

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.10.002

· 基础研究 ·

Wnt5a通过上调miR-141-3p增强前列腺癌细胞血管生成拟态与干细胞特性

刘彼得^{1,2}, 王书恒^{1,2}, 贾宏亮^{1,2}, 李循^{1,2}, 张小安^{1,2}, 董强^{1,2}, 李九智^{1,2} (1. 新疆维吾尔自治区人民医院 泌尿中心, 新疆 乌鲁木齐 830001; 2. 新疆维吾尔自治区人民医院 泌尿外科研究室, 新疆 乌鲁木齐 830001)

[摘要] **目的:** 探究 Wnt5a 通过上调 miR-141-3p 表达对前列腺癌 (PCa) 细胞血管生成拟态 (VM) 形成及肿瘤干细胞 (CSC) 特性的影响。**方法:** 选用人前列腺上皮细胞 RWPE-1 及 PCa 细胞 PC-3、LNCaP 和 DU145, qPCR 法检测细胞中 miR-141-3p 的表达, WB 法检测细胞中 Wnt5a 蛋白的水平。通过质粒转染分别构建稳定敲减 Wnt5a 或 miR-141-3p 的 LNCaP 和 DU145 细胞株。采用三维培养实验检测细胞形成 VM 的能力, CCK-8 法检测细胞增殖能力及药物敏感性, 划痕实验、Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力, qPCR 和 WB 法检测 VM 相关分子及 CSC 标志物的表达水平, 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力, 流式细胞术分选并计算 CD133⁺ 细胞比例, qPCR 和 WB 法检测 CD133⁺ 细胞和 CD133⁻ 细胞中 miR-141-3p 和 Wnt5a 的表达水平。通过质粒转染 PCa 细胞构建稳定过表达 Wnt5a 的细胞株, qPCR 法和双萤光素酶报告基因实验检测 Wnt5a 及不同 Wnt 下游信号通路抑制剂对 miR-141-3p 表达及启动子活性的影响; 通过转染 si-c-Jun 敲减 Wnt5a 过表达细胞中 c-Jun 的表达, qPCR 法、双萤光素酶报告基因实验及染色质免疫共沉淀实验验证 c-Jun 与 miR-141-3p 启动子的靶向结合关系。**结果:** miR-141-3p 和 Wnt5a 在 PCa 细胞中的表达显著高于 RWPE-1 细胞, 在 DU145 细胞中相对表达量最高, 在 LNCaP 细胞中相对表达量最低 ($P < 0.001$)。下调 Wnt5a 或 miR-141-3p 表达, 均能显著抑制 PCa 细胞的 VM 形成能力及干细胞特性, 显著抑制 PCa 细胞的增殖、迁移、侵袭能力, 并能提高其对卡鲁胺的敏感性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。下调 Wnt5a 的表达能够显著抑制 miR-141-3p 的表达及启动子转录活性 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 上调 Wnt5a 的表达能够显著促进 miR-141-3p 的表达及启动子转录活性 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); Wnt5a 对 miR-141-3p 表达及启动子转录活性的促进作用可被 JNK/c-Jun 通路抑制剂所抑制 ($P > 0.05$)。下调 c-Jun 的表达能够显著抑制 Wnt5a 对 miR-141-3p 表达及启动子转录活性的促进作用 ($P > 0.05$)。c-Jun 能够与 miR-141-3p 启动子的 -348 至 -295 序列结合, 该片段缺失后, Wnt5a 无法促进 miR-141-3p 的表达 ($P > 0.05$)。**结论:** Wnt5a/JNK/c-Jun 信号通路能够上调 miR-141-3p 的表达, 从而促进 PCa 细胞的 VM 形成, 其机制可能与 CSC 特性的激活有关。

[关键词] 前列腺癌; miR-141-3p; Wnt5a; 血管生成拟态; 肿瘤干细胞

[中图分类号] R737.25; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 10-1010-09

Wnt5a promotes vasculogenic mimicry and stemness in prostate cancer cells through miR-141-3p upregulation

LIU Bide^{1,2}, WANG Shuheng^{1,2}, JIA Hongliang^{1,2}, LI Xun^{1,2}, ZHANG Xiaolan^{1,2}, DONG Qiang^{1,2}, LI Jiuzhi^{1,2} (1. Department of Urology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, Xinjiang, China; 2. Laboratory of Urology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, Xinjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Wnt5a on the vasculogenic mimicry (VM) and cancer stem cell (CSC) properties of prostate cancer (PCa) cells by upregulating the expression of miR-141-3p. **Methods:** Human prostate epithelial cell line RWPE-1 and PCa cell lines PC-3, LNCaP, and DU145 were cultured. qPCR was employed to detect miR-141-3p expression, and Western blotting (WB) was used to measure Wnt5a protein levels. Stable Wnt5a-knockdown or miR-141-3p-knockdown LNCaP and DU145 cell lines were established respectively via plasmid transfection. VM formation ability was assessed by three-dimensional culture assay. Cell proliferation ability and drug sensitivity were measured by CCK-8 assay. Cell migration and invasion abilities were detected using wound healing and Transwell assays, respectively. The expressions of VM-related molecules and CSC markers were detected by qPCR and WB. Colony formation ability was determined by clonogenic assay. The proportion of CD133⁺ cells was sorted and calculated by flow cytometry. The expressions of miR-141-3p and Wnt5a in CD133⁺ and CD133⁻ cells were detected by qPCR and WB. Stable

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年基金项目 (No. 2024D01C289); 新疆维吾尔自治区人民医院内科科研项目 (No. 20210105, No. 20200309)

[作者简介] 刘彼得 (1990—), 男, 博士, 主治医师, 主要从事泌尿系肿瘤的基础与临床研究

[通信作者] 李九智 (扫码获取作者联系方式)



Wnt5a-overexpressing PCa cell lines were constructed *via* plasmid transfection. The effects of Wnt5a and different Wnt pathway downstream inhibitors on miR-141-3p expression and promoter activity were detected by qPCR and dual-luciferase reporter assays. Expression of c-Jun was knocked down in Wnt5a-overexpressing cells using si-c-Jun transfection. The target binding relationship between c-Jun and the miR-141-3p promoter was verified by qPCR, dual-luciferase reporter assay, and chromatin immunoprecipitation assay. **Results:** The expressions of miR-141-3p and Wnt5a were significantly higher in PCa cells compared with those in RWPE-1 cells, with the highest relative expression in DU145 cells and the lowest in LNCaP cells ($P < 0.001$). Downregulation of Wnt5a or miR-141-3p significantly inhibited VM formation ability and stemness of PCa cells, and significantly suppressed the proliferation, migration, invasion abilities, and enhanced the sensitivity to bicalutamide of PCa cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ or $P < 0.001$). Downregulation of Wnt5a significantly inhibited miR-141-3p expression and promoter transcriptional activity ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), whereas upregulation of Wnt5a significantly promoted miR-141-3p expression and promoter transcriptional activity ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). The promoting effect of Wnt5a on miR-141-3p expression and promoter transcriptional activity could be inhibited by a JNK/c-Jun pathway inhibitor ($P > 0.05$). Downregulation of c-Jun significantly inhibited the promoting effect of Wnt5a on miR-141-3p expression and promoter transcriptional activity ($P > 0.05$). c-Jun could bind to the -348 to -295 sequence of the miR-141-3p promoter. In absence of this fragment Wnt5a wouldn't promote miR-141-3p expression ($P > 0.05$). **Conclusion:** The Wnt5a/JNK/c-Jun signaling pathway can upregulate miR-141-3p expression, and thereby promote VM formation in PCa cells, possibly by activating CSC properties.

[Key words] prostate cancer (PCa); miR-141-3p; Wnt5a; vasculogenic mimicry (VM); cancer stem cell (CSC)

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(10): 1010-1018. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.10.002]

前列腺癌(prostate cancer, PCa)在中国的发病率呈上升趋势,由于初诊患者中有近2/3的患者已经处于中晚期,故中国PCa患者的预后显著差于欧美国家,已成为严重威胁中国老年男性健康的疾病^[1-2]。目前尚无针对中晚期PCa的良好治疗方法,因此,探寻新的有效治疗靶点对改善PCa患者的预后至关重要。血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是肿瘤细胞模拟血管内皮细胞特性形成的具有内皮性血管功能的管状结构,其形成与肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)特性密切相关^[3]。LIU等^[4]的研究结果及本课题组前期研究^[5-6]均证实,VM与PCa的恶性程度及不良预后呈正相关,这表明VM具有作为PCa治疗靶点的潜力;然而,其在PCa中的形成机制尚未被充分阐明。miRNA是非编码RNA家族的重要成员,通过与基因启动子区域的靶向结合调节蛋白质的表达,在多种肿瘤的VM形成中起调控作用^[7]。本课题组既往研究表明,miR-141-3p在PCa组织及细胞中高表达,可促进PCa细胞增殖、侵袭^[8-10];Wnt5a是Wnt非经典信号通路配体,其在PCa组织及细胞中高表达,并可促进PCa的VM形成^[5-6]。尚少见研究分析miR-141-3p和Wnt5a在PCa的调控关系以及对VM形成的影响。因此,本研究在既往成果的基础上,通过体外细胞实验探讨PCa中miR-141-3p和Wnt5a之间的调控关系,以及对VM形成的调控作用,旨在为PCa寻找新的治疗靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人前列腺正常上皮细胞RWPE-1和PCa细胞PC-3、LNCaP、DU145由新疆维吾尔自治区人民医院保存。

DMEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司,qPCR引物由上海生工生物工程有限公司合成,逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司,qPCR试剂盒购自瑞士Roche公司,RIPA裂解液、BCA试剂盒、CKK-8试剂盒、ECL化学发光液均购自上海碧云天生物技术公司,miR-141-3p inhibitor(miR-141-3p inh)及其阴性对照(inh-NC)、Wnt5a过表达慢病毒载体(Wnt5a-OE)及其阴性对照(Vector)、si-Wnt5a及其阴性对照(si-NC)、si-c-Jun及其阴性对照(si-NC),以及miR-141-3p野生型和突变型的萤光素酶报告基因质粒载体均由上海吉玛生物公司合成,双萤光素酶活性检测试剂盒购自美国Promega公司,TRIzol试剂、Lipofectamine™ 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司,Matrigel基质胶、Transwell小室购自美国Corning公司,兔抗人Wnt5a抗体、兔抗人vimentin抗体、小鼠抗人GAPDH抗体、兔抗人VE-cadherin抗体、兔抗人CD133抗体、兔抗人c-Jun抗体均购自英国Abcam公司,兔抗人E-cadherin抗体、兔抗人Nanog、兔抗人Sox2、小鼠抗人Oct4均购自美国Proteintech公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG和山羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司,染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)试剂盒购自Cell Signaling Technology公司。

1.2 细胞培养及分组转染

使用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基培养细胞,培养环境:37℃、5% CO₂恒温培养箱。取对数期生长的LNCaP和DU145细胞,按照Lipofectamine™ 2000转染试剂盒说明书分别对细胞进行转染,将细胞分为miR-141-3p-inh组(转染miR-141-3p inh)、inh-NC组

(转染 inh-NC)、si-Wnt5a 组(转染 si-Wnt5a)、si-Wnt5a 对照组(转染 si-NC)、Wnt5a-OE 组(转染 Wnt5a-OE) 和 Wnt5a-OE 对照组(转染 Vector)。

1.3 qPCR 法检测 PCa 细胞中 miR-141-3p 及 mRNA 的表达

收集各组细胞, TRIzol 法提取细胞总 RNA, 将

RNA 逆转录为 cDNA, 参照 qPCR 试剂盒说明书进行扩增、检测 miRNA 及 mRNA 的表达。引物序列见表 1。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 s 退火和延伸 10 s, 共进行 40 个循环。miR-141-3p 以 U6 为内参, mRNA 以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因 mRNA 的相对表达量。

表 1 qPCR 引物序列

基 因	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
miR-141-3p	TCCCACCCAGTGCGATTTGTC	GTTGCTGGGAGGCTAAGATGAG
VE-cadherin	TTGGAACCAGATGCACATTGAT	TCTTGCGACTCACGCTTGAC
Vimentin	GACGCCATCAACACCGAGTT	CTTTGTCGTTGGTTAGCTGGT
E-cadherin	CGAGAGCTACACGTTTCACGG	GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG
CD133	AGTCGGAAACTGGCAGATAGC	GGTAGTGTTGTACTGGGCCAAT
Nanog	TTTGTGGGCCTGAAGAAACT	AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG
Sox2	GCCGAGTGGAACCTTTTGTCG	GGCAGCGTGACTTATCCTTCT
Oct4	CTGGGTTGATCCTCGGACCT	CCATCGGAGTTGCTCTCCA
U6	CTCGCTTCGGCAGCAGCACATATA	AAATATGGAACGCTTCACGA
GAPDH	TCAACCCTACAAGTCCAGCT	TCCAGTCACCAAGTAGCGATCT

1.4 WB 法检测 PCa 细胞中 Wnt5a、VM 和上皮间质转化(EMT)相关蛋白的表达

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% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 在 Wnt5a (1:2 000)、VE-cadherin(1:1 000)、vimentin(1:1 000)、E-cadherin(1:5 000)、CD133(1:1 000)、Nanog(1:1 000)、Sox2(1:1 000)、Oct4(1:5 000)和 DAPDH(1:5 000)一抗中, 置于 4 °C 摇床处理过夜。洗膜后, 在 HRP 标记山羊抗兔 IgG(1:2 000)或山羊抗小鼠 IgG(1:2 000)二抗中, 室温摇床处理 1 h。ECL 显色, 用化学发光凝胶成像系统成像。以 GAPDH 作为内参, 使用 ImageJ 软件分析蛋白质条带的灰度值, 以灰度值代表目的蛋白质的相对表达量。

1.5 三维培养实验检测 PCa 细胞 VM 的形成情况

预先解冻基质胶, 将预冷的无血清培养基与基质胶 1:1 混合, 向 96 孔板加入混合液 500 μ L, 37 °C 凝固 2 h。取对数生长期各组细胞, 以 1×10^7 个/mL 密度向每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 继续培养 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 5 个视野进行拍照并计数管状结构的数量, 取平均值。

1.6 CCK-8 法检测 PCa 细胞的增殖能力及药物敏感性

取对数期生长的各组细胞, 以每孔 1×10^4 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 μ L 的 CCK-8 试剂,

37 °C 处理 1 h 后, 使用酶标仪测定 450 nm 处的光密度(D)值。同前方法培养细胞 24 h 后, 加入 100 μ mol/L 的比卡鲁胺, 各组细胞分别培养 12、24、48、72、96 h, 向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂, 37 °C 处理 1 h 后, 检测 D 值, 并按照公式“细胞增殖率 = [(实验组 D 值 - 空白对照 D 值)/(阴性对照组 D 值 - 空白对照 D 值)] $\times$ 100%”计算细胞增殖率。

1.7 划痕实验检测 PCa 细胞的迁移能力

取对数生长期的各组细胞, 以每孔 1×10^5 个细胞铺于 6 孔板, 培养 12~24 h, 待细胞汇合度 80% 左右时, 用 200 μ L 吸头垂直于孔板长轴划痕, PBS 轻柔洗涤 2 次后进行拍照, 更换无血清培养基, 继续培养 24 h, 再次对相同位置进行拍照。使用 ImageJ 软件测量划痕宽度, 并进行对比分析。

1.8 Transwell 实验检测 PCa 细胞的侵袭能力

取对数生长期的各组细胞, 以每孔 1×10^5 个细胞接种于预铺基质胶的 Transwell 小室上室(细胞悬液 200 μ L), 向下室加入 600 μ L 含 5% 胎牛血清的培养基。培养 24 h 后, 弃去上室和下室的多余培养液, 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。光学显微镜下随机选取 5 个视野观察细胞并拍照, 计数侵袭细胞数, 取平均值。

1.9 克隆形成实验检测 PCa 细胞的克隆形成能力

取对数生长期的细胞, 制备成单细胞悬液, 按照 5×10^2 个细胞/孔的密度接种 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。当出现肉眼可见的克隆时终止培养,弃去培养液,PBS小心浸洗2次,空气干燥。使用甲醇固定细胞15 min,弃甲醇后空气干燥。用0.1%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 $> 50 \mu\text{m}$ 的细胞克隆,取平均值。

1.10 流式细胞术检测CD133⁺细胞比例

取对数生长期的各组细胞,以800 r/min离心5 min,留取细胞沉淀,再用PBS清洗细胞,再次离心后收集细胞沉淀,加入100 μL CD133抗体(稀释比例为1:500)。轻柔混匀后,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置30 min,采用流式细胞仪检测CD133⁺细胞的比例。

1.11 双萤光素酶报告基因实验验证Wnt5a等与miR-141-3p启动子区的直接结合

采用萤光素酶报告基因实验验证Wnt5a与miR-141-3p的靶向关系。构建miR-141-3p启动子的野生型(miR-141-3p-WT)和突变型(miR-141-3p-MUT)萤光素酶报告基因质粒。使用Lipofectamine™ 2000转染试剂盒将上述萤光素酶报告基因质粒、miR-141-3p inh及其对照、Wnt5a-OE及其对照质粒、si-Wnt5a及其对照质粒、si-c-Jun及其对照质粒,按实验需求搭配转染至PCa细胞中,转染48 h后使用双萤光素酶报告基因检测试剂盒检测萤光素酶的活性。萤火虫萤光素酶活性值与海肾萤光素酶活性值的比值为校正后的萤光素酶活性。

1.12 ChIP实验检测c-Jun与miR-141-3p启动子区结合位点

在37 $^{\circ}\text{C}$ 下以1%甲醛溶液处理细胞10 min,后加入甘氨酸(终浓度125 mmol/L)终止反应。冰上裂解细胞,离心收集细胞核,用限制性内切酶将染色质切成适当的片段,取10%作为Input对照。剩余样品加入c-Jun特异性抗体(对照组用IgG),4 $^{\circ}\text{C}$ 下处理过夜。再加入Protein A/G磁珠,4 $^{\circ}\text{C}$ 继续处理1 h。依次用低盐、高盐、LiCl及TE缓冲液洗涤磁珠复合物后,加入洗脱缓冲液及蛋白酶K,65 $^{\circ}\text{C}$ 解交联过夜。采用DNA纯化试剂盒回收DNA片段,通过qPCR法检测目标基因组区域的富集程度。

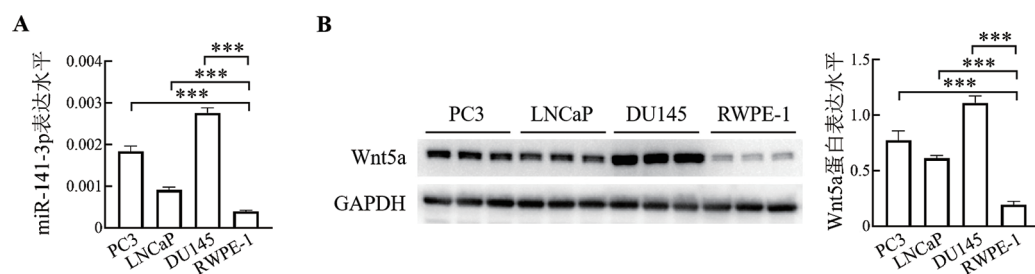
1.13 统计学处理

以上所有实验均独立重复3次。采用SPSS 22.0软件和GraphPad Prism 8.0软件进行数据分析及绘图。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 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-141-3p和Wnt5a在PCa细胞中呈高表达

qPCR法(图1A)和WB法(图1B)检测结果显示,与RWPE-1细胞相比,PCa细胞中miR-141-3p和Wnt5a均显著高表达(均 $P < 0.001$),其中以DU145细胞表达水平最高,而LNCaP细胞的表达水平相对最低。基于检测结果及细胞特性,选择DU145细胞(雄激素不敏感)和LNCaP细胞(雄激素敏感)进行后续实验。



A: qPCR法检测miR-141-3p在RWPE-1细胞和PCa细胞中的相对表达水平;B: WB法检测Wnt5a蛋白在RWPE-1细胞和PCa细胞中的相对表达水平。*** $P < 0.001$ 。

图1 miR-141-3p和Wnt5a蛋白在RWPE-1细胞和PCa细胞中的表达

2.2 成功构建敲低或过表达Wnt5a的PCa细胞株

采用siRNA敲降DU145细胞Wnt5a的表达,并构建过表达质粒上调其表达,以qPCR和WB法评估其敲低或过表达效率,结果显示,si-Wnt5a能显著敲降PCa细胞中Wnt5a mRNA和蛋白的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$,图2A、B),Wnt5a-OE质粒能显著上调PCa细胞中Wnt5a mRNA和蛋白的表达(均 $P < 0.001$,图2C、D),表明成功构建Wnt5a敲低及过

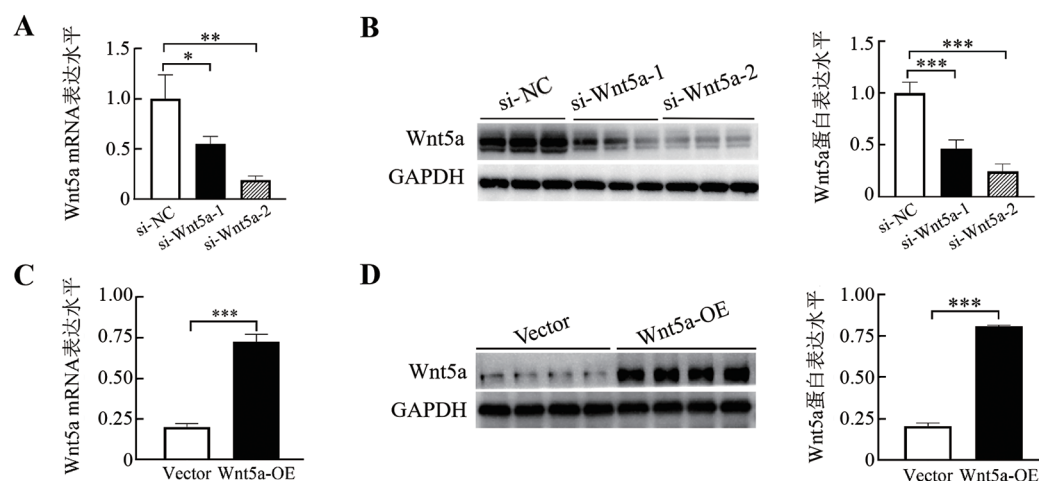
表达细胞株,可以进行后续功能实验。

2.3 Wnt5a和miR-141-3p促进PCa细胞VM的形成

三维培养实验结果(图3A)显示,敲降Wnt5a或抑制miR-141-3p表达均可显著降低PCa细胞管腔结构的形成能力(均 $P < 0.001$)。qPCR和WB法检测结果(图4A、B)显示,敲低Wnt5a或抑制miR-141-3p均可显著下调VM标志因子VE-cadherin及间质标志物vimentin的mRNA和蛋白水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),

同时上调上皮标志物 E-cadherin 的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明, Wnt5a 与 miR-141-3p 协同促进

PCa 细胞 VM 形成并驱动 EMT 进程。



A、C: qPCR 法检测 Wnt5a 在 DU145 细胞中的相对表达水平; B、D: WB 法检测 Wnt5a 蛋白在 DU145 细胞中的相对表达水平。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图2 敲低及过表达 Wnt5a 的效率鉴定

2.4 Wnt5a 和 miR-141-3p 促进 PCa 细胞增殖、迁移与侵袭并抑制药物敏感性

CCK-8 法、划痕实验、Transwell 实验检测结果(图 3B~E)显示, 敲低 Wnt5a 或抑制 miR-141-3p 表达均能显著降低 PCa 细胞的增殖、迁移及侵袭能力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 同时显著提高 PCa 细胞对比卡鲁胺的敏感性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。结果表明, Wnt5a 和 miR-141-3p 均能正向调控 PCa 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 同时抑制 PCa 细胞对比卡鲁胺的敏感性。

2.5 下调 Wnt5a 和 miR-141-3p 表达抑制 PCa 细胞的干细胞特性

qPCR 法、WB 法、克隆形成实验和流式细胞术检测结果(图 4)显示, 敲低 Wnt5a 或下调 miR-141-3p 表达均能显著抑制 PCa 细胞中 CSC 标志因子 CD133、Nanog、Sox2 和 Oct4 的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$, 图 4A、B)、克隆形成能力(均 $P < 0.001$, 图 4C), 以及 CD133⁺ 细胞比例 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$, 图 4D); 此外, CD133⁺ 细胞中 miR-141-3p 和 Wnt5a 的表达水平均显著高于 CD133⁻ 细胞(均 $P < 0.01$, 图 4E、F)。结果表明, Wnt5a 和 miR-141-3p 在维持 PCa 干细胞特性中发挥重要作用, 可作为靶向 PCa 干细胞的潜在治疗靶点。

2.6 Wnt5a 通过激活 JNK/c-Jun 信号通路靶向调控 miR-141-3p 的表达

qPCR 法和双荧光素酶报告基因实验检测结果(图 5A~D)显示, 下调 Wnt5a 的表达能够显著抑制 miR-141-3p 的表达及转录活性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),

过表达 Wnt5a 则可上调 miR-141-3p 的表达及转录活性 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), Wnt5a 对 miR-141-3p 表达及转录活性的促进作用能够被 JNK 通路抑制剂 (SP600125) 抑制 ($P > 0.05$)。c-Jun 是 JNK 通路的关键下游效应分子, 本研究通过 JASPAR 数据库预测发现 c-Jun 存在与 miR-141-3p 启动子的结合区域(图 5E); 通过 qPCR 法和双荧光素酶报告基因实验检测结果(图 5F、G)显示, 下调 c-Jun 的表达能够显著逆转 Wnt5a 对 miR-141-3p 表达及转录活性的上调作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 进一步通过 ChIP 实验和双荧光素酶报告基因实验检测结果(图 5H、I)显示, c-Jun 能与 miR-141-3p 的启动子靶向结合并激活其转录活性, 且该序列位于其-348 至-295 的片段之间(均 $P < 0.01$)。上述结果表明, Wnt5a 通过激活 JNK/c-Jun 信号通路促进 miR-141-3p 表达。

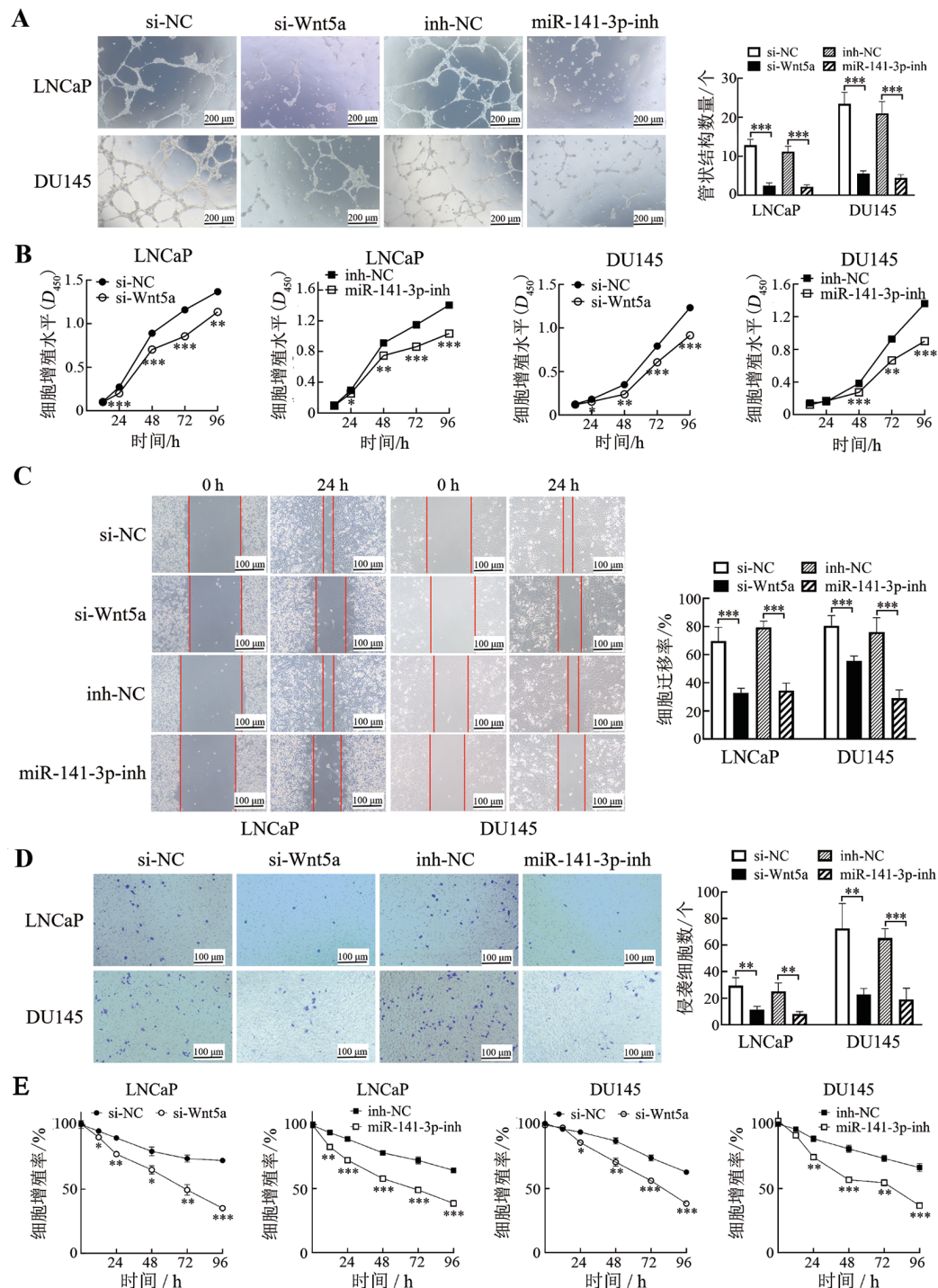
3 讨论

PCa 的进展是一个复杂的过程, 受到多种因素的影响, 包括肿瘤类型、个体差异以及治疗干预的效果等, 目前尚无良好的方法来抑制其进展。VM 是肿瘤微环境的重要调节因素, 是肿瘤细胞获取营养和转移的一种途径, 亦是抗内皮血管药物治疗失败的主要原因之一, 近年来受到较大的关注, 抑制其形成是一种有前景的靶向治疗方法^[11-13]。然而 VM 在 PCa 中形成的分子机制有待探索, 因此研究 PCa 中 VM 的调控基因及机制, 对探寻新的 PCa 治疗策略尤为重要。

miRNA 在多种生物过程中发挥作用, 其异常表达与肿瘤的发生发展有关, 被视为潜在的肿瘤诊断

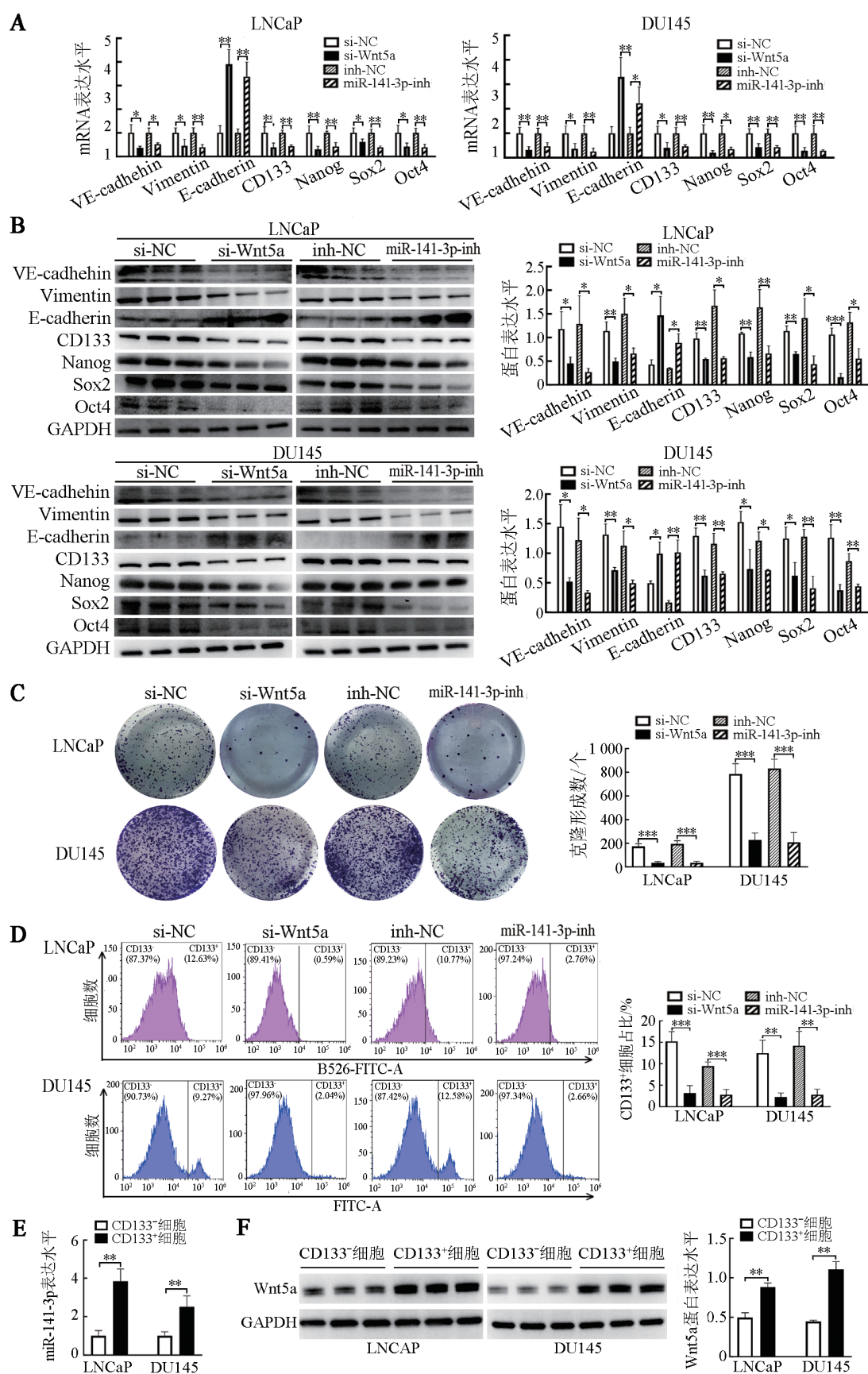
标志物和治疗靶点。研究^[14-18]表明,miRNA不仅参与调控肿瘤内皮血管的生成,还能够调控肿瘤VM的形成。如miR-1-3p可抑制胃癌细胞VM的形成、miR-134-5p/ITGB1/MMP2/PI3K/Akt信号轴能够抑制VM的形成、miR-204/DVL3通路通过抑制胰腺癌干细胞特性从而抑制VM形成、miR-141-3p能抑制黑色素瘤VM的形成。本研究通过细胞实验证实,miR-141-3p能够促进PCa细胞VM的形成,这与黑色素瘤中的研究结果相反,究其原因,考虑与肿瘤异质

性、组织特异性表达、表观遗传学改变、转录因子调控等有关。由于VM的形成涉及肿瘤细胞可塑性及对内皮细胞的模拟,因此VM与CSC特性密切相关。本研究分析发现,miR-141-3p能够提升PCa细胞的干细胞特性,促进PCa细胞获得间质细胞表型,证明miR-141-3p对CSC特性具有调控作用,提示miR-141-3p促进PCa细胞VM形成的作用,可能是通过调控CSC特性实现的。



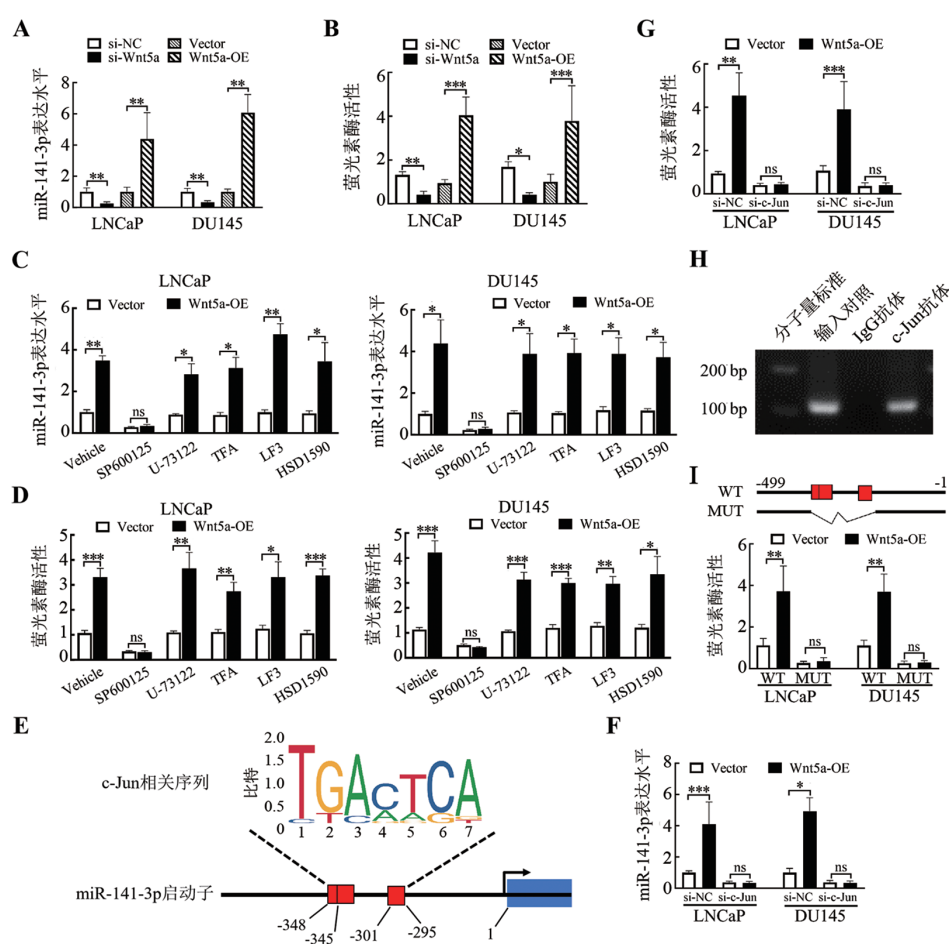
A: 三维培养实验检测细胞VM形成能力;B:CCK-8法检测细胞的增殖能力;C:划痕实验检测细胞的迁移能力;D:Transwell实验检测细胞的侵袭能力;E:CCK-8法检测细胞对比卡鲁胺的敏感性。^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01, ^{***}*P* < 0.001。

图3 miR-141-3p和Wnt5a促进PCa细胞的恶性生物学行为并抑制药物敏感性



A: qPCR法检测细胞VM及CSC标志物mRNA的表达; B: WB法检测细胞VM及CSC标志物蛋白的表达; C: 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力; D: 流式细胞术检测CD133⁺细胞比例; E: qPCR法检测细胞miR-141-3p的表达; F: WB法检测细胞Wnt5a蛋白的表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图4 miR-141-3p和Wnt5a对PCa细胞的干细胞特性的影响



A、C、F: qPCR法检测细胞中miR-141-3p的表达; B、D、G、I: 萤光素酶报告基因实验验证Wnt5a或c-Jun与miR-141-3p的结合; E: JASPAR网站预测c-Jun与miR-141-3p启动子的结合区域; H: ChIP实验检测c-Jun对miR-141-3p启动子区的富集情况。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ns: 差异无统计学意义。

图5 miR-141-3p与Wnt5a的靶向调控关系探究

研究^[19-20]发现, Notch、Wnt、Hedgehog、Hippo等信号通路与PCa干细胞样细胞的激活及活性维持密切相关, 其中也有多条信号通路参与调控VM的形成, 如Notch和Wnt通路。研究结果^[21-27]表明, Wnt信号通路, 尤其是Wnt5a(Wnt非经典信号通路配体)与AR的相互作用在PCa的进展中起到重要作用, Wnt5a能够促进胶质母细胞瘤及脉络膜黑色素瘤VM的形成, 但在PCa方面尚无研究。本研究通过PCa细胞实验证实, Wnt5a能够促进VM的形成, 并能够提升细胞的干细胞特性及间质细胞标志vimentin的表达。可见Wnt5a与miR-141-3p对PCa细胞的VM及CSC特性均起到正向调控作用。

miR-141-3p调控多个下游靶基因, 课题组既往研究^[8-10]证实其能够通过靶向抑制KLF9和ALKBH5的表达从而促进PCa细胞的增殖和侵袭。此外, 研究^[28-29]表明, miR-141-3p可靶向抑制Wnt5a表达, 从而调控心肌纤维化、神经元损伤等。然而, miR-141-3p和Wnt5a在PCa中均高表达, miR-141-3p在PCa中表达水平的升高是受什么因子调控的, 目前研究很少。

本研究通过一系列分子生物学实验证实, Wnt5a能够通过激活JNK/c-Jun信号通路促进miR-141-3p的表达, miR-141-3p为c-Jun的下游靶基因。

去势抵抗是PCa进展的一个重要阶段, 本研究选择雄激素敏感状态的LNCaP细胞和去势抵抗状态的DU145细胞进行实验。结果发现, miR-141-3p和Wnt5a在DU145细胞中表达显著高于LNCaP细胞; DU145细胞的VM形成、侵袭、CSC特性均显著高于LNCaP细胞, 而miR-141-3p和Wnt5a可进一步促进两种PCa细胞的VM形成和CSC特性。这提示miR-141-3p和Wnt5a可能对PCa的去势抵抗起促进作用, 且可能是通过调控VM形成、CSC特性, 从而促进PCa进展。

综上所述, 本研究通过细胞实验证明Wnt5a/JNK/c-Jun信号通路能够上调miR-141-3p的表达, 从而增强PCa细胞的VM形成能力和干细胞特性。然而, Wnt5a/JNK/c-Jun/miR-141-3p这一信号通路促进VM形成的作用是否是通过上调PCa干细胞特性来实现的, 有待进一步的研究去证实。该研究结果为进一步分析PCa进展的机制及治疗靶标提供了参考。

[参考文献]

- [1] HE H R, LIANG L, HAN D 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/OL]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 824464[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35187007/>. DOI: 10.3389/fmed.2022.824464.
- [2] 中国抗癌协会泌尿男生殖系统肿瘤专业委员会前列腺癌学组. 前列腺癌筛查中国专家共识(2021年版)[J]. *中国癌症杂志*, 2021, 31(5): 435-440. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.05.010.
- [3] 耿茜, 束永前. 血管生成拟态在胃癌研究和治疗中的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(6): 621-625. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.06.012.
- [4] LIU R L, YANG K, MENG C, *et al.* Vasculogenic mimicry is a marker of poor prognosis in prostate cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(7): 527-533. DOI: 10.4161/cbt.19602.
- [5] LIU B D, LI X, WANG S H, *et al.* Wnt5a promotes VM formation by modulating the stemness and EMT progression of prostate cancer cell[J/OL]. *Transl Oncol*, 2025, 51: 102155[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39488007/>. DOI: 10.1016/j.tranon.2024.102155.
- [6] 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*, 2024, 51(1): 43-48. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2024.23.0670.
- [7] LUO Q X, WANG J, ZHAO W Y, *et al.* Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 19[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32169087/>. DOI: 10.1186/s13045-020-00858-6.
- [8] 刘彼得, 靳宏勇, 王书恒, 等. miR-141-3p、KLF9异常表达对前列腺癌细胞株药物敏感性和雄激素受体表达的影响及靶向关系[J]. *山东医药*, 2024, 64(15): 1-8. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2024.15.001.
- [9] LI J Z, LI J, WANG H Q, *et al.* miR-141-3p promotes prostate cancer cell proliferation through inhibiting kruppel-like factor-9 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 1381-1386. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.045.
- [10] LI X, LIU B D, WANG S H, *et al.* miR-141-3p promotes malignant progression in prostate cancer through AlkB homolog 5-mediated m⁶A modification of protein arginine methyltransferase 6[J]. *Chin J Physiol*, 2023, 66(1): 43-51. DOI: 10.4103/cjop.CJOP-D-22-00071.
- [11] LI D C, XU W D, CHANG Y F, *et al.* Advances in landscape and related therapeutic targets of the prostate tumor microenvironment[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2023, 55(6): 956-973. DOI: 10.3724/abbs.2023092.
- [12] IOANNIDOU E, MOSCHETTA M, SHAH S, *et al.* Angiogenesis and anti-angiogenic treatment in prostate cancer: mechanisms of action and molecular targets[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9926[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34576107/>. DOI: 10.3390/ijms22189926.
- [13] KROTOFIL M, TOTA M, SIEDNIENKO J, *et al.* Emerging paradigms in cancer metastasis: ghost mitochondria, vasculogenic mimicry, and polyploid giant cancer cells[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2024, 16(20): 3539[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39456632/>. DOI: 10.3390/cancers16203539.
- [14] SALINAS-VERA Y M, MARCHAT L A, GALLARDO-RINCÓN D, *et al.* AngiomiRs: microRNAs driving angiogenesis in cancer (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 657-670. DOI: 10.3892/ijmm.2018.4003.
- [15] LU Y D, YANG B, SHEN A L, *et al.* LncRNA UCA1 promotes vasculogenic mimicry by targeting miR-1-3p in gastric cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2024, 45(9): 658-672. DOI: 10.1093/carcin/bgae031.
- [16] YAN L, ZHOU R H, FENG Y, *et al.* miR-134-5p inhibits the malignant phenotypes of osteosarcoma *via* ITGB1/MMP2/PI3K/Akt pathway[J/OL]. *Cell Death Discov*, 2024, 10: 193[2025-02-07]. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01946-z>. DOI: 10.1038/s41420-024-01946-z.
- [17] CAI X F, WANG Z H, LIN S Z, *et al.* Ginsenoside Rg3 suppresses vasculogenic mimicry by impairing DVL3-maintained stemness *via* PAAD cell-derived exosomal miR-204 in pancreatic adenocarcinoma[J/OL]. *Phytomedicine*, 2024, 126: 155402[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38350242/>. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155402.
- [18] VERRANDO P, CAPOVILLA M, RAHMANI R. Trans-nonachlor decreases miR-141-3p levels in human melanocytes *in vitro* promoting melanoma cell characteristics and shows a multigenerational impact on miR-8 levels in *Drosophila*[J]. *Toxicology*, 2016, 368: 129-141. DOI: 10.1016/j.tox.2016.09.003.
- [19] ANDREUCCI E, PEPPICELLI S, RUZZOLINI J, *et al.* Physicochemical aspects of the tumour microenvironment as drivers of vasculogenic mimicry[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2022, 41(4): 935-951. DOI: 10.1007/s10555-022-10067-x.
- [20] BANERJEE P, KAPSE P, SIDDIQUE S, *et al.* Therapeutic implications of cancer stem cells in prostate cancer[J]. *Cancer Biol Med*, 2023, 20(6): 401-420. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2022.0714.
- [21] LUO J, WANG D, WAN X C, *et al.* Crosstalk between AR and Wnt signaling promotes castration-resistant prostate cancer growth[J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 9257-9267. DOI: 10.2147/OTT.S245861.
- [22] KOUSHYAR S, MENIEL V S, PHESSÉ T J, *et al.* Exploring the Wnt pathway as a therapeutic target for prostate cancer[J/OL]. *Biomolecules*, 2022, 12(2): 309[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35204808/>. DOI: 10.3390/biom12020309.
- [23] GOGOLA S, REJZER M, BAHMAD H F, *et al.* Anti-cancer stem-cell-targeted therapies in prostate cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(5): 1621[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36900412/>. DOI: 10.3390/cancers15051621.
- [24] BUENO M L P, SAAD S T O, ROVERSI F M. WNT5A in tumor development and progression: a comprehensive review[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113599[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36089446/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113599.
- [25] MA F, ARAI S, WANG K S, *et al.* Autocrine canonical Wnt signaling primes noncanonical signaling through ROR1 in metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(8): 1518-1533. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1807.
- [26] YUANY Y, GENG B C, XU X Y, *et al.* Dual VEGF/PDGF knockdown suppresses vasculogenic mimicry formation in choroidal melanoma cells *via* the Wnt5a β -catenin/AKT signaling pathway[J/OL]. *Acta Histochem*, 2022, 124(1): 151842[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34995928/>. DOI: 10.1016/j.acthis.2021.151842.
- [27] SINGH D K, SHIVALINGAPPA P K M, SHARMA A, *et al.* NSG-70, a new glioblastoma cell line with mixed proneural-mesenchymal features, associates NOTCH1-WNT5A signaling with stem cell maintenance and angiogenesis[J]. *J Neuro Oncol*, 2022, 157(3): 575-591. DOI: 10.1007/s11060-022-04002-x.
- [28] HUANG S, XIANG J F. HOTAIR functions as a ceRNA to aggravate myocardial fibrosis through the miR-141/wnt5a axis[J/OL]. *Int J Cardiol*, 2023, 384: 74[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37087052/>. DOI: 10.1016/j.ijcard.2023.04.030.
- [29] YAO W, ZHOU P, YAN Q J, *et al.* ERVWE1 reduces hippocampal neuron density and impairs dendritic spine morphology through inhibiting Wnt/JNK non-canonical pathway *via* miR-141-3p in schizophrenia[J/OL]. *Viruses*, 2023, 15(1): 168[2025-02-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36680208/>. DOI: 10.3390/v15010168.

[收稿日期] 2025-02-08

[修回日期] 2025-08-29

[本文编辑] 党瑞山