

miR-139-5p 靶向 Notch1 抑制前列腺癌细胞上皮间质转化与转移

黄志扬¹, 蔡经爽¹, 周金¹, 张巍¹, 辛军¹, 蔡雪华², 叶燕乐¹

摘要: 目的 探讨 miR-139-5p 靶向调节 Notch1 表达对前列腺癌(PCa)细胞上皮间质转化(EMT)和转移能力的影响。方法 收集福建医科大学附属泉州第一医院泌尿外科手术切除的 PCa 组织标本,购买 PCa 细胞系,分别以良性前列腺增生(BPH)标本和人前列腺上皮细胞系为对照。采用 qRT-PCR 实验和 Western-blot 实验分别检测组织和细胞中 miR-139-5p 和 Notch1 的表达;采用双荧光素酶报告实验验证 miR-139-5p 与 Notch1 的靶向关系;采用 Western-blot 实验检测细胞 EMT 标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和 Vimentin 蛋白水平;采用 Transwell 实验检测细胞迁移能力;采用裸鼠尾静脉注射肿瘤细胞的方式建模,评估肺部肿瘤转移灶的情况。结果 在组织学和细胞水平上,与 BPH 组织比较,前列腺癌 miR-139-5p 低表达,而 Notch1 高表达,差别有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,高表达 miR-139-5p 的 PC-3 细胞 E-cadherin 表达升高,N-cadherin 和 Vimentin 表达降低;Transwell 移移实验每视野穿膜细胞数更少;裸鼠肺转移模型中平均肺转移瘤病灶数目更少,差别有统计学意义($P<0.05$)。miR-139-5p mimics 转染同时过表达 Notch1,与单纯 miR-139-5p mimics 转染比较,E-cadherin 水平降低,而 N-cadherin 和 Vimentin 水平升高,Transwell 移移实验中穿膜细胞数也增加,差别有统计学意义($P<0.05$)。过表达 miR-139-5p 降低 PC-3 细胞 Notch1 的 mRNA 和蛋白表达水平。双荧光素酶报告实验结果显示,野生型 Notch1 的 PC-3 细胞中,转染 miR-139-5p mimics 组细胞荧光活性显著低于 miR-NC 处理组,差别有统计学意义($P<0.05$)。结论 miR-139-5p 在 PCa 中低表达,可通过上调其表达靶向抑制 Notch1,从而抑制 PCa 细胞 EMT 和远处转移。

关键词: miR-139-5p; 前列腺癌; 上皮间质转化; 远处转移

文献标志码: A **文章编号:** 1672-4194(2023)06-0428-07

前列腺癌(prostate cancer, PCa)的发病率在我国呈逐年上升趋势,远处转移在临床中并不少见^[1]。与疾病的早、中期比较,转移性 PCa 预后较差,其发生机制目前仍未完全明确^[2-3]。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤转移的前置生物学过程,miR-139-5p 对 EMT 的抑制作用已有报道^[4-5],但具体调控靶点和机制仍未被完全阐明。Notch 通路在 PCa 进展和转移中起重要作用,也是 EMT 过程中的重要环节^[6]。PCa 细胞表面的神经源性基因 Notch 同源蛋白 1(Notch1)受体可接受癌相关巨噬细胞以直接接触或旁分泌的方式活化,进而增强癌细胞的侵袭性^[7]。在 PCa 中,Notch1 基因还与肿瘤血管新生密切相关^[6]。笔者拟通过组织学、细胞水平和动物实验研究 miR-139-5p 与 Notch1 的靶向关系,探讨 miR-139-5p 调控 Notch1 表达对 PCa 细胞 EMT 和远处转移能力的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 对象 收集 2022 年 5 月—2022 年 12 月福建医科大学附属泉州第一医院泌尿外科手术切除的 PCa 组织标本 10 例,患者年龄(73.1 ± 4.7)岁(68~82 岁);良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)组织标本 10 例为对照组,年龄(71.5 ± 3.4)岁(65~86 岁)。所有患者的病例资料完整,取标本前未接受其他抗肿瘤治疗,无合并其他类型肿瘤。本研究经福建医科大学附属泉州第一医院伦理委员会审批(泉一伦[2020]249 号),患者及其家属均知情同意。

1.2 材料 miR-139-5p mimics 由中国吉凯基因生物技术公司合成,序列为 5'-UCUACAGUG-CACGUGUCUCCAGU-3'。Notch1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、Vimentin 抗体(美国 Abcam 公司);人 PCa 细胞株 PC-3、人前列腺上皮细胞株 RWPE-1(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);qRT-PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);反转录试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司);雄性裸鼠[福建医科大学动物实验中心,许可证号: SYXK(闽)2020-0005]。

收稿日期: 2023-06-27

资助项目: 福建省自然科学基金项目(2020J011279)

作者单位: 福建医科大学附属泉州第一医院,泉州 362000

1. 泌尿外科;2. 护理部

作者简介: 黄志扬,男,主任医师,医学硕士

通信作者: 叶燕乐, Email: yanleye@163.com

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 细胞加入含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素双抗的改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM), 置于 37 °C、体积分数为 0.05 的 CO₂ 培养箱中培养。当细胞融合率为 80% 时, 使用 0.25% 胰酶消化并传代, 取第 3~4 代细胞进行实验研究。

1.3.2 qRT-PCR 实验 根据试剂盒说明书提取组织或细胞总 RNA, 进行反转录操作, 获得 cDNA 行 qRT-PCR 检测。反应条件: 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 40 个循环。本研究中使用的引物由福州博尚生物技术公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 The sequences of primers

基因名称	序列(5'-3')
<i>miR-139-5p</i>	F: TCTACAGTGCACCGTGT R: CTCAACTGGTGTCGTG
	F: TCTACAGTGCACGTGTC R: CTCAACTGGTGTCGTG
<i>Notch1</i>	F: TCTACAGTGCACGTGTC R: CTCAACTGGTGTCGTG
	F: CTCTGCTCCTCCTGTTGAC R: GCGCCCAATACGACCAAATC

miR-139-5p: 微小 RNA-139-5p; *Notch1*: 神经源性基因 *Notch* 同源蛋白 1; *GAPDH*: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.3.3 Western-blot 实验 提取总蛋白后, 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度。配置分离胶和浓缩胶, 行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白条带转移至硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶粉室温下封闭处理 2 h, 浸于一抗溶液(1:1 000)中 4 °C 孵育过夜, 再浸于二抗溶液(1:1 000)中孵育 30 min, 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤后采用增强化学发光法显影曝光。

1.3.4 *Notch1* 过表达慢病毒的构建和细胞转染 通过 pLVX 质粒连接, 测序后, 和包装质粒等一同转染至 HEK-293T 细胞, 收集培养上清液, 浓缩与纯化后获得过表达 *Notch1* 慢病毒。取对数期生长的 PC-3 细胞为转染对象, 按 1×10⁵ 细胞/孔的浓度接种于 6 孔板中。培养至 60% 融合时, 加入 polybrene 8 μg/mL, 以制备的慢病毒感染 PC-3 细胞 24 h 后, 用 1 μg/mL 嘌呤霉素进行筛选, 转染过程中以荧光显微镜观察。PC-3 细胞提取蛋白后行 Western-blot 实验验证是否过表达成功。

1.3.5 双荧光素酶报告实验 采用 Starbase 在线软件 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 预测

miR-139-5p 与 *Notch1* 结合情况和可能的结合位点, 以 mirSVR score 和 PhastCons score 作为量化指标。设计所需的野生型 *Notch1* 序列(含有结合位点的片段)和突变型 *Notch1* 序列(不含有结合位点的片段), 克隆到荧光载体 psiCHECK2 构建荧光报告载体质粒, 分别与 *miR-NC* 和 *miR-139-5p* 共转染至 PC-3 细胞中。

细胞相对荧光活性 = 海肾荧光素酶活性 / 萤火虫荧光素酶活性

1.3.6 Transwell 实验 选择对数期细胞, 用 0.25% 胰酶将贴壁细胞从壁上消化并制成单细胞悬液。Transwell 小室的下室加入 600 μL 含 10% 胎牛血清的细胞培养液; 取 100 μL 细胞悬液种植于 Transwell 小室的上室, 将上室置于下室中, 在 37 °C、体积分数为 0.05 的 CO₂ 条件下孵育 24 h; 取出上室, 用棉签拭去残留在滤膜上室表面的细胞, 经 PBS 洗涤, 用 95% 甲醇固定 20 min 后风干, 0.2% 结晶紫染色 15 min。显微镜下计数侵袭到滤膜下室表面的细胞, 每张滤膜随机取 5 个视野的均值作为结果。

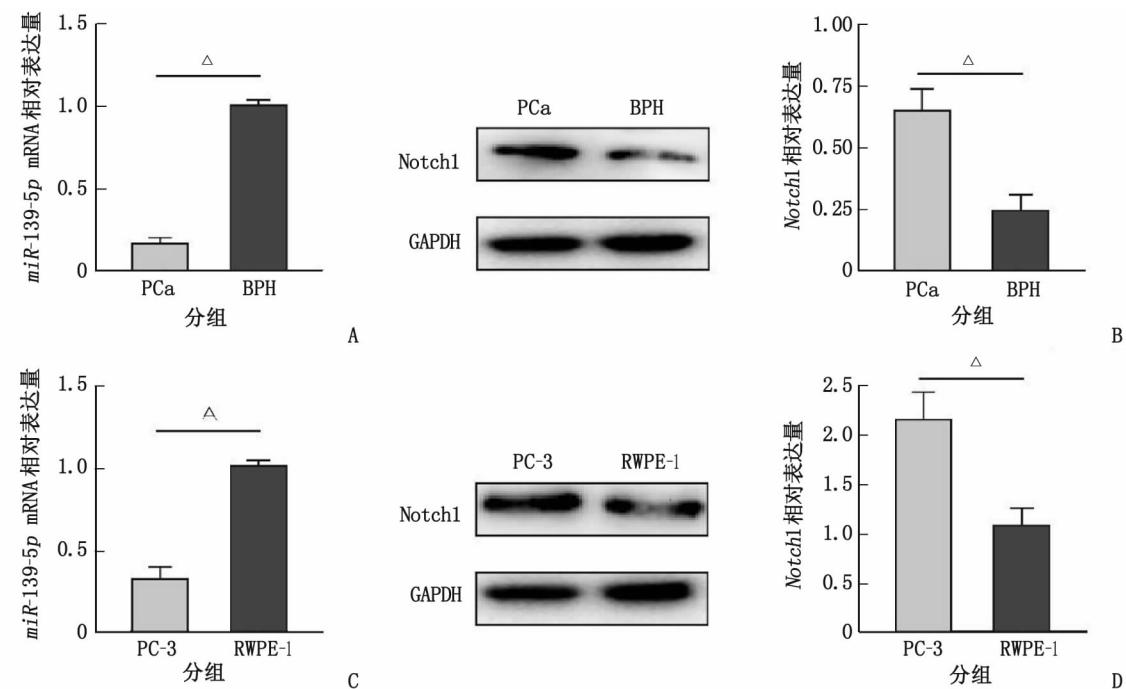
1.3.7 裸鼠肺转移模型 20 只雄性裸鼠在特定的无病原体条件下饲养, 分为对照组和处理组, 各 10 只。充分麻醉后, 缓慢注射 100 μL 浓度为 1×10⁷ mL⁻¹ 的 PC-3 细胞至动物尾静脉内。4 周后处死动物, 取出肺组织, 用多聚甲醛固定制片后, 在镜下计算肺转移灶数目。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。结果以 $\bar{X} \pm S$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析。双侧检验, *P*<0.05 为差别有统计学意义。

2 结 果

2.1 *miR-139-5p* 和 *Notch1* 表达水平检测 PCa 组织中, *miR-139-5p* 相对表达水平显著低于对照组的 BPH 组织(*t*=10.53, *P*<0.05, 图 1A), *Notch1* 蛋白的相对表达水平高于 BPH 组织, 差别有统计学意义(*t*=18.12, *P*<0.05, 图 1B)。细胞水平上, PCa 细胞 PC-3 的 *miR-139-5p* 相对表达水平显著低于对照组的 RWPE-1 细胞(*t*=15.74, *P*<0.05, 图 1C), *Notch1* 蛋白的相对表达水平高于 RWPE-1 细胞, 差别有统计学意义(*t*=12.73, *P*<0.05, 图 1D)。

2.2 *miR-139-5p* 对 *Notch1* 表达、PCa 细胞 EMT 和转移能力的影响 Western-blot 实验结果显示, 与对照组比较, 处理组中 E-cadherin 水平升高(*t*=6.78, *P*<0.05), N-cadherin(*t*=7.24, *P*<0.05) 和 Vimentin(*t*=9.11, *P*<0.05) 水平降低, 差别有统计



PCa: 前列腺癌; BPH: 良性前列腺增生; PC-3: 前列腺癌细胞; RWPE-1: 前列腺上皮细胞; Notch1: 神经源性基因 Notch 同源蛋白 1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。A: 2 组间 *miR-139-5p* mRNA 相对表达量比较 ($n=10$)；B: 2 组间 Notch1 蛋白水平比较 ($n=10$)；C: *miR-139-5p* mRNA 在 PC-3 和 RWPE-1 细胞中水平 ($n=3$)；D: Notch1 蛋白在 PC-3 和 RWPE-1 细胞中水平 ($n=3$)。与对照组比较, △: $P<0.05$ 。

图 1 不同样本中 *miR-139-5p* mRNA 和 Notch1 蛋白表达情况

Fig. 1 Expression of *miR-139-5p* mRNA and Notch1 protein in different samples

学意义,即上调 *miR-139-5p* 抑制 EMT; 处理组 PC-3 细胞 Notch1 在 mRNA 水平 ($t=13.90, P<0.05$) 和蛋白水平上 ($t=13.90, P<0.05$) 的表达也相对更低,差别有统计学意义(图 2A、B)。Transwell 迁移实验显示,处理组中每视野穿膜细胞数少于对照组 ($t=24.11, P<0.05$, 图 2C)。此外,裸鼠肺转移模型中, *miR-139-5p* mimics 转染 PC-3 注射组裸鼠的平均肺转移瘤病灶数目少于对照组,差别有统计学意义 [$(7.2 \pm 1.1) \text{ vs } (14.6 \pm 2.7)$, $t=16.32, P<0.05$, 图 2D], 即上调 *miR-139-5p* 抑制 PC-3 细胞转移能力。

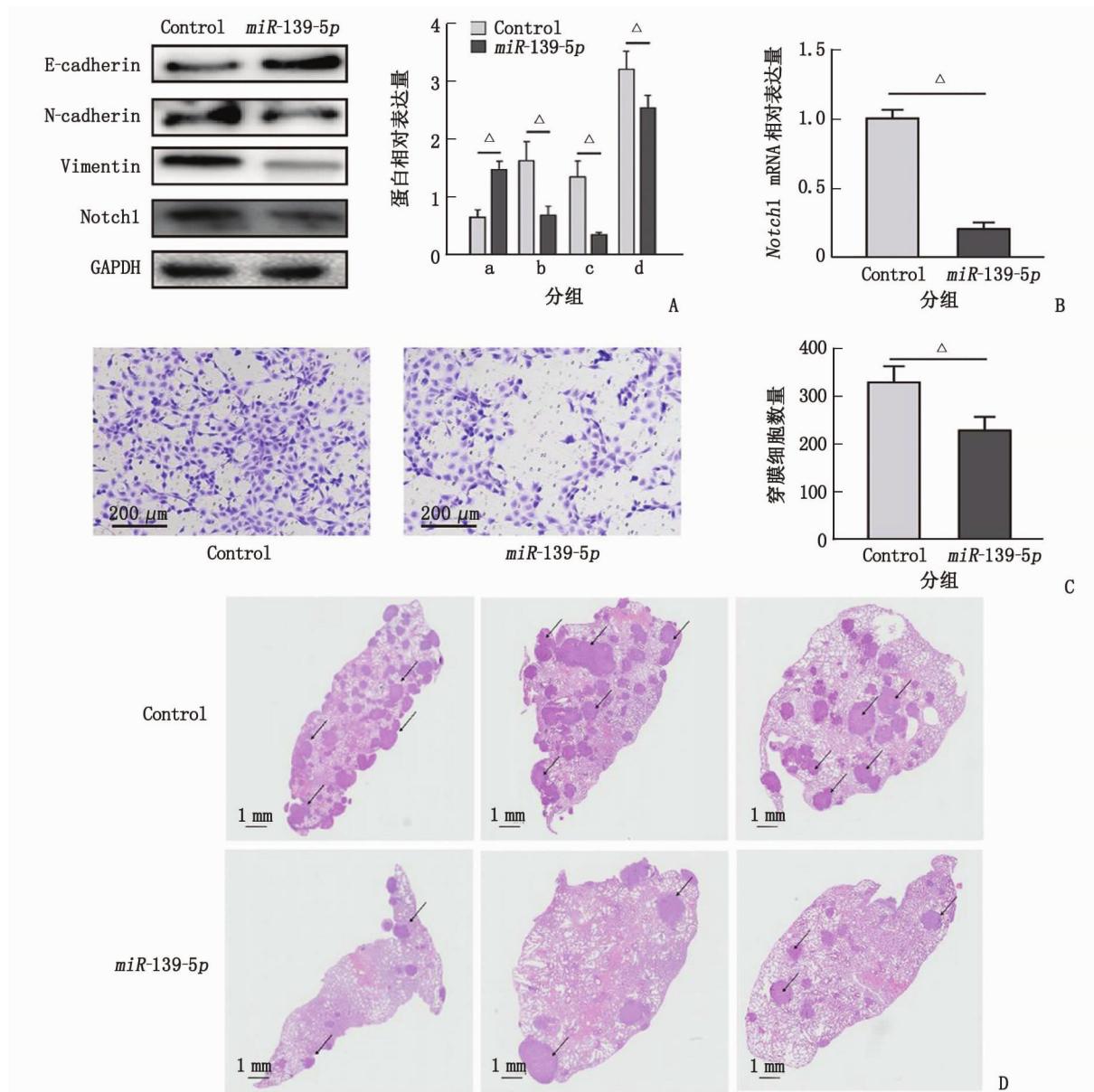
2.3 Notch1 对 PCa 细胞 EMT 和转移能力的影响

Western-blot 实验分别检测无处理组、空白转染组和 Notch1 过表达组的 Notch1 蛋白水平,验证过表达效率(图 3A)。同时,检测空白对照组、过表达 *miR-139-5p* 组和过表达 *miR-139-5p+Notch1* 组的蛋白表达情况,结果显示,过表达 *miR-139-5p+Notch1* 组的 E-cadherin 水平低于过表达 *miR-139-5p* 组 ($t=7.78, P<0.05$),而 N-cadherin 和 Vimentin 高于过表达 *miR-139-5p* 组,差别有统计学意义 ($t=13.71, P<0.05$; $t=11.34, P<0.05$, 图 3B)。在 Transwell 迁移实验中,过表达 *miR-139-5p+Notch1* 组的穿膜细胞数多于过表达 *miR-139-5p* 组,

差别有统计学意义 ($t=14.39, P<0.05$, 图 3C)。以双荧光素酶报告实验验证 *miR-139-5p* 与 Notch1 的 3'-UTR 是否直接结合。*miR-139-5p* 与 Notch1 的 3'-UTR 可能结合位点预测情况见图 3D, mirSVR score 为 -0.938 1, PhastCons score 为 0.669 9, 显示两者结合程度预计较稳定。野生型 Notch1 序列和突变型 Notch1 序列构建荧光报告载体质粒的示意图见图 3E,结果显示,野生型 Notch1 的 PC-3 细胞中,转染 *miR-139-5p* mimics 组细胞荧光活性显著低于 *miR-NC* 处理组,差别有统计学意义 ($t=13.21, P<0.05$);而突变型 Notch1 的 PC-3 细胞中, *miR-139-5p* mimics 处理组与 *miR-NC* 处理的细胞荧光活性比较,差别无统计学意义 ($t=0.38, P=0.35$, 图 3F)。

3 讨 论

PCa 是男性常见的恶性肿瘤,也是男性癌症患者第二大死因^[1]。随着社会老龄化、人们生活水平的不断提高和诊断技术的普及,目前我国 PCa 发病率呈迅速上升趋势。PCa 的发展一般经过癌前病变、原位癌、浸润癌和远处转移等多个阶段,其生物学行为高度异质性,而 PCa 细胞的侵袭和转移能力

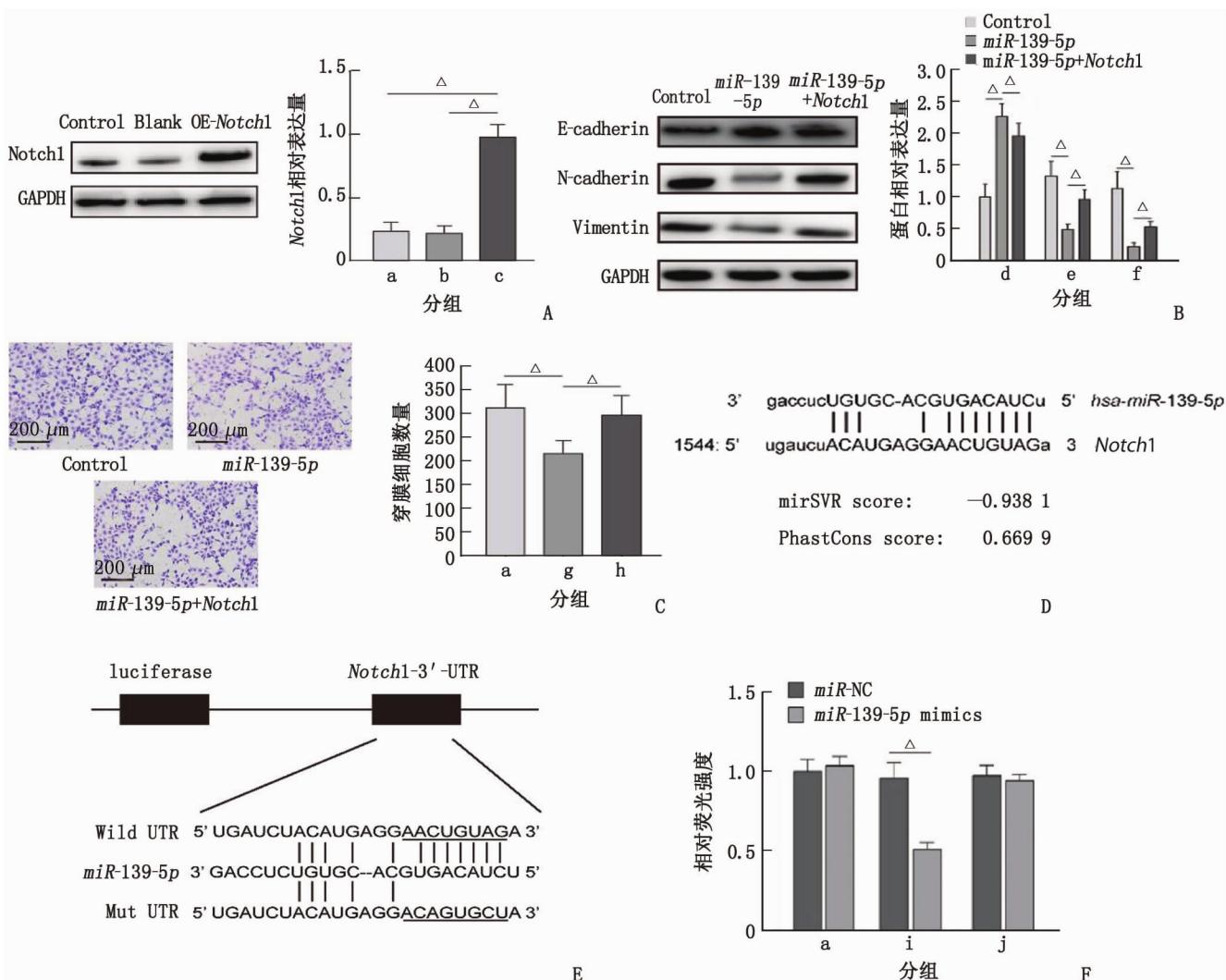


E-cadherin; E-钙黏蛋白; N-cadherin; N-钙黏蛋白; Vimentin; 波形蛋白; Notch1: 神经源性基因 Notch 同源蛋白 1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; PC-3: 前列腺癌细胞。a: E-cadherin 组; b: N-cadherin 组; c: Vimentin 组; d: Notch1 组。A: *miR-139-5p* mimics 处理对 PC-3 细胞 EMT 能力和 Notch1 蛋白表达的影响 ($n=3$)；B: *miR-139-5p* mimics 处理对 PC-3 细胞 Notch1 mRNA 水平的影响；C: *miR-139-5p* mimics 处理对 PC-3 细胞迁移能力的影响；D: *miR-139-5p* mimics 处理对裸鼠肺转移病灶数目影响。与空白对照组比较, $\Delta: P < 0.05$ 。

图 2 *miR-139-5p* 对 PC-3 细胞的影响
Fig. 2 Effects of *miR-139-5p* on PC-3 cell line

是与 PCa 患者预后关系最密切的生物学特性^[8]。EMT 是肿瘤侵袭转移早期事件之一^[9]。在 EMT 过程中, E-cadherin 表达下调, N-cadherin 和 Vimentin 表达上调, 细胞从上皮特征转分化为间质特征, 形态转变趋于纺锤形, 具有更强的黏附性, 并获得侵袭和转移的能力^[10-11]。研究^[12]表明, 对 EMT 的调控及其关键基因的干预, 可以改变 PCa 细胞的侵袭转移能力。miRNA 通过调控癌基因或抑癌基因的表达, 影响肿瘤的发生、发展和各种生物学行

为, 对 EMT 也具有重要调控作用^[13]。*miR-139-5p* 是一种肿瘤抑制分子, 在肺癌、肝癌、黑色素瘤和肠癌等恶性肿瘤中, 均处于低表达状态; 通过直接或间接上调其水平, 可抑制癌细胞增殖、侵袭和 EMT 等恶性表型^[4,14-15]。AZHATI 等^[16]报道, *miR-139-5p* 是脂肪含量和肥胖相关蛋白的下游靶点, 通过 PI3K/Akt 通路抑制 PCa 细胞生长; XIU 等^[17]的研究显示, 上调 *miR-139-5p* 可增强 PCa 细胞的放疗敏感性; NAM 等^[18]报道, *miR-139-5p* 可作为临床



E-cadherin; E-钙黏蛋白; N-cadherin; N-钙黏蛋白; Vimentin; 波形蛋白; Notch1; 神经源性基因 Notch 同源蛋白 1; GAPDH; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; PC-3; 前列腺癌细胞; EMT; 上皮间质转化。a: Control 组(对照组); b: Blank 组(空白组); c: OE-Notch1 组(Notch1 过表达); d: E-cadherin 组; e: N-cadherin 组; f: Vimentin 组; g: miR-139-5p 组; h: miR-139-5p + Notch1 组(Notch1 过表达); i: WT-Notch1 组(野生型 Notch1); j: MUT-Notch1 组(突变型 Notch1)。A: Western-blot 实验验证 Notch1 在 PC-3 细胞中过表达效率($n=3$)；B: miR-139-5p mimics 和 Notch1 过表达处理对 PC-3 细胞 EMT 的影响($n=3$)；C: miR-139-5p mimics 和 Notch1 过表达处理对 PC-3 细胞迁移能力的影响；D: miR-139-5p 序列与 Notch1 的 3'-UTR 区序列的匹配度；E: 野生型 Notch1 序列和突变型 Notch1 序列构建荧光报告载体质粒示意图；F: 双荧光酶报告实验中各组荧光强度。与空白对照组比较, Δ : $P < 0.05$ 。

图 3 miR-139-5p 通过结合 Notch1 抑制 PC-3 细胞 EMT 和迁移

Fig. 3 miR-139-5p targeted Notch1 to suppress EMT and migration of PC-3 cells

中 PCa 生化复发的敏感预测指标。本研究动物实验也获得相似结果, 即上调 miR-139-5p 的表达可显著减弱 PCa 细胞的远处转移能力。

Notch 信号通路在细胞正常发育的命运决定过程中起重要作用, 通路信号反馈异常或调控失衡与多种肿瘤的发生密切相关^[19]。MACIACZYK 等报道, 阻断 Notch 通路成员 CBF1 可抑制胶质瘤细胞中的 EMT 激活剂 ZEB1。抑制 Notch1 导致 NF- κ B 通路及其靶基因 CXCL8、MMP9、VEGF 等下调, 从而抑制乳腺癌的侵袭和血管生成^[21]。Notch 信号通路在 PCa 中与 EMT、血管新生等过

程相关, 驱动肿瘤的侵袭和转移^[6-7]。既往研究^[22-25]报道, miR-455-5p、miR-34-5p、miR-138、miR-146a-5p 等 miRNA 分子对 Notch1 存在直接或间接调控作用, 但 miR-139-5p 对 Notch1 是否具有调控作用仍不明。本研究通过对临床样本和细胞系的检测, 确认 PCa 中 miR-139-5p 为低表达而 Notch1 高表达, 发现两者间的靶向结合与负调控关系, 并证实 Notch1 是 miR-139-5p 调控 PCa 细胞 EMT 过程和转移的重要中间环节。对 Notch1 过表达可显著逆转、改善 miR-139-5p 造成的 PCa 细胞 EMT 和转移能力抑制。双荧光酶报告实验也证实 miR-139-5p

对*Notch1* 的直接靶向调控作用,这与在线预测网站提示的结果一致;而未预测到*Notch2*、*Notch3*、*Notch4* 等与*miR-139-5p* 具有相应的结合靶点,故本研究未进行深入探讨。

本研究探索了*miR-139-5p* 调控*Notch1* 对PCa 细胞EMT 和远处转移的抑制作用,揭示*miR-139-5p* 和*Notch1* 可能是治疗转移性PCa 的潜在靶点。本研究也存在一些不足之处:实验仅采用一种PCa 细胞系,未在多种细胞系进行重复验证,未来可进一步深入研究,增强实验结论的说服力。

参考文献:

- [1] LIN T T, CHEN Y H, WU Y P, et al. Risk factors for progression to castration-resistant prostate cancer in metastatic prostate cancer patients[J]. J Cancer, 2019, 10(22): 5608-5613.
- [2] XU N, CHEN S H, LIN T T, et al. Development and validation of hub genes for lymph node metastasis in patients with prostate cancer[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(8): 4402-4414.
- [3] CHEN Y H, CHEN H, LIN T T, et al. ARPC1A correlates with poor prognosis in prostate cancer and is up-regulated by glutamine metabolism to promote tumor cell migration, invasion and cytoskeletal changes[J]. Cell Biosci, 2023, 13(1): 38.
- [4] SUN J R, WANG S S, LIU P, et al. *MiR-139-5p-ZEB1* is a molecular regulator of growth, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition of cervical cancer[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 12723-12733.
- [5] WU T L, SUN L W, WANG C T, et al. Sevoflurane suppresses the migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through the *miR-139-5p/ARF6* axis[J]. J Surg Res, 2021, 258: 314-323.
- [6] SHEN Y M, CAO J S, LIANG Z X, et al. Strogen receptor α -NOTCH1 axis enhances basal stem-like cells and epithelial-mesenchymal transition phenotypes in prostate cancer [J]. Cell Commun Signal, 2019, 17(1): 50.
- [7] SHI F, SUN M H, ZHOU Z, et al. Tumor-associated macrophages in direct contact with prostate cancer cells promote malignant proliferation and metastasis through NOTCH1 pathway[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(16): 5994-6007.
- [8] YIN C, WANG M, WANG Y Z, et al. BHLHE22 drives the immunosuppressive bone tumor microenvironment and associated bone metastasis in prostate cancer[J]. J Immunother Cancer, 2023, 11(3): e005532.
- [9] LYU X P, Li L L, LYU L, et al. HOXD9 promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis by ZEB1 regulation in hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34: 133.
- [10] CHEN Z Y, WANG P W, SHIEH D B, et al. Involvement of gelsolin in TGF-beta 1 induced epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. J Biomed Sci, 2015, 22: 90.
- [11] MENG L X Y, GAO J, MO W J, et al. MIOX inhibits autophagy to regulate the ROS-driven inhibition of STAT3/c-Myc-mediated epithelial-mesenchymal transition in clear cell renal cell carcinoma[J]. Redox Biol, 2023, 68: 102956.
- [12] JANTA S, PRANWEERAPAI BOON K, VIVITHANAPORN P, et al. Holothurin inhibits RUNX1-enhanced EMT in metastasis prostate cancer via the Akt/JNK and P38 MAPK signaling pathway[J]. Mar Drugs, 2023, 21(6): 345.
- [13] GOHLKE L, ALAHDAB A, OBERHOFER A, et al. Loss of key EMT-regulating miRNAs highlight the role of ZEB1 in EGFR Tyrosine Kinase inhibitor-resistant NSCLC[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 4742.
- [14] DU F, CAO T Y, XIE H H, et al. KRAS mutation-responsive *miR-139-5p* inhibits colorectal cancer progression and is repressed by Wnt signaling[J]. Theranostics, 2020, 10(16): 7335-7350.
- [15] SUN T, LIU Z Y. *MicroRNA-139-5p* suppresses non-small cell lung cancer progression by targeting ATAD2[J]. Pathol Res Pract, 2023, 249: 154719.
- [16] AZHATI B, REHEMAN A, DILIXIATI D, et al. FTO-stabilized *miR-139-5p* targets ZNF217 to suppress prostate cancer cell malignancies by inactivating the PI3K/Akt/mTOR signal pathway[J]. Arch Biochem Biophys, 2023, 741: 109604.
- [17] XIU D H, LIU L, CHENG M, et al. Knockdown of lncRNA TUG1 enhances radiosensitivity of prostate cancer via the TUG1/*miR-139-5p/SMC1A* axis[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 2319-2331.
- [18] NAM R K, BENATAR T, WALLIS C J D, et al. *MicroRNA-139* is a predictor of prostate cancer recurrence and inhibits growth and migration of prostate cancer cells through cell cycle arrest and targeting IGF1R and AXL[J]. Prostate, 2019, 79(12): 1422-1438.
- [19] ZHOU S, HUANG H, ZHENG Z, et al. MOGS promotes stemness acquisition and invasion via enhancing NOTCH1-glycosylation dependent NOTCH pathway in colorectal cancer[J]. Am J Cancer Res, 2023, 13(12): 5996-6010.
- [20] MACIACZYK D, PICARD D, ZHAO L, et al. CBF1 is clinically prognostic and serves as a target to block cellular invasion and chemoresistance of EMT-like glioblastoma cells[J]. Br J Cancer, 2017, 117(1): 102-112.
- [21] LIU Y, SU C F, SHAN Y Q, et al. Targeting Notch1 inhibits invasion and angiogenesis of human breast cancer cells via inhibition nuclear factor- κ B signaling[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(6): 2681-2692.
- [22] ZHANG L, YANG F. Tanshinone II A improves diabetes-induced renal fibrosis by regulating the *miR-34-5p/Notch1* axis[J]. Food Sci Nutr, 2022, 10(11): 4019-4040.
- [23] LIU S J, DOU L, MIAO M, et al. HES1-mediated downregulation of *miR-138* sustains NOTCH1 activation and promotes proliferation and invasion in renal cell carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 72.
- [24] CAI S D, CHANG J L, SU M Q, et al. *miR-455-5p* promotes pathological cardiac remodeling via suppression of PRMT1-

- mediated Notch signaling pathway [J]. Cell Mol Life Sci, 2023, 80(12):359.
- [25] CHEN Z P, GU Q L, CHEN R C. *miR-146a-5p* regulates autophagy and NLRP3 inflammasome activation in epithelial
- barrier damage in the *in vitro* cell model of ulcerative colitis through the RNF8/Notch1/mTORC1 pathway [J]. Immunobiology, 2023, 228(4):152386.

***miR-139-5p* Targeted *Notch1* to Suppress Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Prostate Cancer Cells**

HUANG Zhiyang¹, CAI Jingshuang¹, ZHOU Jin¹, ZHANG Wei¹, XIN Jun¹, CAI Xuehua², YE Yanle¹

Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China

1. Department of Urology; 2. Department of Nursing

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of *miR-139-5p* targeted *Notch1* on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis of prostate cancer (PCa) cells. Methods The PCa tissue samples were obtained from patients who underwent radical prostatectomy in Department of Urology, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University and the PCa cell line was purchased. Samples of benign prostatic hyperplasia (BPH) and human prostatic epithelial cell line were used as the controls. qRT-PCR and Western-blot analysis were performed to detect the expression levels of *miR-139-5p* and *Notch1* in tissues and cells. Dual-luciferase reporter assay was performed to verify whether *miR-139-5p* combined with *Notch1* directly. The expression levels of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin, which were biomarkers of EMT were detected to determine the effect of *miR-139-5p* on EMT by Western-blot analysis. Transwell assay was used to detect the migration ability of the cells. The lung metastasis model in nude mice was established by injecting cancer cells *via* tail vein to determine the metastatic efficacy.

Results In cancer tissue and the cellular level, the expression of *miR-139-5p* was lower ($P < 0.05$), and the expression of *Notch1* was higher ($P < 0.05$) than that in the BPH group. Compared with PC-3 cells in the BPH group, the expression of E-cadherin in the group treated with *miR-139-5p* mimics was higher ($P < 0.05$), while the expression levels of N-cadherin ($P < 0.05$) and Vimentin ($P < 0.05$) were lower. Similarly, the cells migrating through the membrane ($P < 0.05$) and the lung metastatic lesions ($P < 0.05$) were fewer in the group treated with *miR-139-5p* mimics. The expression of E-cadherin in *miR-139-5p* mimics+OE-*Notch1* group was significantly lower ($P < 0.05$), while the expression levels of N-cadherin ($P < 0.05$), Vimentin ($P < 0.05$) were higher, compared with those in *miR-139-5p* mimics group. Also, the cells migrating through the membrane were more in the former group ($P < 0.05$). Overexpression of *miR-139-5p* decreased the mRNA ($P < 0.05$) and protein ($P < 0.05$) expression levels of *Notch1* in PC-3 cells. The results of dual luciferase reporter assay showed that the fluorescence of PC-3 cells with wild type-*Notch1*, transfected with *miR-139-5p* mimics decreased significantly compared with the cells treated with *miR-NC* ($P < 0.05$). **Conclusion** This study indicated that *miR-139-5p* was lowly expressed in PCa cells and up-regulating its expression could suppress EMT and metastasis of PCa cells by targeting *Notch1*.

KEY WORDS: *miR-139-5p*; prostate cancer; epithelial-mesenchymal transition; metastasis

(编辑:张慧茹)