences were statistically significant ($t=83.656$, 31.591 , 36.019 , 30.619 , all $P < 0.001$). Compared with si-NC group, the proportion of CD44+CD133+ cells in sh-NNT-AS1 group was significantly decreased ($9.30\% \pm 0.79\%$ vs $88.50\% \pm 2.77\%$), and the difference was statistically significant ($t=-47.624$, $P < 0.001$). The results of double luciferase reporter gene detection showed that miR-582-5p was the target gene of LncRNA NNT-AS1, and NCKAP1 was the target gene of miR-582-5p. LncRNA NNT-AS1 targets miR-582-5p/NCKAP1 axis. Compared with sh-NNT-AS1 group, cell *A* value in sh-NNT-AS1+inh-582-5p group (0.98 ± 0.03 vs 0.73 ± 0.06 , 1.74 ± 0.04 vs 1.22 ± 0.05 , 2.33 ± 0.16 vs 1.69 ± 0.14) was significantly increased at 24, 48 and 72 h, and the differences were statistically significant ($t=5.977\sim 11.628$, all $P < 0.001$). Compared with sh-NNT-AS1+inh-582-5p group, cell *A* value in sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 group (0.69 ± 0.04 , 1.01 ± 0.07 , 1.39 ± 0.08) was significantly decreased at 24, 48 and 72h, and the differences were statistically significant ($t=7.877\sim 16.323$, all $P < 0.001$). Compared with the sh-NNT-AS1 group, the number of cell migration through the membrane (322.31 ± 28.45 vs 81.42 ± 13.22), the number of cell invasion through the membrane (316.07 ± 30.21 vs 92.13 ± 12.65), and the number of bladder cancer stem cells forming balls (38.55 ± 2.20 vs 18.98 ± 1.16) in the sh-NNT-AS1+inh-582-5p group were significantly increased ($t=15.115$, 13.158 , 14.592 , $P < 0.001$). Compared with sh-NNT-AS1 group, the expression gray values of CD44 (1.05 ± 0.08 vs 0.10 ± 0.01), ALDH1A1 (1.20 ± 0.16 vs 0.22 ± 0.02), Oct4 (1.32 ± 0.14 vs 0.19 ± 0.03), Nanog (0.97 ± 0.12 vs 0.15 ± 0.04), YAP (1.29 ± 0.11 vs 0.42 ± 0.07) and TAZ (1.41 ± 0.16 vs 0.35 ± 0.05) protein in sh-NNT-AS1+inh-582-5p group were significantly increased, and the differences were statistically significant ($t=10.650\sim 21.243$, all $P < 0.001$). Compared with the sh-NNT-AS1+inh-582-5p

group, the number of cell migration through the membrane (65.33 ± 12.60), the number of cell invasion through the membrane (71.08 ± 15.19), and bladder cancer stem cell spherulation number (11.36 ± 1.05) of the sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 group were significantly reduced ($t=16.125, 14.395, 21.365$, all $P < 0.001$). Compared with sh-NNT-AS1+inh-582-5p group, the expression gray values of CD44 (0.25 ± 0.05), ALDH1A1 (0.61 ± 0.11), Oct4 (0.22 ± 0.08), Nanog (0.44 ± 0.07), YAP (0.25 ± 0.09) and TAZ (0.30 ± 0.04) protein in sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 group were significantly increased, and the differences were statistically significant ($t=6.412\sim 17.889$, all $P < 0.001$). **Conclusion** The expression of LncRNA NNT-AS1 was up-regulated in bladder cancer, and its influence on the proliferation and invasion of bladder cancer cells and the stemness of tumor stem cells may be achieved through the activation of Hippo-YAP/TAZ signaling pathway by regulating the molecular axis of miR-582-5p/NCKAP1.

Keywords: bladder cancer; LncRNA NNT-AS1; miR-582-5p/NCKAP1; Hippo-YAP/TAZ pathway; proliferation; migration; invasion; tumor stem cell stemness

膀胱癌是常见的泌尿系统恶性肿瘤,起源于膀胱上皮黏膜组织,多发病于男性,近年来其发病逐渐趋于年轻化且发病率不断上升,临床治疗后易发生转移和复发,患者预后较差^[1-3]。因此探究膀胱癌发病机制,找寻新的生物分子标志物,具有重要临床意义。长链非编码核糖核酸(long non-coding RNA, LncRNA)是一类长度大于200 bp的非编码RNA,研究发现,LncRNAs可调控肿瘤细胞中多种原癌和抑癌基因的表达,影响肿瘤的血管新生、免疫逃逸及细胞干性等,与肿瘤的生长和转移关系密切^[4-6]。在膀胱癌中也曾发现,LncRNA CASC11通过miRNA-150促进癌细胞的增殖^[7];LncRNA GClncl通过激活MYC进而促进膀胱癌的侵袭能力^[8]。LncRNA NNT-AS1是近年发现在肿瘤中高表达的一类LncRNA,研究证实其异常高表达在人类多种肿瘤的恶性进展中均扮演重要角色,参与了肿瘤的发生发展^[9-10]。本研究课题组前期探究也发现,LncRNA NNT-AS1在膀胱癌中亦存在高表达,但其发挥作用的调控机制尚不明确。因此本研究探究了LncRNA NNT-AS1对膀胱癌细胞增殖、转移及肿瘤干细胞干性的影响,并分析LncRNA NNT-AS1可能发挥作用的分子机制,以期对膀胱癌发病机制研究提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择人正常膀胱上皮细胞SV-HUC-1和膀胱癌细胞T24,UM-UC-3,5637和TCC-SUP均购自美国ATCC细胞库。另选取本院收治行手术治疗的膀胱癌患者的癌组织及对应癌旁组织标本20例,均经病理诊断确诊,患者术前未接受放化疗、免疫治疗等任何抗肿瘤治疗,未并发其他恶性肿瘤,研究获得医院伦理委员会审批通过。

1.2 仪器与试剂 逆转录试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);双荧光素酶检测试剂盒(美国GeneCopoeia公司);qRT-PCR仪和Lipofectamine™2000试剂盒(赛默飞公司);CCK-8试剂盒(美国Promega公司);乙醛脱氢酶1A1(Acetaldehyde de-

hydrogenase 1A1, ALDH1A1,批号36673),CD44(批号37295),Nanog(批号8823),八聚体结合转录因子4(Octamerbinding protein 4, Oct4,批号2751),CD133(批号64362),NCKAP1(批号34327),PDZ结合域转录共刺激因子(Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif,TAZ(批号83696),Yes相关蛋白(Yes-Associated Protein, YAP,批号14076),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH,批号5173)抗体及山羊抗兔IgG二抗(批号4427)购自美国Abcam公司;qRT-PCR反应引物序列由上海生工生物设计合成。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养:人正常膀胱上皮细胞SV-HUC-1培养于DMEM/F12培养液中,人膀胱癌细胞T24,5637,UM-UC-3和TCC-SUP培养于RPMI-1640培养液中,37℃常规培养至汇合率达80%时进行传代。

1.3.2 膀胱癌干细胞的分离、培养和鉴定:取生长状态良好的T24细胞,消化后用5 ml无血清DMEM/F12培养液[含0.2 mg/ml B27溶液1 ml,5 μg/ml胰岛素0.5 ml,20 ng/ml碱性成纤维细胞生长因子3 ml,20 ng/ml表皮细胞生长因子10 μl]培养,后将细胞置于低吸附的培养皿中,每孔 5×10^3 个,隔天更换培养液,待细胞形成体积较大的悬浮球体时进行传代。

1.3.3 细胞转染与分组:收集对数生长期T24细胞,胰酶消化,以 5×10^5 孔接种于6孔板,待细胞生长融合至80%时进行转染,根据Lipofectamine™2000试剂盒说明书将NNT-AS1 shRNA Negative Control, NNT-AS1 shRNA, NNT-AS1 shRNA+miR-582-5p inhibitor, sh-NNT-AS1+miR-582-5p inhibitor+NCKAP1 siRNA分别转染至T24细胞,分别设为sh-NC组、sh-NNT-AS1组、sh-NNT-AS1+inh-582-5p组和sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1组,培养箱中孵育8 h,然后更换为新鲜DMEM完全培养液。

1.3.4 qRT-PCR实验检测膀胱癌中LncRNA NNT-

AS1, miR-582-5p 和 NCKAP1 表达水平: 使用 Trizol 法提取细胞及膀胱癌组织中总 RNA, 逆转录为 cDNA, 配置 PCR 反应体系, 进行 qRT-PCR 反应。引物序列如下, LncRNA NNT-AS1: 上游引物: 5'-AGTTGCACGAACTTAGTTGA-3', 下游引物: 5'-AGCTTATGCGACGAATCAC; miR-582-5p: 上游引物: 5'-GCCGTTAGACTTGTTGAAG-3'; 下游引物: 5'-CTGAATCGCTCTGCTCGA-3'; U6: 上游引物: 5'-CTGGCTTGCAGACCAGA-3', 下游引物: 5'-AAGCCTTGAAGCATTAGGCT-3'; GAPDH: 上游引物: 5'-ACAACCGTGCCTGATTTC-3', 下游引物: 5'-AGCCTTCATGCACAGTGTTTC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.3.5 CCK-8 检测膀胱癌细胞增殖能力: 取转染后的各组待测细胞制成细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔 2×10^5 /ml, 每组设 3 个复孔, 分别培养 0, 24, 48 和 72 h, 每孔加入 CCK-8 溶液 $10 \mu\text{l}$, 避光孵育 2 h, 酶标仪 450 nm 处检测各孔吸光度值 (A 值)。

1.3.6 Transwell 检测膀胱癌细胞迁移和侵袭能力: 将 $50 \mu\text{l}$ 的 Matrigel 胶铺于小室上室, 取转染后的各组细胞用无血清 RPMI-1640 培养液稀释为 1×10^4 /ml, 上室中加入 $200 \mu\text{l}$, 下室加入 $600 \mu\text{l}$ 含胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 培养 72 h, 取出小室, 擦去小室内未迁移的细胞, 无水甲醛固定 20 min, 后用结晶紫进行染色, 清洗晾干, 镜下观察、拍照、计数细胞穿膜数。细胞迁移检测不用 Matrigel 胶铺小室, 其他步骤与侵袭检测一致。

1.3.7 干细胞成球实验检测膀胱癌干细胞成球能力: 将分离培养的膀胱癌干细胞用 DMEM/F12 空白培养液重悬, 浓度 5×10^3 /ml, 接种于低吸附性 24 孔板, 每孔加入 $600 \mu\text{l}$ 悬液, 培养箱中继续培养, 每周更换一次培养液, 镜下观察拍照, 记录细胞成球能力。

1.3.8 流式细胞术检测 CD44+CD133+ 细胞比例: 取膀胱癌干细胞将其制成细胞悬液, 每管加入 1×10^6 个细胞, 加入 CD44 和 CD133 抗体以及同型对照抗体, 4°C 避光孵育 25 min, 流式细胞仪上机检测。

1.3.9 LncRNA NNT-AS1 靶基因预测分析及验证: 分别检索 starBase 和 TargetScan 数据库预测 LncRNA NNT-AS1 靶向结合位点基因 (miR-582-5p) 及 miR-582-5p 靶向结合位点基因 (NCKAP1)。构建包含 miR-582-5p 结合位点在内的 NNT-AS1 WT 和 NNT-AS1 MUT 质粒及 NCKAP1 WT 和 NCKAP1 MUT 质粒; 利用 LipofectamineTM 2000 转染试剂盒将所构建的质粒分别与 miR-582-5p mimic 和 miR-NC 转染至 T24 细胞; 双荧光素酶基因检测试剂盒

检测各组细胞荧光强度, 验证 LncRNA NNT-AS1 和 miR-582-5p, miR-582-5p 和 NCKAP1 的靶向关系。

1.3.10 Western blot 检测 CD44, Oct4, ALDH1A1, Nanog 及 NCKAP1, YAP, TAZ 蛋白表达: 取转染后各组待测细胞, 加入细胞裂解液提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取蛋白样品 $20 \mu\text{g}$ 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离出蛋白, 转移至聚偏二氟乙烯膜, 封闭 2 h, 加入 CD44, Oct4, ALDH1A1, Nanog, NCKAP1, YAP 和 TAZ 一抗 (1:1 000), 4°C 孵育过夜, 次日加入二抗 (1:2 000), 室温孵育 1 h, 显影, 拍照, Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 分析数据, 所有实验重复三次取平均值。采用 K-S 法进行检验, 实验数据符合正态分布, 故采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用独立 t 检验分析两组间数据差异; 单因素方差分析多组间数据差异, LSD 检验行组间两两比较; 配对 t 检验分析膀胱癌组织及癌旁组织中表达差异; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌组织及细胞中 LncRNA NNT-AS1 表达情况 结果显示, 膀胱癌组织 T24, UM-UC-3, 5637 和 TCC-SUP 中 LncRNA NNT-AS1 表达水平分别为 6.03 ± 0.17 , 5.47 ± 0.26 , 4.66 ± 0.36 和 3.02 ± 0.20 , 明显高于人正常膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 表达的 1.00 ± 0.01 , 差异具有统计学意义 ($t=17.472\sim 51.160$, 均 $P < 0.001$)。膀胱癌组织中 LncRNA NNT-AS1 表达水平明显高于癌旁组织 (1.15 ± 0.21 vs 0.34 ± 0.07), 差异有统计学意义 ($t=16.364$, $P < 0.001$), 提示膀胱癌中 LncRNA NNT-AS1 显著高表达, 选取表达升高最为明显的 T24 细胞进行后续研究。

2.2 膀胱癌干细胞体外培养结果 干细胞成球实验显示, DMEM/F12 空白培养液诱导的膀胱癌细胞可形成微球, 见图 1A。Western blot 检测显示, 相比 RPMI-1640 组, DMEM/F12 组膀胱癌干细胞表达标志蛋白 CD44, Oct4, ALDH1A1 和 Nanog 表达灰度值明显增高, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 见图 1B 和表 1。流式细胞术检测发现, DMEM/F12 组细胞中 CD44+CD133+ 细胞比例明显高于 RPMI-1640 组 ($80.80\% \pm 1.90\%$ vs $15.30\% \pm 1.02\%$), 差异有统计学意义 ($t=52.609$, $P < 0.001$), 提示膀胱癌干细胞培养成功。

2.3 抑制 LncRNA NNT-AS1 对膀胱癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响 qRT-PCR 检测显示, sh-NNT-AS1 组细胞中 LncRNA NNT-AS1 表达水平较 sh-NC 组明显降低 (0.29 ± 0.07 vs 1.00 ± 0.02), 差异有统计学意义 ($t=-16.892$, $P < 0.001$), 提示抑制

LncRNA NNT-AS1 表达的细胞系构建成功。CCK-8 法检测显示, sh-NNT-AS1 组细胞 A 值在 24, 48 和 72 h 时均较 sh-NC 组显著降低, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 见表 2。Transwell 实验检测显示, sh-NNT-AS1 组细胞迁移穿膜数 (55.00 ± 2.65 个 vs

354.30 ± 7.84 个) 和细胞侵袭穿膜数 (45.67 ± 2.33 个 vs 303.00 ± 9.07 个) 较 sh-NC 组明显降低, 差异有统计学意义 ($t = -62.641, -47.596$, 均 $P < 0.001$), 见图 2。提示抑制 LncRNA NNT-AS1 表达可明显抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

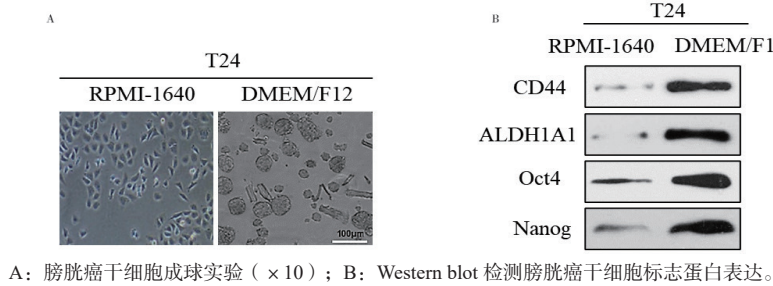


图 1 膀胱癌干细胞培养及鉴定结果

表 1 膀胱癌干细胞标志蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	RPMI-1640 组	DMEM/F12 组	t 值	P 值
CD44	0.11 ± 0.02	1.04 ± 0.03	-44.676	< 0.001
ALDH1A1	0.09 ± 0.01	1.03 ± 0.02	-72.812	< 0.001
Oct4	0.15 ± 0.02	0.96 ± 0.02	-49.602	< 0.001
Nanog	0.13 ± 0.01	0.99 ± 0.04	-36.127	< 0.001

2.4 抑制 LncRNA NNT-AS1 对膀胱癌干细胞干性的影响 干细胞成球实验显示, sh-NNT-AS1 组膀胱癌干细胞成球数目较 sh-NC 组 (20.85 ± 2.17 个 vs 41.35 ± 3.67 个) 明显降低, 差异有统计学意义 ($t = 8.328, P = 0.001$), 见图 3A。Western blot 检测显示, 与 si-NC 组相比, sh-NNT-AS1 组膀胱癌干细胞标志蛋白 CD44, Oct4, ALDH1A1 和 Nanog 表达灰度值明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 见图 3B 和表 3。流式细胞术检测显示, 与 si-NC 组相比, sh-NNT-AS1 组 CD44+CD133+ 细胞比例 (9.30% ± 0.79% vs 88.50% ± 2.77%) 明显降低, 差异有统计学意义 ($t = -47.624, P < 0.001$),

提示抑制 NNT-AS1 可抑制膀胱癌干细胞干性。

表 2 抑制 LncRNA NNT-AS1 对膀胱癌细胞 A 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间点	sh-NC 组	sh-NNT-AS1 组	t 值	P 值
0h	0.50 ± 0.03	0.54 ± 0.02	-1.922	0.127
24h	1.07 ± 0.06	0.80 ± 0.01	7.688	0.002
48h	1.83 ± 0.03	1.18 ± 0.07	14.783	< 0.001
72h	2.53 ± 0.06	1.89 ± 0.07	12.024	< 0.001

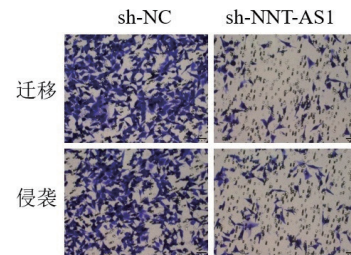


图 2 Transwell 检测抑制 LncRNA NNT-AS1 对膀胱癌细胞迁移和侵袭的影响

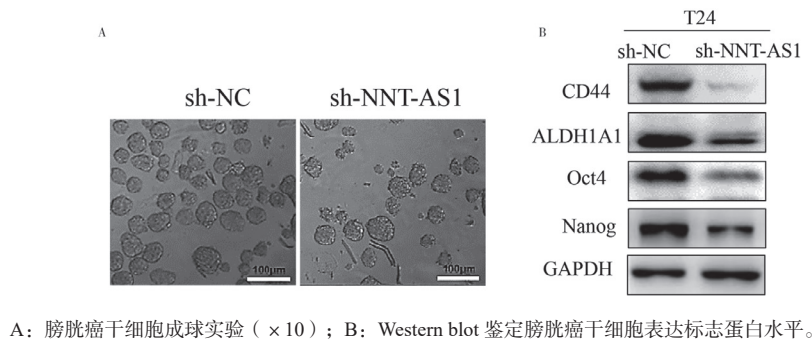


图 3 抑制 LncRNA NNT-AS1 对膀胱癌干细胞干性的影响

2.5 LncRNA NNT-AS1 与 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴的调控关系验证 通过检索数据库发现, miR-582-5p 与 LncRNA NNT-AS1 存在靶向结合位点, 见图 4A。双荧光素酶报告基因实验显示, miR-582-5p mimic 明显降低了 LncRNA NNT-AS1 WT 荧光质粒

活性 ($t = 72.260, P < 0.001$), 对 LncRNA NNT-AS1 MUT 荧光质粒活性无影响 ($t = 1.225, P > 0.05$), 见表 4。qRT-PCR 检测显示, sh-NNT-AS1 组细胞中 miR-582-5p 表达明显高于 sh-NC 组 (1.00 ± 0.01 vs 0.19 ± 0.03), 差异有统计学意义 ($t = 44.366, P < 0.001$),

提示 miR-582-5p 是 LncRNA NNT-AS1 的靶基因。

表3 抑制 LncRNA NNT-AS1 对膀胱癌干细胞标志蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

项目	sh-NC 组	sh-NNT-AS1 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
CD44	1.12 ± 0.02	0.04 ± 0.01	83.656	< 0.001
ALDH1A1	1.16 ± 0.05	0.23 ± 0.01	31.591	< 0.001
Oct4	1.10 ± 0.04	0.17 ± 0.02	36.019	< 0.001
Nanog	1.24 ± 0.03	0.49 ± 0.03	30.619	< 0.001

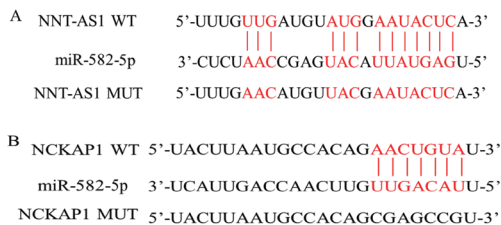


图4 检索数据库预测 LncRNA NNT-AS1 与 miR-582-5p, miR-582-5p 与 NCKAP1 结合位点 另外检索到 NCKAP1 与 miR-582-5p 存在靶向结合位点, 见图4B; 双荧光素酶报告基因实验显示, miR-582-5p mimic 明显降低了 NCKAP1 WT 荧光质粒活性 ($t=29.303$, $P < 0.001$), 对 NCKAP1 MUT 荧光质粒活性无影响 ($t=1.549$, $P > 0.05$), 见表4。qRT-PCR 检测显示, miR-582-5p mimic 组细胞中 NCKAP1 表达显著低于 miR-NC 组 (1.01 ± 0.05 vs 2.00 ± 0.02), 差异有统计学意义 ($t=-31.842$, $P < 0.001$), 提示 NCKAP1 是 miR-582-5p 的直接靶基因。进一步检测发现, sh-NNT-AS1 组细胞中 NCKAP1 表达明显低于 sh-NC 组 (0.12 ± 0.02 vs 1.45 ± 0.03), 差异有统计学意义 ($t=-63.891$, $P < 0.001$); sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组细胞中 NCKAP1

表5 LncRNA NNT-AS1, miR-582-5p, NCKAP1 作用对膀胱癌细胞 A 值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

时间点	sh-NNT-AS1 组	sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组	sh-NNT-AS1+inh-582-5p +si-NCKAP1 组	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
0 h	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.06	0.53 ± 0.08	0.358	0.713
24 h	0.73 ± 0.06	0.98 ± 0.03	0.69 ± 0.04	36.443	< 0.001
48 h	1.22 ± 0.05	1.74 ± 0.04	1.01 ± 0.07	141.233	< 0.001
72 h	1.69 ± 0.14	2.33 ± 0.16	1.39 ± 0.08	40.209	< 0.001

表达明显高于 sh-NNT-AS1 组 (1.39 ± 0.04 vs 0.12 ± 0.02), 差异有统计学意义 ($t=-49.187$, $P < 0.001$), 提示 NNT-AS1 可能通过竞争性吸附 miR-582-5p, 调控 NCKAP1 表达进而发挥作用。

表4 荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

项目	miR-NC	miR-582-5p mimic	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
MUT	1.03 ± 0.02	1.01 ± 0.02	1.225	0.288
NNT-AS1 WT	1.02 ± 0.01	0.43 ± 0.01	72.260	< 0.001
MUT	1.01 ± 0.02	1.00 ± 0.02	1.549	0.196
NCKAP1 WT	1.00 ± 0.03	0.39 ± 0.02	29.303	< 0.001

2.6 LncRNA NNT-AS1 调控 miR-582-5p/NCKAP1 对膀胱癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响 CCK-8 法检测显示, 在 24, 48, 72 h 时, sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组细胞 A 值显著高于 sh-NNT-AS1 组 ($t=6.790, 11.628, 5.977$, 均 $P < 0.001$); sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 组细胞 A 值则显著低于 sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组 ($t=7.877, 16.323, 8.779$, 均 $P < 0.001$), 见表5。Transwell 检测显示, sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组细胞迁移穿膜数 (322.31 ± 28.45 个 vs 81.42 ± 13.22 个) 和细胞侵袭穿膜数 (316.07 ± 30.21 个 vs 92.13 ± 12.65 个) 较 sh-NNT-AS1 组显著增高, 差异有统计学意义 ($t=15.115, 13.158$, 均 $P < 0.001$)。sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 组细胞迁移穿膜数和细胞侵袭穿膜数分别为 65.33 ± 12.60 个和 71.08 ± 15.19 个, 显著低于 sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组, 差异有统计学意义 ($t=16.125, 14.395$, 均 $P < 0.001$), 见图5。说明 LncRNA NNT-AS1 可通过调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴来影响膀胱癌细胞的生长和转移。

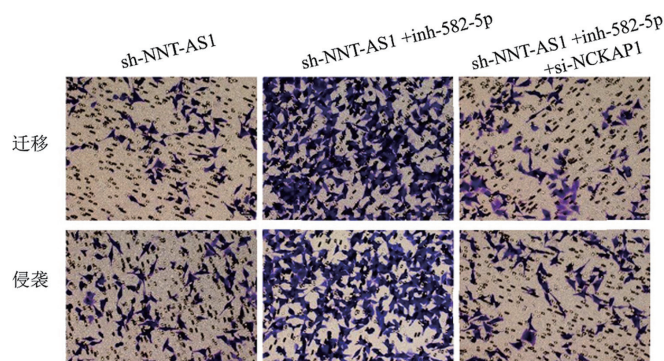
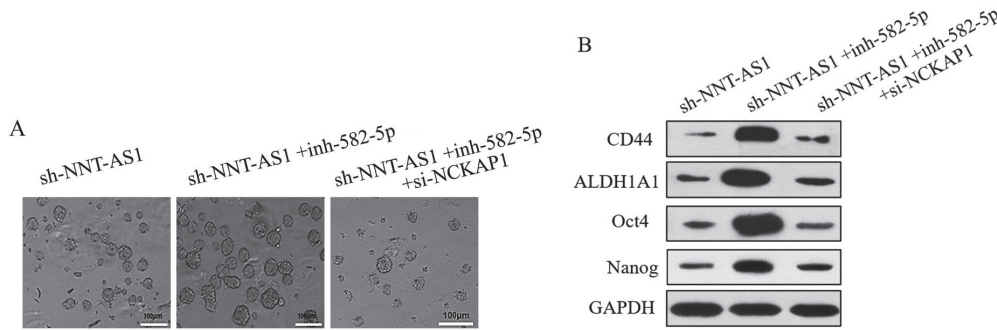


图5 Transwell 实验检测 LncRNA NNT-AS1, miR-582-5p, NCKAP1 作用对膀胱癌细胞迁移和侵袭的影响

2.7 LncRNA NNT-AS1 调控 miR-582-5p/NCKAP1 对干细胞干性的影响 干细胞成球实验显示, sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组细胞成球数目显著高于 sh-NNT-AS1 组 (38.55 ± 2.20 个 vs 18.98 ± 1.16 个), 差异有统计学意义 ($t=14.592, P < 0.001$); sh-NNT-AS1+inh-582-5p +si-NCKAP1 组细胞成球数目为 11.36 ± 1.05 个, 显著低于 sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组, 差异有统计学意义 ($t=21.365, P < 0.001$), 见图 6A。Western blot 检测显示, sh-NNT-AS1+inh-

582-5p 组细胞 CD44, ALDH1A1, Oct4, Nanog 蛋白表达显著高于 sh-NNT-AS1 组 ($t=21.243, 10.650, 14.615, 12.032$, 均 $P < 0.001$); sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 组细胞 CD44, ALDH1A1, Oct4 和 Nanog 蛋白表达灰度值均显著低于 sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组 ($t=17.889, 6.412, 14.227, 7.777$, 均 $P < 0.001$), 见表 6 和图 6B。以上结果综合分析说明, LncRNA NNT-AS1 可通过调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴来影响膀胱癌干细胞干性。



A: 膀胱癌干细胞成球实验 (×10); B: Western blot 检测膀胱癌干细胞标志蛋白表达。

图 6 LncRNA NNT-AS1, miR-582-5p, NCKAP1 作用对膀胱癌干细胞干性鉴定

表 6 LncRNA NNT-AS1, miR-582-5p, NCKAP1 作用对膀胱癌干细胞标志蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	sh-NNT-AS1 组	sh-NNT-AS1 +inh-582-5p 组	sh-NNT-AS1+inh-582-5p +si-NCKAP1 组	F 值	P 值
CD44	0.10 ± 0.01	1.05 ± 0.08	0.25 ± 0.05	260.833	< 0.001
ALDH1A1	0.22 ± 0.02	1.20 ± 0.16	0.61 ± 0.11	57.504	< 0.001
Oct4	0.19 ± 0.03	1.32 ± 0.14	0.22 ± 0.08	138.725	< 0.001
Nanog	0.15 ± 0.04	0.97 ± 0.12	0.44 ± 0.07	74.455	< 0.001

2.8 LncRNA NNT-AS1 调控 miR-582-5p/NCKAP1 对 Hippo-YAP/TAZ 信号通路的影响 Western blot 结果显示, sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组细胞中 NCKAP1, YAP, TAZ 蛋白表达灰度值较 sh-NNT-AS1 组明显升高, 差异有统计学意义 ($t=17.575, 11.649, 13.048$, 均 $P < 0.001$)。sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 组细胞中上述蛋白表达灰度值则较 sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组显著降低, 差异有统计学意义 ($t=17.173, 13.925, 13.663$, 均 $P < 0.001$), 见图 7 和表 7。结果表明, LncRNA NNT-AS1 调控激活 Hippo-YAP/TAZ 信号通路发挥作用可能是通过 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴来实现。

进程中亦发现 LncRNA 足迹, 如 LncRNA MORT, LncRNA CCAT1, LncRNA-RMRP^[16-18] 等均报道与膀胱癌细胞的增殖、迁移、侵袭、凋亡等过程相关。LncRNA NNT-AS1 是近年新发现的 LncRNA, 现已在非小细胞肺癌^[19]、胶质瘤细胞^[10]中证实其扮演重要的原癌基因角色。然而 LncRNA NNT-AS1 在膀胱癌中的作用机制目前尚不明确, 因此本研究基于体外细胞实验探究了其在膀胱癌中的表达作用机制。

3 讨论

近年膀胱癌发病逐渐增多, 转移、复发率高, 临床诊治缺少有效的靶点和标志物, 患者预后较差^[11-12]。随着基因测序技术的发展, 越来越多研究表明, 非编码 RNA 与肿瘤的发生发展关系密切, 其中 LncRNA 可参与细胞的生长、转移及血管新生和耐药等途径, 调控肿瘤的恶性进展, 为肿瘤研究与诊治提供了新的方向和思路^[13-15]。膀胱癌的发展

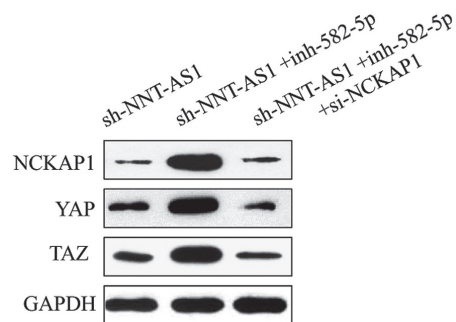


图 7 Western blot 检测 Hippo-YAP/TAZ 信号通路关键蛋白表达

表 7 LncRNA NNT-AS1, miR-582-5p, NCKAP1 作用对 Hippo-YAP/TAZ 信号通路关键蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

项目	sh-NNT-AS1 组	sh-NNT-AS1+inh-582-5p 组	sh-NNT-AS1+inh-582-5p+si-NCKAP1 组	F 值	P 值
NCKAP1	0.13 ± 0.04	1.44 ± 0.15	0.16 ± 0.03	201.324	< 0.001
YAP	0.42 ± 0.07	1.29 ± 0.11	0.25 ± 0.09	111.598	< 0.001
TAZ	0.35 ± 0.05	1.41 ± 0.16	0.30 ± 0.04	119.101	< 0.001

本研究发现膀胱癌组织和细胞中 lncRNA NNT-AS1 均显著高表达, 尤其在 T24 细胞中表达最高。相关研究发现 lncRNA NNT-AS1 高表达于肺癌、胶质瘤以及胆管癌, 促进了肿瘤的生长和转移^[9-10,20]。本研究亦发现, 抑制 lncRNA NNT-AS1 表达能够抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 并抑制肿瘤干细胞干性。在调控机制上, lncRNA 常作为海绵分子, 竞争性吸附 miRNA, 而 miRNA 与其靶基因的 3' 非翻译区结合, 可抑制靶基因的蛋白质翻译^[21]。对 lncRNA NNT-AS1 的功能机制研究发现, 其通过调控 miR-142-5p/SOX4 分子轴介导了胃癌细胞的增殖、迁移^[22]; lncRNA NNT-AS1 调控 miR-3666/E2F2 轴参与了肺癌细胞的恶性生长^[23]。本研究通过数据库预测及验证探究发现, miR-582-5p 为 lncRNA NNT-AS1 的靶基因, NCKAP1 为 miR-582-5p 的靶基因, lncRNA NNT-AS1 可调控 miR-582-5p/NCKAP1 轴来抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移、侵袭及膀胱癌干细胞干性。ZHONG 等^[24]研究表明, NCKAP1 通过增强肝细胞癌中 Rb1/p53 的活化可改善患者预后, 抑制细胞生长。CHEN 等^[25]研究表明, 慢性肾细胞癌中 NCKAP1 表达下调可抑制癌细胞生长, 是重要的预后生物标志物。本研究结果提示, 调控 lncRNA NNT-AS1/miR-582-5p/NCKAP1 轴能够影响膀胱癌的恶性生物学行为, lncRNA NNT-AS1 和 NCKAP1 有望成为膀胱癌诊治的潜在标志物。

Hippo-YAP/TAZ 是一种高保守性的可抑制细胞生长的信号通路, 近年研究证实其在肿瘤侵袭转移、上皮间质转化、化疗耐药、肿瘤免疫逃逸及肿瘤干细胞自我更新中发挥重要作用^[26]。如 QIAO 等^[27]研究表明, 乳腺癌中 YY1 激活的 LINC00673 可能通过调控 miR-515-5p/MARK4 轴, 抑制 Hippo 信号通路, 发挥致癌功能。WANG 等^[28]研究表明, 缺氧可诱导 lncRNA GHET1 表达, 导致 Hippo/YAP 信号通路过度激活, 促进 TNBC 的糖酵解及恶性进展。LIN 等^[29]研究表明, LINC00857 通过与 miR-486-5p 竞争性结合调节 YAP1 表达, 促进了卵巢癌细胞糖酵解及增殖、迁移。ZHU 等^[30]研究发现, miR-582-5p 是可靶向非小细胞肺癌 Hippo-YAP/TAZ 信号通路的肿瘤抑制因子。膀胱癌中 lncRNA NNT-AS1 是否能够调控 miR-582-5p/NCKAP1 轴, 影响 Hippo-YAP/TAZ 信号通路, 进而发挥作用?

为验证该猜想, 本研究探究发现, 抑制 lncRNA NNT-AS1 表达后 NCKAP1 及 Hippo-YAP/TAZ 信号通路关键蛋白表达下调, lncRNA NNT-AS1 高表达可通过调控 miR-582-5p/NCKAP1 轴来激活 Hippo-YAP/TAZ 信号通路, 参与膀胱癌的发生发展。然而肿瘤发生发展机制复杂且多样, 本研究仅局限在体外细胞水平, lncRNA NNT-AS1 的调控作用和机制还需通过体内实验进一步探究。

综上所述, 膀胱癌中 lncRNA NNT-AS1 高表达可能通过调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴, 激活 Hippo-YAP/TAZ 信号通路, 进而参与调控膀胱癌的发生发展。

参考文献:

- [1] POWLES T, BELLMUNT J, COMPERAT E, et al. Bladder cancer: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2022, 33(3):244-258.
- [2] SIRACUSANO S, RIZZETTO R, PORCARO A B. Bladder cancer genomics[J]. Urologia, 2020, 87(2):49-56.
- [3] BORHANI S, BORHANI R, KAJDACSZY-BALLA A. Artificial intelligence: A promising frontier in bladder cancer diagnosis and outcome prediction[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2022, 171:103601.
- [4] OGUNWOBI O O, MAHMOOD F, AKINGBOYE A. Biomarkers in colorectal cancer: current research and future prospects[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15):5311.
- [5] LÜ Dezhong, XU Kang, JIN Xiyin, et al. LncSpA: LncRNA spatial atlas of expression across normal and cancer tissues[J]. Cancer Res, 2020, 80(10):2067-2071.
- [6] STATELLO L, GUO Chunjie, CHEN Lingling, et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(2):96-118.
- [7] LUO Huarong, XU Chengdang, LE Wei, et al. LncRNA CASC11 promotes cancer cell proliferation in bladder cancer through miRNA-150[1]. J Cell Biochem, 2019, 120(8):13487-13493.
- [8] ZHUANG Chengle, MA Qian, ZHUANG Changshui, et al. LncRNA GCIncl1 promotes proliferation and invasion of bladder cancer through activation of MYC[J]. FASEB J, 2019, 33(10):11045-11059.
- [9] HUANG J W, LUO X Y, LI Z H, et al. LncRNA NNT-AS1 regulates the progression of lung cancer through the NNT-AS1/miR-3666/E2F2 axis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(1):238-248.
- [10] ZHENG Dahai, CHEN Daliang, LIN Famu, et al. LncRNA NNT-AS1 promote glioma cell proliferation and metastases through miR-494-3p/PRMT1 axis[J]. Cell Cycle, 2020, 19(13):1621-1631. (下转第 39 页)

- [10] HWANG J H, YOON J, CHO Y H, et al. A mutant KRAS-induced factor REG4 promotes cancer stem cell properties via Wnt/ β -catenin signaling [J]. *International Journal of Cancer*, 2020, 146(10): 2877-2890.
- [11] HU Guoyong, SHEN Jiaqin, CHENG Li, et al. Purification of a bioactive recombinant human Reg IV expressed in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2010, 69(2): 186-190.
- [12] LI A, CRIMMINS D L, LUO Q, et al. Expression of a novel regenerating gene product, Reg IV, by high density fermentation in *Pichia pastoris*: production, purification, and characterization [J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, 31(2): 197-206.
- [13] KESIDIS A, DEPPING P, LODÉ A, et al. Expression of eukaryotic membrane proteins in eukaryotic and prokaryotic hosts [J]. *Methods*, 2020, 180: 3-18.
- [14] 蒋励萍, 陈露颖, 蒯佳婕, 等. 人源 GRK2 的真核表达、纯化及活性检测 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(2): 179-184.
- JIANG Liping, CHEN Luying, KUAI Jiajie, et al. Eukaryotic expression, purification and activity identification of human His-GRK2 recombinant protein [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2023, 58(2): 179-184.

收稿日期: 2022-09-21

修回日期: 2023-04-12

(上接第34页)

- [11] 陈健康, 彭道荣, 陈慧昱, 等. 尿液膀胱肿瘤抗原水平检测在膀胱癌诊断中的意义 [J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(6):135-137.
- CHEN Jiankang, PENG Daorong, CHEN Huiyu, et al. Significance of urine bladder tumor antigen level in the diagnosis of bladder cancer [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2019, 34(6):135-137.
- [12] USUBA W, URABE F, YAMAMOTO Y, et al. Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(1):408-419.
- [13] GUGNONI M, CIARROCCHI A. Long noncoding RNA and epithelial mesenchymal transition in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8):1924.
- [14] ARAVINDHAN S, YOUNUS L A, HADI LAFTA M, et al. P53 long noncoding RNA regulatory network in cancer development [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(8):1583-1598.
- [15] WANG Wenhong, LOU Weiyang, DING Bisha, et al. A novel mRNA-miRNA-lncRNA competing endogenous RNA triple sub-network associated with prognosis of pancreatic cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(9):2610-2627.
- [16] WANG Yunyan, SUN Qing, JI Lu, et al. LncRNA MORT regulates bladder cancer behaviors by downregulating microRNA-146a-5p [J]. *Nephron*, 2020, 144(7):351-357.
- [17] ZHANG Caixiang, WANG Wenying, LIN Jun, et al. LncRNA CCAT1 promotes bladder cancer cell proliferation, migration and invasion [J]. *Int Braz J Urol*, 2019, 45(3):549-559.
- [18] CAO H L, LIU Z J, HUANG P L, et al. LncRNA-RMRP promotes proliferation, migration and invasion of bladder cancer via miR-206 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3):1012-1021.
- [19] HE Wenlong, ZHANG Yeying, XIA Shulan. LncRNA NNT-AS1 promotes non-small cell lung cancer progression through regulating miR-22-3p/YAP1 axis [J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(3):549-560.
- [20] HUANG Lining, JIANG Xingming, KANG Pengcheng, et al. Long non-coding RNA NNT-AS1 functions as an oncogenic gene through modulating miR-485/BCL9 in cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:7739-7749.
- [21] ZHOU Ruisheng, ZHANG Enxin, SUN Qinfeng, et al. Integrated analysis of LncRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in squamous cell carcinoma of tongue [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):779.
- [22] ZHANG Jianfeng, ZHANG Kai, HOU Yingkui. Long non-coding RNA NNT-AS1 knockdown represses the progression of gastric cancer via modulating the miR-142-5p/SOX4/Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2):687-696.
- [23] HUANG J W, LUO X Y, LI Z H, et al. LncRNA NNT-AS1 regulates the progression of lung cancer through the NNT-AS1/miR-3666/E2F2 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(1):238-248.
- [24] ZHONG Xiaoping, KAN Anna, LING Yihong, et al. NCKAP1 improves patient outcome and inhibits cell growth by enhancing Rb1/p53 activation in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(5):369-381.
- [25] CHEN Jiasheng, GE Jianzhang, ZHANG Wancong, et al. NCKAP1 is a Prognostic biomarker for inhibition of cell growth in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 764957.
- [26] DEY A, VARELAS X, GUAN Kunliang. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(7):480-494.
- [27] QIAO Kun, NING Shipeng, WAN Lin, et al. LINC00673 is activated by YY1 and promotes the proliferation of breast cancer cells via the miR-515-5p/MARK4/Hippo signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):418.
- [28] WANG Yu, LIU Shuwei. LncRNA GHET1 promotes hypoxia-induced glycolysis, proliferation, and invasion in triple-negative breast cancer through the Hippo/YAP signaling pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:643515.
- [29] LIN Xueke, FENG Dilu, LI Ping, et al. LncRNA LINC00857 regulates the progression and glycolysis in ovarian cancer by modulating the Hippo signaling pathway [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(21):8122-8132.
- [30] ZHU Bowen, V M, Finch-Edmondson M, et al. MiR-582-5p is a tumor suppressor microRNA targeting the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer*, 2021, 13(4):756-775.

收稿日期: 2022-10-24

修回日期: 2023-07-03