

# LncRNA MALAT1在视网膜母细胞瘤组织中的表达及靶向miR-145-5p/SOX9轴对Y79细胞生物行为的影响

严肖啸<sup>1</sup> 尹双慧<sup>2</sup> 李小静<sup>3</sup> 孙敏<sup>4\*</sup>

(<sup>1</sup>邯郸市中心医院眼科, 邯郸 056001; <sup>2</sup>邯郸邯钢医院内科, 邯郸 056001; <sup>3</sup>邢台医专附属第二医院骨科, 邢台 054002; <sup>4</sup>华北石油管理局总医院眼科, 沧州 062552)

**摘要** 该文旨在探讨长链非编码RNA(LncRNA)肺腺癌相关转录本1(MALAT1)在视网膜母细胞瘤(RB)组织中的表达情况, 及靶向微小RNA(miRNA)-145-5p/性别决定区Y框蛋白9(SOX9)轴对Y79细胞生物行为的影响。qRT-PCR检测RB组织和Y79细胞中MALAT1、miR-145-5p、SOX9 mRNA相对表达量; 荧光原位杂交(FISH)实验、双荧光素酶报告基因实验验证MALAT1、SOX9与miR-145-5p的靶向关系; 将Y79细胞分为sh-NC组、sh-MALAT1组、sh-MALAT1+miR-NC组、sh-MALAT1+miR-145-5p inhibitor组、mimics-NC组、miR-145-5p mimics组、miR-145-5p mimics+pcDNA组、miR-145-5p mimics+SOX9组, MTT法和细胞克隆实验检测细胞增殖; 流式细胞术检测细胞凋亡; Transwell小室检测细胞迁移和侵袭; Western blot检测SOX9、Ki67、MMP9、Bcl-2、Cleaved Caspase-3蛋白表达情况。体内肿瘤形成实验验证MALAT1对RB肿瘤的影响。结果显示, MALAT1在RB组织和Y79细胞中高表达( $P<0.05$ ); FISH实验、双荧光素酶报告基因实验证实MALAT1、SOX9与miR-145-5p存在靶向关系; 沉默MALAT1或过表达miR-145-5p可抑制Y79细胞增殖、迁移和侵袭, 促进凋亡( $P<0.05$ ); 抑制miR-145-5p或过表达SOX9可逆转沉默MALAT1或过表达miR-145-5p对Y79细胞生物学行为的影响( $P<0.05$ ); 体内实验显示, 抑制MALAT1表达可显著抑制小鼠移植瘤的生长( $P<0.05$ )。MALAT1在RB组织和Y79细胞中高表达, MALAT1可通过调节miR-145-5p/SOX9信号轴, 参与Y79细胞生物学行为。

**关键词** 视网膜母细胞瘤; 生物学行为; LncRNA MALAT1; miR-145-5p; 性别决定区Y框蛋白9

## Expression of LncRNA MALAT1 in Retinoblastoma Tissue and Its Effect on Biological Behavior of Y79 Cells by Targeting miR-145-5p/SOX9 Axis

YAN Xiaoxiao<sup>1</sup>, YIN Shuanghui<sup>2</sup>, LI Xiaojing<sup>3</sup>, SUN Min<sup>4\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Handan Central Hospital, Handan 056001, China; <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Handan Hangang Hospital, Handan 056001, China; <sup>3</sup>Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Xingtai 054002, China; <sup>4</sup>Ophthalmology Department, General Hospital of North China Petroleum Administration Bureau, Cangzhou 062552, China)

**Abstract** The aim of this study was to investigate the expression of LncRNA (long non-coding RNA) MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) in RB (retinoblastoma) tissues, and its effect on the biological behavior of Y79 cells by targeting microRNA-145-5p/SOX9 (sex determining region Y box protein 9) axis. qRT-PCR was applied to detect the relative expression levels of MALAT1, miR-145-

收稿日期: 2023-07-12 接受日期: 2023-10-08

河北省2023年度医学科学研究课题计划项目(批准号: 20231955)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 15231775667, E-mail: vctefd@163.com

Received: July 12, 2023

Accepted: October 8, 2023

This work was supported by Hebei Province 2023 Medical Science Research Project (Grant No.20231955)

\*Corresponding author. Tel: +86-15231775667, E-mail: vctefd@163.com

5p, and *SOX9* mRNA in RB tissue and Y79 cells. FISH (fluorescence *in situ* hybridization) experiment and double luciferase reporter gene experiment were applied to verify the targeting relationship between MALAT1, *SOX9* and miR-145-5p. Y79 cells were grouped into sh-NC group, sh-MALAT1 group, sh-MALAT1+miR-NC group, sh-MALAT1+miR-145-5p inhibitor group, mimics-NC group, miR-145-5p mimics group, miR-145-5p mimics+pcDNA group, and miR-145-5p mimics+*SOX9* group. MTT method and cell cloning experiment were applied to detect cell proliferation. Flow cytometry was applied to detect cell apoptosis. Transwell cells were applied to detect cell migration and invasion. Western blot was applied to detect the expression of *SOX9*, Ki67, MMP9, Bcl-2, and Cleaved Caspase-3 proteins. *In vivo* tumor formation experiment was applied to verify the effect of MALAT1 on RB tumors. The results showed that MALAT1 was highly expressed in RB tissue and Y79 cells ( $P<0.05$ ). FISH experiment and double luciferase reporter gene experiment confirmed that MALAT1, *SOX9* and miR-145-5p had a targeting relationship. Silencing MALAT1 or overexpressing miR-145-5p was able to inhibit the proliferation, migration, and invasion of Y79 cells, and promote apoptosis ( $P<0.05$ ). Inhibiting miR-145-5p or overexpressing *SOX9* was able to reverse the effects of silencing MALAT1 or overexpressing miR-145-5p on the biological behavior of Y79 cells ( $P<0.05$ ). *In vivo* experiments showed that inhibiting the expression of MALAT1 was able to obviously inhibit the growth of transplanted tumors in mice ( $P<0.05$ ). MALAT1 is highly expressed in RB tissue and Y79 cells, and MALAT1 can participate in the biological behavior of Y79 cells by regulating the miR-145-5p/*SOX9* signaling axis.

**Keywords** retinoblastoma; biological behavior; LncRNA MALAT1; miR-145-5p; sex determining region Y box protein 9

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是一种眼内恶性肿瘤,常发于儿童。随着治疗水平的提高,眼切除术、化疗、冷冻疗法和激光治疗等多种策略被联合应用,患者的临床结局转好。然而,由于肿瘤的侵袭和迁移,RB患者的预后仍然相当差<sup>[1]</sup>。因此,寻找有效的靶点和生物标志物对于RB患者仍然至关重要,特别是对于遭受癌症扩散的患者。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是重要的癌症相关生物分子,可以调节细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和分化等多种细胞过程<sup>[2]</sup>。已有研究发现,多种LncRNA与RB进展相关,LncRNA肺腺癌相关转录本1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1)是一种高度保守的非编码RNA,在多种癌症中高表达。已有研究表明,MALAT1在RB组织中高表达,且沉默MALAT1可抑制RB细胞增殖<sup>[3]</sup>。本研究通过靶基因预测发现,MALAT1与miR-145-5p存在结合位点。miR-145-5p作为miRNA之一,在多种肿瘤中表达失调。已有研究发现,miR-145-5p有肿瘤抑制作用,miR-145-5p在RB患者中表达下调,参与RB发生发展<sup>[4]</sup>。且有生物信息学发现,性别决定区Y框蛋白9(sex determining region Y box protein 9, *SOX9*)是miR-145-5p的靶基因。*SOX9*是一种重要的转录因子,

可以通过影响不同基因的转录来调节癌症进展<sup>[5]</sup>。已有研究发现,*SOX9*在RB组织中显著上调,与肿瘤侵袭、转移和复发相关<sup>[6]</sup>。推测MALAT1可能通过调节miR-145-5p/*SOX9*轴参与RB的发生发展。本研究探讨MALAT1在RB组织中的表达及靶向miR-145-5p/*SOX9*轴对Y79细胞生物学行为的影响,初步探讨MALAT1在RB中可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本收集、细胞来源和实验动物

收集2022年1月至2023年3月在邯郸市中心医院行肿瘤切除术的20例患者RB组织与瘤旁正常组织(距离肿瘤边缘1~2 cm的组织)。手术前患者没有接受过放化疗,经病理专家证实,符合世界卫生组织的RB诊断,随访资料完整。本研究经邯郸市中心医院伦理委员会的批准(审批号:202111260512),所有受试者均知情同意。

人RB细胞Y79(货号:bio-69252)和正常视网膜色素上皮细胞hTERTRPE-1(货号:bio-089925)购自美国ATCC。

6周龄SPF级雄性BALB/c裸鼠16只,体质量15~18 g,购自山东博安生物技术股份有限公司,生

产许可证号为SCXK(鲁) 20200006。

## 1.2 主要试剂与仪器

MALAT1短发夹RNA(sh-MALAT1)及对照(sh-NC)(货号: siB170613115806-1-5)、miR-145-5p抑制剂(miR-145-5p inhibitor)及对照(miR-NC)(货号: miR20000437-1-5)、miR-145-5p模拟物(miR-145-5p mimics)及对照(mimics-NC)(货号: miR10000437-1-5)、SOX9过表达质粒(SOX9)及对照(pcDNA)(货号: stB0007963A-1-5)、荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)试剂盒(货号: C10910)、实时荧光定量-PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)试剂盒(货号: C10712-1)购自广州锐博生物科技有限公司; DMEM培养基(货号: MED-1004)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(货号: MED-2001)、MTT试剂盒(货号: RC-017)购自武汉赛奥斯生物科技有限公司; Lipofectamine 2000试剂盒(货号: 12566014)购自美国 Thermo Fisher Scientific公司; 细胞核/细胞质分离试剂盒(货号: HR0241-MPU)购自北京百奥莱博科技有限公司; Annexin VFITC/PI试剂盒(货号: E-CK-A211)购自武汉伊莱瑞特生物公司; pmir GLO荧光素酶载体(货号: zt212)购自美国 Promega公司; 兔源一抗SOX9(货号: ab182579)、Ki67(货号: ab21700)、MMP9(货号: ab76003)、Bcl-2(货号: ab182858)、Cleaved Caspase-3(货号: ab214430)、GAPDH(货号: ab8245)购自美国 Abcam公司, 货号分别为; HRP标记的羊抗兔二抗(货号: Y6109L)购自上海百赛生物技术股份有限公司。

CytoFLEX流式细胞仪购自美国 Beckman公司, LIOO JDS300显微镜购自德国 Leica公司, Multiskan GO多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific公司, ABI7500 qRT-PCR仪购自美国ABI公司。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养、分组与转染** 将Y79细胞在含有10% FBS的DMEM培养基中, 置于含有5% CO<sub>2</sub>的培养箱中37 °C培养, 2~3天更换一次培养基。当细胞汇合达到约80%时, 使用Lipofectamine 2000试剂盒转染质粒, 将细胞分为sh-NC组、sh-MALAT1组、sh-MALAT1+miR-NC组、sh-MALAT1+miR-145-5p inhibitor组、mimics-NC组、miR-145-5p mimics组、miR-145-5p mimics+pcDNA组、miR-145-5p mimics+SOX9组, 继续培养48 h后用于后续实验。

**1.3.2 qRT-PCR** 使用TRIzol试剂从RB组织和Y79

细胞中提取总RNA, 紫外分光光度计测定RNA浓度和纯度, 将RNA逆转录为cDNA, 使用ABI7500 qRT-PCR仪进行实时荧光定量PCR。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算MALAT1、miR-145-5p和SOX9 mRNA相对表达量, 以U6、GAPDH为内参。引物序列如下, LncRNA MALAT1, F为5'-AAT GTT AAG AGA AGC CCA GGG-3', R为5'-AAG GTC AAG AGA AGT CAG C-3'; miR-145-5p, F为5'-ACA CTC CAG CTG GGG TCC AGT TTT CCC AGG A-3', R为5'-TGG TGT CGT GGA GTC G-3'; SOX9, F为5'-CGA AAT CAA CGA GAA ACT GGA C-3', R为5'-ATT TAG CAC ACT GAT CAC ACG-3'; U6, F为5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', R为5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; GAPDH, F为5'-CGG ATT TGG TCG TAT TGG GC-3', R为5'-CCC GTT CTC AGC CAT GTA GTT-3'。

**1.3.3 MALAT1在Y79细胞定位检测** 收集Y79细胞约 $1 \times 10^6$ 个, PBS洗涤, 在4 °C、500 ×g条件下离心2 min后取沉淀, 使用细胞核/胞浆分离试剂盒分离细胞质与细胞核, qRT-PCR法检测MALAT1表达情况。

**1.3.4 荧光原位杂交(FISH)实验** MALAT1的特异性探针序列为: 5'-GAT TCT GTG TTA TGC CTF FTT AGG TAT GAG-3'。将Y79细胞用冷PBS洗涤后, 用4%多聚甲醛4 °C固定20 min, PBS洗涤3次, 0.5% Triton X-100透化5 min、室温封闭后, 在37 °C预杂交30 min, 然后与MALAT1 Mix在37 °C孵育杂交过夜, 洗涤后, DAPI细胞核进行复染, 使用共聚焦激光扫描显微镜在345 nm、455 nm处采集图像。

**1.3.5 双荧光素酶报告实验** 将含有miR-145-5p突变序列的MALAT1、SOX9序列克隆到pmir GLO荧光素酶载体中, 构建荧光素酶报告基因WT-MALAT1、MUT-MALAT1、WT-SOX9、MUT-SOX9, Y79细胞共转染荧光素酶报告基因和miR-145-5p mimics或mimics-NC, 48 h后收集细胞, 评估荧光素酶活性。

**1.3.6 MTT和细胞克隆实验检测细胞增殖** MTT法: 将对数生长期的Y79细胞以 $5 \times 10^3$ 个/孔的细胞密度接种在96孔板中, 培养48 h, 每孔加入20 μL MTT溶液, 4 h后离心(4 °C、500 ×g、2 min)弃上清, 加入150 μL二甲基亚砜。使用酶标仪在450 nm处测定吸光度。

**细胞克隆实验:** 将对数生长期的Y79细胞培养14天, 室温下将细胞用4%多聚甲醛固定30 min后结



晶紫染色 20 min, 显微镜下对细胞集落形成计数(细胞数目>50)和拍照。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况 将各组 Y79 细胞离心(4 °C、1 000×g) 5 min, PBS重悬至密度为  $3 \times 10^5$  个/mL, 将总共 500  $\mu$ L 细胞悬液与 15  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L PI 在室温下孵育 10 min, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3.8 Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移 取 200  $\mu$ L( $2 \times 10^5$  个细胞) Y79 细胞悬液于 Matrigel 胶包被的 Transwell 上室, 下室加入 600  $\mu$ L 含 10% FBS 的培养基。培养 24 h 后, 擦去上室 Matrigel 胶和细胞, 多聚甲醛固定穿过基质胶的细胞, 结晶紫室温染色 5 min, 显微镜下拍照, 计数侵袭细胞数。细胞迁移实验上室无 Matrigel 基质胶包被, 其与步骤与侵袭实验相同。

1.3.9 Western blot 检测蛋白表达 将 RB 组织和对数生长期的 Y79 细胞使用 RIPA 提取蛋白质, BCA 试剂盒进行蛋白质定量, SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转移到 PVDF 膜上, 室温封闭 2 h, 洗膜。将一抗 SOX9、Ki67、MMP9、Bcl-2、Cleaved Caspase-3、GAPDH(1:1 000) 添加到 PVDF 膜上, 4 °C 下孵育过夜, 后添加二抗(1:2 000), 置于室温下 2 h, ECL 溶液显影。

1.3.10 裸鼠肿瘤实验 裸鼠在 12 h 的光照/黑暗循环条件下适应性饲养一周, 不禁水食。研究经邯郸市中心医院动物伦理委员会审核批准(审批号: 202210250318)。将转染有 sh-NC 载体或转染 sh-MALAT1 的 Y79 细胞( $1 \times 10^6$  个)皮下注射到 BALB/c

裸鼠的右腋窝, 将小鼠分为 sh-NC 组和 sh-MALAT1 组, 每组 8 只。5 周后, 安乐死小鼠, 取皮下异种移植肿瘤, 测量肿瘤质量和体积, qRT-PCR 检测移植瘤组织中 MALAT1、miR-145-5p 表达。免疫组化检测 SOX9、Ki67 蛋白表达: 将裸鼠肿瘤固定、包埋、切片(5  $\mu$ m), 脱蜡和复水后, 将切片与一抗 SOX9(1:200)、Ki67(1:200) 在 4 °C 孵育过夜, 并与二抗(1:1 000) 孵育 30 min, DAB 染色后苏木精复染, 随机选择 5 个视野, 通过 Image Pro Plus 6.0 软件对阳性细胞进行定量。

#### 1.4 统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 22.0 软件用于统计分析, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

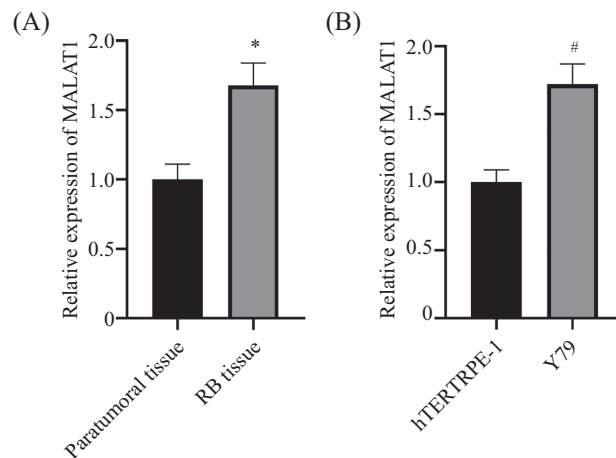
## 2 结果

### 2.1 MALAT1 在组织和细胞中的表达

与瘤旁组织比较, RB 组织 MALAT1 表达量升高( $P < 0.05$ ); 与 hTERT/PE-1 细胞比较, Y79 细胞中 MALAT1 表达量升高( $P < 0.05$ )(图 1)。

### 2.2 MALAT1 靶向调控 miR-145-5p 表达

核/细胞质分离实验与 FISH 实验表明, MALAT1 主要分布在细胞质中(图 2A 和图 2B), 表明 MALAT1 在 RB 细胞中作为竞争性内源性 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)。starBase 在线分析显示, MALAT1 与 miR-145-5p 存在结合位点(图 2C)。双荧光素酶实验显示, WT-MALAT1 与 miR-145-5p mim-



A: MALAT1 在组织中的相对表达水平,  $*P < 0.05$ , 与瘤旁组织比较; B: MALAT1 在细胞中的相对表达水平,  $^{\#}P < 0.05$ , 与 hTERT/PE-1 细胞比较。

A: the relative expression of MALAT1 in tissues,  $*P < 0.05$  compared with adjacent tissues; B: the relative expression of MALAT1 in cells,  $^{\#}P < 0.05$  compared with hTERT/PE-1 cell.

图1 qRT-PCR检测MALAT1相对表达水平

Fig.1 Detection of relative expression level of MALAT1 by qRT-PCR

ics共转染Y79细胞相对荧光素酶活性相比于mimics-NC共转染Y79细胞显著降低( $P<0.05$ )(图2D)。

qRT-PCR结果显示,在Y79细胞中,抑制MALAT1表达可显著升高miR-145-5p的表达量( $P<0.05$ )(图2E)。

### 2.3 MALAT1靶向调控miR-145-5p对Y79细胞生物学行为的影响

相比于sh-NC组,sh-MALAT1组Y79细胞 $D_{450}$ 值、集落形成数、迁移、侵袭细胞数、Ki67、MMP9、Bcl-2表达量显著降低,凋亡率、Cleaved Caspase-3表达量显著升高( $P<0.05$ );相比于sh-MALAT1+miR-NC组,sh-MALAT1+miR-145-5p inhibitor组Y79细胞 $D_{450}$ 值、集落形成数、迁移、侵袭细胞数、Ki67、MMP9、Bcl-2表达量显著升高,凋亡率、Cleaved Caspase-3表达量显著降低( $P<0.05$ )(图3和图4)。

### 2.4 miR-145-5p与SOX9靶向关系验证

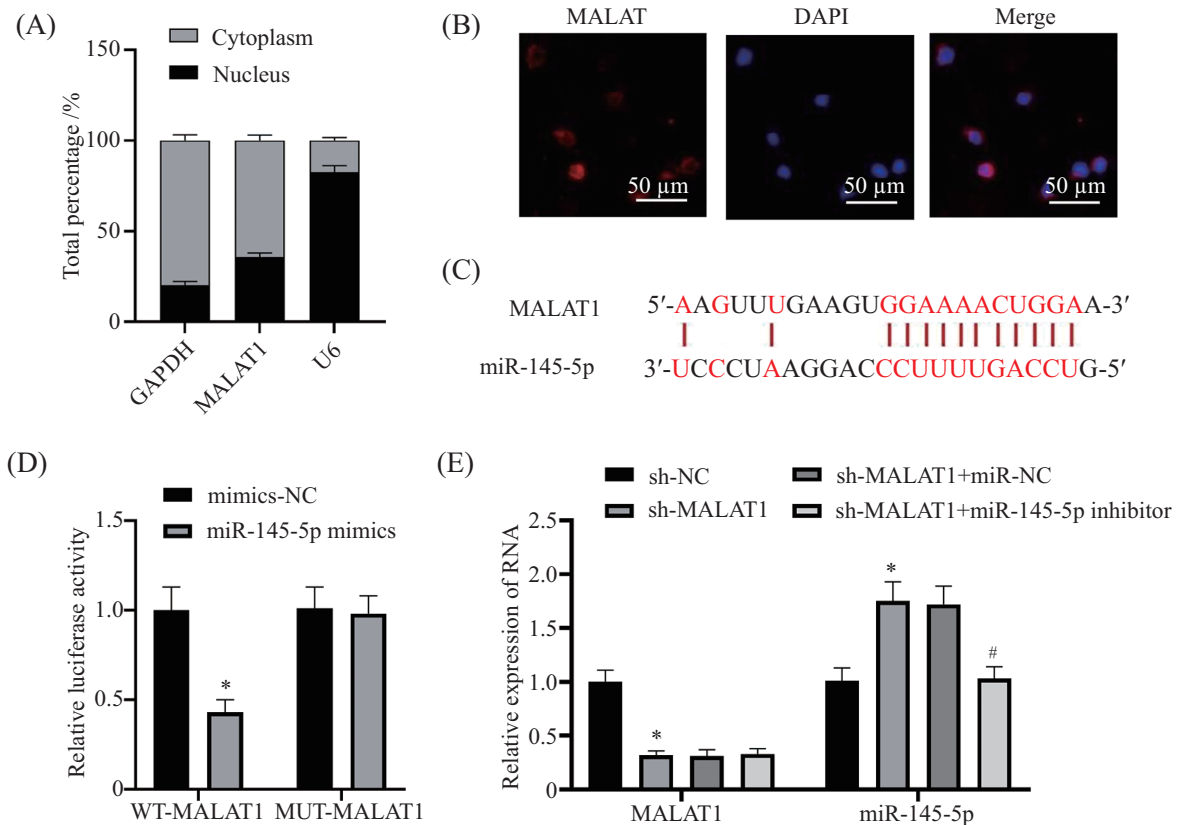
starBase在线分析显示,miR-145-5p与SOX9存

在靶向结合位点(图5A)。双荧光素酶实验显示,WT-SOX9与miR-145-5p mimics共转染Y79细胞相对荧光素酶活性相比于mimics-NC共转染Y79细胞显著降低( $P<0.05$ )(图5B)。

qRT-PCR结果显示,相比于mimics-NC组,miR-145-5p mimics组Y79细胞miR-145-5p表达量显著升高,SOX9表达量显著降低( $P<0.05$ )(图5C和图5E)。

### 2.5 miR-145-5p靶向调控SOX9对Y79细胞生物学行为的影响

相比于mimics-NC组,miR-145-5p mimics组Y79细胞 $D_{450}$ 值、集落形成数、迁移、侵袭细胞数、Ki67、MMP9、Bcl-2表达量显著降低,凋亡率、Cleaved Caspase-3表达量显著升高( $P<0.05$ );相比于miR-145-5p mimics+pcDNA组,miR-145-5p mimics+SOX9组Y79细胞 $D_{450}$ 值、集落形成数、迁移、侵袭细胞数、Ki67、MMP9、Bcl-2表达量显著升高,凋亡率、Cleaved Cas-

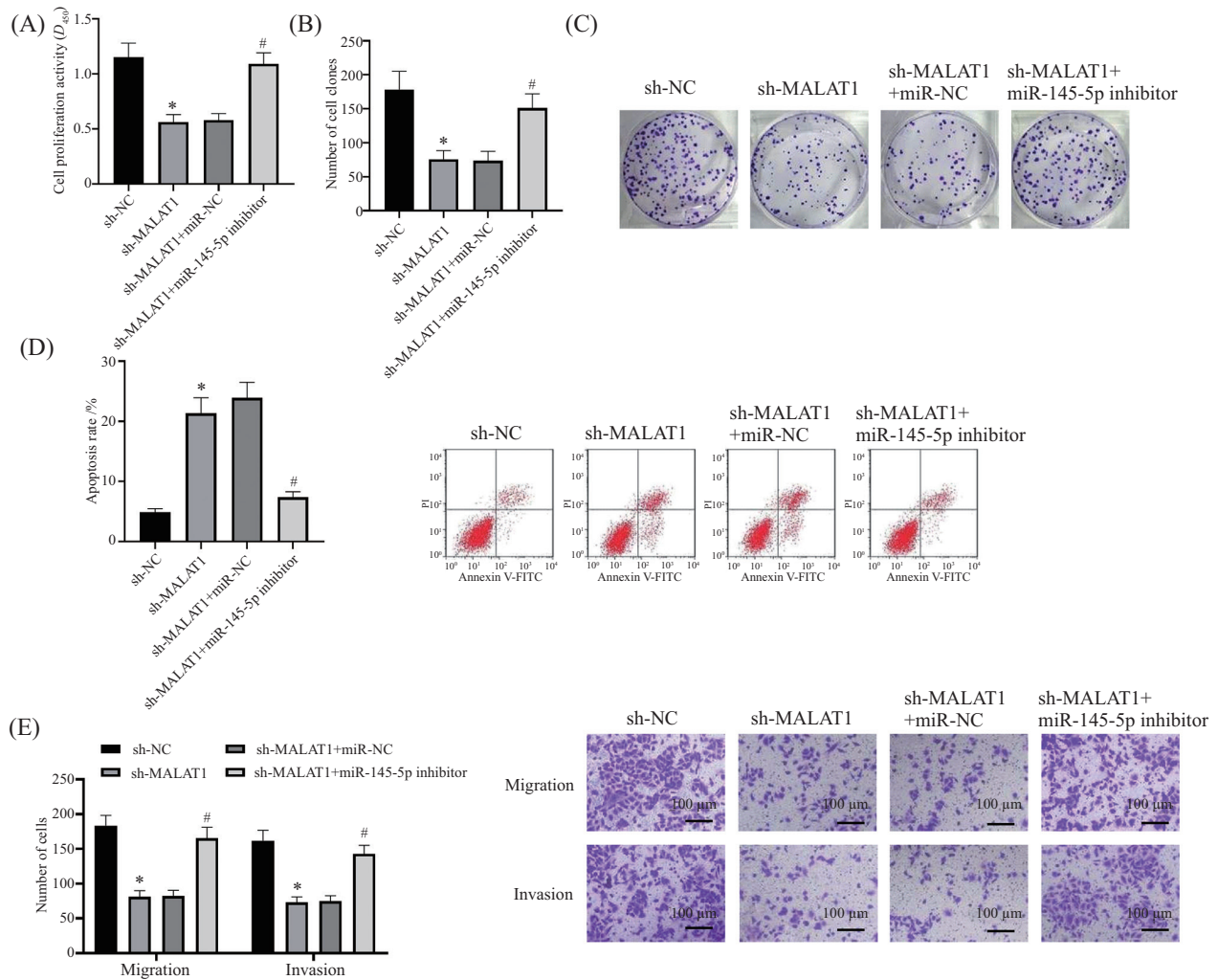


A: 亚细胞分离实验; B: FISH实验结果; C: MALAT1与miR-145-5p靶向关系预测; D: 双荧光素酶报告基因实验结果,  $*P<0.05$ , 与mimics-NC比较; E: MALAT1、miR-145-5p表达情况,  $*P<0.05$ , 与sh-NC组相比; # $P<0.05$ , 与sh-MALAT1+miR-NC组相比。

A: subcellular separation experiment; B: FISH results; C: prediction of the targeting relationship between MALAT1 and miR-145-5p; D: dual luciferase reporter gene experiment results,  $*P<0.05$  compared with mimics-NC; E: the expression of MALAT1, miR-145-5p,  $*P<0.05$  compared with sh-NC group; # $P<0.05$  compared with the sh-MALAT1+miR-NC group.

图2 MALAT1靶向调控miR-145-5p表达

Fig.2 MALAT1 targeted regulation of miR-145-5p expression

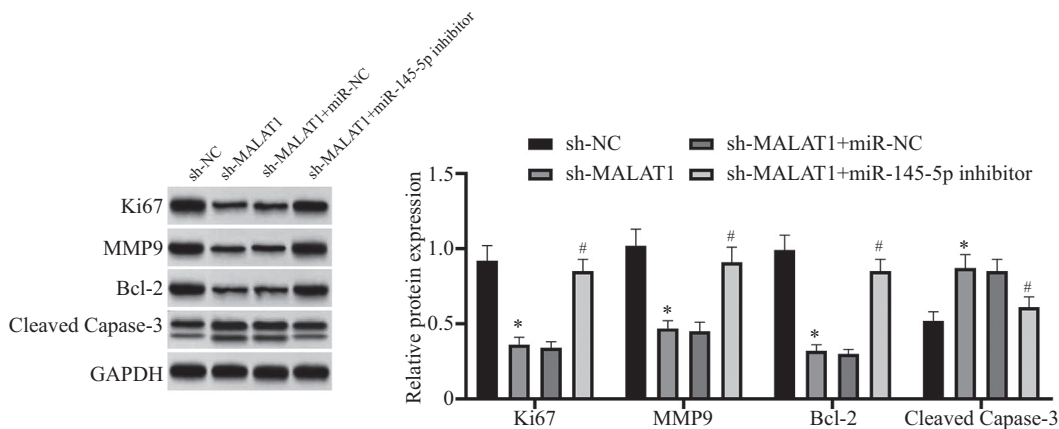


A: 细胞增殖活性检测; B、C: 细胞克隆数目检测; D: 细胞凋亡检测; E: 细胞迁移、侵袭检测。\* $P < 0.05$ , 与 sh-NC 组相比; # $P < 0.05$ , 与 sh-MALAT1+miR-NC 组相比。

A: cell proliferation activity detection; B,C: cell clone number detection; D: apoptosis detection; E: cell migration and invasion detection. \* $P < 0.05$  compared with sh-NC group; # $P < 0.05$  compared with the sh-MALAT1+miR-NC group.

图3 各组细胞增殖、集落形成、凋亡、迁移、侵袭情况

Fig.3 Cell proliferation, colony formation, apoptosis, migration and invasion in each group

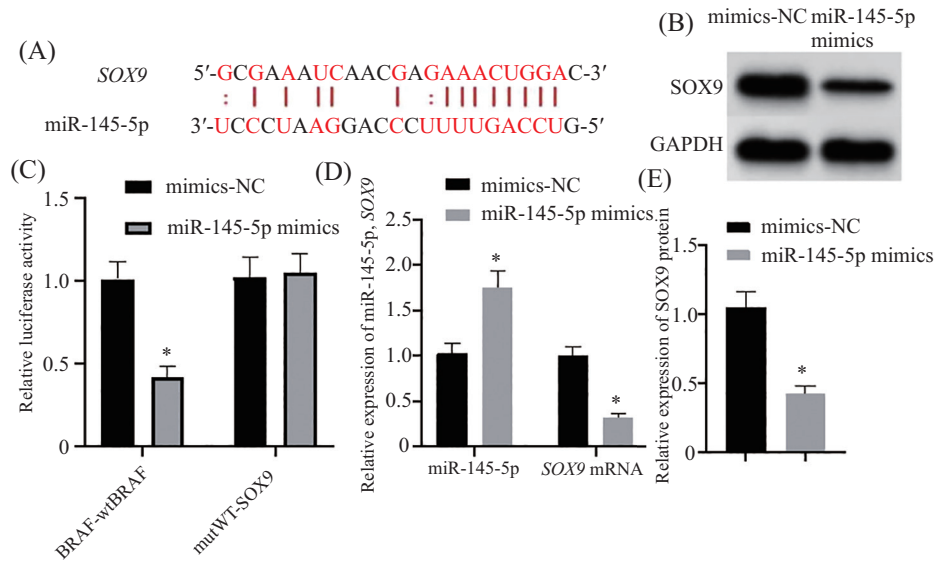


\* $P < 0.05$ , 与 sh-NC 组相比; # $P < 0.05$ , 与 sh-MALAT1+miR-NC 组相比。

\* $P < 0.05$  compared with sh-NC group; # $P < 0.05$  compared with the sh-MALAT1+miR-NC group.

图4 Ki67、MMP9、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 蛋白表达条带图和蛋白相对表达量

Fig.4 Ki67, MMP9, Bcl-2, Cleaved Caspase-3 protein expression band map and relative protein expression



A: miR-145-5p与SOX9结合位点; B: SOX9蛋白表达条带图; C: 双荧光素酶报告基因实验结果, \* $P < 0.05$ , 与mimics-NC比较; D: miR-145-5p、SOX9 mRNA表达水平, \* $P < 0.05$ , 与mimics-NC比较; E: SOX9蛋白相对表达量, \* $P < 0.05$ , 与mimics-NC比较。  
A: miR-145-5p and SOX9 binding sites; B: SOX9 protein expression band diagram; C: dual luciferase reporter gene experimental results, \* $P < 0.05$  compared with mimics-NC; D: miR-145-5p, SOX9 mRNA expression levels, \* $P < 0.05$  compared with mimics-NC; E: the relative protein expression of SOX9, \* $P < 0.05$  compared with mimics-NC.

图5 miR-145-5p与SOX9靶向关系验证

Fig.5 Verification of the targeting relationship between miR-145-5p and SOX9

pase-3表达量显著降低( $P < 0.05$ )(图6和图7)。

## 2.6 体内抑制MALAT1表达抑制RB肿瘤生长

sh-NC组小鼠移植瘤体积、质量、MALAT1表达量、SOX9阳性率、Ki-67阳性率表达显著高于sh-MALAT1组, miR-145-5p表达量显著低于sh-MALAT1组( $P < 0.05$ )(图8)。

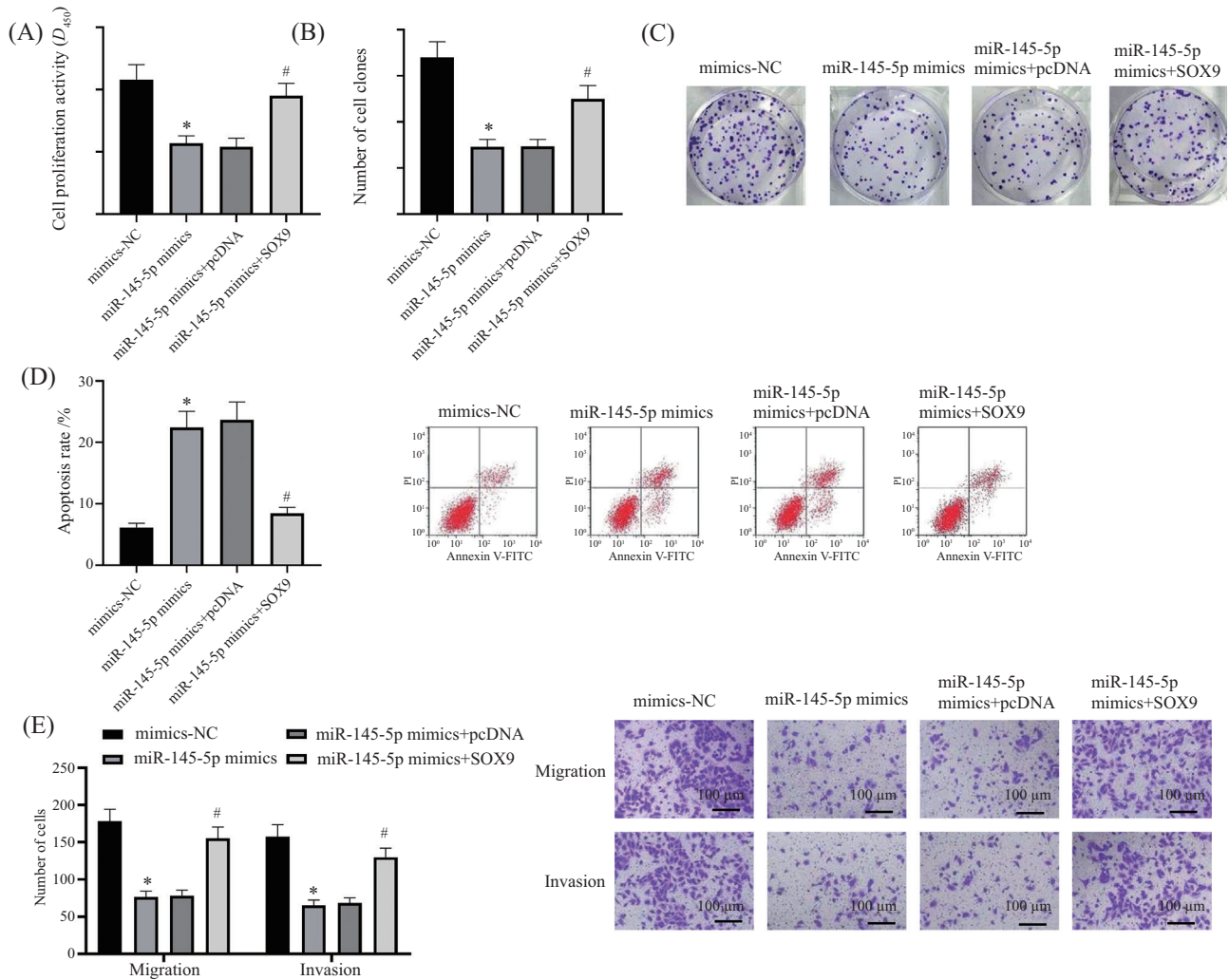
## 3 讨论

RB是全球儿童中最常见的眼内恶性肿瘤,由RB转录共抑制因子1(RB transcription cosuppressor 1, *RBI*)基因失活引发。如果未能及时有效的治疗, RB可能通过视神经扩散到大脑或血液,特别是骨髓中,进而导致患者死亡<sup>[7]</sup>。因此,研究RB发生发展的分子机制,寻找RB新的有效治疗靶点至关重要。其中小分子化合物在RB的治疗中被认为是有吸引力的靶点,既往研究显示, LncRNA在RB的发生发展中起重要作用,如lncRNA ZFP2-AS1<sup>[8]</sup>、LncRNA MEG3<sup>[9]</sup>均参与RB的进展。MALAT1是研究最广泛的lncRNA之一,其失调与多种肿瘤进展有关,如MALAT1在胰腺癌<sup>[10]</sup>、胃癌<sup>[11]</sup>、结直肠癌<sup>[12]</sup>中高表达,且参与癌症的发展。MALAT1也参与RB进展, LIN等<sup>[13]</sup>研究发现, MALAT1上调促进RB细胞增殖并抑

制了细胞凋亡; ZHAO等<sup>[14]</sup>研究发现,抑制MALAT1可抑制RB细胞增殖、转移和上皮-间充质转化,并抑制体内异种移植肿瘤生长。本研究结果表明, MALAT1在RB组织和细胞中高表达,抑制其表达可显著抑制RB细胞增殖、迁移、侵袭和体内肿瘤生长,促进细胞凋亡。这表明MALAT1促进RB进展,并可能作为RB的潜在候选诊断和预后生物标志物。

LncRNA的生物学功能在很大程度上依赖于其独特的亚细胞定位, LncRNA可以作为mRNA诱饵,调节mRNA的输出、稳定性、定位、翻译,影响信号转导途径,从而调节细胞代谢<sup>[15]</sup>。本研究发现, MALAT1主要分布在细胞质中,表明MALAT1在RB中作为竞争的ceRNA发挥作用,且基于生物信息学工具和荧光素酶报告基因测定综合分析, miR-145-5p确定为MALAT1的直接靶标。MALAT1已被证明在子宫内膜异位症中发挥对miR-145-5p的海绵作用<sup>[16]</sup>。miR-145-5p是位于人类染色体9q31的非编码小RNA分子的重要成员,且被认为是多种癌症,如前列腺癌<sup>[17]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[18]</sup>、乳腺癌<sup>[19]</sup>等的肿瘤抑制因子。已有研究表明miR-145-5p过表达抑制RB细胞增殖、侵袭、上皮-间充质转化,促进细胞凋亡<sup>[4]</sup>。本研究发现, miR-145-5p在RB组织和细胞中低表达,过表达miR-





A: 细胞增殖活性检测; B、C: 细胞克隆数目检测; D: 细胞凋亡检测; E: 细胞迁移、侵袭检测。\* $P < 0.05$ , 与mimics-NC组相比; # $P < 0.05$ , 与miR-145-5p mimics+pcDNA组相比。

A: cell proliferation activity detection; B,C: cell clone number detection; D: apoptosis detection; E: cell migration and invasion detection. \* $P < 0.05$  compared with mimics-NC group; # $P < 0.05$  compared with the miR-145-5p mimics+pcDNA group.

图6 各组细胞增殖、集落形成、凋亡、迁移、侵袭情况

Fig.6 Cell proliferation, colony formation, apoptosis, migration and invasion in each group

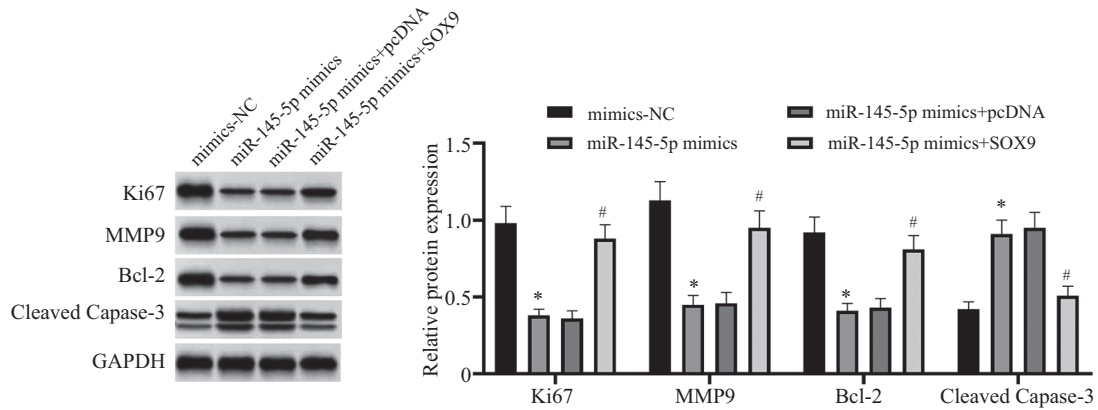
145-5p可抑制RB细胞增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡。且抑制miR-145-5p逆转沉默MALAT1对RB细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响, 表明MALAT1可通过负调节RB细胞中的miR-145-5p起作用。

SOX9在许多肿瘤类型中起重要作用, 在大多数肿瘤中充当癌基因, 上调其表达促进癌细胞的存活和转移, 且SOX9可以影响癌症恶性肿瘤的各种下游靶点, 抑制其表达和核易位可能有助于癌症治疗<sup>[20]</sup>。已有研究表明, SOX9在RB细胞中高表达, 进而促进RB细胞的侵袭和转移<sup>[6]</sup>。miRNA可以通过与SOX9 mRNA的3'-UTR结合来抑制基因的转录, 进而降低SOX9的表达水平。本研究发现, miR-145-5p与SOX9

存在靶向关系, 且过表达miR-145-5p可降低SOX9表达量, 而过表达SOX9可逆转过表达miR-145-5p对RB细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。裸鼠肿瘤模型证实, 抑制MALAT1可显著抑制移植瘤生长及SOX9表达。以上结果表明, MALAT1通过海绵化miR-145-5p上调SOX9, 促进RB细胞的恶性生物学行为。

综上所述, MALAT1在RB中上调并作为癌基因发挥作用, MALAT1促进RB细胞的增殖、迁移和侵袭, 并抑制细胞凋亡, 可能通过调节miR-145-5p/SOX9轴实现。本研究表明, MALAT1可能是治疗RB的新靶点。但本研究尚未阐明SOX9调控RB细胞生物学行为的具体通路, 还需进一步探究。



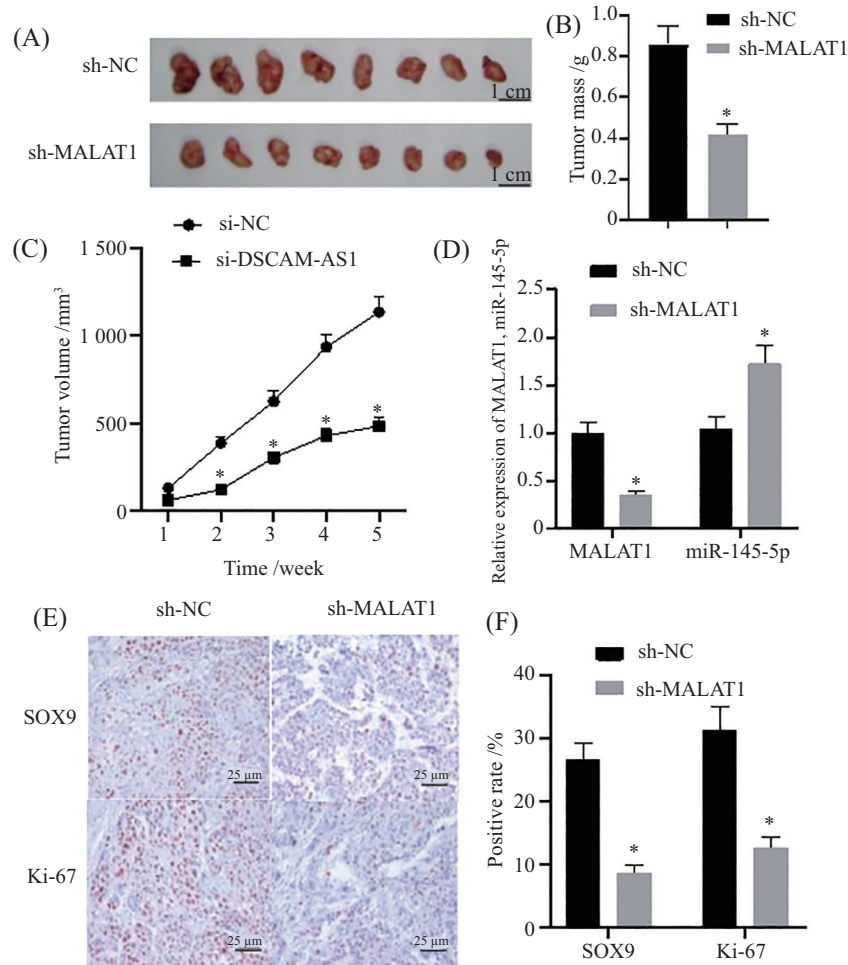


\* $P < 0.05$ , 与mimics-NC组相比; # $P < 0.05$ , 与miR-145-5p mimics+pcDNA组相比。

\* $P < 0.05$  compared with mimics-NC group; # $P < 0.05$  compared with the miR-145-5p mimics+pcDNA group.

图7 Ki67、MMP9、Bcl-2、Cleaved Caspase-3蛋白表达条带图和蛋白相对表达量

Fig.7 Ki67, MMP9, Bcl-2, Cleaved Caspase-3 protein expression band map and relative protein expression



A: 肿瘤生长情况; B: 肿瘤质量分析; C: 肿瘤体积分析; D: MALAT1、miR-145-5p表达; E、F: SOX9、Ki-67阳性细胞数。\* $P < 0.05$ , 与sh-NC组相比。

A: tumor growth; B: tumor quality analysis; C: tumor volume analysis; D: MALAT1, miR-145-5p expression; E,F: SOX9, Ki-67 positive cell number.

\* $P < 0.05$  compared with sh-NC group.

图8 各组裸鼠移植瘤生长, 肿瘤组织中MALAT1、miR-145-5p表达水平及SOX9、Ki-67阳性表达分析

Fig.8 The growth of transplanted tumor and the expression levels of MALAT1 and miR-145-5p and the positive expression of SOX9 and Ki-67 in tumor tissue of nude mice in each group

### 参考文献 (References)

- [1] ROY S R, KALIKI S. Retinoblastoma: a major review [J]. *Myensingh Med J*, 2021, 30(3): 881-95.
- [2] LU H, ZHANG Z, LU Y, et al. LncRNA NEAT1 acts as an miR-148b-3p sponge to regulate ROCK1 inhibition of retinoblastoma growth [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 5587-97.
- [3] WANG L, ZHANG Y, XIN X. Long non-coding RNA MALAT1 aggravates human retinoblastoma by sponging miR-20b-5p to upregulate STAT3 [J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(6): 152977.
- [4] ZHANG T, YANG J, GONG F, et al. Long non-coding RNA CASC9 promotes the progression of retinoblastoma via interacting with miR-145-5p [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(18): 2270-80.
- [5] PANDA M, TRIPATHI S K, BISWAL B K. SOX9: an emerging driving factor from cancer progression to drug resistance [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(2): 188517.
- [6] GAO Y, LUO X, ZHANG J. Sp1-mediated up-regulation of lnc00152 promotes invasion and metastasis of retinoblastoma cells via the miR-30d/SOX9/ZEB2 pathway [J]. *Cell Oncol*, 2021, 44(1): 61-76.
- [7] MANRIQUE M, AKINBOLUE D, MADIGAN W P, et al. Update on the treatment of retinoblastoma [J]. *Neoreviews*, 2021, 22(7): e423-37.
- [8] NI W, LI Z, AI K. LncRNA ZFPM2-AS1 promotes retinoblastoma progression by targeting microRNA miR-511-3p/paired box protein 6 (PAX6) axis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 1637-49.
- [9] GAO Y, CHEN X, ZHANG J. LncRNA MEG3 inhibits retinoblastoma invasion and metastasis by inducing  $\beta$ -catenin degradation [J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(7): 3111-27.
- [10] SONG Z, WANG X, CHEN F, et al. LncRNA MALAT1 regulates METTL3-mediated PD-L1 expression and immune infiltrates in pancreatic cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1004212.
- [11] ZHANG Z, LI M, ZHANG Z. LncRNA MALAT1 modulates oxaliplatin resistance of gastric cancer via sponging miR-22-3p [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 1343-54.
- [12] JIANG X, LI D, WANG G, et al. Thapsigargin promotes colorectal cancer cell migration through upregulation of lncRNA MALAT1 [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(4): 1245-55.
- [13] LIN X, HUANG X, WANG L, et al. The long noncoding RNA MALAT1/microRNA-598-3p axis regulates the proliferation and apoptosis of retinoblastoma cells through the PI3K/AKT pathway [J]. *Mol Vis*, 2022, 28: 269-79.
- [14] ZHAO Y, WANG Z, GAO M, et al. LncRNA MALAT1 regulated ATAD2 to facilitate retinoblastoma progression via miR-655-3p [J]. *Open Med*, 2021, 16(1): 931-43.
- [15] TENG F, ZHANG J X, CHEN Y, et al. LncRNA NKX2-1-AS1 promotes tumor progression and angiogenesis via upregulation of SERPINE1 expression and activation of the VEGFR-2 signaling pathway in gastric cancer [J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(4): 1234-55.
- [16] LIANG Z, WU Q, WANG H, et al. Silencing of lncRNA MALAT1 facilitates erastin-induced ferroptosis in endometriosis through miR-145-5p/MUC1 signaling [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 190.
- [17] JI S, SHI Y, YANG L, et al. miR-145-5p inhibits neuroendocrine differentiation and tumor growth by regulating the SOX11/MYCN axis in prostate cancer [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 790621.
- [18] YU C, LI B, WANG J, et al. miR-145-5p modulates gefitinib resistance by targeting NRAS and MEST in non-small cell lung cancer [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2021, 51(5): 625-37.
- [19] HU Y, WU D, HUANG R, et al. HMGB3 targeted by miR-145-5p impacts proliferation, migration, invasion, and apoptosis of breast cancer cells [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 1954099.
- [20] ASHRAFIZADEH M, ZARRABI A, OROUEI S, et al. Interplay between SOX9 transcription factor and microRNAs in cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 681-94.