

# lncRNA LINC00958对小细胞肺癌细胞阿帕替尼耐药性的影响

杨帆<sup>1</sup> 荣腾浩<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院大学重庆医院, 重庆市人民医院胸外科, 重庆 401100; <sup>2</sup>重庆市璧山区人民医院胸心外科, 重庆 402460)

**摘要** 研究lncRNA LINC00958对小细胞肺癌细胞的阿帕替尼(AP)耐药性的影响及其作用机制。采用逐步增加阿帕替尼浓度法建立小细胞肺癌阿帕替尼耐药细胞株H446/AP, 分别用2.5 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L的阿帕替尼处理H446、H446/AP细胞, 并检测阿帕替尼对其增殖抑制率的影响。然后将H446/AP细胞分为AP+si-NC组(转染LINC00958干扰载体阴性对照+5 μmol/L阿帕替尼)、AP+si-LINC00958组(转染LINC00958干扰载体+5 μmol/L阿帕替尼)、AP+miR-NC组(转染miR-490-3p模拟物阴性对照+5 μmol/L阿帕替尼)、AP+miR-490-3p组(转染miR-490-3p模拟物+5 μmol/L阿帕替尼)、AP+si-LINC00958+anti-miR-NC组(共转染LINC00958干扰载体和miR-490-3p抑制载体阴性对照+5 μmol/L阿帕替尼)、AP+si-LINC00958+anti-miR-490-3p组(共转染LINC00958干扰载体和miR-490-3p抑制载体+5 μmol/L阿帕替尼)。用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测LINC00958和miR-490-3p的表达水平; CCK-8检测细胞增殖抑制率; Western blot检测蛋白表达水平; 细胞划痕实验检测细胞划痕愈合率; Transwell检测细胞迁移和侵袭; 双荧光素酶报告实验检测LINC00958和miR-490-3p的靶向关系。结果显示, 耐药和非耐药小细胞肺癌组织中LINC00958高表达, miR-490-3p低表达( $P<0.05$ ); 相较于H446细胞, H446/AP细胞中LINC00958表达水平显著升高, miR-490-3p表达水平显著降低( $P<0.05$ )。不同浓度阿帕替尼处理后, H446/AP相较于H446细胞增殖抑制率显著降低, 半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)显著升高( $P<0.05$ )。抑制LINC00958表达联合阿帕替尼和miR-490-3p过表达联合阿帕替尼, H446/AP细胞中CyclinD1、MMP-2、MMP-9表达水平显著降低, H446/AP细胞中p21表达水平显著升高, H446/AP细胞抑制率显著升高, 划痕愈合率降低, H446/AP细胞迁移和侵袭数量显著降低( $P<0.05$ )。LINC00958靶向调控miR-490-3p, 干扰miR-490-3p表达逆转了抑制LINC00958表达对H446/AP细胞阿帕替尼耐药性的抑制作用。因此, 抑制LINC00958表达联合阿帕替尼可抑制H446/AP细胞增殖、迁移和侵袭, 降低小细胞肺癌对阿帕替尼的耐药性, 其机制可能与miR-490-3p表达有关。

**关键词** lncRNA LINC00958; miR-490-3p; 小细胞肺癌; 阿帕替尼; 耐药性

## Effect of lncRNA LINC00958 on Apatinib Resistance in Small Cell Lung Cancer

YANG Fan<sup>1</sup>, RONG Tenghao<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Thoracic Surgery, Chongqing People's Hospital, Chongqing General Hospital, University of Chinese Academy of Sciences, Chongqing 401100, China; <sup>2</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, Bishan District People's Hospital, Chongqing 402460, China)

**Abstract** This work aimed to study the effect and mechanism of lncRNA LINC00958 on the AP (apatinib) resistance of small cell lung cancer cells. The method of gradually increasing the concentration of apatinib was

收稿日期: 2020-09-02 接受日期: 2020-09-24

\*通讯作者。Tel: 13658389297, E-mail: 757124613@qq.com

Received: September 2, 2020 Accepted: September 24, 2020

\*Corresponding author. Tel: +86-13658389297, E-mail: 757124613@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5378>

used to establish a small cell lung cancer cell line H446/AP resistant to apatinib, H446 and H446/AP cells were treated with 2.5  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ , 20  $\mu\text{mol/L}$ , 40  $\mu\text{mol/L}$  apatinib to detect the inhibition rate of proliferation. Then the H446/AP cells were divided into AP+si-NC group (transfected with LINC00958 interference vector negative control+5  $\mu\text{mol/L}$  apatinib), AP+si-LINC00958 group (transfected with LINC00958 interference vector+5  $\mu\text{mol/L}$  apatinib), AP+miR-NC group (transfected miR-490-3p mimic negative control+5  $\mu\text{mol/L}$  apatinib), AP+miR-490-3p group (transfected miR-490-3p mimetic+5  $\mu\text{mol/L}$  apatinib), AP+si-LINC00958+anti-miR-NC group (cotransfected with LINC00958 interference vector and miR-490-3p inhibitor vector negative control+5  $\mu\text{mol/L}$  apatinib), AP+si-LINC00958+anti-miR-490-3p group (cotransfected with LINC00958 interference vector and miR-490-3p suppression vector+5  $\mu\text{mol/L}$  apatinib). RT-qPCR (real-time quantitative PCR) was used to detect the expression of LINC00958 and miR-490-3p; CCK-8 (cell counting kit 8) was used to detect the inhibition rate of cell proliferation; Western blot was used to detect protein expressions; Scratch test to detect cell scratch healing rate; Transwell was used to detect cell migration and invasion; dual luciferase reporter assay was used to detect the targeting relationship between LINC00958 and miR-490-3p. The results show that LINC00958 was highly expressed in small cell lung cancer tissues, and miR-490-3p was lowly expressed ( $P<0.05$ ). Compared with H446 cells, the expression of LINC00958 in H446/AP cells was significantly increased, while the expression of miR-490-3p was significantly decreased ( $P<0.05$ ). After treatment with different concentrations of apatinib, the proliferation inhibition rate of H446/AP cells was significantly decreased compared with H446 cells, while  $\text{IC}_{50}$  (half inhibitory concentration) was significantly increased ( $P<0.05$ ). For inhibition of LINC00958 expression combined with apatinib and miR-490-3p overexpression combined with apatinib, CyclinD1, MMP-2, MMP-9 expression were significantly decreased in H446/AP cells; p21 expression was significantly increased in H446/AP cells, and H446/AP cell inhibition rate was significantly increased; scratch healing rate was decreased; the migration and invasion numbers of H446/AP cells were significantly decreased ( $P<0.05$ ). LINC00958 targets miR-490-3p, and interference with miR-490-3p expression reverses the inhibitory effect of inhibition of LINC00958 expression on apatinib resistance of H446/AP cells. Therefore, inhibiting the expression of LINC00958 combined with apatinib can inhibit the proliferation, migration and invasion of H446/AP cells, reducing the resistance of small cell lung cancer to apatinib. The mechanism may be related to the expression of miR-490-3p.

**Keywords** lncRNA LINC00958; miR-490-3p; small cell lung cancer; apatinib; drug resistance

小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)是肺癌的一种, SCLC具有恶性程度高、侵袭性强、易发生转移的特点, 初始其对化疗和放疗都比较敏感, 但随着化疗耐药性的产生, 其治疗效果趋于不佳<sup>[1]</sup>。因此, 迫切需要新的药物和有效的治疗手段降低SCLC的化疗耐药性, 提高治疗效果, 靶向治疗的出现为SCLC的治疗带来了新方向<sup>[2-3]</sup>。阿帕替尼是一种新型高效抗血管生成药物, 对多种恶性肿瘤的治疗有效<sup>[4]</sup>。阿帕替尼在小细胞肺癌的临床治疗中较为常见, 临床上应用阿帕替尼联合化疗可在一定程度上抑制小细胞肺癌患者中肿瘤因子的异常表达, 提高患者的生存率<sup>[5]</sup>。高浓度阿帕替尼能够抑制小细胞肺癌NCI-H446细胞的增殖和迁移, 诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>。阿帕替尼可以抑制人肝癌细胞的生长和迁移<sup>[7]</sup>。阿帕替尼可抑制肺腺癌细胞增殖, 促进细胞凋亡<sup>[8]</sup>。但

阿帕替尼耐药性的出现, 降低了其治疗效果, 因此, 降低阿帕替尼的耐药性对于小细胞肺癌的临床治疗具有重要意义。研究发现, lncRNA不仅参与调控恶性肿瘤的发生发展, 还与肿瘤细胞的耐药有关, 研究其与相应肿瘤细胞的耐药机制, 有助于提高药物敏感性, 改善患者化疗的治疗效果<sup>[9]</sup>。LINC00958是一种lncRNA, 研究发现, LINC00958在口腔鳞状细胞癌组织和细胞中高表达, 可促进口腔鳞状细胞癌细胞的生长、迁移, 抑制细胞凋亡<sup>[10]</sup>。还有研究发现, LINC00958在头颈部鳞状细胞癌组织和细胞中表达上调, 敲低其表达增强了头颈部鳞状细胞癌细胞对电离辐射和顺铂的敏感性<sup>[11]</sup>。研究表明, miRNA影响肿瘤的耐药性<sup>[12]</sup>。研究发现, 上调miR-490-3p可逆转乳腺癌MCF-7/ADM细胞对阿霉素(adriamycin, ADM)的耐药性, 且miR-490-3p上调表达可抑制细胞增殖并

诱导凋亡<sup>[13]</sup>。上调miR-490-3p降低了卵巢癌细胞对紫杉醇的耐药性<sup>[14]</sup>。miR-490-3p上调还抑制食管鳞状细胞癌的增殖、侵袭和迁移<sup>[15]</sup>。然而LINC00958和miR-490-3p对小细胞肺癌生物学行为及阿帕替尼耐药性的影响尚不清楚。本文旨在研究LINC00958是否通过miR-490-3p影响小细胞肺癌细胞对阿帕替尼的耐药性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 临床资料 本研究经本院伦理委员会审批同意,选取本院收治的20例小细胞肺癌患者的癌组织和癌旁组织,所有确诊患者均经该院权威专家鉴定。此外,选择20例耐阿帕替尼小细胞肺癌患者,通过手术取其组织,所有患者均签署知情同意书。

小细胞肺癌细胞H446购自上海传秋生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(货号:10099-141)、DMEM培养基(货号:10569-010)购自美国Gibco公司;阿帕替尼(国药准字H20140103)购自江苏恒瑞医药股份有限公司;荧光定量试剂盒(货号:DRR041A)购自北京智杰方远科技有限公司;RIPA蛋白裂解液(货号:P0013B)、细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)(货号:C0040)购自上海碧云天生物技术有限公司;二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒(货号:ZKP0746)购自深圳子科生物科技有限公司;Transwell小室(货号:354480)、Matrigel(货号:356234)购自美国BD公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒(货号:D0010)购自北京索莱宝科技有限公司。si-NC、si-LINC00958、pcDNA、pcDNA-LINC00958、miR-NC、miR-490-3p、anti-miR-NC、anti-miR-490-3p载体质粒购自北京普瑞金科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及小细胞肺癌阿帕替尼耐药细胞H446/AP的建立 小细胞肺癌细胞H446用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养,取对数生长期H446细胞,用质量浓度为0.001 μg/mL的阿帕替尼刺激作用48 h,然后换新鲜培养液继续培养,观察细胞活力,当细胞无明显死亡时,选择对数生长期细胞,将其用逐渐增加阿帕替尼浓度的培养基培养,不断筛选培养,直至H446细胞能在含浓度为1 μg/mL阿帕替尼的培养基中稳定存活,记为H446/AP耐药细胞。

1.2.2 细胞转染与分组 取对数生长期细胞H446/AP,将si-NC、si-LINC00958、miR-NC、miR-490-3p转染至H446/AP细胞中再用5 μmol/L的阿帕替尼处理,分别记为AP+si-NC组、AP+si-LINC00958组、AP+miR-NC组、AP+miR-490-3p组;将si-LINC00958质粒分别与anti-miR-NC、anti-miR-490-3p共转染至H446/AP细胞中再用5 μmol/L的阿帕替尼处理,分别记为AP+si-LINC00958+anti-miR-NC组、AP+si-LINC00958+anti-miR-490-3p组,具体转染步骤按照Lipofectamine™ 2000转染试剂盒说明书进行,其中LINC00958和miR-490-3p过表达和抑制表达质粒用量均为5 μg。

1.2.3 实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测LINC00958和miR-490-3p表达水平 Trizol试剂提取各组细胞总RNA,取2 μg RNA用逆转录试剂盒反转录成cDNA,按照荧光定量试剂盒使用说明进行PCR, LINC00958和miR-490-3p分别以GAPDH和U6为内参进行PCR扩增,每个样品设3个重复,反应体系总共为20 μL,其中SYBR Green PCR Master Mix 10 μL,上下游引物各0.5 μL, cDNA 1 μL, H<sub>2</sub>O 8 μL。循环条件为95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, 60 °C退火30 s; 72 °C延伸30 s,共40个循环;相对表达量用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算。

1.2.4 CCK-8检测细胞增殖抑制率 取对数生长期H446、H446/AP细胞,分别用2.5 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L的阿帕替尼处理,未添加阿帕替尼的作为对照组。各组细胞培养48 h后每孔加入10 μL的CCK-8试剂,继续培养4 h后用酶标仪检测490 nm处的吸光度(D)值, IC<sub>50</sub>为细胞生长抑制率为50%时的药物浓度。细胞抑制率=(1-实验组D值/对照组D值)×100%。

1.2.5 Western blot检测CyclinD1、p21、MMP-2、MMP-9的蛋白表达水平 提取总蛋白,用BCA试剂盒测定蛋白浓度,蛋白进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF上,用5%脱脂奶粉室温封闭后分别加入一抗4 °C过夜,洗膜后加入二抗室温孵育1 h,用ECL化学发光液显色,检测蛋白条带的灰度值,以GAPDH为内参计算目的蛋白表达水平。

1.2.6 细胞划痕实验检测细胞划痕愈合率 细胞消化后接种在培养皿中,在盘底用划线做标记,细胞铺满后用枪头垂直标记横线划痕,用PBS冲洗划下的细胞,换液后继续培养,在培养0 h和48 h后拍照观察,用



Image-Pro Plus 6.0软件计算划痕面积和划痕愈合率。

**1.2.7 Transwell实验检测细胞迁移和侵袭** 侵袭实验: 用Matrigel胶包被Transwell小室的上室, 上室加入200  $\mu$ L细胞悬液, 下室加入500  $\mu$ L的DMEM培养液, 培养24 h后用多聚甲醛固定, 再用结晶紫染色, 显微镜观察拍照并计算随机5个视野下侵袭细胞数, 取其平均值。迁移实验: Transwell上室未用Matrigel包被, 其余按照侵袭实验步骤进行。

**1.2.8 荧光素酶报告实验检测LINC00958对miR-490-3p的靶向调控** 构建LINC00958野生型荧光素酶表达载体WT-LINC00958和突变型MUT-LINC00958, 用脂质体法将其分别与miR-NC和miR-490-3p共转染至H446/AP细胞中, 按照荧光素酶报告实验检测试剂盒说明书检测荧光素酶活性。

将si-NC、si-LINC00958、pcDNA、pcDNA-LINC00958分别转染至H446/AP细胞中, 按1.2.3中方法检测miR-490-3p的表达水平。

**1.2.9 统计学分析** 用SPSS 20.0进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组比较采用*t*检验, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LINC00958和miR-490-3p在小细胞肺癌组织中的表达

耐药小细胞肺癌组织和非耐药小细胞肺癌组织中LINC00958表达水平高于癌旁组织, miR-490-3p表达水平低于癌旁组织( $P<0.05$ )(表1)。可见, 在耐药和非耐药小细胞肺癌组织中LINC00958高表达, 而miR-490-3p低表达。

### 2.2 LINC00958和miR-490-3p在H446细胞和H446/AP细胞中的表达

与H446细胞相比, H446/AP细胞中LINC00958表达水平显著升高, miR-490-3p表达水平显著降低( $P<0.05$ )(表2)。可见, 在小细胞肺癌阿帕替尼耐药细胞中LINC00958高表达, 而miR-490-3p低表达。

### 2.3 阿帕替尼对小细胞肺癌细胞和小细胞肺癌阿帕替尼耐药细胞的抑制作用

分别用浓度为2.5  $\mu$ mol/L、5  $\mu$ mol/L、10  $\mu$ mol/L、20  $\mu$ mol/L、40  $\mu$ mol/L的阿帕替尼处理H446和H446/AP细胞48 h, 与H446细胞相比, H446/AP细胞增殖抑制率显著降低, 细胞生长受抑50%时H446/AP细胞药

表1 LINC00958和miR-490-3p在小细胞肺癌组织中的表达

Table 1 Expression of LINC00958 and miR-490-3p in small cell lung cancer tissues

组别 Group	LINC00958	miR-490-3p
Paracancer tissues	1.01 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.08
Non-resistant small cell lung cancer tissue	2.64 $\pm$ 0.25*	0.49 $\pm$ 0.04*
Resistant small cell lung cancer tissue	3.06 $\pm$ 0.21*	0.41 $\pm$ 0.02
<i>F</i>	613.409	731.667
<i>P</i>	0.000	0.000

$n=20$ ; \* $P<0.05$ , 与癌旁组织比较。

$n=20$ ; \* $P<0.05$  compared with paracancer tissues.

表2 LINC00958和miR-490-3p在小细胞肺癌细胞和小细胞肺癌阿帕替尼耐药细胞中的表达

Table 2 Expression of LINC00958 and miR-490-3p in small cell lung cancer cells and apatinib-resistant cells

组别 Group	LINC00958	miR-490-3p
H446	1.00 $\pm$ 0.07	1.02 $\pm$ 0.09
H446/AP	2.32 $\pm$ 0.23*	0.57 $\pm$ 0.05*
<i>t</i>	16.471	13.112
<i>P</i>	0	0

$n=9$ ; \* $P<0.05$ , 与H446组比较。

$n=9$ ; \* $P<0.05$  compared with H446 group.

物浓度显著升高( $P<0.05$ )(表3)。可见, H446/AP细胞较H446细胞对阿帕替尼更耐药。

### 2.4 抑制LINC00958表达联合阿帕替尼(5 $\mu\text{mol/L}$ )对H446/AP细胞增殖、迁移和侵袭的影响

与AP+si-NC组相比, AP+si-LINC00958组H446/AP细胞中LINC00958表达水平显著降低, H446/AP

细胞中CyclinD1、MMP-2、MMP-9表达水平显著降低, H446/AP细胞中p21表达水平显著升高, H446/AP细胞抑制率显著升高, 划痕愈合率降低, H446/AP细胞迁移和侵袭数量显著降低( $P<0.05$ )(图1和表4)。可见, 抑制LINC00958表达联合阿帕替尼可抑制H446/AP细胞增殖、迁移和侵袭。

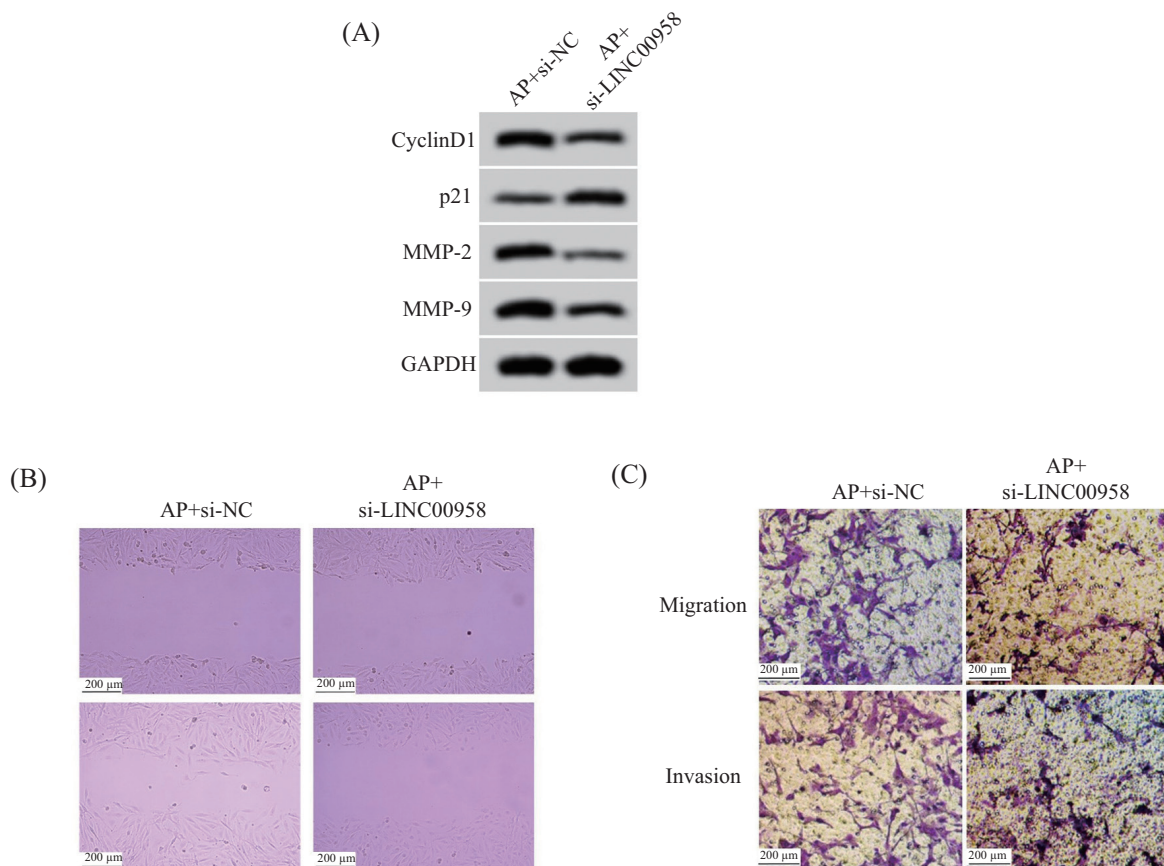
表3 不同浓度阿帕替尼对小细胞肺癌细胞和小细胞肺癌阿帕替尼耐药细胞抑制率的影响

Table 3 Effects of different concentrations of apatinib on the inhibition rate of small cell lung cancer cells and apatinib-resistant cells

组别 Group	阿帕替尼浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Apatinib concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					$\text{IC}_{50}$ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
	2.5	5	10	20	40	
H446	8.64±0.89	19.36±1.87	34.68±3.57	61.25±6.32	83.41±8.33	14.43±1.39
H446/AP	6.32±0.61*	12.01±1.18*	15.32±1.57*	20.36±2.07*	24.69±2.41*	145.40±9.36*
<i>t</i>	6.450	9.972	14.892	18.445	20.314	41.522
<i>P</i>	0	0	0	0	0	0

$n=9$ ; \* $P<0.05$ , 与H446组比较。

$n=9$ ; \* $P<0.05$  compared with H446 group.



A: 增殖、迁移侵袭相关蛋白的表达; B: 划痕实验检测H446/AP细胞的迁移; C: Transwell实验检测H446/AP细胞的迁移和侵袭。

A: expression of proliferation, migration and invasion related proteins; B: Scratch test to detect H446/AP cell migration; C: Transwell test to detect H446/AP cell migration and invasion.

图1 抑制LINC00958表达联合阿帕替尼对H446/AP细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Fig.1 The effects of expression inhibition of LINC00958 combined with apatinib on the proliferation, migration and invasion of H446/AP cells

### 2.5 miR-490-3p过表达联合阿帕替尼对H446/AP细胞增殖、迁移和侵袭的影响

与AP+miR-NC组相比, AP+miR-490-3p组H446/AP细胞中miR-490-3p表达水平显著升高, H446/AP细胞中

CyclinD1、MMP-2、MMP-9表达水平显著降低, H446/AP细胞中p21表达水平显著升高, H446/AP细胞抑制率显著升高, 划痕愈合率降低, H446/AP细胞迁移和侵袭数量显著降低 ( $P < 0.05$ ) (图2和表5)。可见, miR-490-3p过表

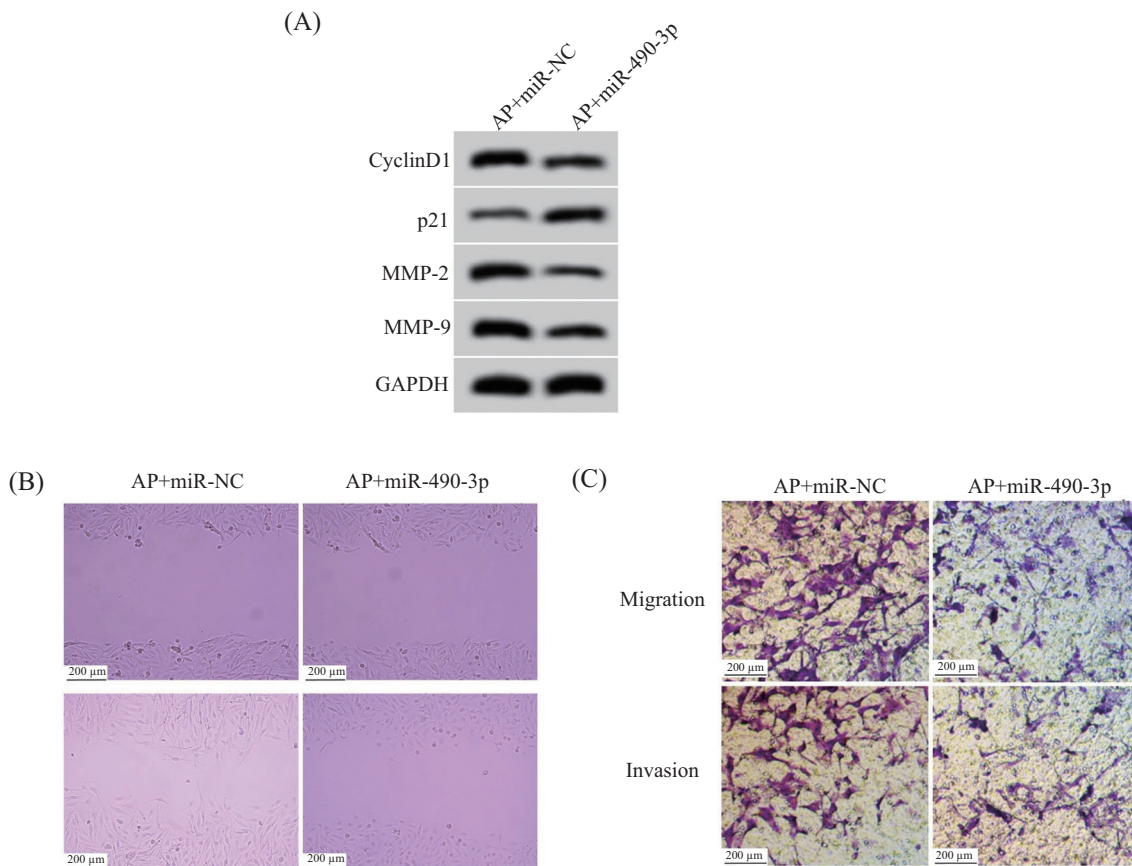
表4 抑制LINC00958表达联合阿帕替尼对H446/AP细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Table 4 The effects of expression inhibition of LINC00958 combined with apatinib on the proliferation, migration and invasion of H446/AP cells

组别 Group	LINC00958	抑制率/% Inhibition rate /%	划痕愈合率 /% Scratch heal- ing rate /%	迁移细胞数 Number of migrating cells	侵袭细胞数 Number of invasion cells	CyclinD1 蛋白 CyclinD1 protein	p21蛋白 p21 protein	MMP-2蛋白 MMP-2 protein	MMP-9蛋白 MMP-9 protein
AP+si-NC	1.01±0.08	11.69±1.18	62.54±6.14	69.32±6.54	53.48±5.27	0.76±0.07	0.25±0.03	0.69±0.06	0.81±0.08
AP+si- LINC00958	0.44±0.04*	46.71±4.68*	22.13±2.06*	32.14±3.45*	26.14±2.68*	0.32±0.03*	0.66±0.06*	0.23±0.03*	0.37±0.03*
<i>t</i>	19.118	21.767	18.719	15.084	13.872	17.332	18.335	20.571	15.449
<i>P</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

$n=9$ ; \* $P < 0.05$ , 与AP+si-NC组比较。

$n=9$ ; \* $P < 0.05$  compared with AP+si-NC group.



A: 增殖、迁移侵袭相关蛋白的表达; B: 划痕实验检测H446/AP细胞的迁移; C: Transwell实验检测 H446/AP细胞的迁移和侵袭。

A: expression of proteins related to proliferation, migration and invasion; B: Scratch test to detect H446/AP cell migration; C: Transwell test to detect H446/AP cell migration and invasion.

图2 miR-490-3p过表达联合阿帕替尼对H446/AP细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Fig.2 The effects of miR-490-3p overexpression combined with apatinib on the proliferation, migration and invasion of H446/AP cells

达联合阿帕替尼抑制H446/AP细胞增殖、迁移和侵袭。

### 2.6 LINC00958靶向调控miR-490-3p的表达

StarBase预测显示, LINC00958与miR-490-3p存在结合位点(图3)。与miR-NC组比较, miR-490-3p组转

染LINC00958野生型表达载体的H446/AP细胞的荧光素酶活性显著降低( $P<0.05$ )(表6)。过表达LINC00958, miR-490-3p表达水平显著降低; 抑制LINC00958表达, miR-490-3p表达水平显著升高( $P<0.05$ )(表7)。可见,

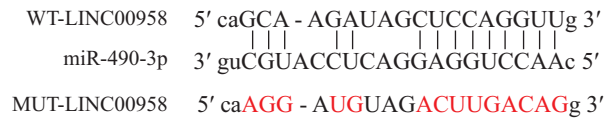
表5 miR-490-3p过表达联合阿帕替尼对H446/AP细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Table 5 Effects of miR-490-3p overexpression combined with apatinib on the proliferation, migration and invasion of H446/AP cells

组别 Group	miR-490-3p	抑制率/% Inhibition rate /%	划痕愈合率/% Scratch healing rate /%	迁移细胞数 Number of migrating cells	侵袭细胞数 Number of invading cells	CyclinD1蛋白 CyclinD1 protein	p21蛋白 p21 protein	MMP-2蛋白 MMP-2 protein	MMP-9蛋白 MMP-9 protein
AP+miR-NC	1.00±0.11	12.54±1.27	58.66±5.47	73.26±7.48	57.41±5.77	0.74±0.07	0.26±0.03	0.66±0.06	0.83±0.08
AP+miR-490-3p	2.29±0.23*	41.69±4.18*	29.75±3.02*	39.64±0.87	31.41±3.42*	0.36±0.03*	0.61±0.06*	0.29±0.03*	0.43±0.04*
<i>t</i>	15.179	20.017	13.881	13.393	11.628	14.968	15.652	16.546	13.416
<i>P</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

$n=9$ ; \* $P<0.05$ , 与AP+miR-NC组比较。

$n=9$ ; \* $P<0.05$  compared with AP+miR-NC group.



红色字体为突变序列。

The red font represents the mutation sequence.

图3 LINC00958的序列中含有与miR-490-3p互补的核苷酸序列

Fig.3 The sequence of LINC00958 contains a nucleotide sequence complementary to miR-490-3p

表6 双荧光素酶报告实验

Table 6 Double luciferase report experiment

组别 Groups	野生型-LINC00958 WT-LINC00958	突变型- LINC00958 MUT-LINC00958
miR-NC	1.04±0.08	1.05±0.09
miR-490-3p	0.39±0.04*	1.02±0.08
<i>t</i>	21.801	0.747
<i>P</i>	0	0.465

$n=9$ ; \* $P<0.05$ , 与miR-NC组比较。

$n=9$ ; \* $P<0.05$  compared with miR-NC group.

表7 LINC00958调控miR-490-3p的表达

Table 7 LINC00958 regulates the expression of miR-490-3p

组别 Groups	miR-490-3p
pcDNA	1.01±0.09
pcDNA-LINC00958	0.38±0.03*
si-NC	1.00±0.08
si-LINC00958	2.29±0.23 <sup>#</sup>
<i>F</i>	339.613
<i>P</i>	0

$n=9$ ; \* $P<0.05$ , 与pcDNA组比较; <sup>#</sup> $P<0.05$ , 与si-NC组比较。

$n=9$ ; \* $P<0.05$  compared with pcDNA group; <sup>#</sup> $P<0.05$  compared with si-NC group.

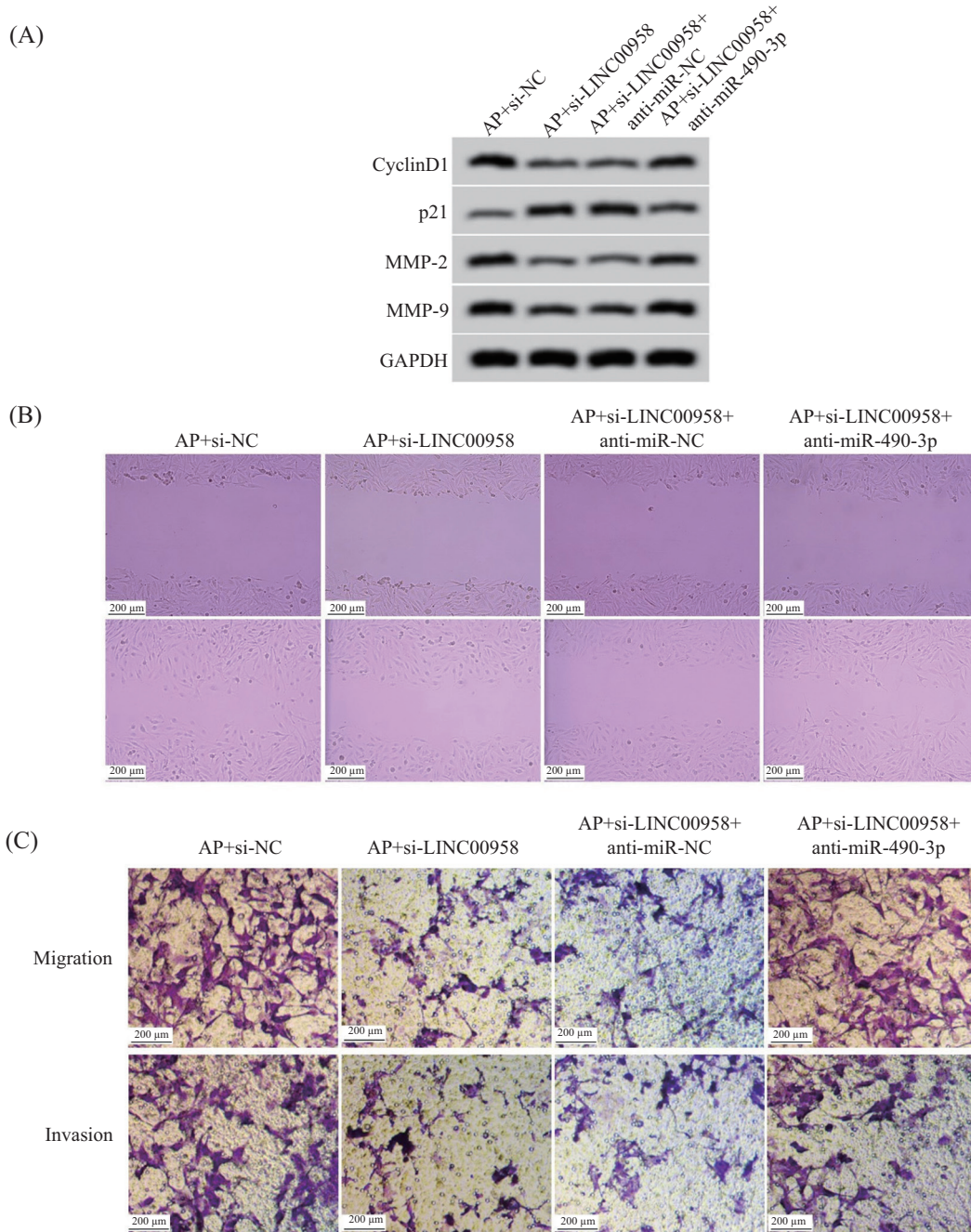


LINC00958可靶向调控miR-490-3p的表达。

## 2.7 干扰miR-490-3p表达逆转了抑制LINC00958表达对H446/AP细胞阿帕替尼耐药性的作用

与AP+si-LINC00958+anti-miR-NC组相比, AP+si-LINC00958+anti-miR-490-3p组H446/AP细胞中miR-490-3p表达水平显著降低, H446/AP细胞

中CyclinD1、MMP-2、MMP-9表达水平显著升高, H446/AP细胞中p21表达水平显著降低, H446/AP细胞抑制率显著降低, 划痕愈合率升高, H446/AP细胞迁移和侵袭数量显著升高( $P<0.05$ )(图4和表8)。可见, 干扰miR-490-3p表达逆转了抑制LINC00958表达对H446/AP细胞阿帕替尼耐药性的抑制作用。



A: 增殖、迁移侵袭相关蛋白的表达; B: 划痕实验检测H446/AP细胞的迁移; C: Transwell实验检测H446/AP细胞的迁移和侵袭。

A: expression of proteins related to proliferation, migration and invasion; B: Scratch test to detect H446/AP cell migration; C: Transwell test to detect H446/AP cell migration and invasion.

图4 干扰miR-490-3p表达逆转了抑制LINC00958表达对H446/AP细胞阿帕替尼耐药性的作用

Fig.4 Interference with miR-490-3p expression reversed the effect of expression inhibition of LINC00958 on apatinib resistance in H446/AP cells



表8 干扰miR-490-3p表达逆转了抑制LINC00958表达对H446/AP细胞阿帕替尼耐药性的作用

Table 8 Interference with miR-490-3p expression reversed the effect of expression inhibition of LINC00958 on the drug resistance of H446/AP cells to apatinib

组别 Group	miR-490-3p	抑制率/% Inhibition rate /%	划痕愈合率 /% Scratch heal- ing rate /%	迁移细胞数 Number of migrating cells	侵袭细胞数 Number of invading cells	CyclinD1蛋 白 CyclinD1 protein	p21蛋白 p21 protein	MMP-2蛋白 MMP-2 protein	MMP-9蛋白 MMP-9 protein
AP+si-NC	1.00±0.09	13.54±1.38	63.15±6.11	71.61±7.05	55.47±5.58	0.73±0.07	0.23±0.03	0.68±0.06	0.84±0.08
AP+si- LINC00958	2.41±0.24*	44.98±4.53*	25.42±2.36*	34.12±3.37*	29.64±2.87*	0.31±0.03*	0.65±0.06*	0.26±0.03*	0.39±0.03*
AP+si- LINC00958+anti- miR-NC	2.48±0.25	47.15±4.63	23.84±2.55	32.64±3.58	27.14±2.73	0.29±0.03	0.67±0.07	0.24±0.03	0.36±0.04
AP+si- LINC00958+anti- miR-490-3p	1.52±0.15 <sup>#</sup>	19.64±1.87 <sup>#</sup>	51.02±5.14 <sup>#</sup>	59.47±5.17 <sup>#</sup>	42.15±4.36 <sup>#</sup>	0.61±0.06 <sup>#</sup>	0.34±0.03 <sup>#</sup>	0.56±0.05 <sup>#</sup>	0.72±0.06 <sup>#</sup>
<i>F</i>	122.777	225.443	191.302	132.286	92.742	168.116	171.116	219.189	164.808
<i>P</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*n*=9; \**P*<0.05, 与AP+si-NC组比较; <sup>#</sup>*P*<0.05, 与AP+si-LINC00958+anti-miR-NC组比较。

*n*=9; \**P*<0.05 compared with AP+si-NC group; <sup>#</sup>*P*<0.05 compared with AP+si-LINC00958+anti-miR-NC group.

### 3 讨论

SCLC占肺癌总数的15%~20%, 易转移, 且多数患者确诊时已为晚期, 治疗效果差, 需寻找新的有效的治疗方法, 随着靶向药物治疗的兴起, 针对小细胞肺癌的靶向药物也成为研究的热点<sup>[16]</sup>。研究发现, lncRNA与多数肿瘤的进展相关, LINC00958在胃癌中高表达, 与胃癌的转移和不良预后相关, 可作为胃癌中新的预后预测因子<sup>[17]</sup>。LINC00958在抗放疗辐射宫颈癌患者中呈高表达, LINC00958可通过miR-5095竞争性结合RRM2, 进而调节宫颈癌细胞对放疗辐射的敏感性<sup>[18]</sup>。本实验用不同浓度阿帕替尼处理H446、H446/AP细胞后检测其增殖抑制率, 结果显示, H446/AP相较于H446细胞, 增殖抑制率显著降低, IC<sub>50</sub>显著升高。说明H446/AP是阿帕替尼耐药细胞, 小细胞肺癌阿帕替尼耐药细胞建立成功。LINC00958在小细胞肺癌组织和H446/AP细胞中均高表达。抑制LINC00958表达且用阿帕替尼处理后, H446/AP细胞中CyclinD1、MMP-2、MMP-9的表达水平均降低, 而H446/AP细胞中p21表达水平升高, H446/AP细胞的增殖抑制率升高, H446/AP细胞的迁移和侵袭数量降低。说明抑制LINC00958表达联合阿帕替尼抑制H446/AP细胞的增殖、迁移和侵袭, 表明抑制LINC00958表达可降低H446/AP对阿帕替尼的耐药性。

胶质瘤组织和细胞中miR-490-3p表达水平降低, 过表达miR-490-3p可抑制胶质瘤细胞的增殖和迁移<sup>[19]</sup>。前列腺癌细胞系中miR-490-3p低表达, 促进了前列腺癌细胞的生长、迁移、侵袭, 抑制了细

胞凋亡<sup>[20]</sup>。miR-490-3p在顺铂抗性卵巢癌组织中下调, 上调miR-490-3p可增强卵巢癌细胞的顺铂敏感性<sup>[21]</sup>。本实验结果显示, miR-490-3p在小细胞肺癌组织和H446/AP细胞中表达。miR-490-3p过表达联合阿帕替尼, H446/AP细胞中CyclinD1、MMP-2、MMP-9的表达水平降低, H446/AP细胞中p21表达水平升高, H446/AP细胞的抑制率升高, H446/AP细胞的迁移和侵袭数量降低。说明miR-490-3p过表达联合阿帕替尼抑制H446/AP细胞的增殖、迁移和侵袭, 表明miR-490-3p过表达可降低H446/AP对阿帕替尼的耐药性。

研究报道, 上调miR-490-3p可抑制内皮细胞和血管平滑肌细胞增殖和迁移<sup>[22]</sup>。lncRNA TP73-AS1通过靶向miR-490-3p抑制三阴性乳腺癌细胞血管生成<sup>[23]</sup>。本实验结果显示, LINC00958靶向调控miR-490-3p, 干扰miR-490-3p表达逆转了抑制LINC00958表达对H446/AP细胞阿帕替尼耐药性的抑制作用。提示, LINC00958可能通过调控miR-490-3p影响H446/AP细胞对阿帕替尼的耐药性。

综上所述, 抑制LINC00958表达联合阿帕替尼可抑制小细胞肺癌H446/AP细胞增殖、迁移和侵袭, 即抑制LINC00958表达降低了小细胞肺癌的阿帕替尼耐药性, 其机制可能与miR-490-3p表达有关, 这将为小细胞肺癌的治疗提供新思路和新靶点。

### 参考文献 (References)

- [1] 任婷婷, 孟庆威. 难治性小细胞肺癌的研究进展[J]. 肿瘤学杂

- 志(REN T T, MENG Q W. Research progress of refractory small cell lung cancer [J]. Journal of Chinese Oncology), 2018, 24(7): 660-5.
- [2] 王伙刚, 洪波, 林文楚. 小细胞肺癌靶向治疗研究进展[J]. 中国药理学通报(WANG H G, HONG B, LIN W C. Development of targeted therapies in small cell lung cancer [J]. Chinese Pharmacological Bulletin), 2017, 33(10): 1333-7.
- [3] 金莹, 余新民. 小细胞肺癌靶向治疗的研究进展[J]. 肿瘤学杂志(HUANG Y, YU X M. Progress on targeted therapy in small cell lung cancer [J]. Journal of Chinese Oncology), 2017, 23(9): 743-8.
- [4] 黄海, 毕锋. 阿帕替尼在恶性肿瘤治疗中的临床应用[J]. 国际肿瘤学杂志(HUANG H, BI F. Clinical application of Apatinib in the treatment of malignancies [J]. Journal of International Oncology), 2019, 46(1): 45-8.
- [5] 李艳芳, 李倩, 朱梅, 等. 阿帕替尼联合化疗一线治疗小细胞肺癌的疗效观察[J]. 癌症进展(LI Y F, LI Q, ZHU M, et al. Therapeutic effect of apatinib-based chemotherapy as the first-line treatment for small cell lung cancer [J]. Oncology Progress), 2020, 18(9): 928-46.
- [6] 刘超, 陈军, 张洪兵, 等. 阿帕替尼联合CCI-779体外抑制小细胞肺癌细胞株NCI-H446的增殖和迁移[J]. 中国肺癌杂志(LIU C, CHEN J, ZHANG H B, et al. Apatinib combined with CCI-779 inhibits the proliferation and migration of small cell lung cancer NCI-H446 cells *in vitro* [J]. Chinese Journal of Lung Cancer), 2020, 23(4): 216-22.
- [7] 姜增凯, 叶晓歌, 陈琴华. 阿帕替尼对肝癌细胞增殖和迁移能力的影响研究[J]. 中国临床药理学杂志(JIANG Z K, YE X G, CHEN Q H. Effect of apatinib on the proliferation and migration of liver cancer cells [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology), 2016, 32(15): 1422-4.
- [8] 宋永安, 刘海洋, 张晓菊. 阿帕替尼对肺腺癌H1650细胞增殖、活性氧水平和凋亡的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版(SONG Y A, LIU H Y, ZHANG X J. Effects of apatinib on proliferation, ROS level and apoptosis of lung adenocarcinoma H1650 cells [J]. Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)), 2019, 54(2): 223-6.
- [9] 高梦如, 魏小丽, 顾康生. 长链非编码RNA在肿瘤耐药中的作用[J]. 中国药理学通报(GAO M R, WEI X L, GU K S. Role of long non-coding RNA in drug resistance of tumor [J]. Chinese Pharmacological Bulletin), 2017, 33(12): 1641-5.
- [10] CHEN F, LIU M, YU Y, et al. LINC00958 regulated miR-627-5p/YBX2 axis to facilitate cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(9): 1270-80.
- [11] HUANG S, ZHAN Z, LI L, et al. LINC00958-MYC positive feedback loop modulates resistance of head and neck squamous cell carcinoma cells to chemo- and radiotherapy *in vitro* [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 5989-6000.
- [12] 林榆凯, 骆亚君, 沈琪琼, 等. 微小RNA对肿瘤耐药性影响的研究进展[J]. 台州学院学报(LIN Y K, LUO Y J, SHEN Q Q, et al. The study advances in the effect of microRNAs on tumor drug resistance [J]. Journal of Tanzhou University), 2018, 40(3): 42-7.
- [13] 王晓先, 孔凡君, 李飞, 等. miR-490-3p逆转MCF-7/ADM细胞对阿霉素耐药性的影响[J]. 临床肿瘤学杂志(WANG X Q, KONG F J, LI F, et al. Reversal effect of miR-490-3p on the resistance of MCF-7/ADM cells to adriamycin [J]. Chinese Clinical Oncology), 2015, 20(9): 780-6.
- [14] CHEN S, CHEN X, XIU Y L, et al. microRNA 490-3P enhances the drug-resistance of human ovarian cancer cells [J]. J Ovarian Res, 2014, 8(1): 84.
- [15] KANG N N, GE S L, ZHANG R Q, et al. MiR-490-3p inhibited the proliferation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by targeting HMGA2 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(23): 8298-305.
- [16] 周毅. 小细胞肺癌靶向药物治疗进展[J]. 中外医学研究(ZHOU Y. Progress in targeted drug therapy for small cell lung cancer [J]. Chinese and Foreign Medical Research), 2019, 17(12): 191-3.
- [17] WANG W, SONG Z J, WANG Y, et al. Elevated long non-coding RNA LINC00958 was associated with metastasis and unfavorable prognosis in gastric cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(2): 598-603.
- [18] ZHAO H, ZHENG G H, LI G C, et al. Long noncoding RNA LINC00958 regulates cell sensitivity to radiotherapy through RRM2 by binding to microRNA-5095 in cervical cancer [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 23349-59.
- [19] ZHANG F, WU A, WANG Y, et al. miR-490-3p functions as a tumor suppressor in glioma by inhibiting high-mobility group AT-hook 2 expression [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(1): 664-70.
- [20] FAN H, ZHANG Y S. miR-490-3p modulates the progression of prostate cancer through regulating histone deacetylase 2 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(2): 539-46.
- [21] TIAN J, XU Y Y, LI L, et al. MiR-490-3p sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin by directly targeting ABCC2 [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3): 1127-38.
- [22] LIU Y, CHEN Y, TAN L, et al. Linc00299/miR-490-3p/AURKA axis regulates cell growth and migration in atherosclerosis [J]. Heart Vessels, 2019, 34(8): 1370-80.
- [23] TAO W, SUN W, ZHU H, et al. Knockdown of long non-coding RNA TP73-AS1 suppresses triple negative breast cancer cell vasculogenic mimicry by targeting miR-490-3p/TWIST1 axis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 504(4): 629-34.