

lncRNA CBR3-AS1调节miR-145-5p/*FSCN1*轴 对鼻咽癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

王华新¹ 娄丹² 杨磊² 张海忠³ 刘丽莎^{1*}

(¹石家庄市第六医院, 耳鼻喉科, 石家庄 050000; ²秦皇岛市第一医院, 耳鼻喉头颈外科, 秦皇岛 066000;

³河北医科大学第二医院, 耳鼻喉科, 石家庄 050000)

摘要 该文旨在探究长链非编码RNA CBR3-AS1(lncRNA CBR3-AS1)靶向微小RNA-145-5p(miR-145-5p)/肌动蛋白束蛋白1(*FSCN1*)轴对鼻咽癌(NPC)细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。qRT-PCR法检测鼻咽癌组织中lncRNA CBR3-AS1和miR-145-5p的表达水平。将鼻咽癌细胞CNE-1分为si-NC组、si-CBR3-AS1组、si-CBR3-AS1+anti-miR-NC组、si-CBR3-AS1+anti-miR-145-5p组、miR-NC组、miR-145-5p mimics组、miR-145-5p mimics+pcDNA组、miR-145-5p mimics+*FSCN1*组。双荧光素酶实验检测lncRNA CBR3-AS1和miR-145-5p及*FSCN1*和miR-145-5p的靶向关系; MTT法检测细胞增殖情况; Annexin V-FITC/PI法检测细胞凋亡情况; Transwell实验检测细胞侵袭能力; Western blot检测细胞周期负调控因子(P21)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)的蛋白表达变化。建立小鼠移植瘤模型, 探究lncRNA CBR3-AS1对鼻咽癌移植瘤生长及miR-145-5p/*FSCN1*轴的影响。在鼻咽癌组织中, lncRNA CBR3-AS1表达上调, miR-145-5p表达下调($P<0.05$)。干扰lncRNA CBR3-AS1或上调miR-145-5p表达可以抑制鼻咽癌细胞的增殖与侵袭, 促进鼻咽癌细胞凋亡($P<0.05$)。下调miR-145-5p表达或上调*FSCN1*表达可以逆转干扰lncRNA CBR3-AS1表达或上调miR-145-5p表达对鼻咽癌细胞的增殖与侵袭的抑制作用($P<0.05$)。小鼠移植瘤实验显示, 下调lncRNA CBR3-AS1表达可上调miR-145-5p表达, 从而下调*FSCN1*表达, 抑制鼻咽癌移植瘤的生长($P<0.05$)。lncRNA CBR3-AS1在鼻咽癌组织中上调表达, 下调lncRNA CBR3-AS1表达可通过调控miR-145-5p/*FSCN1*轴抑制鼻咽癌细胞的增殖与侵袭, 促进细胞凋亡。

关键词 长链非编码RNA CBR3-AS1; 微小RNA-145-5p; 肌动蛋白束蛋白1; 鼻咽癌; 增殖; 凋亡; 侵袭

Impacts of lncRNA CBR3-AS1 on Proliferation, Apoptosis, and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Regulating the miR-145-5p/*FSCN1* Axis

WANG Huaxin¹, LOU Dan², YANG Lei², ZHANG Haizhong³, LIU Lisha^{1*}

(¹Department of Otolaryngology, the Sixth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China;

²Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, the First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, China;

³Department of Otolaryngology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

收稿日期: 2023-11-01 接受日期: 2023-12-26

2022年度河北省医学科学研究课题计划(批准号: 20220198)资助的课题

*通信作者。Tel: 18703219835, E-mail: shashaaml@126.com

Received: November 1, 2023 Accepted: December 26, 2023

This work was supported by the 2022 Medical Science Research Project in Hebei Province (Grant No.20220198)

*Corresponding author. Tel: +86-18703219835, E-mail: shashaaml@126.com

Abstract This study aims to investigate the impacts of lncRNA CBR3-AS1 (long non-coding RNA CBR3-AS1) on the proliferation, apoptosis and invasion of NPC (nasopharyngeal carcinoma) cells by targeting the miR-145-5p (microRNA-145-5p)/*FSCN1* (fascin 1) axis. The qRT-PCR method was applied to analyze the expression levels of lncRNA CBR3-AS1 and miR-145-5p in nasopharyngeal carcinoma tissues. Nasopharyngeal cancer cell CNE-1 was divided into si-NC group, si-CBR3-AS1 group, si-CBR3-AS1+anti-miR-NC group, si-CBR3-AS1+anti-miR-145-5p group, miR-NC group, miR-145-5p mimics group, miR-145-5p mimics+pcDNA group, and miR-145-5p mimics+*FSCN1* group. Double luciferase experiment was applied to detect the targeting relationship between lncRNA CBR3-AS1 and miR-145-5p, and between *FSCN1* and miR-145-5p; MTT method was applied to detect cell proliferation; Annexin V-FITC/PI method was applied to detect cell apoptosis; Transwell experiment was applied to detect cell invasion ability; Western blot was applied to detect the protein expression changes of P21 (cell cycle negative regulator), Bcl-2 (B cell lymphoblastoma-2), Bax (Bcl-2 associated X protein), MMP-2 (matrix metalloproteinase 2), and MMP-9 (matrix metalloproteinase 9). Mouse transplantation tumor experiment was applied to explore the effect of lncRNA CBR3-AS1 on the growth of nasopharyngeal carcinoma transplantation tumors and miR-145-5p/*FSCN1*. In nasopharyngeal carcinoma tissue, the expression of lncRNA CBR3-AS1 was up-regulated, while the expression of miR-145-5p was down-regulated ($P<0.05$). Interference with lncRNA CBR3-AS1 or up-regulation of miR-145-5p expression was able to inhibit the proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells, and promote the apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells ($P<0.05$). Down-regulation of miR-145-5p expression or up-regulation of *FSCN1* expression was able to reverse the inhibitory effects of interfering with lncRNA CBR3-AS1 expression or up-regulation of miR-145-5p expression on the proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells ($P<0.05$). The mouse transplantation tumor experiment showed that down-regulating the expression of lncRNA CBR3-AS1 was able to up-regulate the expression of miR-145-5p, thereby down-regulating the expression of *FSCN1* and inhibiting the growth of nasopharyngeal carcinoma transplantation tumors ($P<0.05$). lncRNA CBR3-AS1 is up-regulated in nasopharyngeal carcinoma tissue, down-regulating the expression of lncRNA CBR3-AS1 can inhibit the proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells, and promote cell apoptosis by regulating the miR-145-5p/*FSCN1* axis.

Keywords long non-coding RNA CBR3-AS1; microRNA-145-5p; fascin 1; nasopharyngeal carcinoma; proliferation; apoptosis; invasion

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种发生于鼻咽上皮的恶性肿瘤,是最常见的头颈部鳞状细胞癌之一,普遍发生于东亚及东南亚地区,在中国具有较高的发病率^[1]。现阶段通过多模式的联合治疗,鼻咽癌患者的生存率得到提高,但是鼻咽癌常发生淋巴结转移或者远处转移,以致于鼻咽癌患者的死亡率还是很高^[2]。因此,了解鼻咽癌的发病机制,开发新的鼻咽癌的治疗策略迫在眉睫。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)具有促进或抑制肿瘤发生发展的功能,如研究发现下调lncRNA牛磺酸上调基因1(taurine upregulated gene 1, TUG1)可以抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移与侵袭,促进鼻咽癌细胞凋亡^[3]。干扰lncRNA CBR3-AS1(CBR3 antisense RNA 1)表达可以抑制胃癌细胞的增殖、迁移与侵袭,但其在鼻咽

癌中的作用还尚未有研究^[4]。miR-145-5p可以抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[5]。而抑制肌动蛋白束蛋白1(fascin 1, *FSCN1*)表达可以抑制鼻咽癌细胞的增殖与侵袭^[6]。生物学分析显示, lncRNA CBR3-AS1与miR-145-5p及*FSCN1*与miR-145-5p之间均有结合位点。推测lncRNA CBR3-AS1可能通过调节miR-145-5p/*FSCN1*轴对鼻咽癌细胞的增殖、凋亡和侵袭产生影响。本研究主要探索lncRNA CBR3-AS1对鼻咽癌细胞增殖、凋亡、侵袭以及miR-145-5p/*FSCN1*轴的影响,为鼻咽癌的治疗提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 一般资料

采集40对石家庄市第六医院鼻咽癌患者的癌

组织及癌旁组织,将其储存于液氮中。所有患者均无其他既往肿瘤病史,且术前均未接受任何治疗,组织采集和实验方案已获得每位患者知情同意并且得到石家庄市第六医院伦理委员会批准(批准号:院字2022-45号)。

1.2 试剂

人鼻咽癌细胞(CNE-1)购于中国科学院上海细胞库。si-NC、si-CBR3-AS1、anti-miR-NC、anti-miR-145-5p、miR-NC、miR-145-5p mimics、pcDNA、FSCN1序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成; lncRNA CBR3-AS1、miR-145-5p、FSCN1、GADPH引物由广州锐博生物科技有限公司设计合成。MTT试剂盒(M1020)购于北京索莱宝科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒(YT273)购于杭州联科生物技术股份有限公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒(AP101-100-kit)购于上海圣尔生物科技有限公司; P21(2947)、Bax(41162)、Bcl-2(3498)、GAPDH(5174)抗体购于美国CST公司; MMP-2(AF0234)、MMP-9(AF5234)购于上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与处理 将CNE-1细胞接种在含有10%胎牛血清及1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中,随后置于37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养48 h。然后将不同的质粒分别转染至培养的CNE-1细胞中,将其记为si-NC组、si-CBR3-AS1组、si-CBR3-AS1+anti-miR-NC组、si-CBR3-AS1+anti-miR-145-5p组、miR-NC组、miR-145-5p mimics组、miR-145-5p mimics+pcDNA组、miR-145-5p mimics+FSCN1组。

1.3.2 qRT-PCR检测lncRNA CBR3-AS1、miR-145-5p、FSCN1表达水平 用TRIzol试剂分别提取各组细胞的RNA, TaqMan逆转录试剂盒逆转录总RNA,合成cDNA,然后稀释cDNA,用qRT-PCR系统进行基因定量检测。以GAPDH或U6为内参,用2^{-ΔΔCt}法计算基因相对表达量。lncRNA CBR3-AS1上游引物(5'→3'): CAG TGG GGA ACT CTG ACT CG,下游引物(5'→3'): GTG CCT GGT GCT CTC TTA CC; miR-145-5p上游引物(5'→3'): ATC GTC CAG TTT TCC CAG G,下游引物(5'→3'): CGC CTC CAC ACA CTC ACC; FSCN1上游引物(5'→3'): GAC ACC AAA AAG TGT GCC TTC CG,下游引物(5'→3'): CAA ACT TGC

CAT TGG ACG CCC T; GAPDH上游引物(5'→3'): GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G,下游引物(5'→3'): ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A; U6上游引物(5'→3'): CTC GCT TCG GCA GCA CAT,下游引物(5'→3'): TTT GCG TGT CAT CCT TGC G。

1.3.3 双荧光素酶实验 StarBase(<https://rnasysu.com/encori/agoClipRNA.php?Source=mRNA>)及TargetScan(https://www.targetscan.org/vert_80/)数据库预测lncRNA CBR3-AS1与miR-145-5p及FSCN1与miR-145-5p之间是否存在靶向结合位点。将lncRNA CBR3-AS1的野生型(WT)和突变型(MUT)及FSCN1的野生型(WT)和突变型(MUT)序列插入psiCHECK载体,并使用Lipofectamine 2000将载体分别与miR-NC和miR-145-5p mimics共同转染至CNE-1细胞,培养48 h,检测细胞荧光素酶活性。

1.3.4 MTT法 将已转染的各组CNE-1细胞置于5% CO₂、37 °C的培养箱中培养48 h,4 °C、2 000 r/min离心10 min弃上清,加入MTT溶液,继续培养4 h,去掉MTT溶液,加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解产物,低速涡旋振荡后将振荡液置于全自动酶标仪中检测细胞吸光度(D)值。

1.3.5 Annexin V-FITC/PI法 将已转染的各组CNE-1细胞用胰蛋白酶室温消化细胞2 min,预冷洗涤,室温2 000 r/min离心5~10 min,弃上清,加入Annexin V-FITC/PI试剂室温避光孵育15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.6 Transwell实验 将已转染的各组CNE-1细胞用无血清培养基调整细胞浓度,将Matrigel凝胶平铺在Transwell上室,待其冷却后再将200 μL细胞悬液加入Transwell上室,同时将500 μL含10%胎牛血清的培养基加入Transwell下室,37 °C孵育24 h后取出小室,4%多聚甲醛室温固定30 min,0.5%结晶紫室温染色30 min,在光学显微镜下随机选取6个视野拍照计数。

1.3.7 Western blot分析 在已转染的各组CNE-1细胞中加入RIPA裂解液低温裂解获得总蛋白,随后进行电泳、转膜、封闭,加入GADPH、P21、Bax、Bcl-2、MMP-2、MMP-9(稀释比例均为1:1 000)抗体,4 °C孵育过夜,添加相应的二抗(1:2 000)室温孵育2 h。加入ECL暗室曝光显影,ImageJ软件分析条带灰度值。

1.3.8 裸鼠移植瘤实验 16只4周龄BALB/c裸鼠由武汉贝赛模式生物科技有限公司提供(生产许可证号:SCXK(鄂)2022-0029)。在SPF条件下适应

性饲养7天后,将小鼠平均分成两组,分别用微量注射器腋下注射0.2 mL si-NC感染的CNE-1细胞或si-CBR3-AS1感染的CNE-1细胞,接种成功后,每7天观察一次裸鼠的成瘤情况。35天后结束观察,处死裸鼠取瘤,测量移植瘤的体积和质量,检测移植瘤组织中lncRNA CBR3-AS1、miR-145-5p、*FSCN1*表达水平。研究经石家庄市第六医院动物伦理委员会批准(批准号:2022-02132)。

1.4 统计学处理

用统计学软件SPSS 25.0分析数据,计量资料用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较行*t*检验,多组间比较及进一步两两比较分别行单因素方差分析和SNK-*q*检验。当 $P < 0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA CBR3-AS1、miR-145-5p在鼻咽癌组织和癌旁组织中的表达情况

qRT-PCR检测结果显示,lncRNA CBR3-AS1在NPC中表达水平(3.57 ± 0.31),显著高于其在癌旁组织中的表达水平(0.93 ± 0.09)($P < 0.05$);miR-145-5p表达在NPC中表达水平为(0.38 ± 0.04),显著低于其在癌旁组织中的表达水平(0.81 ± 0.08)($P < 0.05$)(图1)。

2.2 lncRNA CBR3-AS1、*FSCN1*与miR-145-5p的靶向关系验证

StarBase及TargetScan数据库预测结果显示,

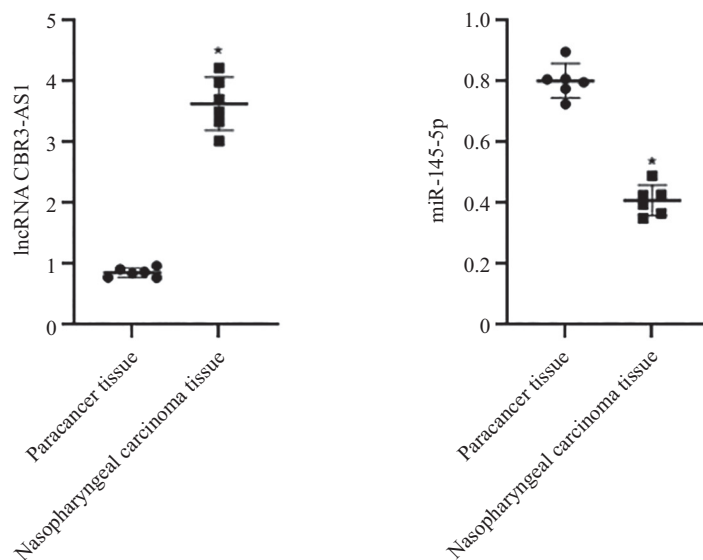
lncRNA CBR3-AS1与miR-145-5p之间及*FSCN1*与miR-145-5p之间均存在靶向结合位点;双荧光素酶报告显示,与lncRNA CBR3-AS1-WT+miR-NC组相比,lncRNA CBR3-AS1-WT+miR-145-5p mimics组CNE-1细胞的相对荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$)(图2)。与*FSCN1*-WT+miR-NC组相比,*FSCN1*-WT+miR-145-5p mimics组CNE-1细胞的相对荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$)(图3)。

2.3 各组细胞lncRNA CBR3-AS1、*FSCN1*、miR-145-5p表达水平

与si-NC组相比,si-CBR3-AS1组lncRNA CBR3-AS1表达水平显著降低,miR-145-5p表达水平显著升高($P < 0.05$);与si-CBR3-AS1+anti-miR-NC组相比,si-CBR3-AS1+anti-miR-145-5p组miR-145-5p表达水平显著降低($P < 0.05$)(图4)。与miR-NC组相比,miR-145-5p mimics组miR-145-5p表达水平显著升高,*FSCN1*表达水平显著降低($P < 0.05$);与miR-145-5p mimics+pcDNA组相比,miR-145-5p mimics+*FSCN1*组*FSCN1*表达水平显著升高($P < 0.05$)(图5和图6)。

2.4 lncRNA CBR3-AS1调节miR-145-5p对鼻咽癌细胞增殖、凋亡、侵袭的影响

与si-NC组相比,si-CBR3-AS1组细胞*D*值、细胞侵袭数量及Bcl-2、MMP-2、MMP-9表达水平显著降低,细胞凋亡率及P21、Bax表达水平显著升高

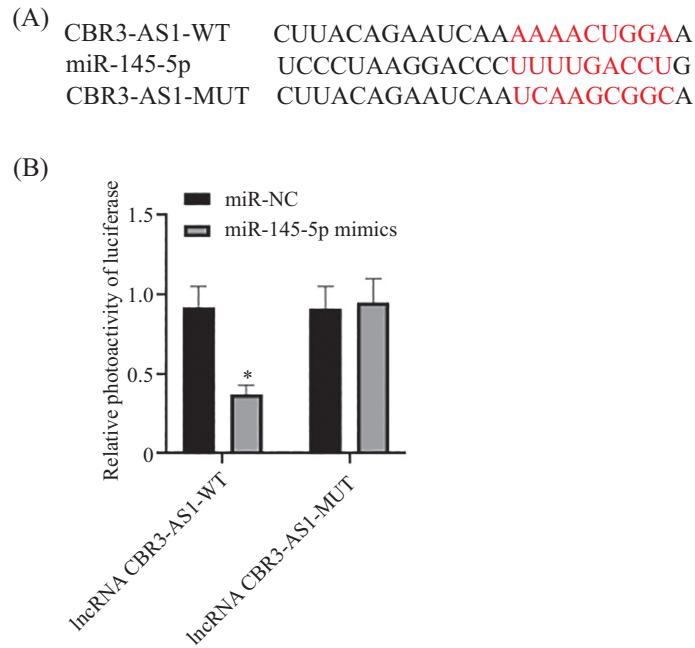


* $P < 0.05$, 与癌旁组织相比。

* $P < 0.05$ compared with paracancer tissue.

图1 lncRNA CBR3-AS1、miR-409-3p在癌旁组织和鼻咽癌组织中的表达水平比较

Fig.1 Comparison of expression of lncRNA CBR3-AS1 and miR-409-3p in paracancer tissues and nasopharyngeal carcinoma tissues

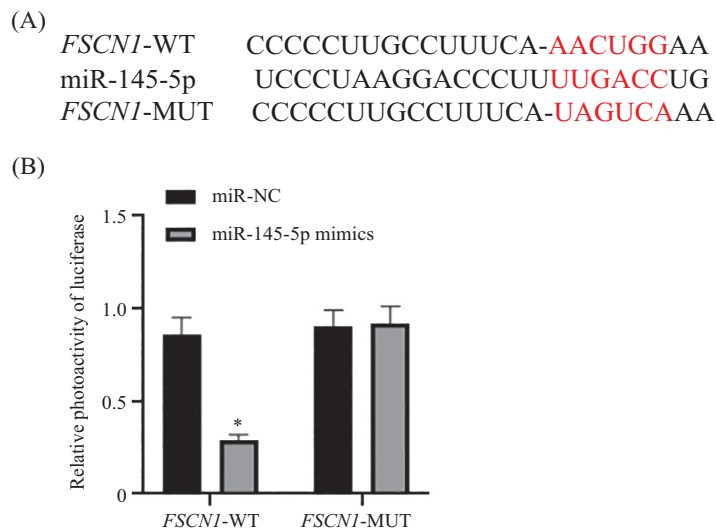


A: lncRNA CBR3-AS1与miR-145-5p的靶向结合位点(红色代表结合位点); B: lncRNA CBR3-AS1与miR-145-5p双荧光素酶实验。* $P < 0.05$, 与lncRNA CBR3-AS1-WT+miR-NC组相比。

A: targeting binding sites of lncRNA CBR3-AS1 and miR-145-5p (red indicates the binding sites); B: lncRNA CBR3-AS1 and miR-145-5p dual luciferase experiment. * $P < 0.05$ compared with lncRNA CBR3-AS1-WT+miR-NC group.

图2 lncRNA CBR3-AS1与miR-145-5p的靶向关系

Fig.2 Targeting relationship between lncRNA CBR3-AS1 and miR-145-5p



A: *FSCN1*与miR-145-5p的靶向结合位点(红色代表结合位点); B: *FSCN1*与miR-145-5p双荧光素酶实验。“-”表示碱基缺失。* $P < 0.05$, 与*FSCN1*-WT+miR-NC组相比。

A: targeting binding sites of *FSCN1* and miR-145-5p (red indicates the binding sites); B: *FSCN1* and miR-145-5p dual luciferase experiment. “-” indicates that a base is missing. * $P < 0.05$ compared with *FSCN1*-WT+miR-NC group.

图3 *FSCN1*与miR-145-5p的靶向关系

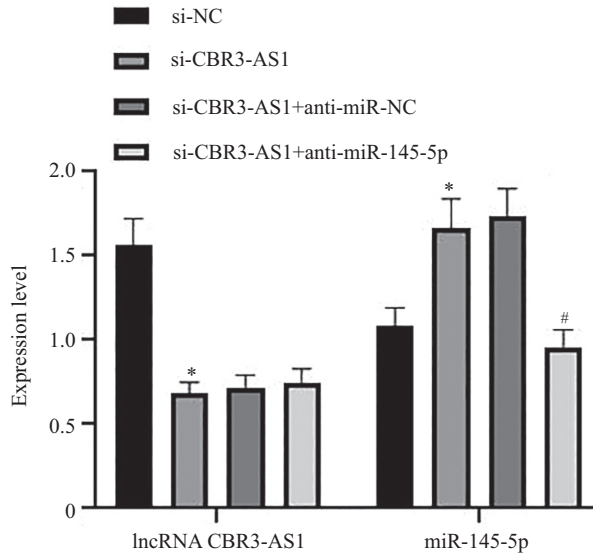
Fig.3 Targeting relationship between *FSCN1* and miR-145-5p

($P < 0.05$); 与si-CBR3-AS1+anti-miR-NC组相比, si-CBR3-AS1+anti-miR-145-5p组*D*值、细胞侵袭数量, 及Bcl-2、MMP-2、MMP-9表达水平显著升高, 细胞凋亡率及P21、Bax表达水平显著降低($P < 0.05$)(图

7)。

2.5 miR-145-5p调控*FSCN1*对鼻咽癌细胞增殖、凋亡、侵袭的影响

与miR-NC组相比, miR-145-5p mimics组*D*值、



* $P < 0.05$, 与si-NC组相比; # $P < 0.05$, 与si-CBR3-AS1+anti-miR-NC组相比。

* $P < 0.05$ compared with the si-NC group; # $P < 0.05$ compared with si-CBR3-AS1+anti-miR-NC group.

图4 各组细胞lncRNA CBR3-AS1、miR-145-5p表达水平

Fig.4 Expression levels of lncRNA CBR3-AS1 and miR-145-5p in cells of each group

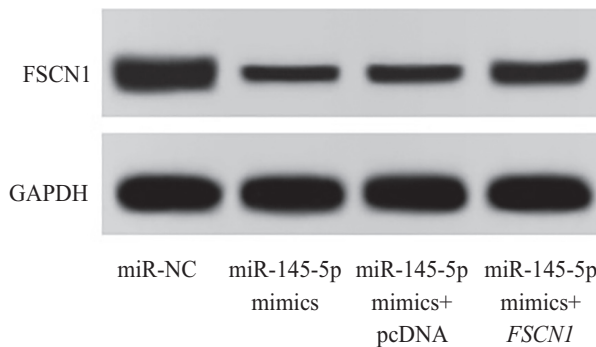


图5 Western blot检测各组细胞FSCN1表达

Fig.5 Western blot analysis of FSCN1 expression in cells of each group

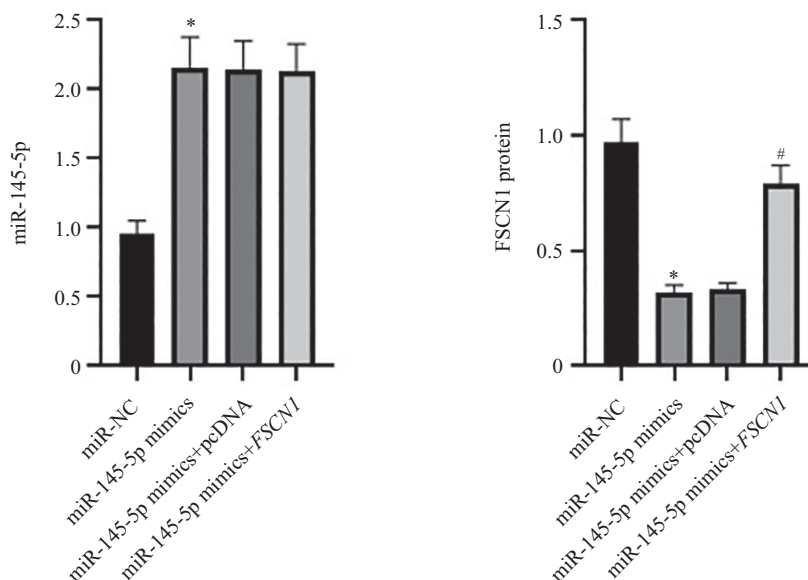
细胞侵袭数量, 及Bcl-2、MMP-2、MMP-9表达水平显著降低, 细胞凋亡率及P21、Bax表达水平显著升高($P < 0.05$); 与miR-145-5p mimics+pcDNA组相比, miR-145-5p mimics+FSCN1组D值、细胞侵袭数量, 及Bcl-2、MMP-2、MMP-9表达水平显著升高, 细胞凋亡率及P21、Bax表达水平显著降低($P < 0.05$) (图8)。

2.6 裸鼠移植瘤实验

与si-NC组比较, 转染si-CBR3-AS1细胞的裸鼠移植瘤体积生长缓慢, 移植瘤组织中lncRNA CBR3-AS1表达水平下降, miR-145-5p表达水平升高($P < 0.005$)。免疫组化检测结果显示, si-CBR3-AS1组移植瘤中, FSCN1蛋白表达水平显著降低($P < 0.005$) (图9~图11)。

3 讨论

lncRNAs是一组超过200个核苷酸但缺乏蛋白质编码潜能的转录本, 广泛存在于基因组中, 参与调控细胞增殖分化、肿瘤发生、肿瘤细胞耐药、干细胞重编程等生理病理过程^[7]。研究显示, 下调lncRNA CBR3-AS1可抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 促进癌细胞凋亡^[8]。本文研究显示, 在鼻咽癌组织中, lncRNA CBR3-AS1表达上调, 下调lncRNA CBR3-AS1的表达可以抑制鼻咽癌细胞的增殖与侵袭, 促进鼻咽癌细胞凋亡。P21负向调控细胞周期, P21表达上调可抑制鼻咽癌细胞增殖^[9]。Bax与Bcl-2均属于Bcl-2家族且参与细胞凋亡, Bax表达上调、Bcl-2表达下调可以促进鼻咽癌细胞凋亡^[10]。MMP-2、MMP-9均属于MMP家



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

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

图6 各组细胞miR-145-5p、FSCN1表达水平

Fig.6 Expression levels of miR-145-5p and FSCN1 in cells of each group

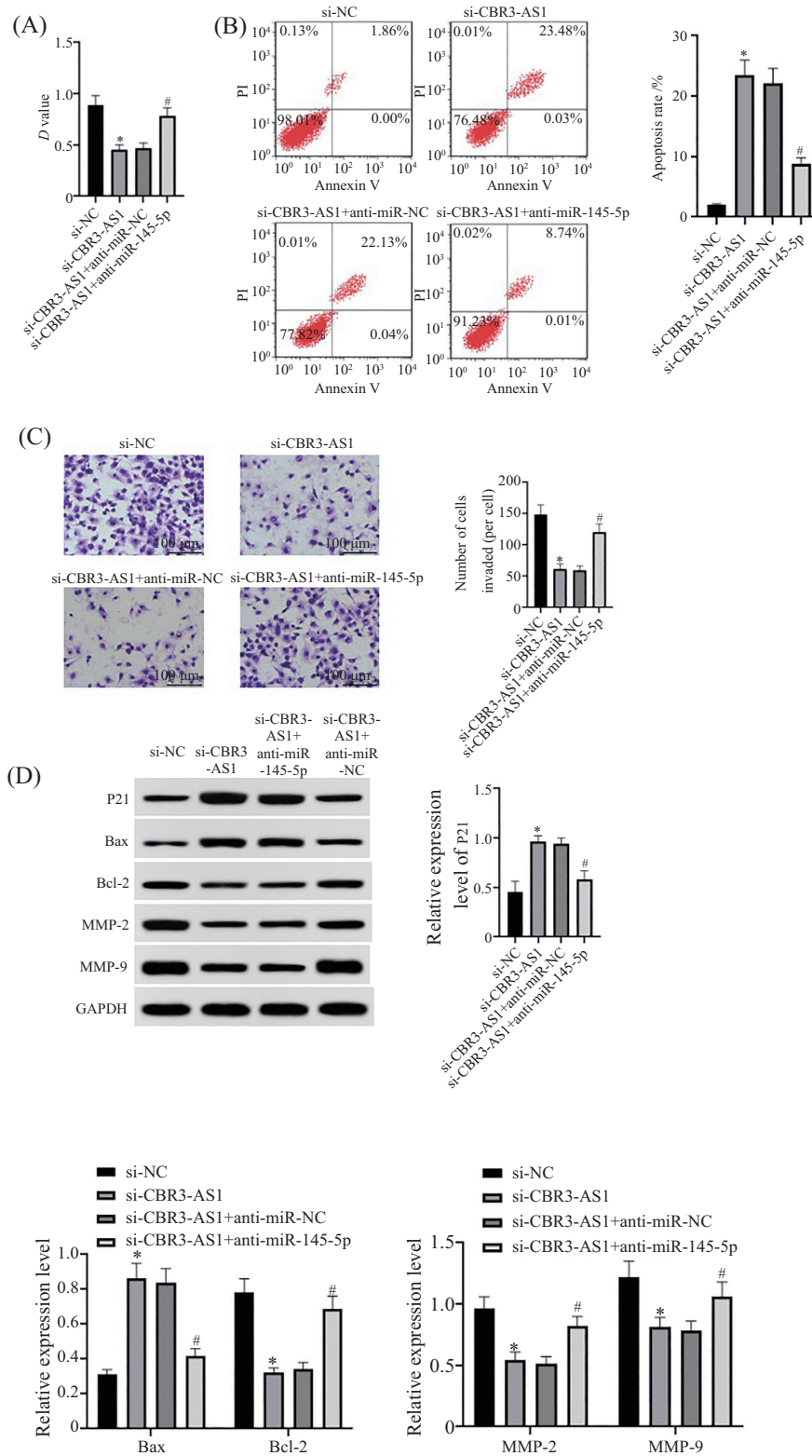
族且参与癌细胞的迁移与侵袭,在鼻咽癌细胞中,抑制MMP-2、MMP-9表达可以抑制癌细胞的迁移与侵袭^[11]。本研究通过在CNE-1细胞中干扰lncRNA CBR3-AS1的表达,发现miR-145-5p表达上调,鼻咽癌细胞的增殖、侵袭,以及Bcl-2、MMP-2、MMP-9表达水平显著降低,细胞凋亡以及P21、Bax表达水平显著升高,说明抑制lncRNA CBR3-AS1的表达可以抑制鼻咽癌细胞的增殖与侵袭,促进鼻咽癌细胞凋亡。

miRNAs是长为22~24个核苷酸的非编码RNA,已被证明参与多种生物过程,并且miRNA可以作为肿瘤抑制因子参与人类癌症(其中包含鼻咽癌)的发生^[12]。另外有研究显示,在喉鳞癌中,miR-145-5p可以通过抑制FSCN1表达抑制喉鳞癌细胞的增殖、迁移与侵袭^[13]。本文研究发现,miR-145-5p在鼻咽癌组织中表达下调,上调miR-145-5p可以抑制鼻咽癌细胞的增殖与侵袭,促进鼻咽癌细胞凋亡。位于细胞质中的lncRNA一直以序列特异性的方式与miRNA竞争,发挥着分子海绵的作用。研究发现,在结直肠癌中,下调lncRNA CBR3-AS1表达可上调miR-145-5p表达,从而抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移与侵袭^[14]。本研究通过生物学检测、双荧光素酶检测及实时荧光定量PCR证明lncRNA CBR3-AS1与miR-145-5p之间存在靶向结合位点。miR-145-5p在鼻咽癌组织中

表达下调,干扰lncRNA CBR3-AS1的表达可以上调miR-145-5p的表达。这说明lncRNA CBR3-AS1可以通过调控miR-145-5p的表达调控鼻咽癌细胞的增殖、凋亡、迁移与侵袭。

FSCN1是一种55 kDa的单链肌动蛋白束结合蛋白,参与细胞运动和迁移以及细胞-基质黏附、伪足形成等过程,促进大多数类型癌症的发生发展^[15]。研究报道称,在肺癌细胞中,miR-1271-5p通过抑制FSCN1的表达抑制肺癌细胞增殖、侵袭和迁移^[16]。本研究通过生物学预测及双荧光素酶检测证实,miR-145-5p与FSCN1之间存在靶向结合位点。在鼻咽癌细胞中,上调miR-145-5p表达可下调FSCN1表达,上调FSCN1表达可部分逆转上调miR-145-5p表达对鼻咽癌细胞增殖、迁移与侵袭的抑制作用。另外裸鼠移植瘤实验显示,干扰lncRNA CBR3-AS1的表达后,裸鼠体内miR-145-5p的表达上调,FSCN1的表达下调,肿瘤的生长减缓,肿瘤的质量与体积减小。这说明下调lncRNA CBR3-AS1的表达可以促进miR-145-5p的表达,从而抑制FSCN1的表达,最终抑制肿瘤的生长。

综上所述,在鼻咽癌细胞中,下调lncRNA CBR3-AS1的表达可以通过调节miR-145-5p/FSCN1轴抑制鼻咽癌细胞的增殖与侵袭,促进鼻咽癌细胞凋亡。本研究还存在不足之处,lncRNA CBR3-AS1可能通过调节其他的miRNA参与鼻咽癌的发生发展,miR-145-5p也

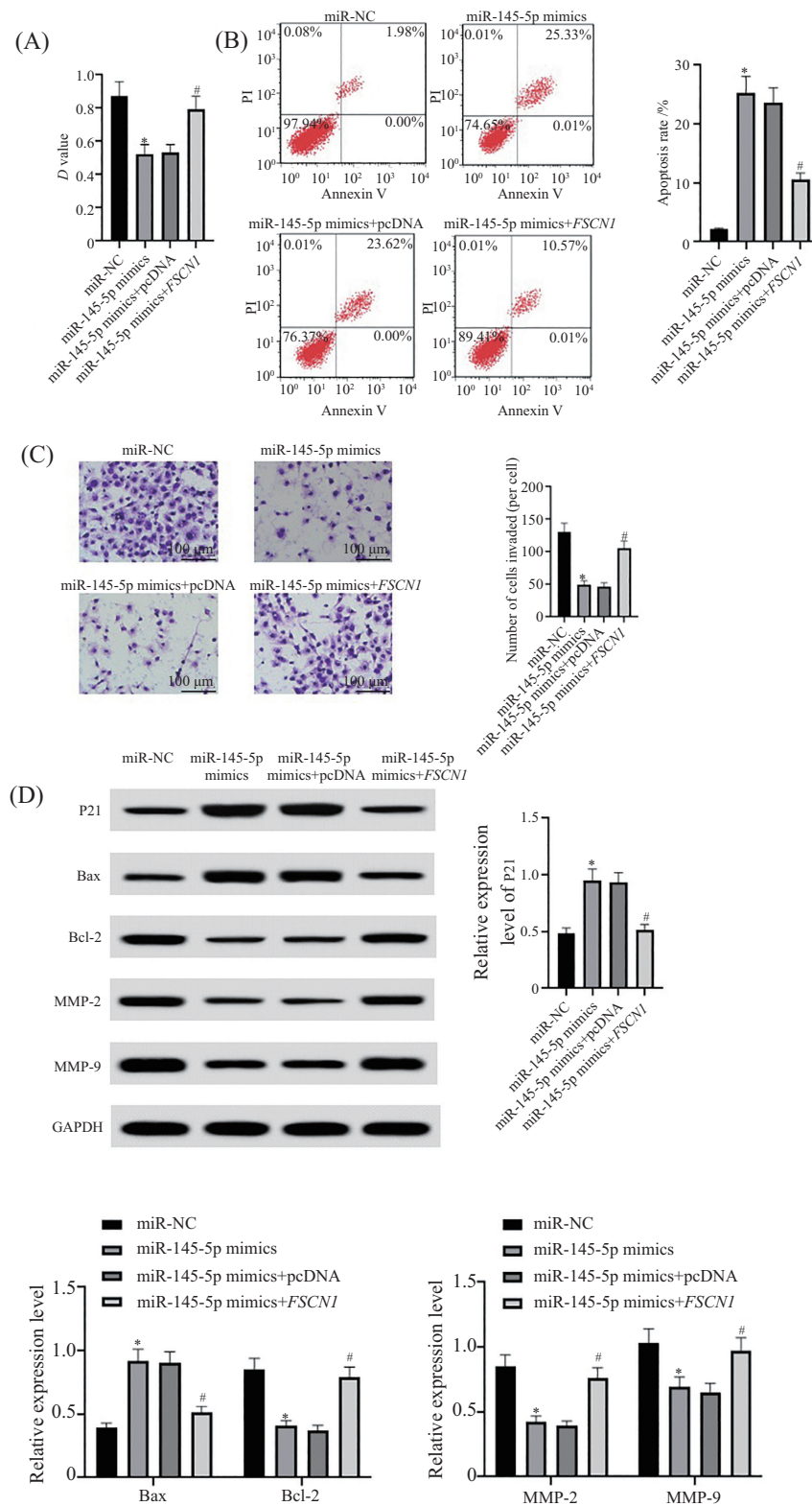


A: MTT检测细胞增殖; B: 流式细胞仪检测细胞凋亡; C: Transwell检测细胞侵袭; D: Western blot检测各组细胞P21、Bax、Bcl-2、MMP-2、MMP-9表达。* $P < 0.05$, 与si-NC组相比; # $P < 0.05$, 与si-CBR3-AS1+anti-miR-NC组相比。

A: cell proliferation was detected by MTT; B: apoptosis was detected by flow cytometry; C: Transwell detected cell invasion; D: the expression of P21, Bax, Bcl-2, MMP-2 and MMP-9 were detected by Western blot. * $P < 0.05$ compared with the si-NC group; # $P < 0.05$ compared with si-CBR3-AS1+anti-miR-NC group.

图7 lncRNA CBR3-AS1调节miR-145-5p对鼻咽癌细胞增殖、凋亡、侵袭的影响

Fig.7 The effects of lncRNA CBR3-AS1 on the proliferation, apoptosis and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by regulating miR-145-5p

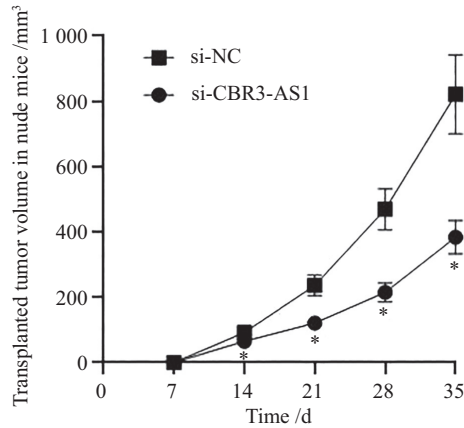


A: MTT检测细胞增殖; B: 流式细胞仪检测细胞凋亡; C: Transwell检测细胞侵袭; D: Western blot检测各组细胞P21、Bax、Bcl-2、MMP-2、MMP-9表达。* $P < 0.05$, 与miR-NC组相比; # $P < 0.05$, 与miR-145-5p mimics+pcDNA组相比。

A: cell proliferation was detected by MTT; B: apoptosis was detected by flow cytometry; C: Transwell detected cell invasion; D: the expression of P21, Bax, Bcl-2, MMP-2 and MMP-9 were detected by Western blot. * $P < 0.05$ compared with miR-NC group; # $P < 0.05$ compared with miR-145-5p mimics+pcDNA group.

图8 miR-145-5p调控*FSCN1*对鼻咽癌细胞增殖、凋亡、侵袭的影响

Fig.8 The effects of miR-145-5p on the proliferation, apoptosis and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by regulating *FSCN1*



* $P < 0.05$, 与si-NC组比较。

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

图9 裸鼠移植瘤生长情况

Fig.9 Growth of transplanted tumor in nude mice

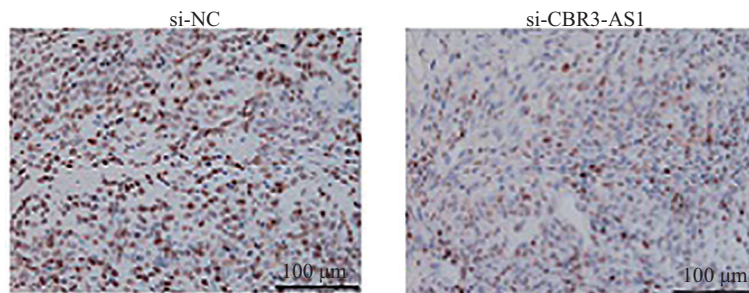
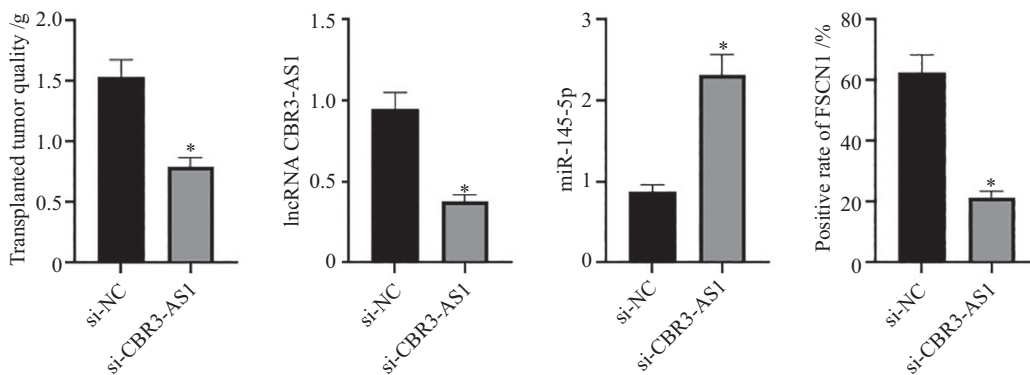


图10 免疫组化检测移植瘤组织中FSCN1蛋白表达情况

Fig.10 Immunohistochemical detection of FSCN1 protein expression in transplanted tumor tissues



* $P < 0.05$, 与si-NC组比较。

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

图11 lncRNA CBR3-AS1对裸鼠移植瘤生长及lncRNA CBR3-AS1、miR-145-5p、FSCN1蛋白表达的影响

Fig.11 Effects of lncRNA CBR3-AS1 on transplanted tumor growth and lncRNA CBR3-AS1, miR-145-5p and FSCN1 protein expression in nude mice

可能通过调节其他的靶向蛋白参与鼻咽癌的发生发展。因此,关于lncRNA CBR3-AS1在鼻咽癌中的作用机制还需要进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021,

- 71(3): 209-49.
- [2] LE Q T, COLEVAS A D, O'SULLIVAN B, et al. Current treatment landscape of nasopharyngeal carcinoma and potential trials evaluating the value of immunotherapy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2019, 111(7): 655-63.
- [3] 廖志伟, 朱建曼, 周同冲, 等. 长链非编码RNA TUG1对鼻咽癌细胞生物学行为及放射敏感性的影响[J]. *实用医学杂志(LIAO Z W, ZHU J M, ZHOU T C, et al. Effects of long non-coding RNA TUG1 on biological behavior and radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Journal of Practical Medicine*, 2023, 39(2): 209-16.
- [4] 刘亮, 刘洪涛, 李医明. lncRNA CBR3-AS1靶向调控miR-5195-3p促进胃癌细胞增殖、迁移及侵袭[J]. *胃肠病学和肝病学杂志(LIU L, LIU H T, LI Y M. lncRNA CBR3-AS1 targeting regulation of miR-5195-3p promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells [J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2021, 30(6): 612-6.
- [5] YUAN C H, HSU W C, HUANG A M, et al. MicroRNA-145-5p modulates Krüppel-like factor 5 and inhibits cell proliferation, migration, and invasion in nasopharyngeal carcinoma [J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 28-42.
- [6] LI Y Q, LU J H, BAO X M, et al. MiR-24 functions as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma through targeting FSCN1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34(1): 130-9.
- [7] BAO Z, YANG Z, HUANG Z, et al. LncRNADisease 2.0: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1034-D7.
- [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*, 2022, 526(1): 1-11.
- [9] 封慕茵, 郑阿秀, 白建荣, 等. 组蛋白甲基化转移酶SETD4对鼻咽癌细胞增殖和迁移的影响[J]. *中国病理生理杂志(FENG M Y, ZHENG A X, BAI J R, et al. Effects of histone methyltransferase SETD4 on proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Chinese Journal of Pathophysiology*, 2023, 39(2): 259-68.
- [10] 杨玉, 张铭璇, 牛鑫, 等. 齐墩果酸靶向Bcl-2诱导鼻咽癌细胞发生线粒体主导的凋亡[J]. *中国老年学杂志(YANG Y, ZHANG M X, NIU X, et al. Mitochondria-led apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells induced by oleanolic acid targeting Bcl-2 [J]. Chinese Journal of Gerontology*, 2023, 43(9): 2186-9.
- [11] 葛源, 马佐鹏, 王延华. 金丝桃苷抑制鼻咽癌细胞生物学行为的分子机制研究[J]. *天津医药(GE Y, MA Z P, WANG Y H. Molecular mechanism of hypericin inhibiting biological behavior of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Tianjin Med*, 2023, 51(4): 344-50.
- [12] LEE K T, TAN J K, LAM A K, et al. MicroRNAs serving as potential biomarkers and therapeutic targets in nasopharyngeal carcinoma: a critical review [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 103(1): 1-9.
- [13] GAO W, ZHANG C, LI W, et al. Promoter methylation-regulated miR-145-5p inhibits laryngeal squamous cell carcinoma progression by targeting FSCN1 [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(2): 365-79.
- [14] XIE L, CUI G, LI T. Long noncoding RNA CBR3-AS1 promotes stem-like properties and oxaliplatin resistance of colorectal cancer by sponging miR-145-5p [J]. *J Oncol*, 2022, 2022(1): 1-12.
- [15] LIN S, TAYLOR M D, SINGH P K, et al. How does fascin promote cancer metastasis [J]? *FEBS J*, 2021, 288(5): 1434-46.
- [16] 龙健, 邹靖, 潘险峰. miR-1271-5p靶向FSCN1对肺癌细胞增殖、侵袭、迁移能力的影响[J]. *中国老年学杂志(LONG J, ZOU J, PAN X F. Effects of miR-1271-5p targeting FSCN1 on proliferation, invasion and migration of lung cancer cells [J]. Chinese Journal of Gerontology*, 2022, 42(10): 2500-5.