

LncRNA MALAT1调控miR-383-5p对神经母细胞瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响

熊应亮 王海鑫 彭涛 黎建华*

(凉山彝族自治州第一人民医院神经外科, 西昌 615000)

摘要 该文旨在探讨长链非编码RNA(lncRNA)肺腺癌转移相关转录本1(MALAT1)对神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)细胞增殖、迁移和侵袭的影响及作用机制。选取2019年1月至2021年12月在凉山彝族自治州第一人民医院接受治疗的45例NB患者的NB组织和相邻的非癌组织,利用qRT-PCR检测NB组织和相邻的非癌组织、人脐静脉内皮细胞HUVECs和神经母细胞瘤细胞系NMB、SHEP21N、SHEP2中MALAT1和miR-383-5p的表达水平。选择SHEP2为研究对象,将其随机分为si-NC组、si-MALAT1组、pc-NC组、pc-MALAT1组、miR-NC组、miR-383-5p过表达组(OE-miR-383-5p组)、anti-NC组、anti-miR-383-5p组、si-MALAT1+anti-NC组和si-MALAT1+anti-miR-383-5p组;CCK-8法检测各组SHEP2细胞的增殖水平;Western blot实验检测各组SHEP2细胞中Cyclin D1、PCNA、MMP-2和MMP-9的蛋白表达水平;Transwell实验检测各组SHEP2细胞的迁移和侵袭情况;双荧光素酶报告实验验证MALAT1和miR-383-5p的靶向关系。NB组织和细胞系(NMB、SHEP21N、SHEP2)中MALAT1表达上调,miR-383-5p表达下调,其中SHEP2细胞中MALAT1表达水平最高,miR-383-5p表达水平最低。敲低MALAT1表达或过表达miR-383-5p可明显降低SHEP2细胞增殖活性、迁移细胞数目和侵袭细胞数目,并下调Cyclin D1、PCNA、MMP-2和MMP-9蛋白表达水平。MALAT1可靶向调控miR-383-5p的表达,抑制miR-383-5p表达可逆转敲低MALAT1对SHEP2细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。敲低MALAT1可以抑制SHEP2细胞的增殖、迁移和侵袭,其作用机制可能与靶向调控miR-383-5p有关。

关键词 MALAT1; miR-383-5p; 神经母细胞瘤; 增殖; 迁移; 侵袭

Effects of LncRNA MALAT1 Regulating miR-383-5p on Proliferation, Migration and Invasion of Neuroblastoma Cells

XIONG Yingliang, WANG Haixin, PENG Tao, LI Jianhua*

(Department of Neurosurgery, the First People's Hospital of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Xichang 615000, China)

Abstract This study is aimed to investigate the effect of lncRNA (long non-coding RNA) MALAT1 (metastasis associated in lung denocarcinoma transcript 1) on the proliferation, migration and invasion of NB (neuroblastoma) cells. NB tissues and adjacent non-cancer tissues of 45 NB patients treated in the First People's Hospital of Liangshan Yi Autonomous Prefecture from January 2019 to December 2021 were selected. The expression levels of MALAT1 and miR-383-5p in NB tissue and adjacent non-cancer tissue, human umbilical vein endothelial cells HUVECs and NB cell lines (NMB, SHEP21N, and SHEP2) were detected by qRT-PCR. SHEP2 was selected as the research object, and was randomly grouped into si-NC group, si-MALAT1 group, pc-NC group, pc-MALAT1 group, miR-NC group, miR-383-5p overexpression group (OE-miR-383-5p group), anti-NC group, anti-miR-383-5p group, si-MALAT1+anti-

收稿日期: 2022-12-09

接受日期: 2023-02-06

*通讯作者: Tel: 13981507333, E-mail: 595653877@qq.com

Received: December 9, 2022

Accepted: February 6, 2023

*Corresponding author. Tel: +86-13981507333, E-mail: 595653877@qq.com

NC group and si-MALAT1+anti-miR-383-5p group. The proliferation of SHEP2 cells in each group was detected by CCK-8 method. The protein expression levels of Cyclin D1, PCNA, MMP-2 and MMP-9 in SHEP2 cells of each group were detected by Western blot assay. The migration and invasion of SHEP2 cells in each group were detected by Transwell assay. Dual luciferase reporter assay verified the targeting relationship between MALAT1 and miR-383-5p. The expression of MALAT1 was up-regulated and miR-383-5p was down-regulated in NB tissues and cell lines (NMB, SHEP21N, SHEP2), with the highest expression of MALAT1 and the lowest expression of miR-383-5p in SHEP2 cells. Knockdown of MALAT1 expression or over-expression of miR-383-5p significantly reduced SHEP2 cell proliferation, the number of migrating cells and the number of invasive cells, and down-regulated the expression of Cyclin D1, PCNA, MMP-2 and MMP-9 proteins. MALAT1 can target and regulate the expression of miR-383-5p, and inhibiting the expression of miR-383-5p can reverse the inhibitory effect of knocking down MALAT1 on the proliferation, migration and invasion of SHEP2 cells. The knockdown of MALAT1 can inhibit the proliferation, migration and invasion of SHEP2 cells, and its mechanism of action may be related to the targeted regulation of miR-383-5p.

Keywords MALAT1; miR-383-5p; neuroblastoma; proliferation; migration; invasion

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是一种儿童常见的恶性肿瘤,约占儿童癌症相关死亡的15%^[1-3]。尽管已经发展了多种疗法,如放射、手术和化学疗法,但患者的总生存率仍较低^[4]。因此,深入了解NB发展的分子机制,对于NB的治疗具有重要意义。长链非编码RNA(lncRNA)在NB的发生和转移中起重要作用^[5-6]。肺腺癌转移相关转录本1(metastasis associated in lung denocarcinoma transcript 1, MALAT1)是一种在肺癌组织中高表达的lncRNA,被报道与肿瘤细胞的增殖、凋亡和转移相关,在NB中MALAT1表达上调可促进肿瘤细胞的迁移和侵袭^[7-9]。但MALAT1在NB中的作用机制尚不完全清楚。miRNA(microRNA)是在转录后水平介导基因表达的细胞分子^[10]。miR-383-5p作为一种肿瘤抑制因子,在多种癌症中表达下调并参与肿瘤(如子宫内膜癌、前列腺癌和乳腺癌)的发生与发展^[11-13]。据报道, MALAT1与miR-383-5p之间存在相互作用^[14]。在胃癌中,下调MALAT1表达可通过靶向上调miR-383-5p表达,抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭^[15]。然而, MALAT1在NB中的作用是否与miR-383-5p有关还未可知。因此,本研究旨在探讨lncRNA MALAT1对NB细胞增殖、迁移和侵袭的影响,并分析其分子机制,以期对NB的治疗拓展新的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 样本来源

2019年1月至2021年12月期间,从凉山彝族自治

州第一人民医院获得了来自45例NB患者(小于9岁;男性25例,女性20例)的NB组织和相邻的非癌组织(距病灶2 cm的正常组织)。这些患者在手术前未进行全身或局部治疗。两名病理学家对组织切片进行了审查,以确认组织学诊断。新鲜标本立即在液氮中冷冻,并在-80℃下保存,直到提取RNA。采集标本前,所有患者家长均签署了知情同意书,研究经凉山彝族自治州第一人民医院伦理委员会批准(批准号:201901003)。

1.2 细胞与主要试剂

人脐静脉内皮细胞HUVECs和神经母细胞瘤癌细胞系NMB、SHEP21N和SHEP2购于中国科学院分子细胞科学卓越创新中心;DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购于美国Gibco公司;Lipofectamine™ 2000、ECL发光试剂盒购于美国Thermo公司;TRIzol试剂盒、逆转录试剂盒购于大连TaKaRa公司;MTT试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司;Cyclin D1抗体、PCNA抗体、MMP-2抗体、MMP-9抗体和GAPDH抗体购于美国Cell Signaling Technology公司;Transwell小室、基质胶购于美国Corning公司;双荧光素酶报告实验检测试剂盒购于美国Promega公司。靶向MALAT1的小分子干扰RNA(si-MALAT1)及其阴性对照(si-NC)、用于MALAT1过表达的pcDNA3.1质粒(pc-MALAT1)及其阴性对照(pc-NC)、miR-383-5p抑制剂(miR-383-5p inhibitor)及其阴性对照(inhibitor-NC)均购于广州锐博生物技术有限公司。

1.3 细胞培养与分组

将人脐静脉内皮细胞HUVECs和NB细胞系

NMB、SHEP21N、SHEP2常规复苏培养在含有10%胎牛血清的DMEM培养基内,在恒温箱中培养,条件设置为37℃、5% CO₂。取SHEP2细胞,经胰酶消化培养后,将细胞接种至96孔板中,待细胞生长至75%融合后,将其分为si-NC组(转染si-MALAT1阴性对照si-NC)、si-MALAT1组(转染si-MALAT1)、pc-NC组(转染pc-MALAT1阴性对照pc-NC)、pc-MALAT1组(转染pc-MALAT1)、miR-NC组(转染miR-383-5p mimic阴性对照mimic-NC)、miR-383-5p过表达组(OE-miR-383-5p组,转染miR-383-5p mimic)、anti-NC组(转染miR-383-5p inhibitor阴性对照inhibitor-NC)、anti-miR-383-5p组(转染miR-383-5p inhibitor)、si-MALAT1+anti-NC组(si-MALAT1和inhibitor-NC共转染至SHEP2细胞)和si-MALAT1+anti-miR-383-5p组(si-MALAT1和miR-383-5p inhibitor共转染至SHEP2细胞)。按照Lipofectamine™ 2000转染试剂盒说明书进行转染,转染48 h后,收集细胞用于后续实验。

1.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测MALAT1和miR-383-5p表达量

取对数生长期的神经母细胞瘤细胞HUVECs和NB细胞系NMB、SHEP21N、SHEP2以及各组SHEP2细胞,使用TRIzol试剂提取细胞总RNA,按照逆转录试剂盒说明逆转录合成cDNA,以此为模板进行PCR扩增。反应体系(25 μL): 12.5 μL SYBR Green qPCR Master Mix, 正向引物和反向引物各0.5 μL, 2.0 μL cDNA模板, 9.5 μL ddH₂O。反应条件: 95℃预变性10 min; 95℃变性15 s, 60℃退火60 s, 循环40次; 72℃延伸60 s。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算MALAT1和miR-383-5p的表达量, GAPDH和U6为内参基因。引物序列为MALAT1正向: 5'-GGT AAC GAT GGT GTC GAG GTC-3'和反向: 5'-CCA GCA TTA CAG TTC TTG AAC ATG-3'; miR-383-5p正向: 5'-GGG AGA TCA GAA GGT GAT TGT GGC T-3'和反向: 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'; U6正向: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'和反向: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; GAPDH正向: 5'-GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G-3'和反向: 5'-ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A-3'。

1.5 CCK-8检测细胞增殖水平

取各组SHEP2细胞,接种至96孔板中,分别在培养48 h、72 h时,弃上清培养液,然后在每孔内加入10 μL CCK-8溶液,继续在37℃培养箱中孵育2 h,用

酶标仪于490 nm波长处检测各组细胞的吸光度(D)值。

1.6 Western blot检测Cyclin D1、PCNA、MMP-2和MMP-9蛋白表达情况

取各组SHEP2细胞,加入胰酶消化细胞,重悬细胞,加入RIPA裂解缓冲液提取细胞总蛋白,使用BCA试剂盒检测蛋白浓度,采用SDS-PAGE分离等量蛋白样品后,转膜,加入5%脱脂牛奶室温封闭孵育2 h,在4℃孵育培养过夜加入Cyclin D1(1:1 000)、PCNA(1:1 000)、MMP-2(1:500)、MMP-9(1:500)和GAPDH(1:2 000)抗体,第二天加入二抗(1:4 000),37℃孵育2 h, ECL发光显影。ImageJ软件分析蛋白条带灰度值。

1.7 Transwell法检测细胞迁移和侵袭情况

细胞迁移实验: 取各组SHEP2细胞,制备不含血清的培养基,调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL,在Transwell上室加入100 mL细胞悬液,下室加入600 mL的10% PBS培养基;置于37℃、5% CO₂培养箱中继续培养24 h,使用棉签轻轻擦去上室细胞,用甲醇于室温下固定20 min, 0.2%结晶紫染色20 min, PBS洗涤2遍,选取5个视野于显微镜下观察迁移细胞数目。细胞侵袭实验: 在Transwell上室铺板50 μL稀释好的基质胶Matrigel,下室加入600 mL的10% PBS培养基,培养箱内继续培养待基质胶Matrigel凝固,后续实验步骤按照上述细胞迁移实验方法操作。最后选取5个视野于显微镜下观察侵袭细胞数目。

1.8 双荧光素酶报告实验验证MALAT1和miR-383-5p的靶向关系

通过TargetScan预测MALAT1的靶基因,发现MALAT1 3'UTR区域和miR-383-5p存在结合位点。构建MALAT1 3'UTR的野生型(WT-MALAT1)和突变型(MUT-MALAT1)荧光表达载体,取对数生长期的SHEP2细胞,接种至24孔板中,待细胞生长至75%融合时,按照Lipofectamine™ 2000转染试剂盒说明书将WT-MALAT1和MUT-MALAT1载体与miR-NC或miR-383-5p共转染至SHEP2细胞。按照双荧光素酶试剂盒说明书检测荧光素酶活性。

1.9 统计学分析

采用SPSS 20.0软件处理并分析数据,计量数据均符合正态分布,以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

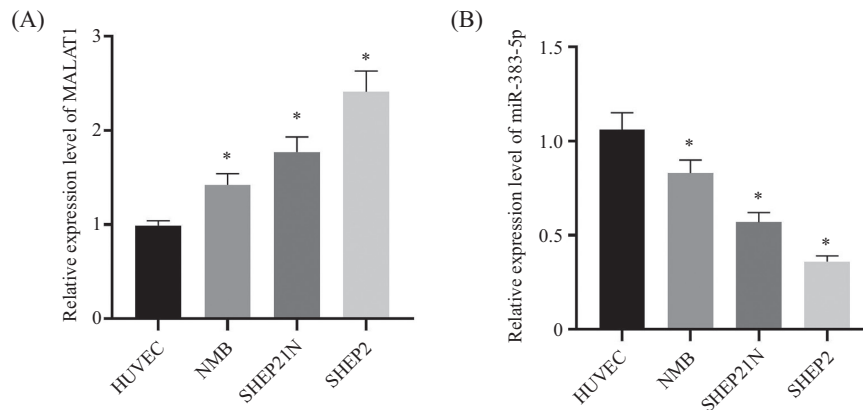
2.1 MALAT1和miR-383-5p在NB组织和细胞中的表达情况

与正常组织相比, NB组织中MALAT1表达水平显著升高 $[(2.29 \pm 0.05) \text{ vs } (1.00 \pm 0.08), P < 0.05]$, miR-383-5p表达水平显著降低 $[(0.49 \pm 0.04) \text{ vs } (1.01 \pm 0.06), P < 0.05]$ 。图1结果显示, 与HUVEC细胞相比, NMB细

胞、SHEP21N细胞和SHEP2细胞中MALAT1的表达水平显著升高 $(P < 0.05)$, miR-383-5p表达水平显著降低 $(P < 0.05)$, 其中SHEP2细胞中MALAT1的表达水平显著高于其他细胞, miR-383-5p表达水平显著低于其他细胞, 因此, 本研究选择SHEP2细胞进行后续实验。

2.2 敲低MALAT1对SHEP2细胞增殖的影响

图2结果显示, 与si-NC组相比, si-MALAT1组

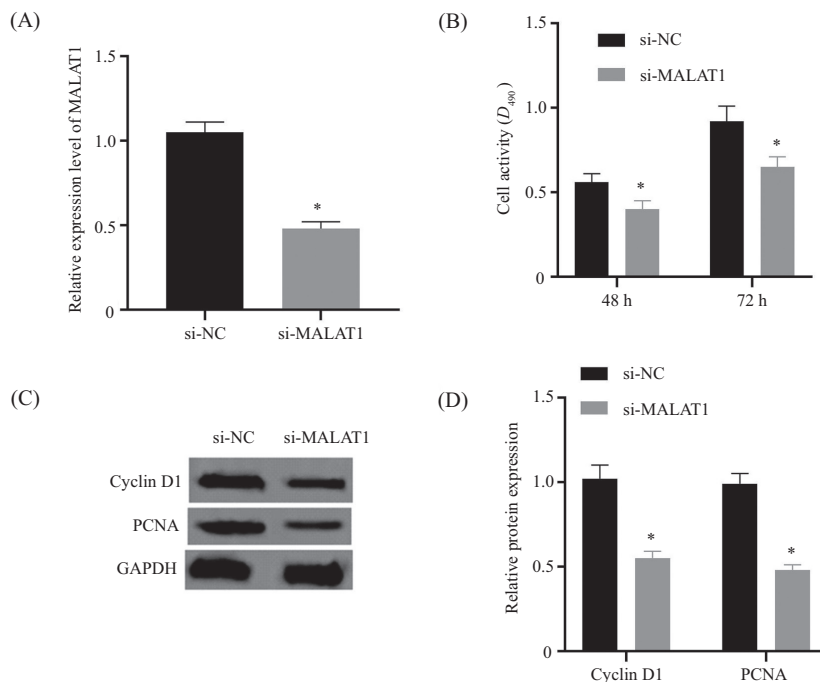


A: MALAT1相对表达水平; B: miR-383-5p相对表达水平。* $P < 0.05$, 与HUVEC比较。

A: relative expression level of MALAT1; B: relative expression level of miR-383-5p. * $P < 0.05$ compared with HUVEC.

图1 MALAT1和miR-383-5p在神经母细胞中的表达

Fig.1 Expression of MALAT1 and miR-383-5p in neuroblasts



A: MALAT1相对表达水平; B: 细胞活性; C: Cyclin D1、PCNA蛋白表达条带图; D: Cyclin D1、PCNA蛋白表达的分析结果。* $P < 0.05$, 与si-NC组相比。

A: relative expression level of MALAT1; B: cell activity; C: Cyclin D1, PCNA protein expression band map; D: analysis results of Cyclin D1 and PCNA protein expression. * $P < 0.05$ compared with si-NC group.

图2 敲低MALAT1对SHEP2细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of MALAT1 knockdown on the proliferation of SHEP2 cells

SHEP2细胞中MALAT1表达水平显著降低($P<0.05$), 48 h、72 h时的细胞活性显著降低($P<0.05$), PCNA蛋白和Cyclin D1蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。

2.3 敲低MALAT1对SHEP2细胞迁移和侵袭的影响

图3结果显示, 与si-NC组相比, si-MALAT1组迁移细胞数目、侵袭细胞数目显著降低($P<0.05$), MMP-2蛋白表达量、MMP-9蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。

2.4 MALAT1靶向负调控miR-383-5p的表达

通过TargetScan在线数据库进行预测发现MALAT1和miR-383-5p存在结合位点(图4A)。双荧光素酶报告实验结果显示, 与miR-NC和WT-MALAT1共转染组相比, WT-MALAT1和miR-383-5p共转染组细胞的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$), 而与miR-NC和MUT-MALAT1共转染组相比, MUT-MALAT1和miR-383-5p共转染组细胞的荧光素酶活性没有显著差异($P>0.05$, 图4B)。qRT-PCR结果显示, 与pc-NC组相比, pc-MALAT1组MALAT1表达量显

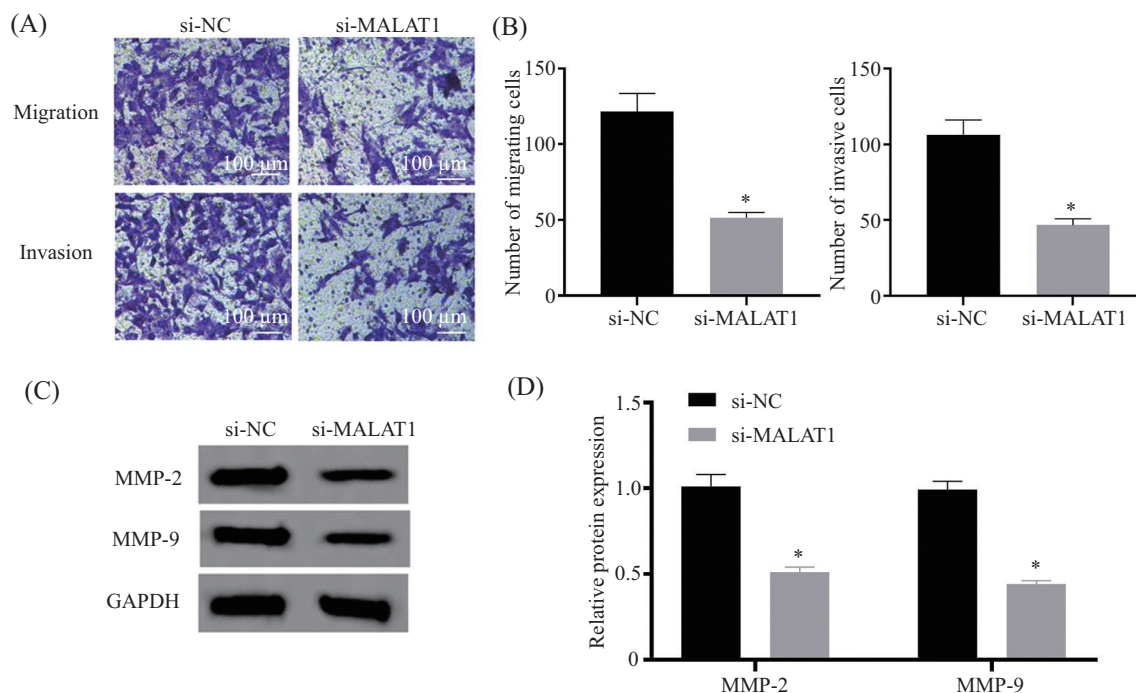
著升高($P<0.05$, 图4C)。与si-NC组相比, si-MALAT1组miR-383-5p表达量显著升高($P<0.05$), 与pc-NC组相比, pc-MALAT1组miR-383-5p表达量显著降低($P<0.05$, 图4D)。

2.5 miR-383-5p对SHEP2细胞增殖、迁移和侵袭的影响

图5和图6结果显示, 与miR-NC组相比, OE-miR-383-5p组细胞活性、迁移细胞数目、侵袭细胞数目、PCNA和Cyclin D1蛋白表达水平以及MMP-2、MMP-9蛋白表达水平均显著降低, miR-383-5p表达水平显著升高($P<0.05$); 与anti-NC组相比, anti-miR-383-5p组细胞活性、迁移细胞数目、侵袭细胞数目、PCNA和Cyclin D1蛋白表达水平以及MMP-2、MMP-9蛋白表达水平均显著升高, miR-383-5p表达水平显著降低($P<0.05$)。

2.6 抑制miR-383-5p表达可以逆转敲低MALAT1对SHEP2细胞增殖的影响

图7显示, 与si-NC组相比, si-MALAT1组细胞活性和Cyclin D1、PCNA表达水平显著降低($P<0.05$);

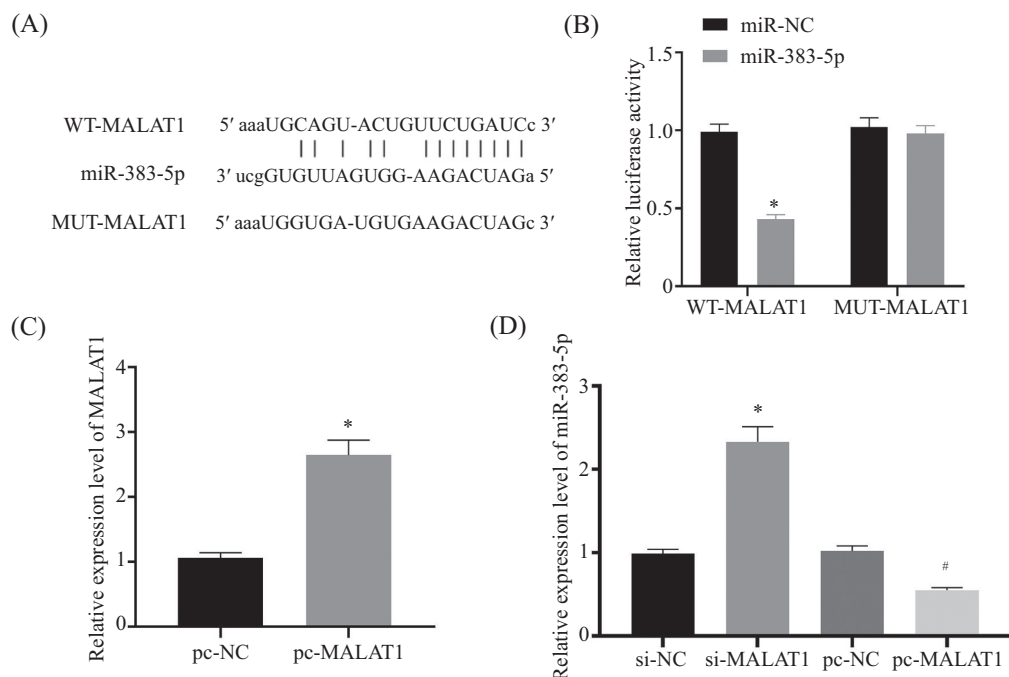


A: Transwell法检测SHEP2细胞迁移、侵袭的代表图; B: 迁移细胞数、侵袭细胞数的分析结果; C: MMP-2、MMP-9蛋白表达条带图; D: MMP-2、MMP-9蛋白表达的分析结果。* $P<0.05$, 与si-NC组比较。

A: Transwell method was used to detect the migration and invasion of SHEP2 cells; B: analysis results of the number of migrating cells and invasive cells; C: MMP-2, MMP-9 protein expression band map; D: analysis results of MMP-2 and MMP-9 protein expression. * $P<0.05$ compared with si-NC group.

图3 敲低MALAT1对SHEP2细胞迁移和侵袭的影响

Fig.3 Effect of MALAT1 knockdown on migration and invasion of SHEP2 cells

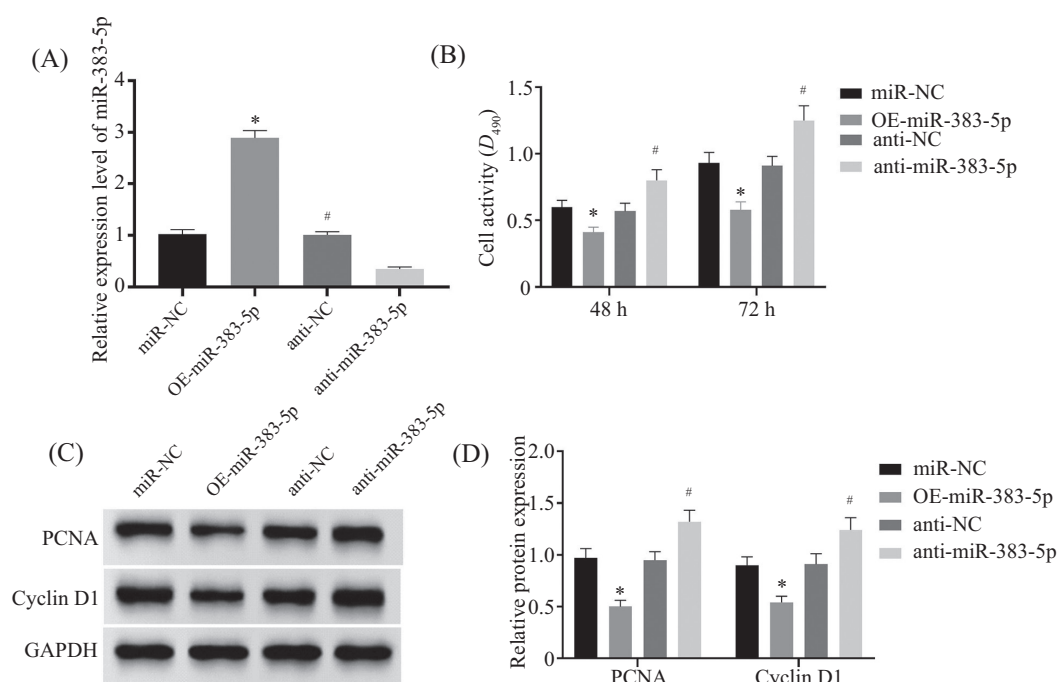


A: MALAT1和miR-383-5p互补核苷酸序列; B: 双荧光素酶报告实验结果, $*P<0.05$, 与miR-NC组相比; C: 过表达MALAT1转染效率, $*P<0.05$, 与pc-NC组相比; D: MALAT1靶向调控miR-383-5p的表达, $*P<0.05$, 与si-NC组相比; # $P<0.05$, 与pc-NC组比较。

A: MALAT1 and miR-383-5p complementary nucleotide sequences; B: double luciferase reported experimental results, $*P<0.05$ compared with miR-NC group; C: transfection efficiency of overexpression of MALAT1, $*P<0.05$ compared with pc-NC group; D: MALAT1 targeted regulation of miR-383-5p expression, $*P<0.05$ compared with si-NC group; # $P<0.05$ compared with pc-NC group.

图4 MALAT1靶向负调控miR-383-5p的表达

Fig.4 MALAT1 negatively regulates the expression of miR-383-5p

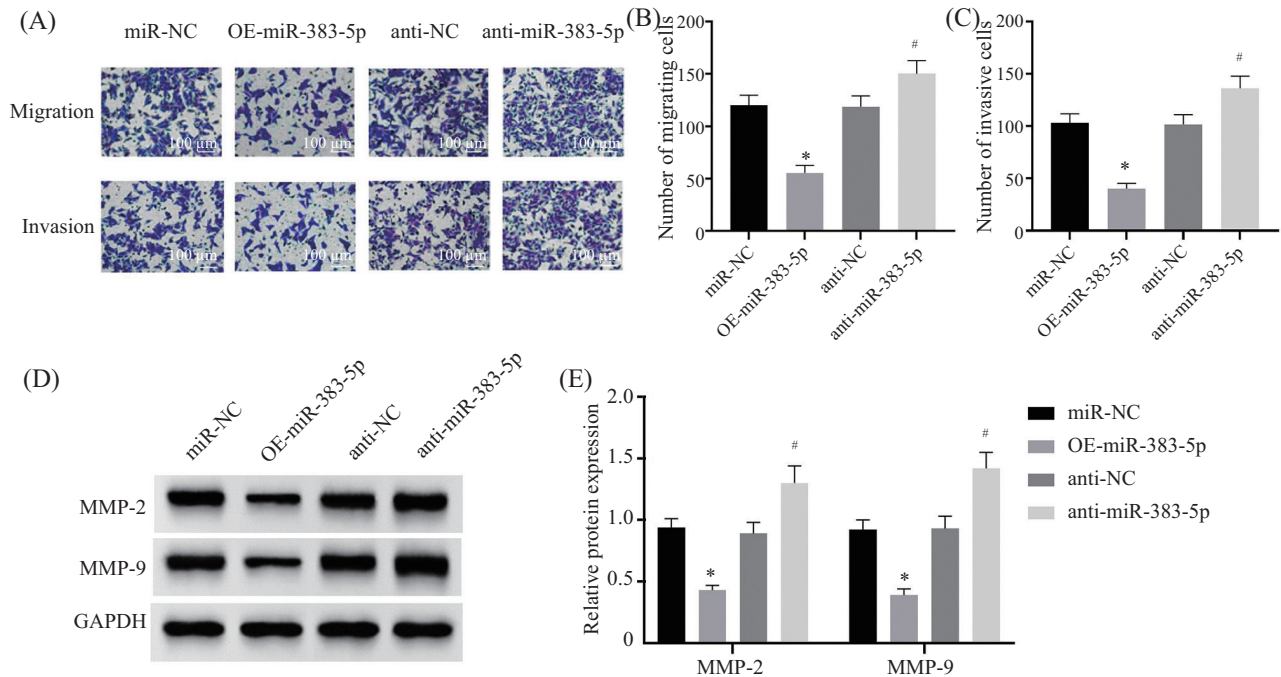


A: miR-383-5p表达水平; B: 细胞活性; C: Cyclin D1、PCNA蛋白表达条带图; D: Cyclin D1、PCNA蛋白表达的分析结果。* $P<0.05$, 与miR-NC组相比; # $P<0.05$, 与anti-NC组相比。

A: expression level of miR-383-5p; B: cell activity; C: Cyclin D1, PCNA protein expression band map; D: analysis results of Cyclin D1 and PCNA protein expression. $*P<0.05$ compared with miR-NC group; # $P<0.05$ compared with anti-NC group.

图5 miR-383-5p对SHEP2细胞增殖的影响

Fig.5 Effects of miR-383-5p on the proliferation of SHEP2 cells

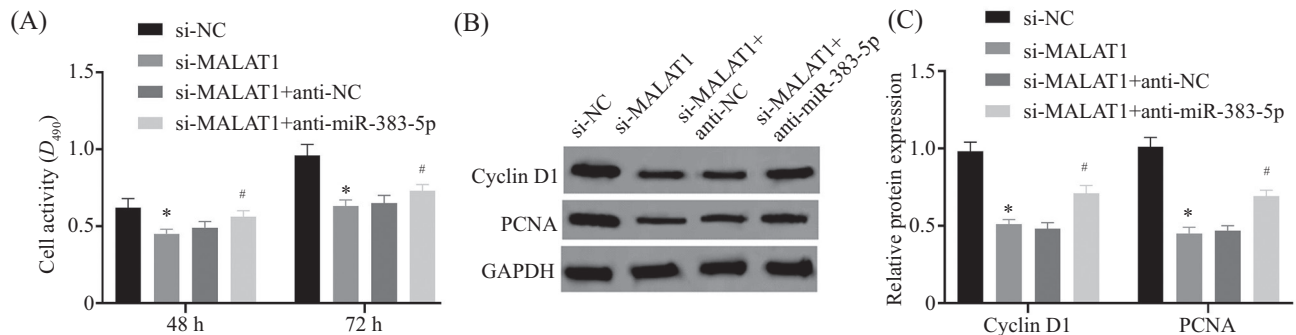


A: Transwell法检测SHEP2细胞迁移、侵袭的代表图; B: 迁移细胞数的分析结果; C: 侵袭细胞数的分析结果; D: MMP-2、MMP-9蛋白表达条带图; E: MMP-2、MMP-9蛋白表达的分析结果。* $P<0.05$, 与miR-NC组相比; # $P<0.05$, 与anti-NC组相比。

A: Transwell method was used to detect the migration and invasion of SHEP2 cells; B: analysis results of the number of migrating cells; C: analysis results of the number of invasive cells; D: MMP-2, MMP-9 protein expression band map; E: analysis results of MMP-2 and MMP-9 protein expression. * $P<0.05$ compared with miR-NC group; # $P<0.05$ compared with anti-NC group.

图6 miR-383-5p对SHEP2细胞迁移和侵袭的影响

Fig.6 Effects of miR-383-5p on migration and invasion of SHEP2 cells



A: 细胞活性; B: Cyclin D1、PCNA蛋白表达条带图; C: Cyclin D1、PCNA蛋白表达的分析结果。* $P<0.05$, 与si-NC组相比; # $P<0.05$, 与si-MALAT1+anti-NC组相比。

A: cell activity; B: Cyclin D1, PCNA protein expression band map; C: analysis results of Cyclin D1 and PCNA protein expression. * $P<0.05$ compared with si-NC group; # $P<0.05$ compared with si-MALAT1+anti-NC group.

图7 抑制miR-383-5p表达可以逆转敲低MALAT1对SHEP2细胞增殖的影响

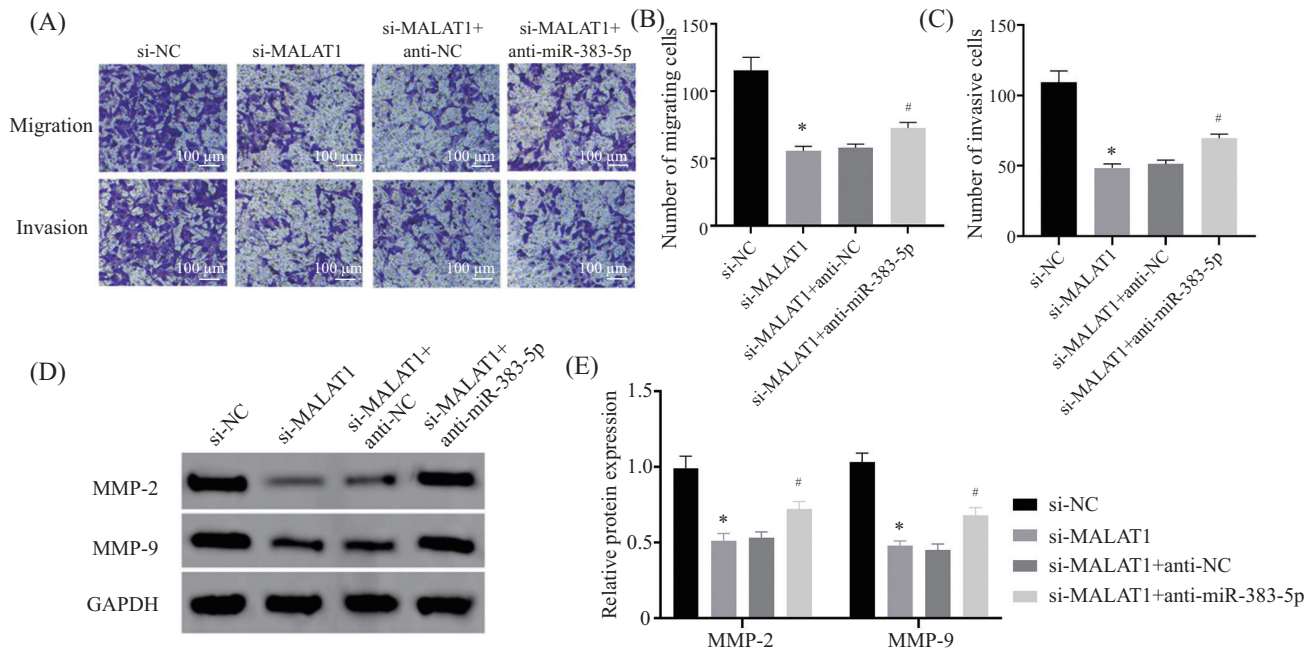
Fig.7 Inhibition of miR-383-5p expression can reverse the effect of MALAT1 knockdown on SHEP2 cell proliferation

与si-MALAT1+anti-NC组相比, si-MALAT1+anti-miR-383-5p组细胞活性和Cyclin D1、PCNA表达水平显著升高($P<0.05$)。

2.7 抑制miR-383-5p表达可以逆转敲低MALAT1对SHEP2细胞迁移和侵袭的影响

图8中的分析结果显示, 与si-NC组相比, si-

MALAT1组细胞的迁移细胞数目、侵袭细胞数目、MPP-2和MPP-9蛋白表达水平显著降低($P<0.05$); 与si-MALAT1+anti-NC组相比, si-MALAT1+anti-miR-383-5p组细胞迁移细胞数目、侵袭细胞数目以及MPP-2和MPP-9蛋白水平显著升高($P<0.05$)。



A: Transwell法检测SHEP2细胞迁移、侵袭的代表图; B: 迁移细胞数的分析结果; C: 侵袭细胞数的分析结果; D: MMP-2、MMP-9蛋白表达条带图; E: MMP-2、MMP-9蛋白表达的分析结果。* $P < 0.05$, 与si-NC组相比; # $P < 0.05$, 与si-MALAT1+anti-NC组相比。

A: Transwell method was used to detect the migration and invasion of SHEP2 cells; B: analysis results of the number of migrating cells; C: analysis results of the number of invasive cells; D: MMP-2, MMP-9 protein expression band map; E: analysis results of MMP-2 and MMP-9 protein expression. * $P < 0.05$ compared with si-NC group; # $P < 0.05$ compared with si-MALAT1+anti-NC group.

图8 抑制miR-383-5p表达可以逆转敲低MALAT1对SHEP2细胞迁移和侵袭的影响

Fig.8 Inhibition of miR-383-5p expression can reverse the effect of MALAT1 knockdown on the migration and invasion of SHEP2 cells

3 讨论

NB常见于0~3岁幼儿,近年来其发病趋势逐年上升,严重威胁着儿童的生命安全和健康安全,其中晚期肿瘤转移、侵袭和复发是NB死亡率较高的主要原因^[16-17]。LncRNA参与NB细胞的增殖、迁移和侵袭等生物学过程^[6]。如SAHU等^[18]通过Kaplan-Meier分析发现,*SNHG1*在高危型NB中表达上调,其高表达与不良预后有关。*SNHG16*在NB中的异常高表达与肿瘤分期、高危等因素有关;沉默*SNHG16*可抑制NB细胞增殖、迁移,使细胞周期阻滞^[19]。董孟宁等^[20]研究发现,敲低MALAT1可抑制SHEP2细胞的增殖、侵袭和迁移,并促进其凋亡,提示MALAT1可以作为NB的生物标志物和作用靶点。在本研究中,MALAT1在NB组织和细胞中表达上调,敲低MALAT1抑制了NB细胞的增殖、迁移和侵袭,这与董孟宁等人的研究结果一致。这进一步证明了MALAT1在NB中充当促癌基因。

miR-383-5p可以参与多种癌症的增殖、迁移和侵袭,如miR-383-5p在乳腺癌组织和细胞中低表

达,其异常表达与淋巴结转移、TNM分期和分化有关,过表达miR-383-5p抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[21]。ZHAO等^[22]研究发现,miR-383-5p在肺腺癌组织中下调,上调其表达可抑制肺腺癌细胞增殖。MALAT1可作为miR-383-5p的内源性竞争RNA,参与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[15]。本研究结果显示,miR-383-5p在NB组织和细胞中表达下调;过表达miR-383-5p可抑制NB细胞的增殖、迁移和侵袭,而抑制miR-383-5p表达则表现出相反作用,表明miR-383-5p在NB中发挥抑癌作用。双荧光素酶报告实验显示miR-383-5p是MALAT1的靶基因;qRT-PCR结果显示,敲低MALAT1可上调miR-383-5p表达,而过表达MALAT1则表现出相反作用,说明MALAT1靶向负调控miR-383-5p的表达。为了进一步验证MALAT1的作用机制,本研究在敲低MALAT1的基础上,采用miR-383-5p inhibitor转染以下调miR-383-5p表达,结果发现抑制miR-383-5p表达可以明显减弱敲低MALAT1对NB细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。这提示敲低MALAT1对

NB细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用可能与上调miR-383-5p表达有关。

综上所述,敲低MALAT1可能通过靶向上调miR-383-5p表达,抑制NB细胞增殖、迁移和侵袭。本研究首次明确了MALAT1/miR-383-5p调控网络可能是MALAT1参与NB发病机制的一种作用模式,MALAT1是一种很有希望治疗NB的生物标志物。在未来的研究中将对miR-383-5p的下游靶基因进行分析,以完善MALAT1/miR-383-5p调控网络。

参考文献 (References)

- [1] IRWIN M S, PARK J R. Neuroblastoma: paradigm for precision medicine [J]. *Pediatr Clin North Am*, 2015, 62(1): 225-56.
- [2] BURKE P W, HOELZER D, PARK J H, et al. Managing toxicities with asparaginase-based therapies in adult ALL: summary of an ESMO Open-Cancer Horizons roundtable discussion [J]. *ESMO Open*, 2020, 5: e000858.
- [3] NAKAGAWARA A, LI Y, IZUMI H, et al. Neuroblastoma [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2018, 48(3): 214-41.
- [4] FURMAN W L, MCCARVILLE B, SHULKIN B L, et al. Improved outcome in children with newly diagnosed high-risk neuroblastoma treated with chemimmunotherapy: updated results of a phase II study using hu14.18K322A [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(4): 335-44.
- [5] PANDEY G K, KANDURI C. Long noncoding RNAs and neuroblastoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(21): 18265-75.
- [6] LI D, WANG X J, MEI H, et al. Long noncoding RNA pancEts-1 promotes neuroblastoma progression through hnRNP-mediated β -catenin stabilization [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(5): 1169-83.
- [7] BI S J, WANG C Y, LI Y X, et al. LncRNA-MALAT1-mediated Axl promotes cell invasion and migration in human neuroblastoma [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5): 1010428317699796.
- [8] SUN Q, LI Q, XIE F F. LncRNA-MALAT1 regulates proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells by targeting miR-503-5p [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 6297-307.
- [9] YUAN S, GUO N H, ZHENG J F. LncRNA-MALAT1 regulates proliferation and apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells via miR-205-PTK7 pathway [J]. *Pathol Int*, 2020, 70(10): 724-32.
- [10] 李滋泽, 岳振, 胡楠. miR-127对皮肤鳞状细胞癌细胞生物学行为调控作用研究[J]. 蚌埠医学院学报 (LI Z Z, YUE Z, HU N. Study on the regulatory effect of miR-127 on biological behavior of skin squamous cell carcinoma cells [J]. *Journal of Bengbu Medical College*), 2022, 47(8): 999-1002.
- [11] 朱丽娟, 王爱华, 段晓艳. 长链非编码RNA AWPPH调控微RNA-383-5p对子宫内膜癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响及作用机制研究[J]. 中华生物医学工程杂志 (ZHU L J, WANG A H, DUAN X Y. Study on the effect and mechanism of microRNA-383-5p regulated by long chain non-coding RNA AWPPH on the proliferation, invasion and migration of endometrial cancer cells [J]. *Journal of Modern Clinical Medical Bioengineering*), 2019, 26(6): 667-72.
- [12] HUANG G, GUO X, YANG H. Long noncoding RNA SNHG1 promotes human prostate cancer progression by sponging miR-383-5p [J]. *Anticancer Drugs*, 2022, 32(3): 286-95.
- [13] ZHANG Z, LIN J, HU J, et al. Liquiritigenin blocks breast cancer progression by inhibiting connective tissue growth factor expression via up-regulating miR-383-5p [J]. *Int J Toxicol*, 2022, 41(1): 5-15.
- [14] WANG H, LIN S, YANG Y, et al. Significant role of long non-coding RNA MALAT1 in deep vein thrombosis via the regulation of vascular endothelial cell physiology through the microRNA-383-5p/BCL2L1 axis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 13728-38.
- [15] YANG Z, XIA L. Resveratrol inhibits the proliferation, invasion, and migration, and induces the apoptosis of human gastric cancer cells through the MALAT1/miR-383-5p/DDIT4 signaling pathway [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2022, 13(3): 985-96.
- [16] ELZOMOR H, AHMED G, ELMENAWI S, et al. Survival outcome of intermediate risk neuroblastoma at children cancer hospital Egypt [J]. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2018, 30(1): 21-6.
- [17] BHOOPATHI P, PRADHAN A K, BACOLOD M D, et al. Regulation of neuroblastoma migration, invasion, and *in vivo* metastasis by genetic and pharmacological manipulation of MDA-9/Syntenin [J]. *Oncogene*, 2019, 38(41): 6781-93.
- [18] SAHU D, HSU C L, LIN C C, et al. Co-expression analysis identifies long noncoding RNA SNHG1 as a novel predictor for event-free survival in neuroblastoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(36): 58022-37.
- [19] YU Y B, CHEN C, YANG Y R, et al. LncRNA SNHG16 is associated with proliferation and poor prognosis of pediatric neuroblastoma [J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(1): 93-102.
- [20] 董孟宁, 张建党, 张元峰, 等. 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[J]. 中国临床神经外科杂志 (DONG M N, ZHANG J D, ZHANG Y F, et al. Effects of long-chain non-coding RNA MALAT1 on biological characteristics of neuroblastoma cells [J]. *Chinese Journal of Clinical Neurosurgery*), 2019, 24(2): 93-7.
- [21] ZHANG J W, KONG X, SHI Q S, et al. MicroRNA-383-5p acts as a potential prognostic biomarker and an inhibitor of tumor cell proliferation, migration, and invasion in breast cancer [J]. *Cancer Biomark*, 2020, 27(4): 423-32.
- [22] ZHAO S S, GAO X Y, ZANG S Z, et al. MicroRNA-383-5p acts as a prognostic marker and inhibitor of cell proliferation in lung adenocarcinoma by cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3573-9.