

# LncRNA SPINT1-AS1通过靶向miR-433-3p调控非小细胞肺癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭

王秀丽 卡哈尔江·阿不都外力 顾国民 刘春玲\*

(新疆医科大学附属肿瘤医院肺内科二病区, 乌鲁木齐 830011)

**摘要** 该研究主要探讨lncRNA SPINT1-AS1对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞H1299增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及其分子机制。选取新疆医科大学附属肿瘤医院2017年3月至2019年3月的30例NSCLC组织及匹配的癌旁组织; 体外培养人正常肺上皮细胞BEAS-2B和NSCLC细胞系H1299、Calu-3、Calu-6, 将H1299细胞分为NC组、si-NC组、si-SPINT1-AS1组、miR-NC组、miR-433-3p组、si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC组、si-SPINT1-AS1+anti-miR-433-3p组。RT-qPCR检测NSCLC组织和细胞中lncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p的表达水平; MTT检测细胞增殖情况; Transwell检测细胞的迁移和侵袭; 流式细胞仪检测细胞凋亡; Western blot检测相关蛋白的表达; 双荧光素酶报告基因实验检测lncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p的靶向关系。结果表明与癌旁组织和人正常肺上皮细胞BEAS-2B相比, NSCLC组织和细胞系中lncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p表达水平分别升高和降低( $P<0.05$ )。与si-NC组相比, si-SPINT1-AS1组可降低H1299细胞D值、迁移数目、侵袭数目以及PCNA、MMP-2、MMP-9、Bcl-2蛋白水平, 升高细胞凋亡率以及Bax蛋白水平( $P<0.05$ ); 与miR-NC组相比, miR-433-3p组可降低H1299细胞D值、迁移数目、侵袭数目以及PCNA、MMP-2、MMP-9、Bcl-2蛋白水平, 升高细胞凋亡率以及Bax蛋白水平( $P<0.05$ )。LncRNA SPINT1-AS1靶向调控miR-433-3p表达( $P<0.05$ ), 且下调miR-433-3p逆转了干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响( $P<0.05$ )。因此lncRNA SPINT1-AS1可通过靶向调控miR-433-3p抑制H1299细胞增殖、迁移和侵袭, 并促进凋亡。

**关键词** lncRNA SPINT1-AS1; miR-433-3p; 肺癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡

## The LncRNA SPINT1-AS1 Regulates the Proliferation, Apoptosis, Migration and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Targeting miR-433-3p

WANG Xiuli, KAHAERJIANG Abuduwaili, GU Guomin, LIU Chunling\*

(Second Ward of Department of Pulmonary Medicine, Affiliated Tumor Hospital Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**Abstract** The study aims to investigate the effects of lncRNA SPINT1-AS1 on proliferation, migration, invasion and apoptosis of NSCLC (non-small cell lung cancer cell) H1299 and its molecular mechanism. 30 NSCLC tissues and matching paracancer tissues were selected from March 2017 to March 2019 in Affiliated Tumor Hospital Xinjiang Medical University. Human normal lung epithelial cells BEAS-2B and NSCLC cell lines H1299, Calu-3 and Calu-6 were cultured *in vitro*. H1299 cells were divided into NC group, si-NC group, si-SPINT1-AS1

收稿日期: 2022-06-13

接受日期: 2022-07-25

新疆维吾尔自治区自然科学基金(批准号: 2019D01C256)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 1399931987, E-mail: liudeyouxiang66@163.com

Received: June 13, 2022

Accepted: July 25, 2022

This work was supported by the Xinjiang Uygur Autonomous Region Natural Science Foundation (Grant No.2019D01C256)

\*Corresponding author. Tel: +86-1399931987, E-mail: liudeyouxiang66@163.com

group, miR-NC group, miR-433-3p group, si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC group, si-SPINT1-AS1+anti-miR-433-3p group. RT-qPCR detection of lncRNA SPINT1-AS1 and miR-433-3p expression levels in NSCLC tissues and cells. MTT was used to detect cell proliferation. Transwell was used to detect cell migration and invasion. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Western blot was used to detect the expression of related proteins. Dual luciferase reporter gene assay was used to detect the targeting relationship between lncRNA SPINT1-AS1 and miR-433-3p. Results showed that compared with paracancerous tissue and human normal lung epithelial cells BEAS-2B, the expression levels of lncRNA SPINT1-AS1 and miR-433-3p in NSCLC tissues and cell lines were increased and decreased, respectively ( $P<0.05$ ). Compared with the si-NC group, the si-SPINT1-AS1 group could decrease cell proliferative number, migration number, invasion number, protein levels of PCNA, MMP-2, MMP-9 and Bcl-2, and increase apoptosis rate and Bax protein level of H1299 cells ( $P<0.05$ ); compared with the miR-NC group, the miR-433-3p group could reduce the *D* value, migration number, invasion number, and protein levels of PCNA, MMP-2, MMP-9, and Bcl-2 in H1299 cells, increase apoptosis rate and Bax protein level ( $P<0.05$ ). lncRNA SPINT1-AS1 targeted regulation of miR-433-3p expression ( $P<0.05$ ), and down-regulated miR-433-3p reversed the effects of interfering lncRNA SPINT1-AS1 on proliferation, migration, invasion and apoptosis of H1299 cells ( $P<0.05$ ). Thus, the lncRNA SPINT1-AS1 inhibits the proliferation, migration and invasion of H1299 cells and promotes apoptosis by targeting miR-433-3p.

**Keywords** lncRNA SPINT1-AS1; miR-433-3p; lung cancer; proliferation; migration; invasion; apoptosis

肺癌属于常见的恶性肿瘤,通常包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)两种。肺癌亚型中以NSCLC最为常见,在肺癌患者中约占3/4<sup>[1]</sup>。尽管临床治疗手段已取得较大进展,但NSCLC患者的5年生存率仍较低,且因耐药或肿瘤转移,使得患者复发率较高<sup>[2]</sup>。因此,亟待研究NSCLC病理机制和寻找新的治疗策略。长非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是不可以进行编码蛋白的转录本,其长度>200个核苷酸,可通过调控微小RNA(microRNA, miRNA)来调控癌细胞生物学过程,从而介导参与人类多种疾病进展。研究发现, lncRNA SPINT1-AS1在宫颈癌中表达水平升高,其高表达与晚期宫颈癌和不良预后相关,且可促进宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭以及肿瘤发生<sup>[3]</sup>。敲除 lncRNA SPINT1-AS1可有效减缓乳腺细胞的增殖及扩散现象<sup>[4]</sup>。lncRNA SPINT1-AS1在大肠癌中表达上调,其高表达与区域淋巴结转移、远处转移和较短生存期相关<sup>[5]</sup>。但lncRNA SPINT1-AS1在NSCLC中的表达及作用未见报道。Starbase预测显示, lncRNA SPINT1-AS1与 miR-433-3p之间存在核苷酸结合位点。研究报道, miR-433-3p在NSCLC中表达水平降低,上调 miR-433-3p可抑制NSCLC细胞的增殖和自噬,促进细胞凋亡<sup>[6]</sup>。过表达miR-433-3p抑制NSCLC细胞的恶性生物学行为<sup>[7]</sup>。关于lncRNA SPINT1-

AS1与miR-433-3p调控作用对NSCLC分级机制未见报道,因此,本实验旨在研究lncRNA SPINT1-AS1在NSCLC中的作用以及其是否可通过调控miR-433-3p表达影响NSCLC细胞H1299的增殖、迁移、侵袭和凋亡。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

以新疆医科大学附属肿瘤医院2017年3月至2019年3月收治的30例NSCLC患者为研究对象,从中观察记录原发性NSCLC组织和相关癌变附近组织,对其行手术切除,在-80℃条件下储存样本。本研究需患者及其家属签署知情同意书,且本研究已获本院伦理委员会认可批准(伦理号: K-2019064)。

### 1.2 材料

人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 和 NSCLC 细胞系 H1299、Calu-3 和 Calu-6 购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清及 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司; Trizol 试剂、反转录试剂盒及荧光定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; MTT 试剂盒和检测 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司; Transwell 小室和 Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司; RIPA 蛋白裂解液、二辛可宁酸(BCA)和双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于北京百奥莱博科技有限公司;

Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司。

### 1.3 细胞转染与分组

取对数生长期H1299细胞并将其接种至96孔板中,再将si-NC、si-SPINT1-AS1、miR-NC、miR-433-3p以每孔加200  $\mu$ L的量,分别转染至H1299细胞,记为si-NC组、si-SPINT1-AS1组、miR-NC组、miR-433-3p组,未经转染的H1299细胞记为NC组;将si-SPINT1-AS1分别与anti-miR-NC、anti-miR-433-3p共转染至H1299细胞,记为si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC组、si-SPINT1-AS1+anti-miR-433-3p组。依据Lipofectamine 2000试剂盒说明书对各组进行转染。转染48 h收集细胞进行后续实验。

### 1.4 RT-qPCR检测lncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p的表达水平

提取组织、细胞及各组H1299细胞总RNA,按照逆转录试剂盒合成反转录成cDNA,lncRNA SPINT1-AS1、miR-433-3p分别以*GAPDH*、*U6*为内参,按照荧光定量试剂盒进行扩增反应,反应体系为2  $\mu$ L RNA、12.5  $\mu$ L 2 $\times$  PCR Maser mix、0.5  $\mu$ L RT Primer(10  $\mu$ mol/L)、0.5  $\mu$ L上下引物,再用DEPC-H<sub>2</sub>O补足至20  $\mu$ L。反应程序为:95  $^{\circ}$ C预变性2 min;95  $^{\circ}$ C变性30 s、59  $^{\circ}$ C退火40 s、72  $^{\circ}$ C延伸45 s,35个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算其相对表达量。lncRNA SPINT1-AS1上游引物:5'-AGC CAG ACA GAC GGA CAG G-3',下游引物:5'-GCA GCA CAA ACT TCT TTA CAT C-3';miR-433-3p上游引物:5'-GGA GAA GTA CGG TGA GCC TG-3',下游引物:5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3';*GAPDH*上游引物:5'-GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA-3',下游引物:5'-GTG AGG GTC TCT CTC TTC CT-3';*U6*上游引物:5'-CTC GCT TCG GCA GCA CAT-3',下游引物:5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。引物由上海生工生物工程公司合成。

### 1.5 MTT检测细胞增殖

取1.3各组H1299细胞培养48 h后,加MTT溶液20  $\mu$ L/孔,培养4 h弃上清,加DMSO(150  $\mu$ L/孔),酶标仪检测波长为450 nm处的*D*值,即代表细胞增殖能力。

### 1.6 Transwell检测细胞迁移和侵袭

用不含和含Matrigel基质胶的Transwell实验分别检测细胞的迁移和侵袭,将各组H1299细胞接种于上室( $5 \times 10^4$ 个/孔),在下室中加600  $\mu$ L含10%胎

牛血清培养液,37  $^{\circ}$ C孵育24 h后,用棉签擦去未穿膜细胞。多聚甲醛室温固定15 min,0.1%结晶紫色5 min。最后在显微镜下观察,并随机挑选5个视野计数进行记录。

### 1.7 Annexin V检测细胞凋亡

采用PBS将收集细胞漂洗2次,同时以缓冲液重悬,将5  $\mu$ L碘化丙啶(PI)及5  $\mu$ L Annexin V-FITC混合,25 min后用流式细胞仪对细胞凋亡进行检测。

### 1.8 Western blot检测相关蛋白的表达

提取各组H1299细胞总蛋白,采用BCA试剂盒测定蛋白浓度。进行蛋白电泳后,转移至PVDF,室温下,密封放置于5%脱脂牛奶中,一抗(1:1 000稀释)4  $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗(1:5 000稀释)室温下孵育2 h,避光曝光显影,定影,蛋白条带灰度值采用ImageJ软件分析。

### 1.9 双荧光素酶报告基因实验检测lncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p的靶向关系

建立SPINT1-AS1野生型和突变型荧光素酶表达载体WT-SPINT1-AS1和MUT-SPINT1-AS1,与miR-NC及miR-433-3p联合转染H1299细胞。荧光素酶活性必须严格依据试剂盒说明书进行检测。

### 1.10 统计学处理

采用SPSS 21.0软件进行数据分析,计量资料使用( $\bar{x} \pm s$ )表示,均契合正态分布,两组间数据通过*t*检验,单因素方差对多组间的数据进行分析,以*P*<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 lncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p在NSCLC组织中的表达

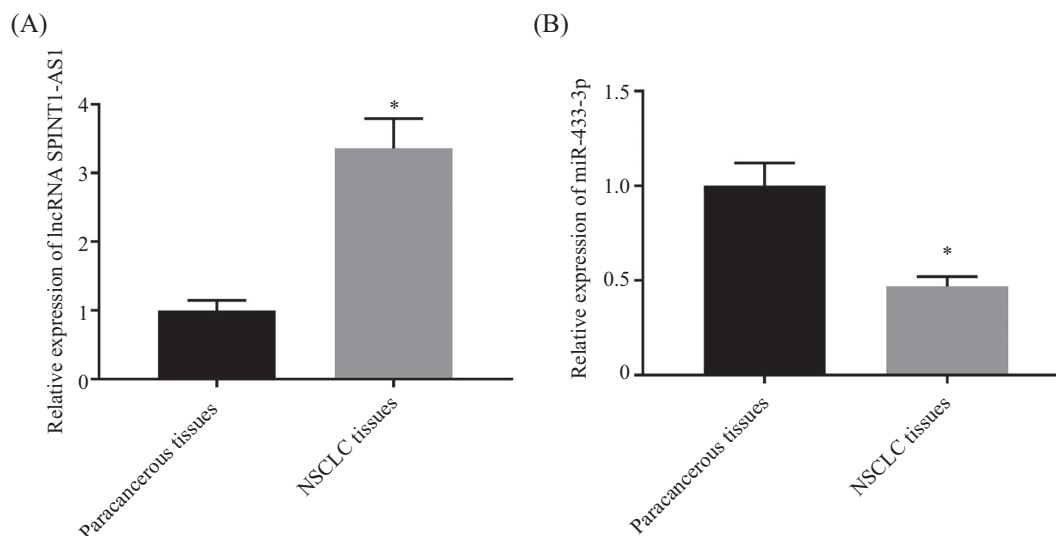
如图1所示,较癌旁组织,NSCLC组织中lncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p的表达水平分别显著升高和降低(*P*<0.05)。

### 2.2 lncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p在NSCLC细胞中的表达

如图2所示,与BEAS-2B细胞比较,NSCLC细胞系H1299、Calu-3、Calu-6中lncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p表达水平分别升高和降低(*P*<0.05)。因H1299细胞的lncRNA SPINT1-AS1表达水平最高,故后续实验选择H1299细胞进行。

### 2.3 干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

如图3、图4、表1和表2所示,与si-NC组比较,

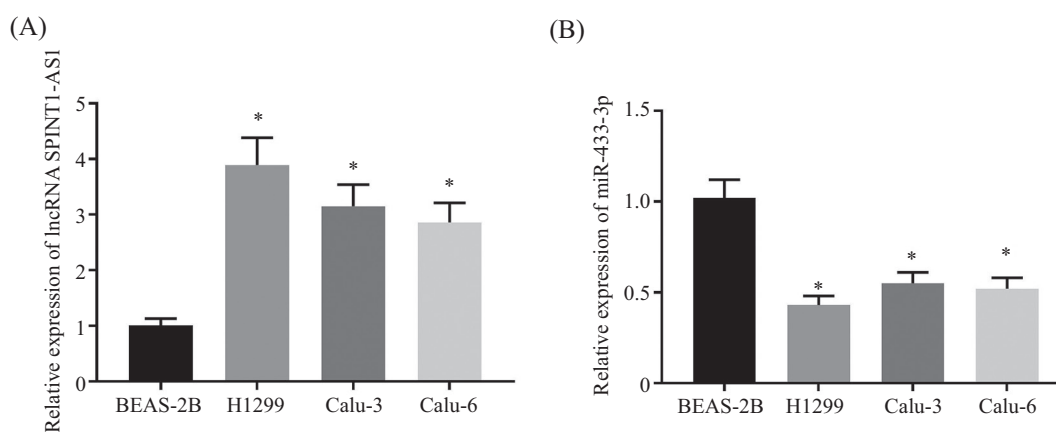


A: lncRNA SPINT1-AS1在NSCLC组织中的表达; B: miR-433-3p在NSCLC组织中的表达。\* $P < 0.05$ , 与癌旁组织组比较。

A: the expression of lncRNA SPINT1-AS1 in NSCLC tissues; B: the expression of miR-433-3p in NSCLC tissues. \* $P < 0.05$  compared with paracancerous lung tissues group.

图1 LncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p在NSCLC组织中的表达

Fig.1 LncRNA SPINT1-AS1 and miR-433-3p expression in NSCLC tissues



A: lncRNA SPINT1-AS1在NSCLC细胞系中的表达; B: miR-433-3p在NSCLC细胞系中的表达; \* $P < 0.05$ , 与BEAS-2B细胞组比较。

A: the expression of lncRNA SPINT1-AS1 in NSCLC cells; B: the expression of miR-433-3p in NSCLC cells. \* $P < 0.05$  compared with BEAS-2B cells group.

图2 LncRNA SPINT1-AS1和miR-433-3p在NSCLC细胞系中的表达

Fig.2 The expression of lncRNA SPINT1-AS1 and miR-433-3p in NSCLC cells

si-SPINT1-AS1组 lncRNA SPINT1-AS1表达水平降低, H1299细胞细胞活性、迁移数目、侵袭数目与 si-NC组比较, si-SPINT1-AS1组 PCNA、MMP-2、MMP-9、Bcl-2蛋白水平降低, 细胞凋亡率以及 Bax 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ ); NC组、si-NC组各指标无显著差异。表明干扰 lncRNA SPINT1-AS1 可抑制 H1299 细胞增殖、迁移、侵袭, 促进凋亡。

#### 2.4 过表达miR-433-3p对H1299细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

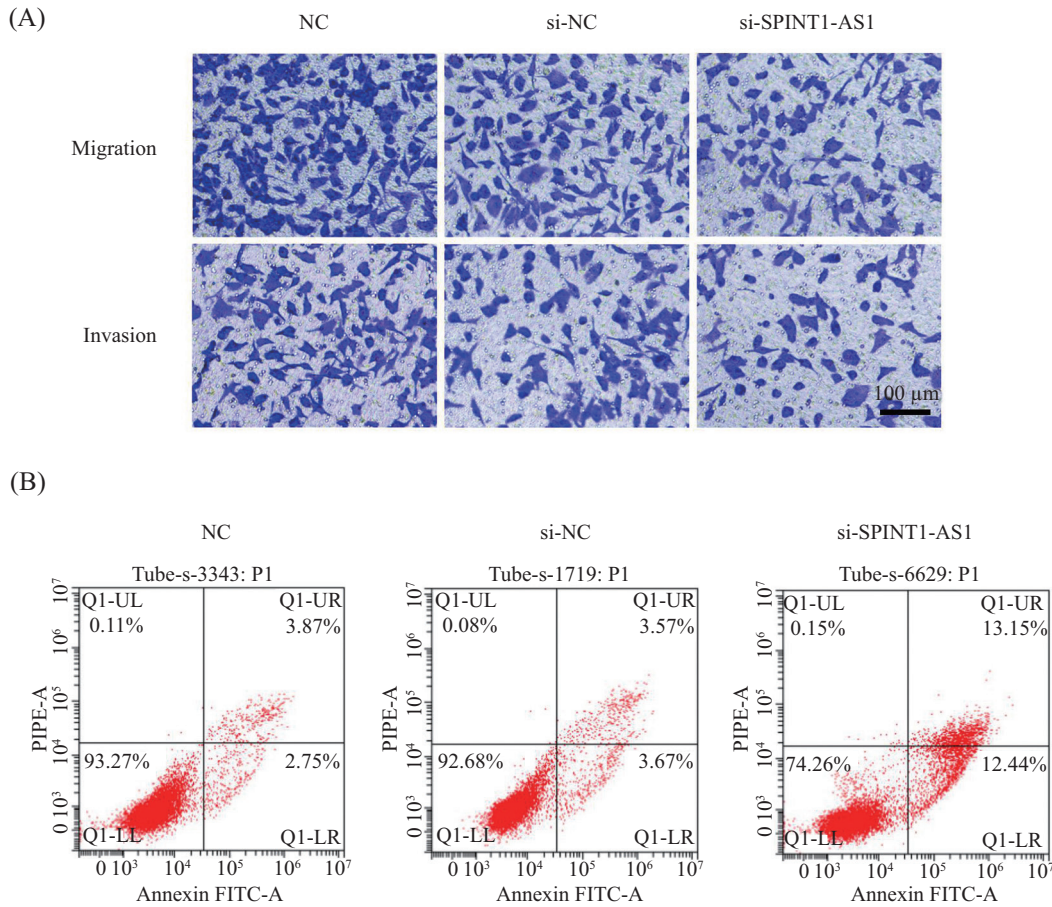
如图5、图6、表3和表4所示, 与miR-NC组比

较, miR-433-3p组miR-433-3p表达升高, H1299细胞 *D*值、迁移数目、侵袭数目以及PCNA、MMP-2、MMP-9、Bcl-2蛋白水平降低, 细胞凋亡率以及Bax 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ ); NC组、miR-NC组各指标无显著差异。表明过表达miR-433-3p可抑制H1299细胞增殖、迁移、侵袭, 促进凋亡。

#### 2.5 LncRNA SPINT1-AS1靶向调控miR-433-3p的表达

如图7所示, Starbase预测显示lncRNA SPINT1-AS1与miR-433-3p之间存在互补核苷酸序列。如表5





A: H1299细胞的迁移和侵袭; B: 细胞凋亡流式图。

A: the images of H1299 cell migration and invasion; B: flow cytometry analysis for cell apoptosis.

图3 干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞迁移、侵袭和凋亡的影响

Fig.3 The effects of lncRNA SPINT1-AS1 knockdown on H1299 cell migration, invasion and apoptosis

表1 干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

Table 1 The effects of lncRNA SPINT1-AS1 knockdown on H1299 cell proliferation, migration, invasion and apoptosis

分组 Group	SPINT1-AS1	D值(450 nm) D value (450 nm)	迁移数目/个 Migration cell number	侵袭数目/个 Invasion cell number	凋亡率/% Apoptotic rate /%
NC	1.02±0.11	1.41±0.17	136.52±15.45	106.23±13.14	6.82±0.82
si-NC	1.01±0.08	1.36±0.15	129.15±14.26	98.36±11.62	7.29±0.93
si-SPINT1-AS1	0.37±0.04*	0.79±0.08*	76.28±7.92*	46.57±5.65*	25.72±3.26*
F	186.313	55.417	57.754	83.525	257.867
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

\*P<0.05, 与si-NC组比较。

\*P<0.05 compared with si-NC group.

所示, 与miR-NC组相比, miR-433-3p组WT-SPINT1-AS1, 荧光素酶活性降低(P<0.05), 对MUT-SPINT1-AS1荧光素酶活性差异不显著(P>0.05); 如表6所示, 与pcDNA组相比, pcDNA-SPINT1-AS1组SPINT1-AS1表达水平增加, miR-433-3p表达水平降低; 与si-NC组相比, si-SPINT1-AS1组SPINT1-AS1表达水平降低, miR-433-3p表达水平增加, 表明lncRNA

SPINT1-AS1负调控miR-433-3p的表达(P<0.05)。

### 2.6 下调miR-433-3p逆转了干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

如图8、图9、表7和表8所示, 与si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC组比较, si-SPINT1-AS1+anti-miR-433-3p组miR-433-3p表达水平降低, H1299细胞D值、迁移数目、侵袭数目以及PCNA、MMP-2、MMP-

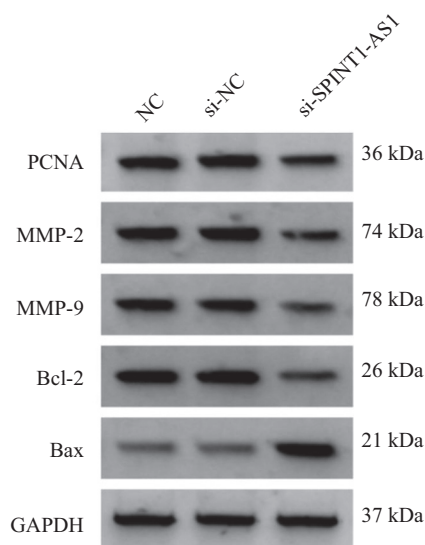


图4 干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞相关蛋白的影响

Fig.4 The effects of lncRNA SPINT1-AS1 silencing on protein expression in H1299 cells

表2 干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞相关蛋白的影响

Table 2 The effects of lncRNA SPINT1-AS1 silencing on protein expression in H1299 cells

分组 Group	PCNA	MMP-2	MMP-9	Bcl-2	Bax
NC	0.70±0.07	0.84±0.10	0.62±0.08	0.61±0.07	0.24±0.02
si-NC	0.73±0.08	0.82±0.08	0.64±0.07	0.59±0.06	0.22±0.03
si-SPINT1-AS1	0.32±0.04*	0.39±0.05*	0.25±0.03*	0.19±0.03*	0.65±0.08*
<i>F</i>	109.326	92.333	106.746	161.234	206.532
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

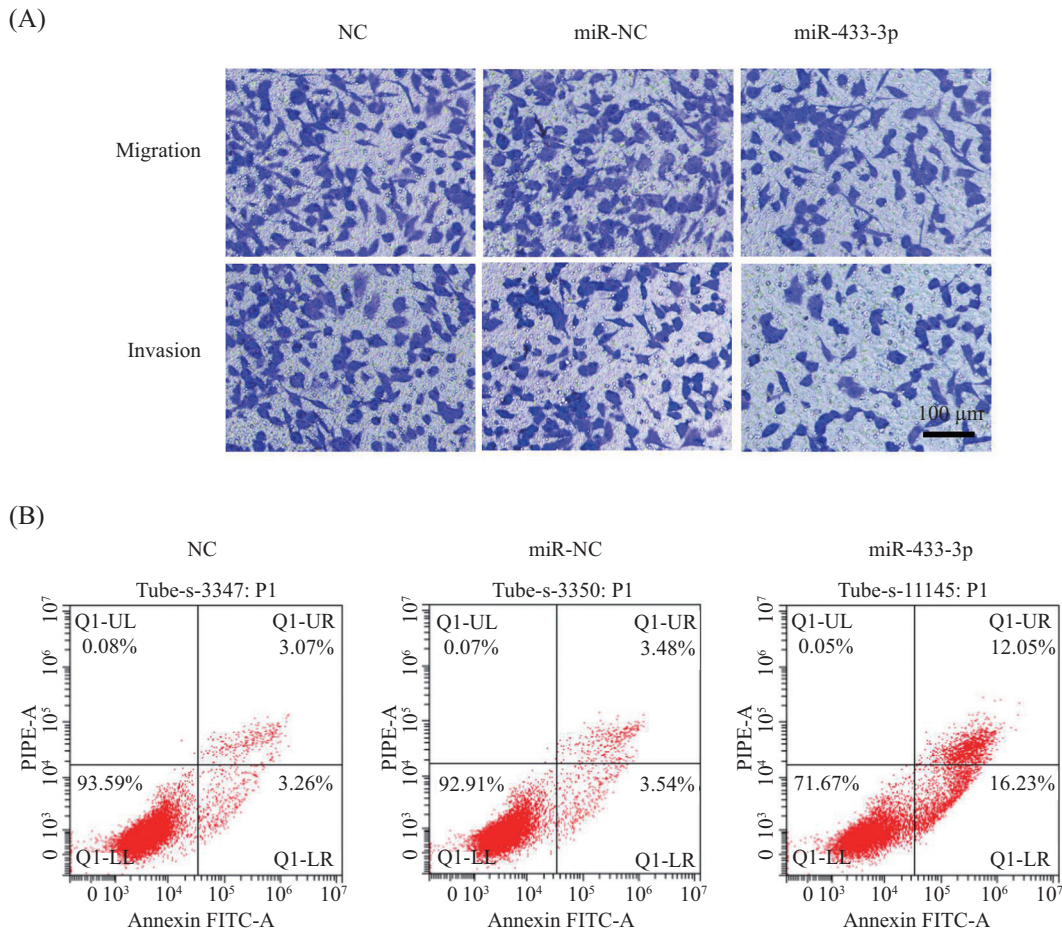
\* $P < 0.05$ , 与si-NC组比较。\* $P < 0.05$  compared with si-NC group.

9、Bcl-2蛋白水平升高,细胞凋亡率以及Bax蛋白水平降低( $P < 0.05$ ); si-SPINT1-AS1组、si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC组各指标无显著差异。

### 3 讨论

高通量测序及微阵列技术发展水平越来越高,越来越多微小RNA(microRNA, miR)、lncRNA等非编码RNA被筛选和鉴定。研究发现,lncRNA异常高表达与肺癌的发生和发展有关,如lncRNA CBR3-AS1在NSCLC组织中表达上调,抑制lncRNA CBR3-AS1可抑制NSCLC细胞增殖、迁移侵袭,促进细胞凋亡和细胞周期阻滞<sup>[8]</sup>。下调lncRNA SDHAP1可降低NSCLC细胞的增殖、迁移和侵袭能力<sup>[9]</sup>。沉默lncRNA NR2F2-AS1可抑制NSCLC细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化<sup>[10]</sup>。LncRNA DRAIC高表达与肺腺癌肿瘤分期、TNM分期、淋巴结转移和

预后不佳联系紧密,敲除lncRNA DRAIC可通过上调miR-3940-3p,抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[11]</sup>。以上说明lncRNA与NSCLC发病密切相关,先前研究显示lncRNA SPINT1-AS1在宫颈癌、乳腺癌、大肠癌中高表达<sup>[3-5]</sup>,但对NSCLC的研究未知。与上述研究结果<sup>[3-5]</sup>相似,本实验结果显示,与癌旁组织和BEAS-2B细胞比较,NSCLC组织和细胞系中lncRNA SPINT1-AS1表达水平升高,干扰lncRNA SPINT1-AS1可降低H1299细胞D值、迁移数目、侵袭数目,升高细胞凋亡率,表明干扰lncRNA SPINT1-AS1可抑制H1299细胞的恶性生物学行为。PCNA是肿瘤细胞增殖相关蛋白,MMP-2、MMP-9为肿瘤细胞转移相关蛋白,有研究显示,PCNA、MMP-2、MMP-9在NSCLC组织中高表达,且与淋巴结转移等相关,可作为NSCLC预后指标<sup>[12-13]</sup>。Bcl-2和Bax是凋亡相关蛋白,两者共同促进细胞凋亡,研究发



A: H1299细胞的迁移和侵袭; B: 细胞凋亡流式图。

A: the images of H1299 cell migration and invasion; B: flow cytometry analysis for cell apoptosis.

图5 过表达miR-433-3p对H1299细胞迁移、侵袭和凋亡的影响

Fig.5 The effects of miR-433-3p overexpression on H1299 cell migration, invasion and apoptosis

表3 过表达miR-433-3p对H1299细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

Table 3 The effects of miR-433-3p overexpression on H1299 cell proliferation, migration, invasion and apoptosis

分组 Group	miR-433-3p	D值(450 nm) D value (450 nm)	迁移数目/个 Cell migration number	侵袭数目/个 Cell invasion number	凋亡率/% Apoptotic rate %
NC	1.02±0.10	1.39±0.14	132.75±16.12	110.29±12.36	6.47±0.69
miR-NC	1.01±0.12	1.45±0.18	140.18±14.29	102.42±11.97	6.93±0.75
miR-433-3p	2.98±0.42*	0.83±0.08*	72.26±8.16*	51.23±6.35*	27.16±3.47*
F	173.066	54.062	70.618	82.548	288.156
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

\*P<0.05, 与miR-NC组比较。

\*P<0.05 compared with miR-NC group.

现, 在NSCLC组织中Bcl-2高表达, Bax低表达, 且与肿瘤分期、淋巴结转移有相关性<sup>[14]</sup>。本研究发现, 干扰lncRNA SPINT1-AS1降低了H1299细胞PCNA、MMP-2、MMP-9、Bcl-2蛋白水平, 升高了Bax蛋白水平, 提示干扰lncRNA SPINT1-AS1可抑制H1299细胞的恶性生物学行为可能与以上蛋白相关, 从而发

挥抑癌作用。

研究表明, lncRNA SPINT1-AS1作为竞争性内源RNAs吸附microRNAs调控肿瘤细胞的恶性行为<sup>[3-4]</sup>。本实验的Starbase预测显示, lncRNA SPINT1-AS1与miR-433-3p之间含有互补核苷酸序列, 双荧光素酶报告基因实验结果表明, 过表达miR-433-3p降低

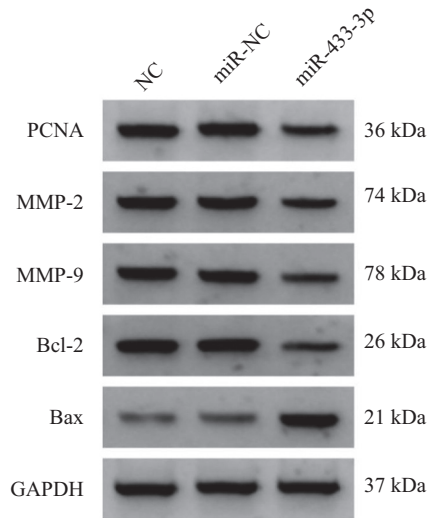


图6 过表达miR-433-3p对H1299细胞相关蛋白表达的影响

Fig.6 The effects of miR-433-3p overexpression on protein expression in H1299 cells

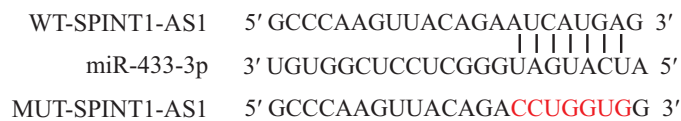
表4 过表达miR-433-3p对H1299细胞相关蛋白表达的影响

Table 4 The effects of miR-433-3p overexpression on protein expression in H1299 cells

分组 Group	PCNA	MMP-2	MMP-9	Bcl-2	Bax
NC	0.69±0.08	0.82±0.08	0.65±0.07	0.62±0.06	0.23±0.03
miR-NC	0.71±0.07	0.85±0.09	0.61±0.06	0.58±0.07	0.24±0.02
miR-433-3p	0.34±0.05*	0.41±0.05*	0.27±0.03*	0.21±0.02*	0.67±0.07*
<i>F</i>	84.717	95.982	125.234	155.022	274.790
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

\**P*<0.05, 与miR-NC组比较。

\**P*<0.05 compared with miR-NC group.



红色碱基: 突变碱基序列。

The highlighted bases: the mutant base sequence.

图7 LncRNA SPINT1-AS1的序列中含有与miR-433-3p互补的核苷酸序列

Fig.7 The binding sites of LncRNA SPINT1-AS1 for miR-433-3p

表5 双荧光素酶报告实验

Table 5 Dual-luciferase reporter assay

分组 Group	WT-SPINT1-AS1	MUT-SPINT1-AS1
miR-NC	1.01±0.10	1.00±0.08
miR-433-3p	0.47±0.06*	1.02±0.13
<i>t</i>	13.891	0.393
<i>P</i>	0.000	0.699

\**P*<0.05, 与miR-NC组比较。

\**P*<0.05 compared with miR-NC group.

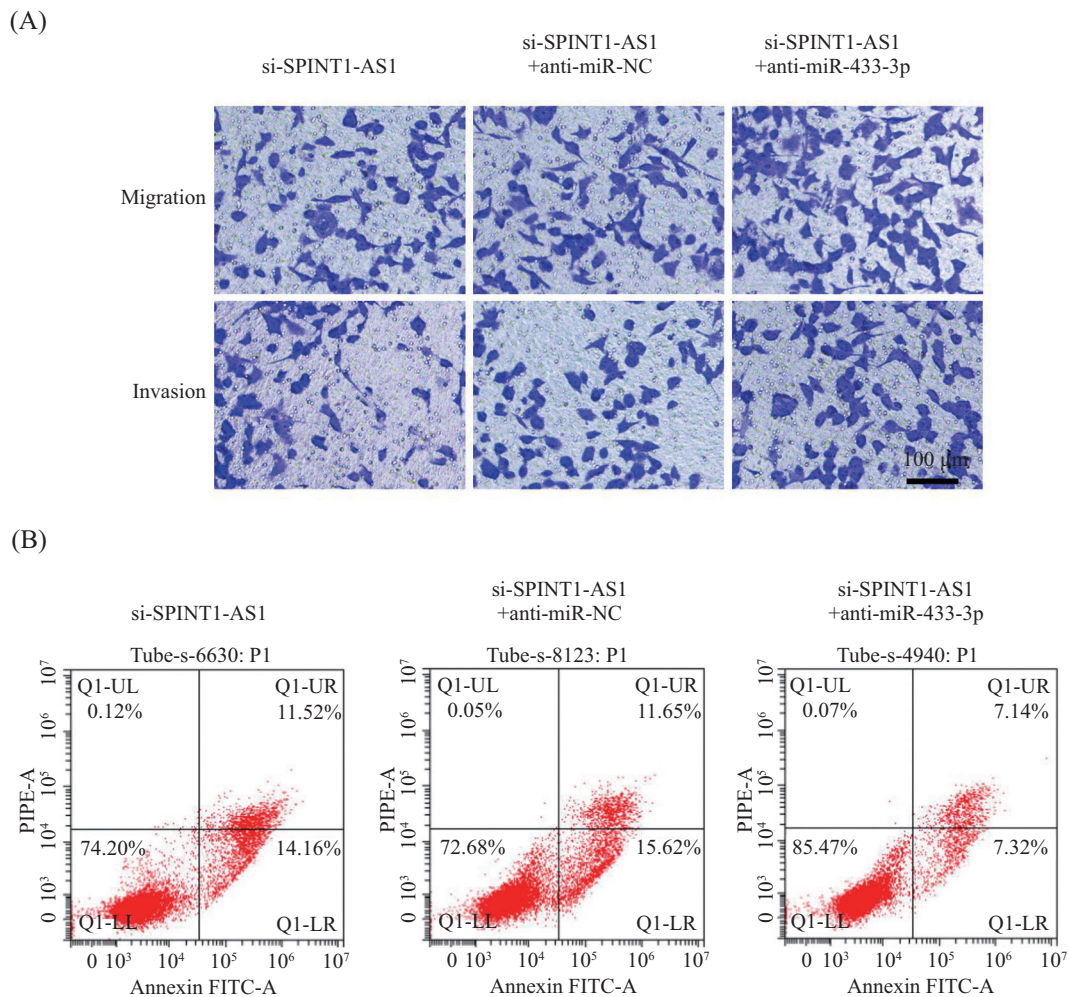


表6 lncRNA SPINT1-AS1对miR-433-3p表达的影响  
Table 6 LncRNA SPINT1-AS1-mediated effect on miR-433-3p expression

分组 Group	SPINT1-AS1	miR-433-3p
pcDNA	1.01±0.12	1.02±0.09
pcDNA-SPINT1-AS1	3.11±0.38 <sup>#</sup>	0.54±0.06 <sup>#</sup>
si-NC	1.02±0.10	1.00±0.07
si-SPINT1-AS1	0.42±0.06 <sup>&amp;</sup>	2.92±0.41 <sup>&amp;</sup>
<i>F</i>	290.993	217.702
<i>P</i>	0.000	0.000

<sup>#</sup>*P*<0.05, 与pcDNA组比较; <sup>&</sup>*P*<0.05, 与si-NC组比较。

<sup>#</sup>*P*<0.05 compared with pcDNA group; <sup>&</sup>*P*<0.05 compared with si-NC group.



A: H1299细胞的迁移和侵袭; B: 细胞凋亡流式图。

A: the images of H1299 cell migration and invasion; B: flow cytometry analysis for cell apoptosis.

图8 下调miR-433-3p逆转了干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞迁移、侵袭和凋亡的作用

Fig.8 MiR-433-3p downregulation attenuated lncRNA SPINT1-AS1 silencing-mediated effects on H1299 cell migration, invasion and apoptosis

了WT-SPINT1-AS1荧光素酶活性降低, 且lncRNA SPINT1-AS1负调控miR-433-3p表达。如miR-433-3p可通过调节染色体结构维持蛋白4(structural main-

tenance of chromosome 4, SMC4)表达抑制胶质瘤的发生发展<sup>[15]</sup>。miR-433-3p低表达通过靶向硬脂酰辅酶A去饱和酶1(stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1)促

表7 下调miR-433-3p逆转了干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响  
Table 7 The effect on miR-433-3p downregulation attenuated lncRNA SPINT1-AS1 silencing-mediated H1299 cell proliferation, migration, invasion and apoptosis

分组 Group	miR-433-3p	D值(450 nm) D value (450 nm)	迁移数目/个 Migration cell number	侵袭数目/个 Invasion cell number	凋亡率/% Apoptotic rate /%
si-SPINT1-AS1	1.01±0.11	0.80±0.09	71.58±6.82	43.72±5.68	25.21±2.98
si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC	1.02±0.08	0.78±0.08	67.35±7.65	49.24±4.76	26.47±3.13
si-SPINT1-AS1+anti-miR-433-3p	0.58±0.07	1.23±0.15	113.18±12.58*	85.15±10.13*	14.28±1.67*
<i>F</i>	72.808	47.165	65.782	86.735	56.527
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

\**P*<0.05, 与si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC组比较。

\**P*<0.05 compared with si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC group.

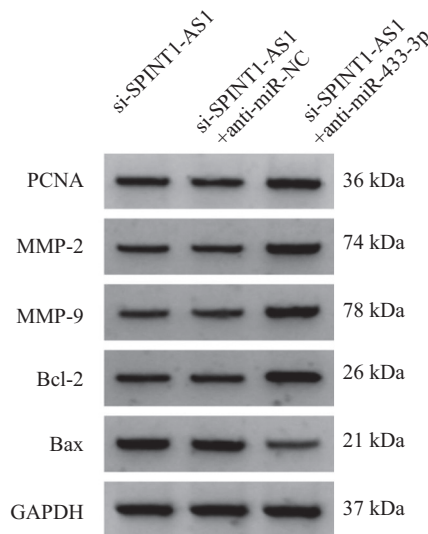


图9 下调miR-433-3p逆转了干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞相关蛋白表达的影响  
Fig.9 The effect on miR-433-3p downregulation attenuated lncRNA SPINT1-AS1 silencing-mediated protein expression in H1299 cells

表8 下调miR-433-3p逆转了干扰lncRNA SPINT1-AS1对H1299细胞相关蛋白表达的影响  
Table 8 The effect on miR-433-3p downregulation attenuated lncRNA SPINT1-AS1 silencing-mediated protein expression in H1299 cells

分组 Group	PCNA	MMP-2	MMP-9	Bcl-2	Bax
si-SPINT1-AS1	0.34±0.03	0.37±0.04	0.24±0.02	0.20±0.03	0.63±0.07
si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC	0.33±0.04	0.40±0.05	0.25±0.03	0.21±0.02	0.66±0.06
si-SPINT1-AS1+anti-miR-433-3p	0.57±0.06	0.71±0.08*	0.51±0.05	0.43±0.04	0.37±0.04
<i>F</i>	81.590	91.114	166.500	157.345	67.990
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

\**P*<0.05, 与si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC组比较。

\**P*<0.05 compared with si-SPINT1-AS1+anti-miR-NC group.

进鼻咽癌细胞的增殖、迁移和脂质积累<sup>[6]</sup>。骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭可通过miR-433-3p的高表达抑制,但其也会诱导细胞凋亡<sup>[17]</sup>。以上表明miR-

433-3p与癌症密切相关,之前研究显示miR-433-3p在NSCLC中可发挥抑癌作用<sup>[6-7]</sup>。与上述研究结果<sup>[6-7]</sup>一致,本实验结果显示,与癌旁组织和BEAS-2B细胞

比较, NSCLC组织和细胞系中 miR-433-3p 表达水平降低, 过表达 miR-433-3p 降低了 H1299 细胞 *D* 值、迁移数目、侵袭数目以及 PCNA、MMP-2、MMP-9、Bcl-2 蛋白水平, 提高了细胞凋亡率以及 Bax 蛋白水平, 提示过表达 miR-433-3p 可抑制 H1299 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并促进细胞凋亡; 进一步功能回复实验结果显示, 下调 miR-433-3p 逆转了干扰 lncRNA SPINT1-AS1 对 H1299 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响, H1299 细胞 *D* 值、迁移数目、侵袭数目以及 PCNA、MMP-2、MMP-9、Bcl-2 蛋白水平增加, 细胞凋亡率以及 Bax 蛋白水平下降, 提示 lncRNA SPINT1-AS1 可通过靶向调控 miR-433-3p 表达影响 H1299 细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡。

综上所述, 干扰 lncRNA SPINT1-AS1 可抑制 H1299 细胞的恶性表型, 可能与靶向调控 miR-433-3p 有关。

### 参考文献 (References)

- [1] HERBST R S, MORGENZSTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-54.
- [2] KIM C, GIACCONE G. Precision oncology in non-small-cell lung cancer: opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(6): 348-9.
- [3] SONG H, LIU Y, LIANG H, et al. SPINT1-AS1 Drives cervical cancer progression via repressing miR-214 biogenesis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.691140.
- [4] ZHOU T, LIN K, NIE J, et al. LncRNA SPINT1-AS1 promotes breast cancer proliferation and metastasis by sponging let-7a/b/i-5p [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, doi: 10.1016/j.prp.2020.153268.
- [5] LI C, LI W, ZHANG Y, et al. Increased expression of antisense lncRNA SPINT1-AS1 predicts a poor prognosis in colorectal cancer and is negatively correlated with its sense transcript [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, doi: 10.2147/OTT.S163883.
- [6] ZHANG F, CHENG R, LI P, et al. Hsa\_circ\_0010235 functions as an oncogenic drive in non-small cell lung cancer by modulating miR-433-3p/TIPRL axis [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 73.
- [7] WENG L, QIU K, GAO W, et al. LncRNA PCGEM1 accelerates non-small cell lung cancer progression via sponging miR-433-3p to upregulate WTAP [J]. *BMC Pulm Med*, 2020, 20(1): 213.
- [8] LIU S, ZHAN N, GAO C, et al. Long noncoding RNA CBR3-AS1 mediates tumorigenesis and radiosensitivity of non-small cell lung cancer through redox and DNA repair by CBR3-AS1/miR-409-3p/SOD1 axis [J]. *Cancer Lett*, 2021, doi: 10.1016/j.canlet.2021.11.009.
- [9] HE L, ZHOU L, LU Z B, et al. Influence of LncRNA SDHAP1 on multiplication, migration and invasiveness of non-small cell lung carcinoma cells [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(10): 11245-54.
- [10] LIU C, LI Q G, ZHOU Y, et al. LncRNA NR2F2-AS1 induces epithelial-mesenchymal transition of non-small cell lung cancer by modulating BVR/ATF-2 pathway via regulating miR-545-5p/c-Met axis [J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(10): 4844-65.
- [11] LIU Z, YANG S, ZHOU S, et al. Prognostic value of lncRNA DRAIC and miR-3940-3p in lung adenocarcinoma and their effect on lung adenocarcinoma cell progression [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, doi: 10.2147/CMAR.S320616.
- [12] 韩松岩, 赵楠, 李丹. 非小细胞肺癌动态增强磁共振成像参数与血清PCNA、Survivin及VEGF表达的相关性研究[J]. *中国医学装备*(HAN S Y, ZHAO N, LI D. A relevant research between DCE-MRI parameters and expressions of PCNA, survivin and VEGF in NSCLC [J]. *China Medical Equipment*), 2022, 19(2): 72-6.
- [13] 赵天源, 张艳敏, 常延河. 非小细胞肺癌组织中HAb18G、MMP-9和MMP-2表达与预后的相关性[J]. *临床与实验病理学杂志*(ZHAO T Y, ZHANG Y M, CHANG Y H. Correlation between the expression of HAb18G, MMP-9 and MMP-2 in non-small cell lung cancer and prognosis [J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*), 2020, 36(7): 819-22.
- [14] 陈涛, 杜维. 非小细胞肺癌患者热休克蛋白90 $\alpha$ 、凋亡促进因子Bax、凋亡抑制因子Bcl-2表达水平变化及与病理学特征的相关性[J]. *中国医学工程*(CHEN T, DU W. Expression of heat shock protein 90 $\alpha$ , apoptosis-promoting factor Bax and apoptosis-inhibiting factor Bcl-2 in patients with non-small cell lung cancer and their correlation with pathological features [J]. *China Medical Engineering*), 2019, 27(8): 9-13.
- [15] YOU A, RAO G, WANG J, et al. MiR-433-3p restrains the proliferation, migration and invasion of glioma cells via targeting SMC4 [J]. *Brain Res*, 2021, doi: 10.1016/j.brainres.2021.147563.
- [16] YIN H, QIU X, SHAN Y, et al. HIF-1 $\alpha$  downregulation of miR-433-3p in adipocyte-derived exosomes contributes to NPC progression via targeting SCD1 [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(4): 1457-70.
- [17] HOU X K, MAO J S. Long noncoding RNA SNHG14 promotes osteosarcoma progression via miR-433-3p/FBXO22 axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 523(3): 766-72.