

. 实验研究 .

长链非编码RNA MALAT1对神经母细胞瘤系
细胞生物学特性的影响

董孟宁 张建党 张元峰 韩伟一

【摘要】目的 探讨长链非编码RNA MALAT1对神经母细胞瘤系细胞生物学特性的影响及作用机制。**方法** 体外培养神经母细胞瘤系 SHEP2 细胞,细胞分为 Control、sh-MALAT1、miR-181a-5p inhibitor 和 sh-MALAT1+ miR-181a-5p inhibitor 组,其中 sh-MALAT1 组转染 sh-MALAT1, miR-181a-5p inhibitor 组转染 miR-181a-5p inhibitor, sh-MALAT1+inhibitor 组共同转染 sh-MALAT1 与 miR-181a-5p inhibitor, Control 组加入等量空载体。PCR 检测 mRNA 水平;生物信息预测 MALAT1 与 miR-181a-5p 的靶向关系,荧光素酶实验鉴定;CCK8 法检测细胞增殖能力;Hoechst 法检测细胞凋亡;划痕实验测试细胞迁移;Transwell 实验检测细胞侵袭;免疫印迹法检测蛋白表达。**结果** sh-MALAT1 明显降低 MALAT1 并提高 miR-181a-5p 在神经母细胞瘤细胞系 SHEP2 细胞 mRNA 水平。miR-181a-5p mimic 明显降低 MALAT1 wt 荧光素酶活性。sh-MALAT1 抑制 SHEP2 细胞增殖、侵袭及迁移,促进细胞凋亡;miR-181a-5p inhibitor 促进细胞增殖、侵袭及迁移,抑制细胞凋亡,并减弱 sh-MALAT1 产生的影响。同时,sh-MALAT1 抑制 PI3K/Akt 信号通路,而 miR-181a-5p inhibitor 可激活此信号通路并减弱 sh-MALAT1 的抑制作用。**结论** MALAT1 靶向下调 miR-181a-5p 表达促进神经母细胞瘤细胞系 SHEP2 细胞增殖、迁移和侵袭。

【关键词】 神经母细胞瘤;SHEP2 细胞;长链非编码 RNA MALAT1;miR-181a-5p;细胞侵袭;细胞增殖;细胞凋亡

【文章编号】 1009-153X(2019)02-0093-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41

Effects of long non-coding RNA MALAT1 on proliferation and invasiveness of neuroblastoma cells and its mechanism

DONG Meng-ning, ZHANG Jian-dang, ZHANG Yuan-feng, HAN Wei-yi. Department Of Neurosurgery, Nanyang Municipal Central Hospital, Nanyang 473009, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of long non-coding RNA MALAT1 on survival and metastasis of neuroblastoma cells and their mechanisms. **Methods** The mRNA level of MALAT1 and miR-181a-5p in the neuroblastoma cell line and the cell transfected with sh-MALAT1 were measured by qRT-PCR. The targeted-relationship between MALAT1 and miR-181a-5p was predicted by bioinformatics and confirmed by luciferase reporter assay. The neuroblastoma cells proliferation, apoptosis, migration and invasion were detected respectively by CCK8, Hoechst, wound healing and transwell tests, and the levels of protein related to proliferation, invasion and PI3K/Akt signal pathway were detected by Western blot in the neuroblastoma cells after the MALAT1 and miR-181a-5p were silenced. **Results** Sh-MALAT1 declined the mRNA level of MALAT1 and enhanced mRNA level of miR-181a-5p in the neuroblastoma cells. MiR-181a-5p mimic decreased the luciferase activity of MALAT1 wt. Sh-MALAT1 inhibited neuroblastoma cells proliferation, migration, invasion, and promoted their apoptosis, and miR-181a-5p inhibitor promoted the cell proliferation, migration, invasion, inhibited apoptosis, and weakened the effect of sh-MALAT1. Meanwhile, sh-MALAT1 inhibited PI3K/Akt signal pathway, and miR-181a-5p inhibitor activated this pathway and weakened the inhibition effect of sh-MALAT1 on the neuroblastoma cells proliferation, migration and invasion. **Conclusions** MALAT1 promoted the proliferation, invasion and migration of the neuroblastoma cells by down regulation of miR-181a-5p expression.

【Key words】 Neuroblastoma cells; Long non-coding RNA MALAT1; MiR-181a-5p; Invasion; Proliferation; Mechanism

神经母细胞瘤(Neuroblastoma, NB)是由神经嵴的交感神经细胞发生突变而引起的颅外实体恶性肿瘤。高危 NB 病人经化疗及手术后易复发,5 年生存率 <30%^[1]。探索 NB 发生机制是目前研究热点。近

来发现长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 异常表达是许多癌症的共同特征。lncRNA MALAT1 被发现在多种癌症中过表达,如在 NB 中 MALAT1 高度表达并促进癌细胞侵袭和迁移^[2]。同时, MALAT1 可作为多种 miRNA 的内源性竞争 RNA,如在前列腺癌中 MALAT1 通过下调 miR-1 抑制细胞凋亡并促进其增殖^[3]。目前, NB 中 MALAT1 与 miRNA 的作用机制并不明确。本文通过沉默 MALAT1,探讨 MALAT1 通过 miR-181a-5p 对

NB 生存和转移能力的调控作用,为临床靶向治疗 NB 提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与转染 NB 细胞系 SKNAS、SHEP2、SH-SY5Y 和 NGP,均由美国典藏中心提供。细胞用含 10%胎牛血清(美国 Corning 公司)、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素(美国 BI 公司)的细胞培养液 RPMI 1640(美国 Gibco 公司)进行培养,培养箱条件为 37 ℃、5% CO₂,细胞融合率达到 85% 以上后以 1×10⁴ 个/ml 进行传代。细胞分为 Control、sh-MALAT1、miR-181a-5p inhibitor 和 sh-MALAT1+ miR-181a-5p inhibitor 组。sh-MALAT1 组转染 sh-MALAT1, miR-181a-5p inhibitor 组转染 miR-181a-5p inhibitor, sh-MALAT1+inhibitor 组共同转染 sh-MALAT1 与 miR-181a-5p inhibitor, Control 组加入等量空载体。

1.2 实时定量 PCR 检测 NB 细胞系中 MALAT1 及 miR-181a-5p 的 mRNA 水平 用总 RNA 抽提试剂盒在通风橱中进行总 RNA 抽提。定量分析后,各检测样品取等量 RNA 反转录为 cDNA,PCR 扩增,利用实时定量 PCR 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)进行定量分析。

1.3 荧光素酶系统检测验证 MALAT1 靶向 miR-181a-5p 生物信息分析两者之间的结合片段,PCR 扩增将片段插入荧光素酶报告载体中构建 MALAT1 wt。对两者之间结合片段核苷酸位点进行突变,构建 MALAT1 mut。miR-181a-5p mimic 和 MALAT1 wt 或 mut 同时转染细胞,24 h 后,检测荧光素酶活性。

1.4 CCK8 检测细胞增殖 培养细胞 0、1、2、3、4 d 后,CCK8 试剂盒(上海碧云天公司)检测细胞吸光度,计算细胞的增殖生长倍数。

1.5 Hoechst 检测细胞凋亡 细胞固定、洗涤后,利用 Hoechst 试剂盒(上海碧云天公司)染色,再度洗涤后用荧光显微镜检测。激发波长 350 nm,发射波长 460 nm,可检测到蓝色的细胞核。

1.6 划痕实验检测细胞迁移 先用 marker 笔在细胞培养板背面划横线,然后培养细胞并转染,细胞铺满板孔时,用枪头垂直于背面横线划痕,划痕后用 PBS 洗涤,加入无血清培养基培养。0 和 24 h 取样并拍照,划痕闭合率=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%。

1.7 Transwell 检测细胞侵袭 放 Matrigel 于 4 ℃融化,取 Matrigel 到 Transwell 小室中进行预包被。接种细

胞于上室中,用无血清培养液培养,24 h 后,棉签拭去滤膜上层未转移细胞,结晶紫染色液对下层转移细胞染色并计数。

1.8 免疫印迹法检测相关蛋白表达 RIPA 裂解细胞,提取细胞蛋白。BCA 试剂盒(上海碧云天公司)对蛋白浓度定量并调平,取蛋白 30 μg,10% SDS-PAGE 分离蛋白,半干转膜法将蛋白转移到 PVDF 膜,放至 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入适宜浓度增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP)-9、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(美国 Santa Cruz 公司)、cleaved caspase-3、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase,PI3K)、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、Akt,p-Akt(美国 Cell Signaling Technology 公司)抗体 4 ℃过夜。次日洗涤后加入二抗(上海博士德公司)37 ℃孵育 1 h,曝光显色。以 GAPDH 为内参。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件分析;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差齐性分析和 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MALAT1 mRNA 水平 SKNAS、SHEP2、SH-SY5Y 和 NGP 细胞中,SHEP2 细胞 MALAT1 的 mRNA 水平最高,本文选用 SHEP2 细胞进行后续实验。

2.2 sh-MALAT1 上调 miR-181a-5p sh-MALAT1 可显著降低 MALAT1 mRNA 水平(*P*<0.001,图 1),而提高 miR-181a-5p mRNA 水平(*P*<0.001,图 1)。

2.3 MALAT1 与 miR-181a-5p 之间存在靶向关系 生物信息预测 MALAT1 与 miR-181a-5p 之间存在连续结合片段。miR-181a-5p mimic 可明显提高 miR-181a-5p mRNA 水平,降低 MALAT1 wt 荧光素酶活性(*P*<0.001,图 2)。将结合片段核苷酸位点突变后,miR-181a-5p mimic 对 MALAT1 mut 荧光素酶活性的抑制效果消失。

2.4 sh-MALAT1 抑制 SHEP2 细胞增殖并促进细胞凋亡 与 Control 组比,sh-MALAT1 组细胞生长速率(*P*<0.001,图 3)及 PCNA 表达水平(*P*<0.001,图 7)显著降低,细胞凋亡率(*P*<0.001,图 4)及 cleaved Caspase-3 表达水平(*P*<0.001,图 7)显著升高;miR-181a-5p inhibitor 组细胞生长速率(*P*<0.01,图 3)及 PCNA 表达水平(*P*<0.01,图 7)显著升高,细胞凋亡率(*P*<0.01,图 4)及 cleaved Caspase-3 表达水平(*P*<0.001,图 7)显著降低。与 sh-MALAT1 组比,sh-

MALAT1 + miR-181a-5p inhibitor 组细胞生长速率 ($P<0.01$, 图3)及PCNA 表达水平 ($P<0.001$, 图7)显

著升高,细胞凋亡率 ($P<0.001$, 图4)及 cleaved Caspase-3 表达水平 ($P<0.01$, 图7)显著降低。

2.5 sh-MALAT1 抑制 SHEP2 细胞迁移、侵袭 与 Control 组比较, sh-MALAT1 组划痕闭合率、侵袭细胞数 ($P<0.001$, 图5)及 VEGF、MMP-9 表达水平 ($P<0.001$, 图7)显著降低, miR-181a-5p inhibitor 组划痕闭合率、侵袭细胞数 ($P<0.001$, 图5)及 VEGF、MMP-9 表达水平 ($P<0.01$, 图7)显著增高。与 sh-MALAT1 组比较, sh-MALAT1 + miR-181a-5p inhibitor 组划痕闭合率、侵袭细胞数 ($P<0.01$, 图5)及 VEGF、MMP-9 表达 ($P<0.01$, 图7)显著增高。

2.6 sh-MALAT1 抑制 SHEP2 细胞 P13K/ATK 信号通路 与 Control 组比较, sh-MALAT1 组 p-PI3K/PI3K 及 p-Akt/Akt 比值显著降低 ($P<0.001$, 图8), miR-181a-5p inhibitor 组 p-PI3K/PI3K 及 p-Akt/Akt 的比值显著升高 ($P<0.001$, 图8)。与 sh-MALAT1 组比较, sh-MALAT1 + miR-181a-5p inhibitor 组 p-PI3K/PI3K 及 p-Akt/Akt 的比值显著升高 ($P<0.001$, 图8)。

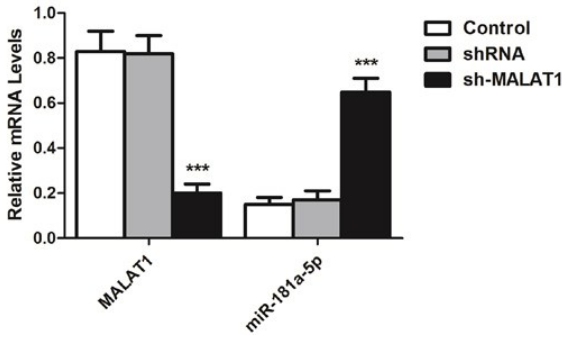


图1 各组细胞 sh-MALAT1 及 miR-181a-5p mRNA 水平与 Control 组比较, *** $P<0.001$

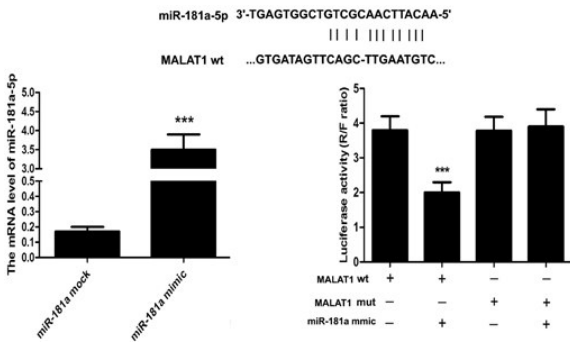


图2 MALAT1 与 miR-181a-5p 的靶向关系与 MALAT1 wt 组比较, *** $P<0.001$

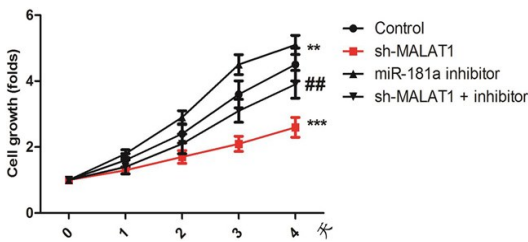


图3 sh-MALAT1 对 SHEP2 细胞增殖的影响与 Control 组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与 sh-MALAT1 组比较, ## $P<0.01$

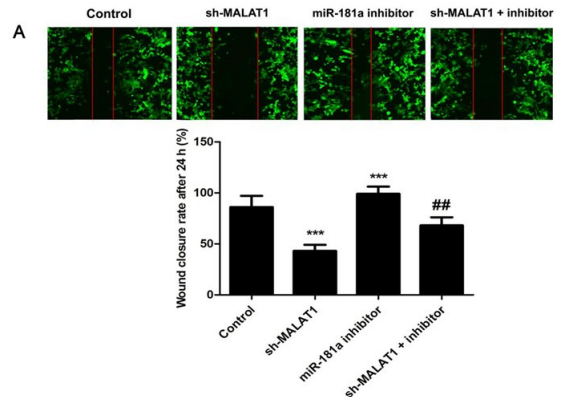


图5 sh-MALAT1 对 SHEP2 细胞迁移的影响与 Control 组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与 sh-MALAT1 组比较, ## $P<0.01$

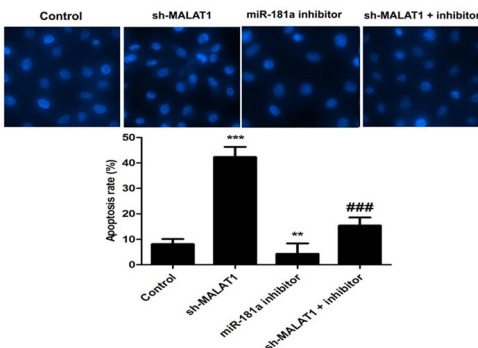


图4 sh-MALAT1 对 SHEP2 细胞凋亡的影响与 Control 组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与 sh-MALAT1 组比较, ### $P<0.01$

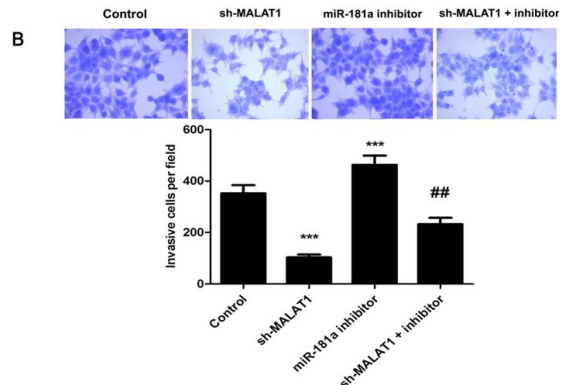


图6 sh-MALAT1 对 SHEP2 细胞侵袭的影响与 Control 组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与 sh-MALAT1 组比较, ## $P<0.01$

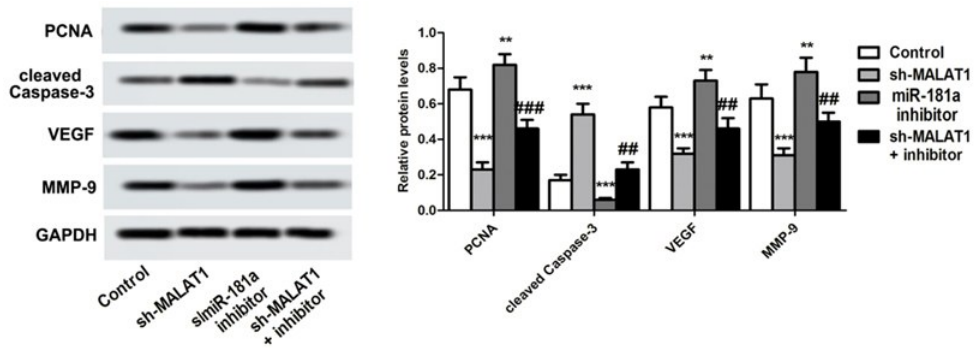


图7 sh-MALAT1对SHEP2细胞PCNA、cleaved Caspase-3、VEGF和MMP-9表达的影响与Control组比较,** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与sh-MALAT1组比较,## $P < 0.01$

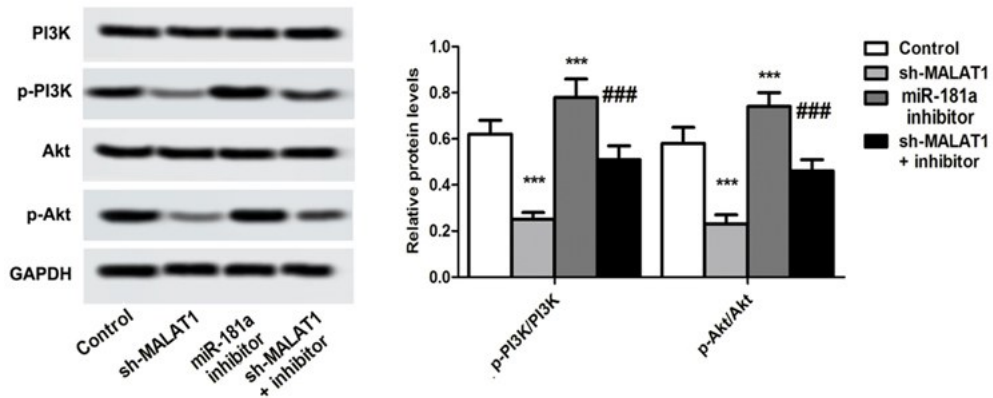


图8 sh-MALAT1对SHEP2细胞P13K/ATK信号通路蛋白表达的影响与Control组比较,** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与sh-MALAT1组比较,## $P < 0.01$

3 讨论

据报道,MALAT1可显著促进NB细胞侵袭和迁移^[2],但具体作用机制有待深入研究。本文观察到MALAT1在NB细胞株SKNAS、SHEP2、SH-SY5Y和NGP中都高度表达,SHEP2细胞最高。在前列腺癌中,MALAT1充当miR-1的内源竞争性RNA,显著减弱miR-1的抗增殖和促凋亡作用^[3]。在膀胱移行细胞癌中,MALAT1充当miR-124的内源竞争性RNA,通过抑制miR-124表达促进肿瘤生长和转移^[4]。本文首先利用sh-MALAT1沉默MALAT1后发现,miR-181a-5p的mRNA水平显著升高;生物信息预测miR-181a-5p为MALAT1的候选靶标,荧光素酶报告实验证明miR-181a-5p mimic可使MALAT1 wt的荧光素酶活性降低,对两者之间结合片段突变的MALAT1 mut没有影响,说明MALAT1与miR-181a-5p存在靶向关系。

研究发现,胃癌MALAT1可通过募集穿梭蛋白SF2/ASF促进癌细胞增殖^[5],结肠直肠癌MALAT1通过调节PRKA激酶锚定蛋白9促进癌细胞增殖和侵

袭^[6]。PCNA蛋白是评价细胞增殖活力的经典指标,cleaved Caspase-3是Caspase-3的活化形式,可评价细胞凋亡^[5]。本文沉默MALAT1可抑制SHEP2细胞增殖及PCNA表达,促进细胞凋亡及cleaved Caspase-3表达;利用miR-181a-5p inhibitor进一步抑制miR-181a-5p后,sh-MALAT1对SHEP2细胞的抗增殖抑凋亡作用显著减弱。这表明,sh-MALAT1能通过上调miR-181a-5p抑制SHEP2细胞增殖。

Tian等^[7]用MALAT1 siRNA转染黑色素瘤细胞后发现,细胞迁移和侵袭的效率下降。Han等^[8]观察到沉默MALAT-1可抑制膀胱尿路上皮癌细胞的迁移和侵袭。VEGF可强烈刺激内皮细胞增生,是迁移侵袭的关键蛋白,MMP-9可加速细胞外基质的降解,促进癌细胞转移^[7]。本文发现,沉默MALAT1可显著抑制SHEP2细胞迁移、侵袭及VEGF、MMP-9的表达;进一步利用miR-181a-5p inhibitor抑制miR-181a-5p后,细胞迁移和侵袭能力显著提高,VEGF及MMP-9表达显著增加。这表明,sh-MALAT1通过上调miR-181a-5p抑制SHEP2细胞侵袭、迁移。

P13K/Akt是经典的促增殖、抗凋亡信号通路。

研究发现它在NB等多种肿瘤组织中均被异常激活,靶向抑制PI3K/Akt通路可作为治疗NB的新策略^[9]。p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt比值升高表明PI3K/Akt信号通路被过度激活^[9]。本文发现sh-MALAT1可降低p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt比值,进一步抑制miR-181a-5p后,p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt比值升高。这说明,sh-MALAT1通过上调miR-181a-5p可显著抑制PI3K/Akt信号通路。

综上所述,sh-MALAT1可上调miR-181a-5p,抑制SHEP2细胞增殖、侵袭及迁移,并促进细胞凋亡;抑制miR-181a-5p可减弱sh-MALAT1对细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的调控作用。此外,sh-MALAT1可阻碍PI3K/Akt信号通路的激活。提示MALAT1可通过靶向下调miR-181a-5p提高NB存活和转移能力,为临床治疗NB提供新的思路。

【参考文献】

- [1] Gigliotti AR, De Ioris MA, De GE, *et al.* Congenital neuroblastoma with symptoms of epidural compression at birth [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2016, 33(2): 94-101.
 - [2] Bi S, Wang C, Li Y, *et al.* LncRNA-MALAT1-mediated Axl promotes cell invasion and migration in human neuroblastoma [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5): 1010428317699796.
 - [3] Chang J, Xu W, Du X, *et al.* MALAT1 silencing suppresses prostate cancer progression by upregulating miR-1 and downregulating KRAS [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 3461-3473.
 - [4] Jiao D, Li Z, Zhu M, *et al.* LncRNA MALAT1 promotes tumor growth and metastasis by targeting miR-124/foxq1 in bladder transitional cell carcinoma (BTCC) [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(4): 748-760.
 - [5] Wang J, Su L, Chen X, *et al.* MALAT1 promotes cell proliferation in gastric cancer by recruiting SF2/ASF [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68: 557-564.
 - [6] Yang MH, Hu ZY, Xu C, *et al.* MALAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation/migration/invasion via PRKA kinase anchor protein 9 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852: 166-174.
 - [7] Tian Y, Zhang X, Hao Y, *et al.* Potential roles of abnormally expressed long noncoding RNA UCA1 and Malat-1 in metastasis of melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2014, 24: 335-341.
 - [8] Han Y, Liu Y, Nie L, *et al.* Inducing cell proliferation inhibition, apoptosis, and motility reduction by silencing long noncoding ribonucleic acid metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in urothelial carcinoma of the bladder [J]. *Urology*, 2013, 81(1): 209.e1-209.e7.
 - [9] Gómez-Villafuertes R, García-Huerta P, Díaz-Hernández JL, *et al.* PI3K/Akt signaling pathway triggers P2X7 receptor expression as a pro-survival factor of neuroblastoma cells under limiting growth conditions [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18417.
- (2018-07-20收稿,2018-12-03修回)
-
- (上接第83页)
- [4] Shrivastava A, Srivastava T, Saxena R. CT angiographic evaluation of pattern and distribution of stenosis and its association with risk factors among indian ischemic stroke patients [J]. *Pol J Radiol*, 2016, 7(81): 357-362.
 - [5] Yu Z, Shi X, Qian H, *et al.* Internal maxillary artery to intracranial artery bypass: a case series of 31 patients with chronic internal carotid/middle cerebral arterial-sclerotic steno-occlusive disease[J]. *Neurol Res*, 2016, 38: 420-428.
 - [6] 程明,王跃.重复经颅磁刺激联合丁苯酞对脑卒中后运动功能恢复及血清学指标的影响[J].东南大学学报(医学版),2017,36(6):946-950.
 - [7] 张莎莎,陈雪涛,王海音,等.中青年健康男性血压水平与颅内血管血流动力学参数间关系的研究[J].空军医学杂志,2017,33(1):39-43.
 - [8] 李瑞英,陈会生.急性缺血性脑卒中早期神经功能恶化研究现状及进展[J].临床军医杂志,2017,45(2):136-139.
 - [9] 何平.3种溶栓方案对急性大脑中动脉闭塞性脑梗死患者近远期疗效及并发症的影响[J].检验医学与临床,2017,14(23):3495-3496,3499.
 - [10] 汤海潮,许晓丹,姚懿函,等.动静脉联合应用重组组织型纤溶酶原激活剂治疗超时间窗急性脑梗死患者近期预后影响因素分析[J].临床军医杂志,2017,45:784-786.
 - [11] 李舜,唐晓平,文军,等.成人出血型烟雾病合并颅内动脉瘤的诊治及预后分析[J].中国临床神经外科杂志,2017,22(4):213-215.
 - [12] 李珊珊,李国营.缺血性脑卒中中药防治的研究进展[J].解剖学研究,2016,38(3):200-202.
 - [13] 钱小蕾,徐宇浩,于明,等.尿激肽原酶与胰激肽原酶序贯治疗前循环非进展性脑梗死的效果观察[J].江苏大学学报(医学版),2017,27(2):176-178,182.
- (2018-02-08收稿,2018-03-27修回)