LINC00667调节miR-454-3p/MAP3K9轴对鼻咽癌 细胞恶性生物学行为的影响

吴华 孙永明 蔡佳伟 赖世佳 蔡雪花 郑建华* (厦门大学附属成功医院,眼耳鼻喉头颈外科,厦门 361003)

摘要 该研究探讨LINC00667调节miR-454-3p/MAP3K9轴对鼻咽癌细胞恶性生物学行为的 影响。该研究将鼻咽癌细胞HNE1分为control组、si-NC组、si-LINC00667组、mimic NC组、miR-454-3p mimic组、si-LINC00667+inhibitor NC组、si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor组。利用 qRT-PCR检测LINC00667、miR-454-3p、MAP3K9mRNA表达水平; MTT法检测细胞增殖情况; 划 痕实验检测细胞迁移情况; Transwell检测细胞侵袭情况; TUNEL染色检测细胞凋亡情况; Western blot法检测MAP3K9蛋白表达水平; 双荧光素酶报告基因实验检测LINC00667与miR-454-3p以及 miR-454-3p与MAP3K9的相互作用。结果得出,HNE1与人正常鼻咽上皮细胞相比,LINC00667、 MAP3K9 mRNA表达水平升高, miR-454-3p表达水平降低(P<0.05)。与control组和si-NC组比较, si-LINC00667组HNE1细胞中LINC00667表达水平、MAP3K9表达水平以及细胞增殖、迁移和侵袭 能力降低, miR-454-3p表达水平和细胞凋亡率升高(P<0.05)。转染 miR-454-3p mimic对 HNE1细胞 的影响与转染 si-LINC00667类似。与 si-LINC00667+inhibitor NC组相比, si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor组HNE1细胞的增殖、迁移和侵袭能力升高, MAP3K9表达水平升高, miR-454-3p表达 水平、细胞凋亡率降低(P<0.05); 双荧光素酶报告基因实验显示, LINC00667与miR-454-3p、miR-454-3p与MAP3K9存在靶向关系。总结可得,干扰LINC00667可能通过上调miR-454-3p表达,抑制 MAP3K9表达,进而抑制鼻咽癌细胞恶性生物学行为。

关键词 LINC00667; miR-454-3p; MAP3K9; 鼻咽癌; 恶性生物学行为

Effect of LINC00667 on the Malignant Biological Behavior of Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Regulating the miR-454-3p/MAP3K9 Axis

WU Hua, SUN Yongming, CAI Jiawei, LAI Shijia, CAI Xuehua, ZHENG Jianhua* (Department of Ophthalmology, Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Xiamen University Affiliated Success Hospital, Xiamen 361003, China)

Abstract This study investigated the effect of LINC00667 on the malignant biological behavior of nasopharyngeal carcinoma cells by regulating the miR-454-3p/MAP3K9 axis. In this study, nasopharyngeal carcinoma cells HNE1 were divided into the control group, the si-NC group, the si-LINC00667 group, the mimic NC group, the miR-454-3p mimic group, the si-LINC00667+inhibitor NC group, and the si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor group. qRT-PCR was applied to detect the mRNA expression levels of LINC00667, miR-454-3p, and *MAP3K9*. MTT assay was applied to detect cell proliferation. Scratch experiment was applied to detect cell migration. Transwell method was applied to detect cell invasion. TUNEL staining was applied to detect cell

apoptosis. Western blot was applied to detect the expression level of MAP3K9 protein. Dual luciferase reporter gene assay was applied to detect the interaction between LINC00667 and miR-454-3p, and between miR-454-3p and *MAP3K9*. The results showed that compared with normal human nasopharyngeal epithelial cells, HNE1 had higher expression of LINC00667 and *MAP3K9* mRNA, and lower expression of miR-454-3p (P<0.05). Compared with the control group and si-NC group, the expression of LINC00667, MAP3K9, cell proliferation, migration, and invasion abilities were lower in the si-LINC00667 group, while the expression of miR-454-3p and apoptosis rate were higher (P<0.05). The effect of transfecting miR-454-3p mimic on HNE1 cells was similar to that of transfecting si-LINC00667. Compared with the si-LINC00667+inhibitor NC group, the si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor group had higher proliferation, migration, and invasion abilities of HNE1 cells, higher MAP3K9 expression, and lower miR-454-3p and apoptosis rate (P<0.05). The dual luciferase reporter gene experiment showed that LINC00667 had a targeted relationship with miR-454-3p, and miR-454-3p had a targeted relationship with *MAP3K9*. In summary, LINC00667 silencing may suppress the malignant biological behavior of nasopharyngeal carcinoma cells by upregulating miR-454-3p expression and inhibiting MAP3K9 expression.

Keywords LINC00667; miR-454-3p; MAP3K9; nasopharyngeal carcinoma; malignant biological behavior

鼻咽癌是鼻咽部上皮来源的恶性肿瘤,在中国 南方和东南亚的发病率可达千分之二。虽然鼻咽癌 发生在鼻咽部,早期症状不明显,但其仍然具有很强 的侵袭和转移倾向^[1]。临床研究表明,约70%的鼻咽 癌患者会发生颈部淋巴结转移,且鼻咽癌细胞在几 乎所有晚期患者都会侵袭性生长至颅底[2]。然而, 迄 今为止,鼻咽癌发展,特别是转移过程中的分子机制 仍不清楚。因此, 需要进一步了解鼻咽癌的发病机制, 以开发更有效的治疗策略来对抗鼻咽癌的发展[3]。研 究表明, LncRNA和miRNA在肿瘤的不同类型和病 理生理阶段都有特别表达,使其成为多种癌症的分 子诊断标志物^[4]。与正常细胞相比, LINC00667在鼻 咽癌细胞中过表达,沉默LINC00667可抑制鼻咽癌 细胞增殖、迁移、侵袭和上皮--间质转化(epithelialmesenchymal transition, EMT), LINC00667敲低可 抑制异种移植小鼠体内鼻咽癌肿瘤的生长^[5]。沉默 HOXA11-AS可以通过特异性上调miR-454-3p来抑 制 c-Met/AKT/mTOR通路,从而促进细胞凋亡并增 强顺铂耐药鼻咽癌细胞对顺铂的敏感性^[6]。HCG11 通过抑制miR-490-3p显著提高丝裂原活化蛋白激酶 MAPK激酶9(mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9, MAP3K9)水平,从而促进鼻咽癌进展^[7]。 Starbase分析显示LINC00667与miR-454-3p、miR-454-3p与MAP3K9有互补结合序列,因此,本研究通 过干扰LINC00667表达和过表达miR-454-3p, 探究 LINC00667调节miR-454-3p/MAP3K9信号通路对鼻 咽癌细胞恶性生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

HNE1人鼻咽癌细胞株(货号: IM-H433)购自厦门 逸漠生物科技有限公司; NP69人正常鼻咽上皮细胞系 (货号: CL-0804)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 主要试剂

si-LINC00667、si-NC、miR-454-3p mimic、 mimic NC、miR-454-3p inhibitor、inhibitor NC购 自上海吉玛制药技术有限公司; TRIzol试剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、TUNEL试剂盒、逆转录试 剂盒、Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix、RIPA Lysis Buffer RIPA裂解液、PVDF膜购自翌圣生物 科技(上海)股份有限公司; MTT细胞增殖及细胞毒 性检测试剂盒(货号:G65905)购自上海晶抗生物 工程有限公司;Lipofectamine 3000转染试剂购自 ThermoFisher Scientific公司;基质胶、细胞总蛋白 提取试剂盒、Transwell小室、超敏ECL化学发光 检测试剂盒、SDS-PAGE购自武汉三鹰生物技术 有限公司; MAP3K9、GAPDH兔单克隆抗体(货号: ab228752、ab128915)、HRP标记的羊抗兔IgG抗体(货 号:ab205718)购自英国Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与分组转染 使用 RPMI-1640 培养基培养无支原体细胞,培养基中补充有10% FBS。所有细胞在37°C培养箱中,5% CO₂浓度 下培养。将 HNE1细胞分为 control组 (不转染质 粒)、si-NC组 (转染 si-NC)、si-LINC00667组 (转 染si-LINC00667)、mimic NC组(转染mimic NC)、miR-454-3p mimic组(转染miR-454-3p mimic)、si-LINC00667+inhibitor NC组(共转染si-LINC00667与inhibitor NC)、si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor 组(共转染si-LINC00667与miR-454-3p inhibitor),使用Lipofectamine 3000进行质粒转染。

1.3.2 qRT-qPCR检测LINC00667、miR-454-3p和 MAP3K9 mRNA表达水平 使用TRIzol试剂提取 细胞中的总RNA,用NanoDrop 2000分光光度计测 定RNA浓度和纯度。用逆转录系统试剂盒从1 µg总 RNA中制备cDNA,根据GenBank数据库中的基因序 列,使用Primer Premier 5.0软件设计PCR引物。PCR 反应均在ABI PRISM 7500 Real-time PCR系统上进 行。靶基因相对表达量采用2^{-AACI}法进行定量,其中, miR-454-3p以U6为内参,LINC00667、MAP3K9以 GAPDH为内参,使用的所有引物序列见表1中。

1.3.3 MTT检测细胞增殖 将细胞接种于96孔板中,每孔2×10³个细胞,在5% CO₂、饱和湿度、37°C条件下培养。培养48 h后,加入MTT试剂(5 mg/mL)(20 μL/孔),在37°C下孵育4 h,除去培养基并替换为200 μL二甲基亚砜(DMSO),在波长为490 nm处测量吸光度值。

1.3.4 划痕实验检测细胞迁移 将细胞在6孔板中 培养至汇合度>90%。在伤口愈合测定中使用移液 器吸头通过划痕形成伤口。室温培养24 h,在倒置 显微镜下,观察细胞划痕0 h和24 h时伤口愈合结果。 划痕愈合率=[(0 h时的划痕面积-24 h时的划痕面积)/0 h的划痕面积]×100%。

1.3.5 Transwell检测细胞侵象 将细胞在不含血 清的培养基中饥饿培养12 h, 37 °C消化细胞30 min, 然后将其加入到覆盖基质胶的Transwell上室中,其 中加入200 mL含有1% FBS的培养基,下室装满培养 基(含10% FBS)。培养24 h后,将细胞从内膜上取出, 用4%多聚甲醛于4 °C固定侵袭细胞30 min, 然后用结晶紫室温染色15 min。在显微镜下对外膜上的细胞进行成像并进行分析。

1.3.6 TUNEL染色检测细胞凋亡 制作细胞爬片, 用PBS清洗后,4%多聚甲醛4°C下固定30min;PBS 清洗1次后,加入蛋白酶K室温反应2min,再用PBS清 洗1次。然后,用3%H₂O₂室温孵育5min。将载玻片 与脱氧核糖核酸末端转移酶在37°C下孵育60min。 将爬片与Streptavidin-HRP工作液室温反应30min,并 使用TUNEL室温染色20min。在光学显微镜下观察, 并使用ImageJ软件计算TUNEL阳性细胞数目。

1.3.7 Western blot检测MAP3K9的蛋白表达 用 RIPA缓冲液裂解细胞,提取总蛋白。蛋白经 SDS-PAGE电泳分离,用PVDF膜跨膜转移,用牛奶室 温封闭2h,4°C下与MAP3K9(稀释比:1/1000)、 GAPDH(稀释比:1/20000)一抗孵育过夜。一抗孵育 后,二抗(稀释比:1/50000)室温孵育1h。使用ECL 化学发光试剂盒显影,化学发光系统分析蛋白条带, GAPDH作为内参对照。

1.3.8 LINC00667与miR-454-3p、miR-454-3p与 MAP3K9的相互作用 HNE1细胞接种于6孔板 中培养,处于对数生长期时,将LINC00667野生型 (WT)、突变型(MUT)质粒分别与mimic NC、miR-454-3p mimic共转染HNE1细胞;MAP3K9WT、 MAP3K9 MUT质粒分别与mimic NC、miR-454-3p mimic共转染HNE1细胞,48h后,收集并用裂解液冰 上孵育5min裂解细胞,然后使用双荧光素酶报告基 因检测系统测量荧光素酶活性。

1.4 统计学分析

实验数据用(x̄±s)表示,采用Graphpad Prism 7.0 软件进行统计分析,两组比较采用t检验,多组比较 采用单因素方差分析,两组间差异采用Tukey's检 验。P<0.05表示差异有统计学意义。

Table 1 LINC00667, miR-454-3p, MAP3K9 and internal reference primer sequences		
基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Gene name	Upstream primer $(5' \rightarrow 3')$	Downstream primer $(5' \rightarrow 3')$
LINC00667	TGT GCG AGA AAG CCT ACC TG	GCC TGC ATC AAA AAG TCG GG
miR-454-3p	TAG TGC AAT ATT GCT TA	CAG TGC GTG TCG TGG AGT
MAP3K9	GAG TGC GGC AGG GAC GTA T	CCC CAT AGC TCC ACA CAT CAC
<i>U6</i>	CTC GCT TCG GCA GCA CA	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
GAPDH	CCC ACT CCT CCA CCT TTG AC	GGA TCT CGC TCC TGG AAG ATG

表1 LINC00667、miR-454-3p、*MAP3K*9及内参引物序列 ale 1 LINC00667 miR-454-3p *MAP3K*9 and internal reference primer sequen

2 结果

2.1 LINC00667、miR-454-3p、*MAP3K9* mRNA 表达水平

与NP69细胞比较, HNE1中LINC00667表达水 平升高, miR-454-3p表达水平降低, *MAP3K9* mRNA 表达水平升高(P<0.05), 见表2。

2.2 各组HNE1中LINC00667、miR-454-3p和 MAP3K9的mRNA表达水平

与 control组和 si-NC组比较, si-LINC00667组 HNE1细胞中 LINC00667和 *MAP3K9* mRNA表达水 平降低, miR-454-3p表达水平升高(*P*<0.05); 与mimic NC组比较, miR-454-3p mimic组 HNE1细胞中 miR-454-3p表达水平升高, *MAP3K9* mRNA表达水平降 低(*P*<0.05); 与 si-LINC00667+inhibitor NC组比较, si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor组 HNE1细胞中 miR-454-3p表达水平降低, *MAP3K9* mRNA表达水 平升高(*P*<0.05), 见表3。

2.3 各组HNE1细胞增殖比较

与 control组和 si-NC组比较, si-LINC00667 组 HNE1细胞的 *D*₄₉₀值降低 (*P*<0.05); 与 control组

和 mimic NC组比较, miR-454-3p mimic组 HNE1 细胞的 D_{490} 值降低 (P < 0.05);与 si-LINC00667 组、si-LINC00667+inhibitor NC组比较, si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor组HNE1细胞的 D_{490} 值升高(P < 0.05),见表4。

2.4 各组HNE1细胞迁移比较

与 control组和 si-NC组比较, si-LINC00667组 HNE1细胞的划痕愈合率降低 (*P*<0.05); 与 control 组和 mimic NC组比较, miR-454-3p mimic组 HNE1 细胞的划痕愈合率降低 (*P*<0.05); 与 si-LINC00667 组、 si-LINC00667+inhibitor NC组比较, si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor组 HNE1细胞的划 痕愈合率升高(*P*<0.05), 见图1和表5。

2.5 各组HNE1细胞侵袭比较

与 control组和 si-NC组比较, si-LINC00667组 HNE1细胞的侵入细胞数减少 (*P*<0.05); 与 control 组和 mimic NC组比较, miR-454-3p mimic组 HNE1 细胞的侵入细胞数减少 (*P*<0.05); 与 si-LINC00667 组、 si-LINC00667+inhibitor NC组比较, si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor组 HNE1细胞的侵

	Table 2 Comparison of cell LINC00667, n	niR-454-3p and <i>MAP3K9</i> exp	pression between two groups
细胞系	LINIC00667	miD 454 2m	MAD2V0 = DNA
Cell lines	LINC00007	шк-434-5р	MAP SK9 MKNA
NP69	1.03±0.11	1.08±0.11	$1.05{\pm}0.11$
HNE1	2.85±0.29	0.39±0.04	2.94±0.30
t	17.604	17.685	17.754
Р	0.000	0.000	0.000

表2 两组细胞LINC00667、miR-454-3p、MAP3K9表达比较

表3 HNE1中LINC00667、miR-454-3p、*MAP3K9*表达水平比较 Table 3 Comparison of LINC00667, miR-454-3p and *MAP3K9* expression in HNE1

P			
组别	LINC00667	miR-454-3p	MAP3K9
Groups			
Control	$1.04{\pm}0.11$	1.05±0.12	1.02±0.11
si-NC	1.02 ± 0.11	1.02±0.11	0.99±0.11
si-LINC00667	$0.43 {\pm} 0.05^{*^{\#}}$	2.42±0.25*#	0.54±0.06* [#]
mimic NC	1.05 ± 0.11	$1.03{\pm}0.11$	1.03 ± 0.11
miR-454-3p mimic	1.04 ± 0.11	2.45±0.25 ^{&}	0.56±0.06 ^{&}
si-LINC00667+inhibitor NC	$0.46{\pm}0.06$	2.48±0.26	0.55 ± 0.06
si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor	0.42 ± 0.05	1.07±0.12 [@]	0.96±0.11 [@]
F	114.247	145.331	62.139
Р	0.000	0.000	0.000

*P<0.05,与control组相比; *P<0.05,与si-NC组相比; *P<0.05;与mimic NC组相比; @P<0.05,与si-LINC00667+inhibitor NC组相比。n=9。

*P<0.05 compared with control group; [#]P<0.05 compared with si-NC group; [&]P<0.05 compared with mimic NC group; [@]P<0.05 compared with si-LINC00667+inhibitor NC group. n=9.

组别	D	
Groups	D_{490}	
Control	0.97±0.11	
si-NC	0.94±0.10	
si-LINC00667	$0.68{\pm}0.08{*}^{\#}$	
mimic NC	0.96±0.11	
miR-454-3p mimic	$0.65 \pm 0.07^{\&}$	
si-LINC00667+inhibitor NC	0.67±0.07	
si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor	$0.88{\pm}0.09^{@}$	
F	23.528	
Р	0.000	

	表4 各组HNE1细胞增殖比较
Table 4	Comparison of HNE1 cell proliferation in each group

*P<0.05, 与control组相比; *P<0.05, 与si-NC组相比; *P<0.05; 与mimic NC组相比; @P<0.05, 与si-LINC00667+inhibitor NC组相比。 n=9。 *P<0.05 compared with control group; *P<0.05 compared with si-NC group; *P<0.05 compared with mimic NC group; @P<0.05 compared with si-LINC00667+inhibitor NC group. n=9.



图1 划痕实验检测各组HNE1细胞迁移情况 Fig.1 Scratch assay to detect migration of HNE1 cells in each group

入细胞数增加(P<0.05),见图2和表6。

2.6 各组HNE1细胞凋亡比较

与 control组和 si-NC组比较, si-LINC00667 组 HNE1细胞凋亡率升高 (*P*<0.05); 与 control 组、mimic NC组比较, miR-454-3p mimic组 HNE1细胞凋亡率升高 (*P*<0.05); 与 si-LINC00667 组、si-LINC00667+inhibitor NC组比较, siLINC00667+miR-454-3p inhibitor组HNE1细胞凋亡 率降低(P<0.05), 见图3和表7。

2.7 各组HNE1细胞中MAP3K9蛋白表达

与 control组和 si-NC组比较, si-LINC00667组 HNE1细胞 MAP3K9蛋白表达水平降低 (P<0.05); 与 control组和 mimic NC组比较, miR-454-3p mimic组 HNE1细胞MAP3K9蛋白表达水平降低 (P<0.05)。与

Table 5 Comparison of myEr cen inigration in each group		
分组	划痕愈合率/%	
Groups	Scratch healing rate /%	
Control	56.25±5.72	
si-NC	54.97±5.57	
si-LINC00667	28.26±2.89* [#]	
mimic NC	55.52±5.64	
miR-454-3p mimic	27.78±2.83*	
si-LINC00667+inhibitor NC	28.13±2.87	
si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor	51.15±5.22 [@]	
F	86.329	
Р	0.000	

	表5 各组HNE1细胞迁移比较
able 5	Comparison of HNE1 cell migration in each group

*P<0.05, 与control组相比; *P<0.05, 与si-NC组相比; *P<0.05; 与mimic NC组相比; @P<0.05, 与si-LINC00667+inhibitor NC组相比。 n=9。 *P<0.05 compared with control group; *P<0.05 compared with si-NC group; *P<0.05 compared with mimic NC group; @P<0.05 compared with si-LINC00667+inhibitorNC group. n=9.



图2 Transwel小室检测各组HNE1细胞侵袭情况 Fig.2 Transwel chamber detection of HNE1 cell invasion in each group

Table 6 Comparison of HNE1 cell invasion in each group		
分组	侵入细胞数	
Groups	Number of invading cells	
Control	89.47±9.02	
si-NC	90.45±9.16	
si-LINC00667	55.47±5.62* [#]	
mimic NC	91.12±9.18	
miR-454-3p mimic	54.78±5.54 ^{&}	
si-LINC00667+inhibitor NC	55.26±5.57	
si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor	82.13±8.27 [@]	
F	49.355	
Р	0.000	

表6 各组HNE1细胞侵袭情况比较 Fable 6 Comparison of HNE1 cell invasion in each groug

*P<0.05, 与control组相比; *P<0.05, 与si-NC组相比; *P<0.05; 与mimic NC组相比; @P<0.05, 与si-LINC00667+inhibitor NC组相比。n=9。 *P<0.05 compared with control group; *P<0.05 compared with si-NC group; *P<0.05 compared with mimic NC group; @P<0.05 compared with si-

LINC00667+inhibitor NC group. n=9.





si-LINC00667组、si-LINC00667+inhibitor NC组相 比, si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor组HNE1细胞 MAP3K9蛋白表达水平升高(P<0.05), 见表8和图4。

2.8 LINC00667与miR-454-3p、miR-454-3p与 *MAP3K*9相互关系

如图5和图6所示, Starbase分析显示LINC00667 与miR-454-3p、miR-454-3p与*MAP3K9*有互补结 合序列。双荧光素酶报告基因检测结果显示,与 LINC00667突变型质粒和mimic NC共转染比较, LINC00667野生型质粒和miR-454-3p mimic共转 染HNE1后,荧光素酶活性显著降低(P<0.05),见表 9;与MAP3K9突变型质粒和mimic NC共转染比较, MAP3K9野生型质粒和miR-454-3p mimic共转染 HNE1后,荧光素酶活性显著降低(P<0.05),见表10。

3 讨论

鼻咽癌是一种高度恶性的鼻咽黏膜上皮性肿瘤,已成为最常见的头颈部恶性肿瘤,具有浸润性强、易发生远处转移的特点,广泛分布于亚洲^[8]。鼻咽癌患者通常根据肿瘤的大小和范围采取手术切

Table 7 Comparison of HNE1 cell apoptosis in each group		
分组	细胞凋亡率/%	
Groups	Cell apoptosis rate /%	
Control	3.82±0.39	
si-NC	4.43±0.45	
si-LINC00667	24.57±2.52*#	
mimic NC	4.12±0.42	
miR-454-3p mimic	25.43±2.61 ^{&}	
si-LINC00667+inhibitor NC	24.86±2.54	
si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor	$8.56{\pm}0.87^{@}$	
F	342.617	
Р	0.000	

	表7 各组HNE1细胞凋亡比较
able 7	Comparison of HNE1 cell apoptosis in each group

*P<0.05, 与control组相比; *P<0.05, 与si-NC组相比; *P<0.05; 与mimic NC组相比; @P<0.05, 与si-LINC00667+inhibitor NC组相比。n=9。 *P<0.05 compared with control group; *P<0.05 compared with si-NC group; *P<0.05 compared with mimic NC group; @P<0.05 compared with si-LINC00667+inhibitor NC group. n=9.



A: control组; B: si-NC组; C: si-LINC00667组; D: mimic NC组; E: miR-454-3p mimic组; F: si-LINC00667+inhibitor NC组; G: si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor组。

A: control group; B: si-NC group; C: si-LINC00667 group; D: mimic NC group; E: miR-454-3p mimic group; F: si-LINC00667+inhibitor NC group; G: si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor group.

图4 Western blot检测各组HNE1细胞MAP3K9和GAPDH蛋白表达情况

Fig.4 Western blot detection of MAP3K9 and GAPDH proteins in HNE1 cell of each group

	表8 各组HNE1细胞中MAP3K9蛋白表达水平比较
Table 8	Comparison of MAP3K9 protein expression levels in HNE1 cells in each group

组别	ΜΔΡ3ΚΟ
Groups	MAI JK7
Control	1.06±0.12
si-NC	1.05±0.11
si-LINC00667	$0.55{\pm}0.06^{*^{\#}}$
mimic NC	1.03±0.11
miR-454-3p mimic	0.52±0.06 ^{&}
si-LINC00667+inhibitor NC	0.53±0.06
si-LINC00667+miR-454-3p inhibitor	0.94±0.11 [@]
F	90.937
Р	0.000

*P<0.05, 与control组相比; *P<0.05, 与si-NC组相比; *P<0.05; 与mimic NC组相比; @P<0.05, 与si-LINC00667+inhibitor NC组相比。n=9。 *P<0.05 compared with control group; *P<0.05 compared with si-NC group; *P<0.05 compared with mimic NC group; @P<0.05 compared with si-LINC00667+inhibitor NC group. n=9.

除、放射治疗和化疗^[9]。尽管目前鼻咽癌的临床治 疗和管理方法各不相同,但由于鼻咽癌患者存在局 部侵袭和转移,其预后仍较差,有必要研究鼻咽癌发

展和转移的潜在机制[10]。

作为非编码RNA, lncRNA长度超过200个核 苷酸,已被发现其可调节染色质动力学、基因表



图6 miR-454-3p与MAP3K99靶向结合位点预测 Fig.6 Prediction of miR-454-3p and MAP3K9 target binding sites

	表9 LINC00667与miR-454-3p双荧光素酶活性检测结果
Fable 9	Results of dual luciferase activity detection of LINC00667 and miR-454-3p

分组	LINC00667(WT)	LINC00667(MUT)
Groups		
mimic NC	1.03±0.11	1.06±0.11
miR-454-3p mimic	$0.54{\pm}0.06$	1.05±0.11
t	11.732	0.239
Р	0.000	0.814

表10 miR-454-3p与MAP3K9双荧光素酶活性检测结果 Table 10 Results of dual luciferase activity detection of miR-454-3p and MAP3K9

		_
分组	MAP3K9(WT)	MAP3K9(MUT)
Groups		
mimic NC	1.03±0.11	1.05±0.11
miR-454-3p mimic	0.57±0.06	1.07±0.11
t	11.014	0.386
Р	0.000	0.705

达、肿瘤进展(增殖、凋亡、转移、细胞代谢和耐药)^[11]。lncRNA可以作为竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)与miRNA竞争性结合,从而调节致癌和肿瘤抑制途径,与鼻咽癌的发生和发展有关^[12]。LINC00667位于人类chr18(5238100-5246508),包含多个miRNA反应元件区域,是多种恶性肿瘤过程中的关键介质^[13]。例如,LINC00667通过调节miR-200b-3p/SLC2A3轴在转移性食管癌中发挥关键作用^[14]。miRNA是高度保守的单链非编码RNA,长度为20~23个核苷酸,已发现其通过下调癌基因或肿瘤抑制基因来调节各种肿瘤的进展,如

增殖、凋亡和侵袭。miRNA可以与靶基因mRNA 的3'非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)上的互 补序列部分结合,从而导致靶基因翻译的阻断和 降解^[15]。miR-454-3p是miR-130-3p/301-3p/454-3p miRNA簇的成员,该簇已被证实在多种癌症的进展 中发挥关键作用,且实验已证明miR-454-3p在胶质 母细胞瘤、肺癌、膀胱癌和胰腺导管腺癌等多种癌 症中起抑制作用^[16]。miR-454-3p通过靶向PTEN表 达促进结直肠癌细胞对奥沙利铂的耐药性,而PTEN 表达则负向调节PI3K/AKT信号通路^[17]。因此,本研 究首先干扰LINC00667表达,发现HNE1细胞miR- 454-3p表达水平、细胞凋亡率升高,增殖、迁移和 侵袭能力明显降低,MAP3K9蛋白表达水平降低;然 后过表达miR-454-3p,研究发现其对HNE1细胞的 作用与干扰LINC00667表达类似;最后,本研究抑 制miR-454-3p表达,结果可逆转干扰LINC00667对 HNE1细胞的影响;双荧光素酶报告基因实验显示, LINC00667与miR-454-3p存在靶向关系。结果表明 干扰LINC00667可通过上调miR-454-3p,抑制HNE1 细胞增殖、迁移、侵袭,促进细胞凋亡。

MAP3K9是MAPK/JNK信号通路的上游激活因 子,可调节细胞生长、分化、迁移和凋亡^[18]。抑制 MAP3K9表达可抑制胰腺癌中的细胞坏死性凋亡, 在肺腺癌中,沉默MAP3K9可显著抑制细胞生长、 迁移、侵袭和细胞骨架重组,同时抑制EMT^[19]。在 喉鳞状细胞癌组织中, MAP3K9过表达减弱了miR-125b-5p对癌细胞活力和糖酵解的抑制作用以及 miR-125b-5p的促凋亡作用^[20]。因此,本研究通过双 荧光素酶报告基因实验进一步探究miR-454-3p与 MAP3K9的相互作用,发现miR-454-3p与MAP3K9存 在靶向关系; 通过qRT-PCR和Western blot实验得出, miR-454-3p过表达抑制MAP3K9的mRNA和蛋白的 表达,降低HNE1细胞增殖、迁移和侵袭能力,提高 细胞凋亡率; miR-454-3p表达被抑制时, MAP3K9的 mRNA和蛋白表达水平升高,细胞增殖、迁移和侵 袭能力提高,细胞凋亡率降低。结果表明miR-454-3p通过抑制MAP3K9表达来抑制HNE1细胞增殖、 迁移和侵袭,并促进凋亡。

综上所述,LINC00667在HNE1细胞中异常表达, LINC00667通过抑制miR-454-3p,促进MAP3K9表达,从 而促进鼻咽癌进展。LINC00667调节miR-454-3p/MAP3K9 轴参与鼻咽癌的进展,因此,miR-454-3p/MAP3K9可能是 一个有效的治疗靶点和新诊断标志物。

参考文献 (References)

- GUO R, MAO Y P, TANG L L, et al. The evolution of nasopharyngeal carcinoma staging [J]. Br J Radiol, 2019, 92(1102): 244.
- [2] GUAN S, WEU J, HUANG L, et al. Chemotherapy and chemoresistance in nasopharyngeal carcinoma [J]. Eur J Med Chem, 2020, 207(1): 112758.
- [3] WHALEY J J, AFKHAMI M, ONYSHCHENKO M, et al. Recurrent/metastatic nasopharyngeal carcinoma treatment from present to future: where are we and where are we heading [J]? Curr Treat Options Oncol, 2023, 24(9): 1138-66.
- [4] WANG H, WANG W, FAN S. Emerging roles of lncRNA in nasopharyngeal carcinoma and therapeutic opportunities [J]. Int J

Biol Sci, 2022, 18(7): 2714-28.

- [5] LIAO B, YI Y, ZENG L, et al. LINC00667 sponges miR-4319 to promote the development of nasopharyngeal carcinoma by increasing FOXQ1 expression [J]. Front Oncol, 2021, 10(1): 632813.
- [6] LIN F J, LIN X D, XU L Y, et al. Long noncoding RNA HOXA11-AS modulates the resistance of nasopharyngeal carcinoma cells to cisplatin via miR-454-3p/c-met [J]. Mol Cells, 2020, 43(10): 856-69.
- [7] ZHENG J, ZHAO Z, REN H, et al. LncRNA HCG11 facilitates nasopharyngeal carcinoma progression through regulating miR-NA-490-3p/MAP3K9 axis [J]. Front Oncol, 2022, 12(1): 872033.
- [8] YAO L, WANG T, WANG X. LncRNA FOXP4-AS1 serves as a biomarker for nasopharyngeal carcinoma diagnosis and prognosis [J]. Biotech, 2021, 11(1): 25.
- [9] LI Z X, ZHENG Z Q, YANG P Y, et al. WTAP-mediated m⁶A modification of lncRNA DIAPH1-AS1 enhances its stability to facilitate nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(6): 1137-51.
- [10] LIU Q, LI J, NG W T, et al. Treatment strategy for *de novo* metastatic nasopharyngeal carcinoma: a literature review [J]. Chin Clin Oncol, 2023, 12(4): 43.
- [11] ZHANG S, LI Y, XIN S, et al. Insight into lncRNA- and circRNA-mediated CeRNAs: regulatory network and implications in nasopharyngeal carcinoma: a narrative literature review [J]. Cancers, 2022, 14(19): 4564.
- [12] LU X, CHEN X, WANG X, et al. Construction of lncRNA and mRNA co-expression network associated with nasopharyngeal carcinoma progression [J]. Front Oncol, 2022, 12(1): 965088.
- [13] YANG H, YANG W, DAI W, et al. LINC00667 promotes the proliferation, migration, and pathological angiogenesis in nonsmall cell lung cancer through stabilizing VEGFA by EIF4A3 [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(8): 1671-80.
- [14] PAN J, ZANG Y. LINC00667 promotes progression of esophageal cancer cells by regulating miR-200b-3p/SLC2A3 axis [J]. Dig Dis Sci, 2022, 67(7): 2936-47.
- ZHANG F, WANG Y. YY1-regulated lncRNA SOCS2-AS1 suppresses HCC cell stemness and progression via miR-454-3p/CPEB1
 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 679(1): 98-109.
- [16] LIAO H, LIANG Y, KANG L, et al. miR-454-3p inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation and metastasis by targeting TGFB2 [J]. Oncol Rep, 2021, 45(5): 67.
- [17] QIAN X L, ZHOU F, XU S, et al. MiR-454-3p promotes oxaliplatin resistance by targeting PTEN in colorectal cancer [J]. Front Oncol, 2021, 11(1): 638537.
- [18] REN Q, XIAO X, LENG X, et al. MicroRNA-361-5p induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis and enhances drug sensitivity by targeting MAP3K9 [J]. Exp Ther Med, 2021, 21(6): 574.
- [19] LIANG L, XU W Y, SHEN A, et al. Promoter methylation-regulated miR-148a-3p inhibits lung adenocarcinoma (LUAD) progression by targeting MAP3K9 [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(11): 2946-55.
- [20] CHEN F, LAO Z, ZHANG H Y, et al. Elevation of miR-125b-5p is related to improved prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma and inhibits the malignancy and glycometabolic disorder by targeting MAP3K9 [J]. Neoplasma, 2022, 69(3): 550-9.