·论著·

# miR-10a-5p通过调控Apaf1逆转膀胱癌T24细胞顺铂耐药

张鹰[1,2],李鹏[1,2],欧阳慧[1,2],刘嵩[1,2]
(1.南华大学附属第二医院重症医学科,湖南 衡阳 421001;2.南华大学衡阳医学院,湖南 衡阳 421001)

**摘要 目的** 探讨下调miR-10a-5p表达对人膀胱癌T24细胞顺铂(DDP)耐药的影响,并阐明其分子机制。**方法** 采用实时定量PCR检测人膀胱癌DDP耐药细胞株T24/DDP及其亲本T24细胞中miR-10a-5p的表达水平。将T24/DDP细胞分为对照组、inhibitor NC组、miR-10a-5p inhibitor组、miR-10a-5p inhibitor+si-NC组和miR-10a-5p inhibitor+si-Apaf1组,分别给予不同浓度DDP处理24 h。用MTT法检测各组细胞增殖活性,并计算耐药指数;用流式细胞术检测各组细胞凋亡水平;用Western blotting检测各组细胞中Apaf1、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3及胞质中细胞色素C(Cyt C)等蛋白的表达水平;用双萤光素酶报告基因实验验证miR-10a-5p与*Apaf1*的靶向结合关系。**结果** 与亲本T24细胞比较,T24/DDP细胞中miR-10a-5p表达水平升高($P < 0.05$)。与inhibitor NC组比较,miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞对DDP的敏感性增强,耐药指数降低,凋亡水平升高,且细胞中Apaf1、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3及胞质Cyt C等蛋白表达水平升高(均$P < 0.05$)。与miR-10a-5p inhibitor+si-NC组比较,miR-10a-5p inhibitor+si-Apaf1组T24/DDP细胞对DDP敏感性降低,耐药指数升高,凋亡水平降低(均$P < 0.05$)。双萤光素酶报告基因实验结果显示,*Apaf1*是miR-10a-5p下游靶基因。**结论** miR-10a-5p敲低可靶向上调*Apaf1*,从而逆转T24/DDP细胞对DDP的耐药性。

**关键词** 膀胱癌;miR-10a-5p;*Apaf1*;顺铂;耐药
**中图分类号** R737.14 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)05-0448-07
**网络出版地址** https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250519.1520.008
**DOI:** 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.05.012

## miR-10a-5p reverses cisplatin resistance in bladder cancer T24 cells via regulating Apaf1

ZHANG Ying[1,2], LI Peng[1,2], OUYANG Hui[1,2], LIU Song[1,2]
(1. Department of Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China)

**Abstract Objective** To investigate the effect of miR-10a-5p downregulation on cisplatin (DDP) resistance in bladder cancer T24 cells and elucidate the underlying molecular mechanism. **Methods** Quantitative real-time PCR quantified the expression of miR-10a-5p in the cisplatin-resistant bladder cancer cell line T24/DDP and its parental cell line T24. T24/DDP cells were divided into control, inhibitor NC, miR-10a-5p inhibitor, miR-10a-5p inhibitor+si-NC, and miR-10a-5p inhibitor+si-Apaf1 groups. Different concentrations of DDP were administered for 24 h. Cell proliferative activity was detected using the MTT assay, and the drug resistance index was calculated. Apoptosis was analyzed using flow cytometry. The protein expression levels of Apaf1, cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, and cytochrome C (Cyt C) were analyzed using Western blotting. A dual-luciferase reporter gene assay confirmed the target binding relationship between miR-10a-5p and *Apaf1*. **Results** The expression of miR-10a-5p was significantly higher in drug-resistant T24/DDP cells than in parental T24 cells ($P < 0.05$). Compared with the inhibitor NC group, the miR-10a-5p inhibitor group exhibited increased T24/DDP cells sensitivity to DDP, decreased drug resistance index, and elevated apoptosis levels. The protein expression levels of Apaf1, cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, and cytoplasmic Cyt C proteins were upregulated in the miR-10a-5p inhibitor group compared with the inhibitor NC group (all $P < 0.05$). The DDP sensitivity of T24/DDP cells was reduced in the miR-10a-5p inhibitor+si-Apaf1 group compared to the miR-10a-5p inhibitor+si-NC group, accompanied by an increase in the drug resistance index and a decrease in apoptosis (all $P < 0.05$). The double-luciferase reporter gene assay results confirmed that *Apaf1* was a downstream target gene regulated by miR-10a-5p. **Conclusion** miR-10a-5p knockdown targeting the upregulation of *Apaf1* reversed DDP resistance in T24/DDP cells.

**Keywords** bladder cancer; miR-10a-5p; *Apaf1*; cisplatin; drug resistance

**基金项目:** 湖南省卫生健康委卫生科研课题(D202304058812)
**作者简介:** 张鹰(1987-),男,主治医师,硕士.
**通信作者:** 刘嵩,E-mail:932304751@qq.com
**收稿日期:** 2024-08-14
**网络出版时间:** 2025-05-20 10:15:23

膀胱癌(bladder cancer,BC)是较为常见的泌尿系统恶性肿瘤[1]。作为临床治疗BC的一线化疗药物,顺铂(cisplatin,DDP)可以降低BC引发的死亡风险,但化疗药物的长期使用往往会产生耐药性,导致患者治疗效果不佳[2]。微RNA(microRNA,miRNA)是一类由内源基因编码的非编码单链RNA分子,长度约为22个核苷酸,其异常表达与肿瘤的恶性进程有关。miR-10a是miR-10家族成员之一,包括miR-10a-3p和miR-10a-5p 2个成熟体。其中,miR-10a-5p高度保守,广泛参与BC的发生发展。YANG等[3]研究发现,miR-10a-5p在BC患者癌组织中高表达,并与晚期临床病理特征和患者不良预后密切相关。KÖHLER等[4]研究表明,受miR-10a-5p调控的DNA序列高甲基化可作为BC的表观遗传生物标志物。VEERLA等[5]研究显示,miR-10a-5p在尿路上皮癌组织中高表达,其表达水平与尿路上皮癌病理亚型相关。然而,miR-10a-5p是否参与调控BC化疗耐药目前尚不明确。凋亡蛋白酶激活因子1(apoptotic protease-activating factor 1,Apaf1)作为细胞凋亡的核心因子,在线粒体凋亡中发挥重要作用,并参与调控肿瘤细胞凋亡及耐药[6]。YUAN等[7]研究表明,沉默*Apaf1*基因可降低BC细胞对DDP化疗的敏感性。然而,miR-10a-5p是否可通过靶向*Apaf1*调控人膀胱癌DDP耐药有待进一步研究。本研究拟探讨miR-10a-5p敲低对膀胱癌细胞DDP耐药性的影响及机制,旨在为治疗膀胱癌DDP耐药提供有效的潜在靶点。

## 1　材料与方法

### 1.1　主要材料与试剂

人膀胱癌细胞株T24购自中国典型培养物保藏中心;人膀胱癌顺铂耐药细胞株T24/DDP由本课题组前期构建并保留[8];McCoy's 5A培养基、Opti-MEM培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购自美国Gibco公司;噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide,MTT)检测试剂盒购自美国MCE公司;lipofectamine 6000™转染试剂、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒、细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、逆转录试剂盒、高灵敏ECL发光检测试剂盒和BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;MirX miRNA RT-qPCT TB和GreenTB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒购自日本TaKaRa公司;miR-10a-5p抑制物、miR-10a-5p模拟物和Apaf1干扰质粒及其阴性对照均由汉恒生物科技(上海)有限公司提供;Apaf1抗体、Cyt C抗体、cleaved caspase-9抗体、cleaved caspase-3抗体购自英国abcam公司;GAPDH抗体、Lamin B1抗体和HPR酶标记的山羊抗兔IgG(H+L)二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。

### 1.2　主要仪器

$CO_2$培养箱(型号CCL-170B-8)购自新加坡ESCO公司,倒置显微镜(型号NIB610-FL)购自宁波永新光学股份有限公司,酶标仪(型号HH3400)购自美国PerkinElmer公司,实时定量PCR仪(型号CFX96)购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司,化学发光系统(型号Tanon-5200)购自上海天能科技有限公司。

### 1.3　方法

1.3.1　细胞培养:采用含10%胎牛血清的McCoy's 5A完全培养基复苏T24/DDP及亲本T24细胞,复苏后将细胞置于37 ℃、5% $CO_2$培养箱中培养。待细胞融合度达到90%时,使用0.25%胰酶消化液消化细胞,并接种至细胞培养板中用于后续实验。

1.3.2　细胞转染和分组:按照$5\times10^5$/孔的密度将对数生长期T24/DDP细胞接种至6孔板中培养过夜,使用Lipo6000™转染试剂和Opti-MEM培养基参照说明书进行转染实验。将细胞分为对照组、inhibitor NC组、miR-10a-5p inhibitor组、miR-10a-5p inhibitor+si-NC组和miR-10a-5p inhibitor+si-Apaf1组。转染12 h后更换新鲜的完全培养基,继续培养48 h后收集细胞用于后续实验。

1.3.3　实时定量PCR检测细胞中miR-10a-5p和*Apaf1* mRNA表达水平:收集各组细胞沉淀,加入1 mL TRIzol试剂抽取细胞中总RNA,随后使用分光光度计测定RNA纯度和浓度。采用逆转录试剂盒将总RNA逆转录成cDNA,分别采用MirX miRNA RT-qPCT TB Green试剂盒和TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒对miRNA和mRNA进行实时定量PCR扩增。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分别以*U6*和*GAPDH*为内参计算各组细胞中miR-10a-5p和*Apaf1* mRNA相对表达量。引物序列如下:miR-10a-5p,正向,5'-CGCTACCCTGTAGATCCGAA-3';反向,5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'。*Apaf1*,正向,5'-AGGAAAAAGTAAGAAATGAGCCCAC-3';反向,5'-TGTCCTTACACTGGAAGAAGAGA-3'。*U6*,

正向，5’-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3’；反向，5’-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3’。*GAPDH*，正向，5’-GAATGGGCAGCCGTTAGGAA-3’；反向，5’-CCCAATACGACCAAATCAGAGA-3’。反应条件为95 ℃预变性5 min，95 ℃变性 5 s、60 ℃ 退火30 s和 72 ℃ 延伸30 s，进行40个循环。

1.3.4　MTT法检测各组细胞增殖活性：按照$4\times10^3$/孔的密度，将转染后的各组T24/DDP细胞接种至96孔板中，同时设置调零孔（仅含培养基），置于培养箱中过夜。加入不同浓度（0、0.25、0.50、1.00、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00 mg/L）的DDP处理各组细胞24 h后，取出培养板，向每孔加入20 μL MTT（5 g/L）溶液，继续培养4 h，弃培养液，每孔加入100 μL DMSO，置于振荡器上以300 r/min震荡10 min，采用酶标仪检测490 nm处吸光度（absorbance，A）值，根据下列公式计算细胞增殖活性。细胞增殖活性（%）=（$A_{实验孔}-A_{调零孔}$）/（$A_{对照孔}-A_{调零孔}$）×100。根据细胞增殖率计算半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，$IC_{50}$）。耐药指数=$IC_{50}$（T24/DDP细胞）/$IC_{50}$（T24细胞），逆转倍数= $IC_{50}$（T24/DDP细胞）/$IC_{50}$（T24/DDP细胞+miR-10a-5p inhibitor），T24细胞的$IC_{50}$为（1.30 ± 0.14）mg/L[8]。

1.3.5　Annexin V-FITC/PI双染结合流式细胞术检测各组细胞凋亡率：按照$5\times10^5$/孔的密度，将转染后的各组T24/DDP细胞接种至6孔板中，加入不同浓度（0、1 mg/L）DDP处理各组细胞24 h，分别收集$1\times10^5$个细胞，加入200 μL PBS重悬，再分别加入5 μL Annexin V-FITC溶液和10 μL碘化丙啶（propidium iodide，PI）染液，充分混匀，于4 ℃避光条件下孵育15 min，通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.3.6　双萤光素酶报告基因实验验证miR-10a-5p与*Apaf1*的靶向关系：分别将含有miR-10a-5p结合位点的*Apaf1*野生型（*Apaf1*-wt）和突变型（*Apaf1*-mut）片段插入双萤光素酶报告载体pmirGLO中，得到*Apaf1*-wt和*Apaf1*-mut质粒。采用lipofectamine6000™转染试剂和Opti-MEM培养基参照说明书进行转染。转染48 h后，采用荧光酶标仪分别检测各组细胞萤火虫萤光素酶荧光度值和海肾萤光素酶荧光度值，以海肾萤光素酶荧光度值为内参，计算相对萤光素酶活性。

1.3.7　Western blotting检测相关蛋白表达：收集各组转染后的细胞，部分细胞加入RIPA裂解液提取细胞中总蛋白用于检测Apaf1、cleaved caspase-9和cleaved caspase-3蛋白水平，另一部分细胞分离浆蛋白用于检测Cyt C蛋白表达水平。采用BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度，取30 μg蛋白上样，依次经过凝胶、电泳和转膜处理后，将膜置于5%脱脂牛奶中封闭1 h，加入Apaf1抗体（1 ∶ 1 000）、Cyt C抗体（1 ∶ 1 000）、cleaved caspase-9抗体（1 ∶ 1 000）、cleaved caspase-3抗体（1 ∶ 1 000）、GAPDH抗体（1 ∶ 1 000）和Lamin B1（1 ∶ 1 000）抗体，4 ℃孵育过夜，加入HPR酶标记的山羊抗兔IgG（H+L）二抗（1 ∶ 5 000），室温孵育1 h，加入ECL显影液曝光，采用ImageJ软件分析各蛋白条带灰度值，并计算目的蛋白相对表达水平，其中GAPDH为总蛋白内参，Lamin B1为核蛋白内参。

1.4　统计学分析

采用SPSS 26.0统计软件进行统计分析，数据以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，2组间比较采用*t*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

## 2　结果

2.1　耐药株T24/DDP细胞中miR-10a-5p表达水平

实时定量PCR结果显示，与T24细胞（1.02 ± 0.03）比较，T24/DDP细胞中miR-10a-5p表达水平（16.73 ± 1.49）升高（$P<0.05$）。

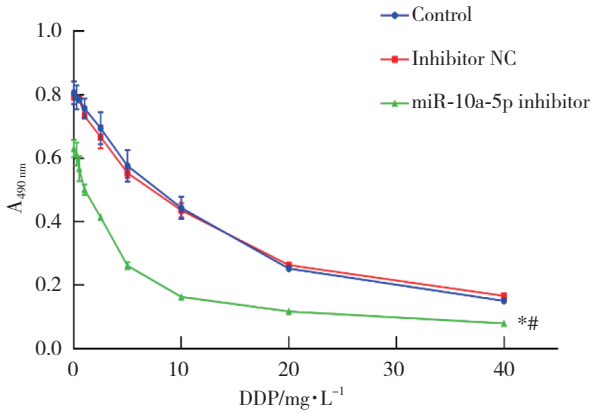
2.2　下调miR-10a-5p表达对T24/DDP耐药性的影响

实时定量PCR结果显示，与对照组（1.01 ± 0.04）和inhibitor NC组（1.02 ± 0.02）相比，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞中miR-10a-5p表达水平（0.12 ± 0.02）降低（$P<0.05$），提示miR-10a-5p inhibitor转染成功。MTT结果显示（图1），随着DDP处理浓度升高，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞增殖活性较对照组和inhibitor NC组降低（$P<0.05$）；与对照组$IC_{50}$值（11.14 mg/L ± 0.56 mg/L）、耐药指数（8.57）和inhibitor NC组$IC_{50}$值（11.20 mg/L ± 0.26 mg/L）、耐药指数（8.62）比较，miR-10a-5p inhibitor组$IC_{50}$值（4.12 mg/L ± 0.19 mg/L）、耐药指数（3.17）降低，逆转倍数为2.70。

2.3　下调miR-10a-5p表达对DDP暴露下T24/DDP细胞凋亡的影响

流式细胞术结果（图2）显示，0 mg/L DDP干预时，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞凋亡率（17.48% ± 1.01%）较inhibitor NC组（5.31% ± 0.68%）升高（$P<$

0.05)；1 mg/L DDP干预时，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞凋亡率(34.08% ± 2.82%)较inhibitor NC组(6.03% ± 0.32% )升高($P < 0.05$)；而与0 mg/L DDP干预比较，1 mg/L DDP干预后inhibitor NC组T24/DDP细胞凋亡率无明显变化($P > 0.05$)。




*$P$ < 0.05 vs. control group; #$P$ < 0.05 vs. inhibitor NC group.

图1　下调miR-10a-5p表达对T24/DDP细胞增殖活性的影响

Fig.1　Effects of downregulation of miR-10a-5p expression on the proliferation activity of T24/DDP cells

## 2.4　下调miR-10a-5p表达对T24/DDP细胞中线粒体凋亡途径相关蛋白表达水平的影响

Western blotting结果(图3)显示，与inhibitor NC组比较，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞中Apaf1、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3及胞质中Cyt C蛋白表达水平均升高($P < 0.05$)。

## 2.5　miR-10a-5p与*Apaf1*存在靶向结合位点

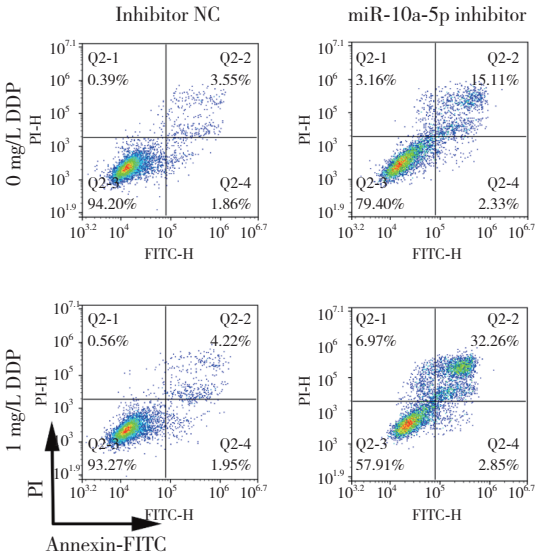
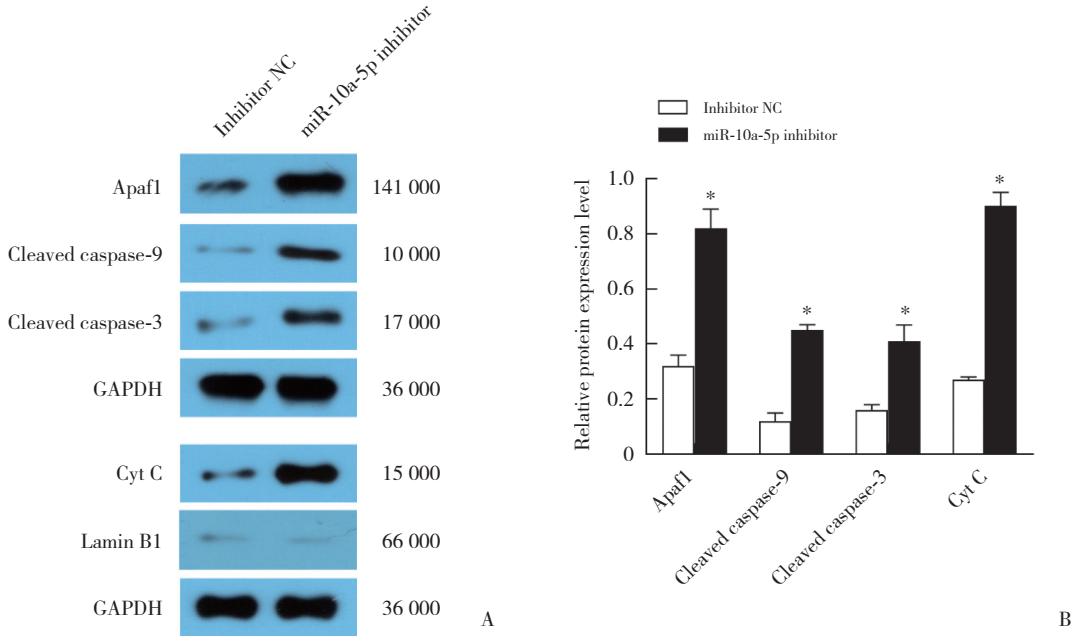



图2　下调miR-10a-5p表达对DDP暴露下T24/DDP细胞凋亡的影响

Fig.2　Effect of downregulation of miR-10a-5p expression on apoptosis of T24/DDP cells exposed to DDP

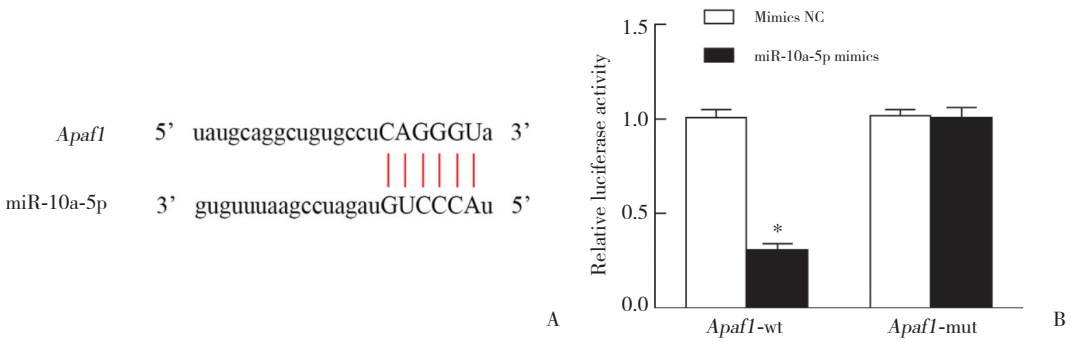



A, electropherogram of protein expression in T24/DDP cells; B, histogram of protein expression in T24/DDP cells. *$P$ < 0.05 vs. inhibitor NC group. Lamin B1 was used as a nuclear protein reference.

图3　下调miR-10a-5p表达对T24/DDP细胞中Apaf1、Cyt C、cleaved caspase-9和cleaved caspase-3蛋白表达水平的影响

Fig.3　Effects of downregulation of miR-10a-5p expression on the expression levels of Apaf1, Cyt C, cleaved caspase-9, and cleaved caspase-3 proteins in T24/DDP cells

miRmap在线数据库（https://mirmap.ezlab.org/）预测结果显示，miR-10a-5p与*Apaf1*之间存在互补的结合位点（图4A）。双萤光素酶报告基因实验结果（图4B）显示，*Apaf1*-wt+miR-10a-5p mimics组共转染后T24细胞中萤光素酶活性相较于*Apaf1*-wt+mimics NC组显著下降（$P < 0.05$）；*Apaf1*-mut+miR-10a-5p mimics组共转染后T24细胞中萤光素酶活性与*Apaf1*-mut+mimics NC组相比，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。同时，实时定量PCR结果显示，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞中*Apaf1* mRNA表达水平（7.28 ± 0.69）与inhibitor NC组（0.99 ± 0.03）相比明显升高（$P < 0.05$）；Western blotting结果显示，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞中Apaf1蛋白表达水平与inhibitor NC组相比显著升高（$P < 0.05$，图3A）。




A，binding site of miR-10a-5p to *Apaf1*；B，relative luciferase activity in T24/DDP cells. *$P < 0.05$ vs. mimics NC group.

图4　miR-10a-5p与*Apaf1*的靶向关系

Fig.4　miR-10a-5p relationship with *Apaf1* targeting

### 2.6　*Apaf1*基因沉默抑制miR-10a-5p下调对T24/DDP细胞DDP耐药的逆转作用

Western blotting结果（图5A、5B）显示，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞中Apaf1蛋白表达水平与inhibitor NC组相比显著升高（$P < 0.05$），而miR-10a-5p inhibitor+si-Apaf1组T24/DDP细胞中Apaf1蛋白表达水平与miR-10a-5p inhibitor组和miR-10a-5p inhibitor+si-NC组相比显著降低（$P < 0.05$）。MTT结果（图5C）显示，随着DDP处理浓度升高，miR-10a-5p inhibitor+si-Apaf1组T24/DDP细胞增殖活性较miR-10a-5p inhibitor组和miR-10a-5p inhibitor+si-NC组升高（$P < 0.05$）。与inhibitor NC组$IC_{50}$值（11.10 mg/L ± 0.42 mg/L）相比，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞$IC_{50}$值（4.24 mg/L ± 0.16 mg/L）降低；与miR-10a-5p inhibitor组（4.24 mg/L ± 0.16 mg/L）和miR-10a-5p inhibitor+si-NC组$IC_{50}$值（4.16 mg/L ± 0.21 mg/L）相比，miR-10a-5p inhibitor+si-Apaf1组T24/DDP细胞$IC_{50}$值（8.10 mg/L ± 0.45 mg/L）升高。

### 2.7　*Apaf1*基因沉默抑制miR-10a-5p下调对DDP暴露下T24/DDP细胞凋亡的诱导作用

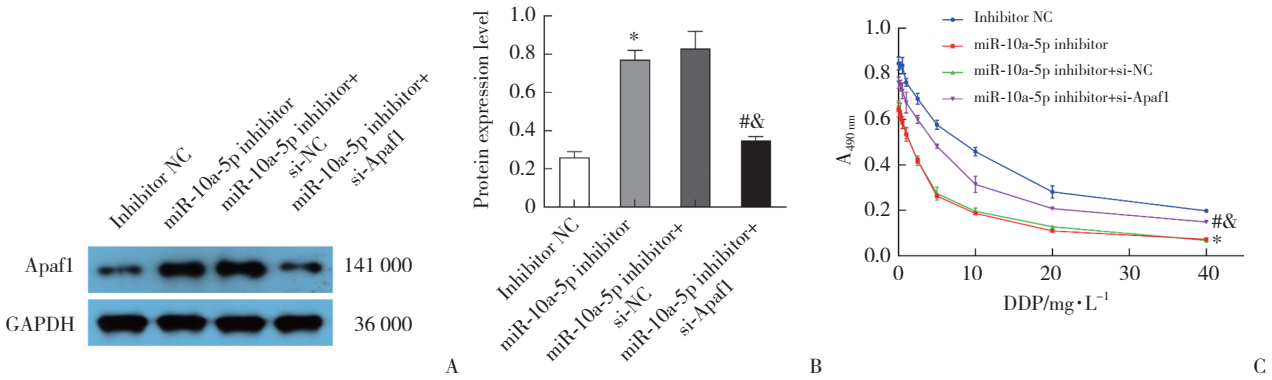
细胞凋亡检测结果（图6）显示，0 mg/L DDP干预时，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞凋亡率（16.39% ± 1.12%）与inhibitor NC组（5.71% ± 0.61%）相比明显升高（$P < 0.05$），而miR-10a-5p inhibitor+si-Apaf1组T24/DDP细胞凋亡率（8.95% ± 0.23%）与miR-10a-5p inhibitor+si-NC组（15.21% ± 0.95%）相比显著降低（$P < 0.05$）。1.0 mg/L DDP干预时，miR-10a-5p inhibitor组T24/DDP细胞凋亡率（32.79% ± 2.57%）与inhibitor NC组（6.30% ± 0.44%）相比显著升高（$P < 0.05$）；miR-10a-5p inhibitor +si-Apaf1组T24/DDP细胞凋亡率（18.95% ± 0.83%）与miR-10a-5p inhibitor+si-NC组（30.71% ± 1.89%）相比明显降低（$P < 0.05$）。

## 3　讨论

miRNA与多种肿瘤的发生发展关系密切，在调控BC细胞增殖、凋亡以及DDP耐药性方面发挥着关键作用。

LIN等[9]研究报道，miRNA-325在BC细胞系和BC组织中低表达，上调其表达可抑制BC细胞增殖并降低细胞对DDP的耐药性。然而，miR-10a-5p与膀胱癌DDP耐药是否有关目前尚不明确。本研究结果显示，miR-10a-5p在人膀胱癌DDP耐药细胞株T24/DDP

中表达升高；下调miR-10a-5p表达可抑制T24/DDP细胞增殖活性，促进DDP诱导的细胞凋亡，说明下调miR-10a-5p可增强T24/DDP细胞对DDP的敏感性，但具体机制尚未明确。




A，electrophoresis of protein expression in T24/DDP cells；B，histogram of protein expression in T24/DDP cells；C，cell proliferation activity of T24/DDP cells. *$P$ < 0.05 vs. inhibitor NC group；#$P$ < 0.05 vs. miR-10a-5p inhibitor group；&$P$ < 0.05 vs. miR-10a-5p inhibitor+si-NC group.

图5　*Apaf1*基因沉默和下调miR-10a-5p表达对T24/DDP细胞增殖活性和$IC_{50}$的影响

Fig.5　Effect of *Apaf1* gene silencing and downregulation of miR-10a-5p expression on the proliferation activity and $IC_{50}$ in T24/DDP cells

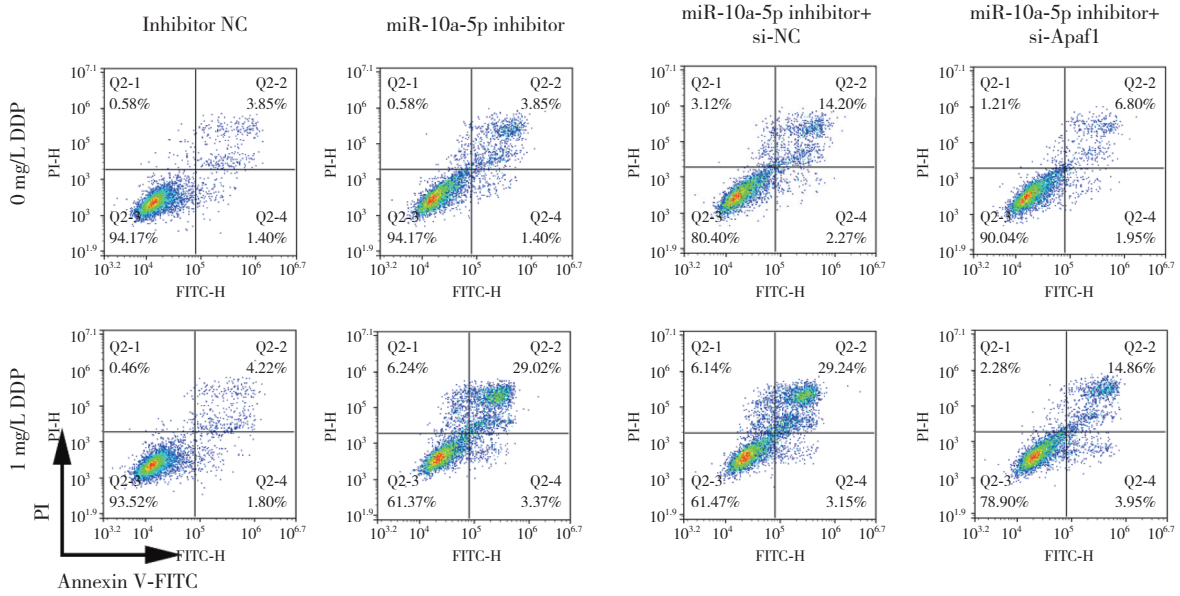



图6　*Apaf1*基因沉默和下调miR-10a-5p表达对T24/DDP细胞凋亡的影响

Fig.6　Effect of *Apaf1* gene silencing and downregulation of miR-10a-5p expression on apoptosis of T24/DDP cells

*Apaf1*作为一种抑癌基因，在线粒体参与的凋亡途径中具有重要作用，与肿瘤细胞凋亡和耐药性关系密切。研究[10-11]表明，细胞受到诸如DNA损伤、化疗药物、氧化应激等刺激时，位于线粒体内膜上的Cyt C会被释放到胞质中，与单体形式的Apaf1蛋白结合，引起Apaf1构象改变，随后在ATP或dATP的参与下形成凋亡复合体，进而活化caspase-9，并进一步通过级联反应激活caspase-3诱导细胞凋亡。因此上调*Apaf1*表达诱导细胞凋亡可能是降低肿瘤细胞耐药性的关键途径。DDP对敲除*Apaf1*的肝癌HepG2细胞凋亡诱导作用降低[12]，而*Apaf1*过表达可增强多西紫杉醇对乳腺癌MCF-7细胞的敏感性及凋亡促进作用[13]。李彦明等[14]研究报道，miR-125a-5p可增强人非小细胞肺癌A549细胞对吉非替尼的耐药性，其机制是通过靶向*Apaf1*促进细胞增殖和迁移并抑制凋亡实现的。本研究结果显示，miR-10a-5p靶向负

调控*Apaf1*表达，下调miR-10a-5p可促进T24/DDP细胞中*Apaf1*表达，同时上调Apaf1、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3及胞质中Cyt C等蛋白表达。进一步研究结果显示，下调miR-10a-5p同时沉默*Apaf1*可促进T24/DDP细胞增殖，抑制细胞凋亡，增强细胞对DDP的耐药性，提示下调miR-10a-5p可通过靶向上调*Apaf1*表达逆转耐药细胞株T24/DDP对DDP的耐药性，进一步说明了miR-10a-5p/Apaf1分子轴可通过调控caspase-9和caspase-3活化影响T24/DDP细胞对DDP耐药的分子机制。

综上所述，miR-10a-5p在膀胱癌耐药细胞株T24/DDP细胞高表达，其表达下调可通过激活*Apaf1*介导的线粒体凋亡途径，抑制T24/DDP细胞增殖并促进细胞凋亡，从而降低细胞对DDP的耐药性。临床可通过检测 miR-10a-5p 水平筛选高表达患者，开发抑制miR-10a-5p的药物并联合DDP增强疗效，同时开展临床试验评估安全性与有效性。本研究存在一定局限性，如缺乏体内实验数据支撑，后续课题组将进一步开展研究验证。

**参考文献：**


[1] 张玉冬，魏后忆，王润锦，等.回肠通道术术前营养控制状态评分对判断膀胱癌患者预后的价值[J]. 首都医科大学学报，2023，44(3)：449-456. DOI：10.3969/j.issn.1006.7795.2023.03.014.

[2] LI F，ZHENG ZS，CHEN W，et al. Regulation of cisplatin resistance in bladder cancer by epigenetic mechanisms[J]. Drug Resist Updat，2023，68：100938. DOI：10.1016/j.drup.2023.100938.

[3] YANG L，SUN HF，GUO LQ，et al. miR-10a-5p：a promising biomarker for early diagnosis and prognosis evaluation of bladder cancer[J]. Cancer Manag Res，2021，13：7841-7850. DOI：10.2147/CMAR.S326732.

[4] KÖHLER CU，BRYK O，MEIER S，et al. Analyses in human urothelial cells identify methylation of miR-152，miR-200b and miR-10a genes as candidate bladder cancer biomarkers[J]. Biochem Biophys Res Commun，2013，438(1)：48-53. DOI：10.1016/j.bbrc.2013.07.021.

[5] VEERLA S，LINDGREN D，KVIST A，et al. MiRNA expression in urothelial carcinomas：important roles of miR-10a，miR-222，miR-125b，miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis，and frequent homozygous losses of miR-31[J]. Int J Cancer，2009，124(9)：2236-2242. DOI：10.1002/ijc.24183.

[6] 贾明旭，陈吉. 凋亡蛋白酶活化因子-1与肿瘤相关性的研究进展[J]. 世界华人消化杂志，2015，23(23)：3729-3735.

[7] YUAN WB，ZHOU R，WANG JZ，et al. Circular RNA Cdr1as sensitizes bladder cancer to cisplatin by upregulating APAF1 expression through miR-1270 inhibition[J]. Mol Oncol，2019，13(7)：1559-1576. DOI：10.1002/1878-0261.12523.

[8] 张鹰，蒋先训，万朝辉. TPX2基因沉默对膀胱癌耐药细胞株T24/DDP顺铂化疗敏感性的增强作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版)，2024，50(2)：346-354. DOI：10.13481/j.1671-587X.20240207.

[9] LIN T，ZHOU SM，GAO H，et al. microRNA-325 is a potential biomarker and tumor regulator in human bladder cancer[J]. Technol Cancer Res Treat，2018，17：1533033818790536. DOI：10.1177/1533033818790536.

[10] ZHOU MY，LI YN，HU Q，et al. Atomic structure of the apoptosome：mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1[J]. Genes Dev，2015，29(22)：2349-2361. DOI：10.1101/gad.272278.115.

[11] KING VL，CAMPELLONE KG. F-actin-rich territories coordinate apoptosome assembly and caspase activation during DNA damage-induced intrinsic apoptosis[J]. Mol Biol Cell，2023，34(5)：ar41. DOI：10.1091/mbc.E22-04-0119.

[12] WANG ZX，QU K，ZHOU L，et al. Apaf1 nanoLuc biosensors identified lentinan as a potent synergizer of cisplatin in targeting hepatocellular carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun，2021，577：45-51. DOI：10.1016/j.bbrc.2021.08.030.

[13] MEHDIZADEH K，ATAEI F，HOSSEINKHANI S. Treating MCF7 breast cancer cell with proteasome inhibitor Bortezomib restores apoptotic factors and sensitizes cell to Docetaxel[J]. Med Oncol，2021，38(6)：64. DOI：10.1007/s12032-021-01509-7.

[14] 李彦明，郝雁冰，杨继雷，等. miR-125a-5p通过靶向APAF1增强非小细胞肺癌细胞吉非替尼耐药性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2020，27(6)：622-628. DOI：10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.005.


(编辑　于　溪)