

· 论 著 ·

lncRNA MSC-AS1 通过调节 miR-429/RhoA 轴对人鼻咽癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响*

程莉雅, 吴 洁, 牛金明[△]

潍坊市中医院耳鼻喉科, 山东潍坊 261000

摘 要:目的 探索长链非编码 RNA(lncRNA)MSC-AS1 通过调节微小 RNA(miR)-429/Ras 同源基因家族成员 A(RhoA)轴对人鼻咽癌(NPC)细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响。方法 实时荧光定量 PCR 法(qPCR)检测 NPC 细胞系(CNE-1、HNE2、HONE-1 细胞)以及人鼻咽上皮细胞系 NP69 细胞中 lncRNA MSC-AS1、miR-429、RhoA mRNA 的表达水平。以 CNE-1 细胞为研究对象,将 si-MSC-AS1、miR-429 inhibitor、miR-429 mimics 及相应阴性对照分别转染或共转染 CNE-1 细胞,记为对照组(未转染)、si-NC 组、si-MSC-AS1 组、mimics NC 组、miR-429 mimics 组、si-MSC-AS1 + inhibitor NC 组、si-MSC-AS1 + miR-429 inhibitor 组。MTT 法、流式细胞术、Transwell 分别检测细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力;双荧光素酶实验分别验证 miR-429 与 MSC-AS1、RhoA 的靶向关系;免疫印迹法检测 RhoA、B 淋巴细胞因子相关 x 蛋白(Bax)、上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)、细胞周期素 D1(CyclinD1)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)的表达水平。结果 miR-429 分别与 MSC-AS1、RhoA 存在靶向关系。与 NP69 细胞相比,CNE-1、HNE2、HONE-1 细胞中 MSC-AS1、RhoA mRNA 的表达水平显著增加,miR-429 表达水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组、si-NC 组相比,si-MSC-AS1 组细胞增殖率、迁移和侵袭数、MSC-AS1、N-cadherin、RhoA、CyclinD1 比较表达水平显著下降,细胞凋亡率、E-cadherin、Bax 显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组、mimics NC 组相比,miR-429 mimics 组细胞增殖率、迁移和侵袭数、N-cadherin、RhoA、CyclinD1 表达水平显著下降,细胞凋亡率、miR-429、E-cadherin、Bax 显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);抑制 miR-429 表达水平可减弱干扰 MSC-AS1 对细胞恶性生物学行为的影响($P < 0.05$)。结论 干扰 MSC-AS1 可以抑制 NPC 细胞增殖、侵袭及迁移,促进其凋亡,可能与 miR-429/RhoA 轴有关。

关键词:人鼻咽癌细胞; 增殖; 长链非编码 RNA MSC-AS1; 凋亡; 微小 RNA-429/RhoA 轴

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.22.019

中图法分类号:R739.63

文章编号:1673-4130(2023)22-2789-07

文献标志码:A

Impacts of LncRNA MSC-AS1 on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating the miR-429/RhoA axis*

CHENG Liya, WU Jie, NIU Jinming[△]

Department of Otolaryngology, Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Weifang, Shandong 261000, China

Abstract: Objective To explore the impacts of long non-coding RNA (lncRNA) MSC-AS1 on the proliferation, apoptosis, invasion and migration of human nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells by regulating the microRNA (miR)-429/Ras homologous gene family member A (RhoA) axis. **Methods** real time quantitative Pcr (qPCR) was performed to measure the expression levels of lncRNA MSC-AS1, miR-429 and RhoA mRNA in NPC cell lines (CNE-1, HNE2, HONE-1 cells) and human nasopharyngeal epithelial cell line NP69 cells. Taking CNE-1 cells as the research object, the CNE-1 cells were transfected or co-transfected with si-MSC-AS1, miR-429 inhibitor, miR-429 mimics and corresponding negative controls, which were recorded as control group (untransfected), si-NC group, si-MSC-AS1 group, mimics NC group, miR-429 mimics group, si-MSC-AS1 + inhibitor NC group, and si-MSC-AS1 + miR-429 inhibitor group. MTT method, flow cytometry and Transwell were performed to measure cell proliferation, apoptosis, migration and invasion abilities; dual luciferase experiments were performed to verify the targeting relationship of miR-429 with MSC-AS1 and RhoA;

* 基金项目:潍坊市卫生健康委员会中医药科研项目[2022 年(第 4 类)第 072 号]。

作者简介:程莉雅,女,主治医师,主要从事耳鼻咽喉头颈外科学的基础与临床方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: niujm@sina.com。

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1176.R.20231024.1028.004\(2023-10-25\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1176.R.20231024.1028.004(2023-10-25))

Western blot was performed to measure the expressions of RhoA, B-lymphokine-associated X protein (Bax), epithelial cell cadherin (E-cadherin), cyclin D1 (CyclinD1) and neural cadherin (N-cadherin). **Results** MiR-429 had a targeting relationship with MSC-AS1 and RhoA, respectively. Compared with NP69 cells, the expressions of MSC-AS1 and RhoA mRNA in CNE-1, HNE2, and HONE-1 cells were significantly increased, and the expression of miR-429 was significantly decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group and si-NC group, the cell proliferation rate, the numbers of migration and invasion, the expression level of MSC-AS1, N-cadherin, RhoA and CyclinD1 in si-MSC-AS1 group were significantly decreased, and the cell apoptosis rate, E-cadherin, and Bax were significantly increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); compared with the control group and the mimics NC group, the cell proliferation rate, the numbers of migration and invasion, the expression level of N-cadherin, RhoA and CyclinD1 in miR-429 mimics group were significantly decreased, and the cell apoptosis rate, miR-429, E-cadherin, and Bax were significantly increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); inhibiting the expression level of miR-429 attenuated the effect of interfering with MSC-AS1 on the malignant biological behavior of cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Interfering with MSC-AS1 can inhibit the proliferation, invasion and migration of NPC cells and promote their apoptosis, which may be related to the miR-429/RhoA axis.

Key words: human nasopharyngeal carcinoma cells; proliferation; lncRNA MSC-AS1; apoptosis; microRNA-429/RhoA axis

鼻咽癌(NPC)是一种常见的上喉癌,高发于广东、广西等地区^[1]。该疾病发病隐匿,不易被诊断,大部分鼻咽癌患者被发现时已处于中晚期,随着医疗水平的进步,患者的长期生存率虽然明显增加,但远处转移和局部复发依然会造成患者死亡^[2]。因此,探索NPC的发病机制对于确定最佳治疗方案至关重要。长链非编码RNA(lncRNA)的特征是一组长度超过200个核苷酸的非编码RNA。有研究表明,lncRNA在人类癌症发展中起癌基因或肿瘤抑制因子的作用^[3]。lncRNA MSC-AS1作为lncRNA家族中的一员,在胰腺导管腺癌中显著上调,敲低MSC-AS1可明显抑制癌细胞增殖,但对于其是否在NPC中发挥作用鲜有报道^[4]。近年来的研究表明微小RNA(miRNA)参与癌症的发生和转移,miRNA是20~22个核苷酸的非编码RNA,通过特异性结合和切割mRNA调节其同源靶基因的表达^[5]。据报道miR-429编码基因位于人类染色体1p36.33上,与肿瘤的发生密切相关,在大多数类型的肿瘤如乳腺癌细胞中,miR-429作为一种肿瘤抑制基因^[6]。WANG等^[7]研究发现miR-429过表达抑制了NPC细胞的转移性、增殖和侵袭能力,但具体靶向基因尚不清楚。生物信息网站预测RhoA、MSC-AS1均与miR-429存在靶向关系。因此,本研究旨在探讨lncRNA MSC-AS1通过调节miR-429/RhoA轴对NPC细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 中国科学院上海细胞库提供人鼻咽上皮细胞系NP69细胞及3种NPC细胞系(CNE-1、HNE2、HONE-1)。

1.2 主要试剂、仪器 RNA干扰MSC-AS1(si-MSC-AS1)、miR-429抑制物(miR-429 inhibitor)、miR-429模拟物(miR-429 mimics)及相应阴性对照(si-NC、mimics NC、inhibitor NC)均由广州市锐博生物科技有限公司提供;所有引物由上海生工合成;FBS、RPMI-1640培养基购自Gibco公司;TRIzol试剂盒购自美国Invitrogen公司;Lipofectamine™2000转染试剂盒购自Merck公司;Matrigel基质胶购自BD公司;Transwell小室购自美国密理博公司;结晶紫染色液购自上海碧云天生物技术有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒购自翌圣生物科技有限公司;聚合酶链式反应(PCR)试剂盒购自美国Promega公司;CO₂培养箱购自日本SANYO公司;酶标仪、实时荧光定量PCR(qPCR)仪购自美国Bio-rad公司;RhoA、B淋巴细胞因子相关x蛋白(Bax)、上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)、细胞周期素D1(CyclinD1)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)抗体及羊抗兔IgG二抗均购自Abcam公司。

1.3 细胞培养与转染 将CNE-1、HNE2、HONE-1、NP69细胞在含有10% FBS的RPMI-1640培养基中孵育。并于标准环境(37℃、5% CO₂)中培养。取对数生长期CNE-1细胞,利用Lipofectamine™2000转染试剂盒将si-MSC-AS1、miR-429 mimics、miR-429 inhibitor及相应阴性对照si-NC、mimics NC、inhibitor NC分别转染或共转染至CNE-1细胞,分组记为对照组(未转染)、si-NC组、si-MSC-AS1组、mimics NC组、miR-429 mimics组、si-MSC-AS1 + inhibitor NC组、si-MSC-AS1 + miR-429 inhibitor组。转染48 h后,收集各组细胞进行指标分析。

1.4 qPCR 检测 MSC-AS1、miR-429、RhoA mRNA 表达水平 使用 TRIzol 试剂提取各细胞中的总 RNA,然后应用 PrimeScript 逆转录酶试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板,使用荧光定量试剂盒进行 PCR 扩增。以 U6、GAPDH 为内源性对照,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算 MSC-AS1、miR-429、RhoA mRNA 的相对表达量。见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

引物名称	方向	序列(5'-3')	长度 (bp)
MSC-AS1	反向	AAG CAA CAA CTG TCT GGC CT	154
	正向	TGA TGC CAG CAA ATT GGT GC	
miR-429	反向	AGG TCT CTG AGG GTC AAG CA	116
	正向	CTG GTT GAA AAG CAT GAG CA	
RhoA	反向	CAG CAA GGA CCA GTT CCC AGA	138
	正向	AGC TGT GTC CCA TAA AGC CAA CT	
GAPDH	反向	CCA CAG TCC ATG CCA TCA C	98
	正向	CGT TCA GCT CAG GGA TGA C	
U6	反向	CTC GCT TCG GCA GCA CA	124
	正向	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT	

1.5 MTT 法检测细胞增殖率 取各组细胞分别接种于 96 孔板中,培养 48 h 后,加入 20 μ L MTT 溶液,4 h 后弃上清液,加入 150 μ L DMSO,利用酶标仪检测 490 nm 处的光密度值(A_{600} 值),计算增殖率,增殖率(%)=(实验组 A_{600} 值-空白组 A_{600} 值)/(对照组 A_{600} 值-空白组 A_{600} 值) $\times 100\%$ 。

1.6 Transwell 检测细胞侵袭、迁移 侵袭实验:在无血清培养基中,将各组 CNE-1 细胞接种在顶部的 Transwell 小室中,该小室涂有 Matrigel 基质。底部室涂有含 10% FBS 的培养基。之后固定侵入的细胞,用 1%结晶紫染色并最终通过倒置显微镜进行评估。迁移实验:操作步骤与侵袭实验一致,但 Transwell 小室不涂 Matrigel 基质。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 收集转染 48 h 后的各组细胞分别接种于 24 孔板中(2.5×10^5 个/孔),PBS 小心洗涤 2 次,离心弃上清。将 FITC 膜联蛋白、碘化丙啶添加到每个样品中以对细胞进行染色。24℃下将这些细胞孵育 10 min,然后通过流式细胞仪分析细胞凋亡率、左下角的象限是早期凋亡,右上角的是晚期凋亡。

1.8 双荧光素酶报告基因活性测定 分别构建野生型(WT)和突变型(MUT)的 MSC-AS1、RhoA 3'UTR 荧光素酶报告载体,标记为 WT-MSC-AS1、MUT-MSC-AS1、WT-RhoA、MUT-RhoA,将荧光素酶报告载体分别与 mimics NC 或 miR-429 mimics 共转染 CNE-1 细胞,转染 48 h 后测定荧光素酶活性。

1.9 免疫印迹法检测相关蛋白表达水平 用 RIPA

裂解缓冲液提取各细胞系的总蛋白,并用 BCA 试剂盒检测其浓度。取样 10 μ g 蛋白质上样,并进行 SDS-聚丙烯酰胺电泳(PAGE),将凝胶中的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜,用 5%脱脂牛奶封闭,并与 RhoA、Bax、E-cadherin、CyclinD1、N-cadherin 一抗在 4℃下孵育过夜,然后与羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 2 h。以 β -actin 为内参,Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.10 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计学软件进行数据分析,计数资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用单因素方差分析,进一步两组间的比较行 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各细胞中 MSC-AS1、miR-429、RhoA mRNA 表达水平 与 NP69 细胞相比,CNE-1、HNE2、HONE-1 细胞中 miR-429 表达水平显著降低,MSC-AS1、RhoA mRNA 表达水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),且在 CNE-1 细胞中 MSC-AS1、MCL1 mRNA 表达水平最高,miR-429 表达水平最低。见图 1。

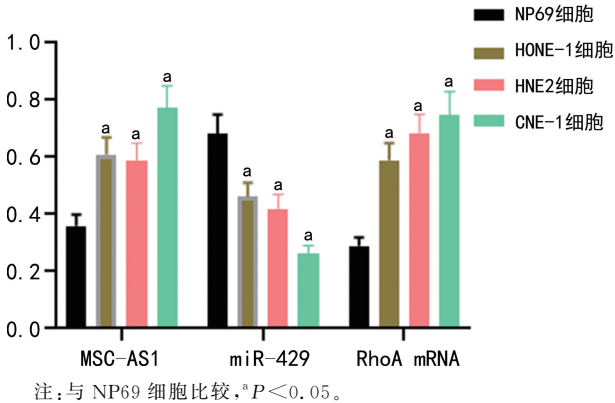


图 1 MSC-AS1、miR-429、RhoA mRNA 在不同细胞中的表达

2.2 干扰 MSC-AS1 对细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移、MSC-AS1 表达水平的影响 与对照组、si-NC 组相比,si-MSC-AS1 组细胞增殖率、侵袭与迁移数以及 MSC-AS1 表达均显著降低,细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2、表 2。

2.3 过表达 miR-429 对细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移及 miR-429 的影响 miR-429 mimics 组细胞增殖率、侵袭与迁移数较对照组、mimics NC 组均显著降低,细胞凋亡率、miR-429 表达水平较对照组、mimics NC 组显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3、表 3。

2.4 抑制 miR-429 减弱了干扰 MSC-AS1 对细胞增殖、凋亡和侵袭、迁移的影响 与 si-MSC-AS1 + inhibitor NC 组相比,si-MSC-AS1 + miR-429 inhibitor 组细胞增殖率、侵袭与迁移数均显著增加,细胞凋亡率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4、表 4。

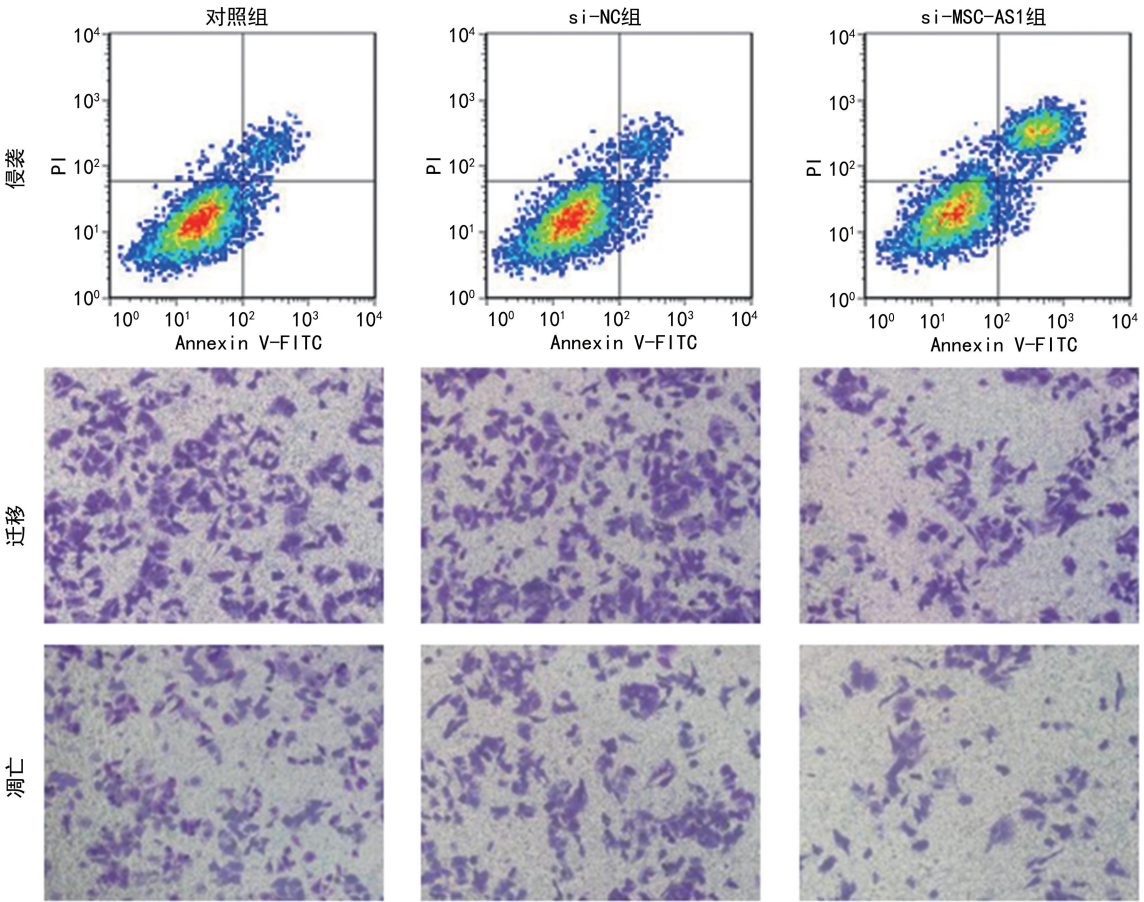


图 2 各组细胞凋亡、迁移与侵袭图 ($\times 400$)

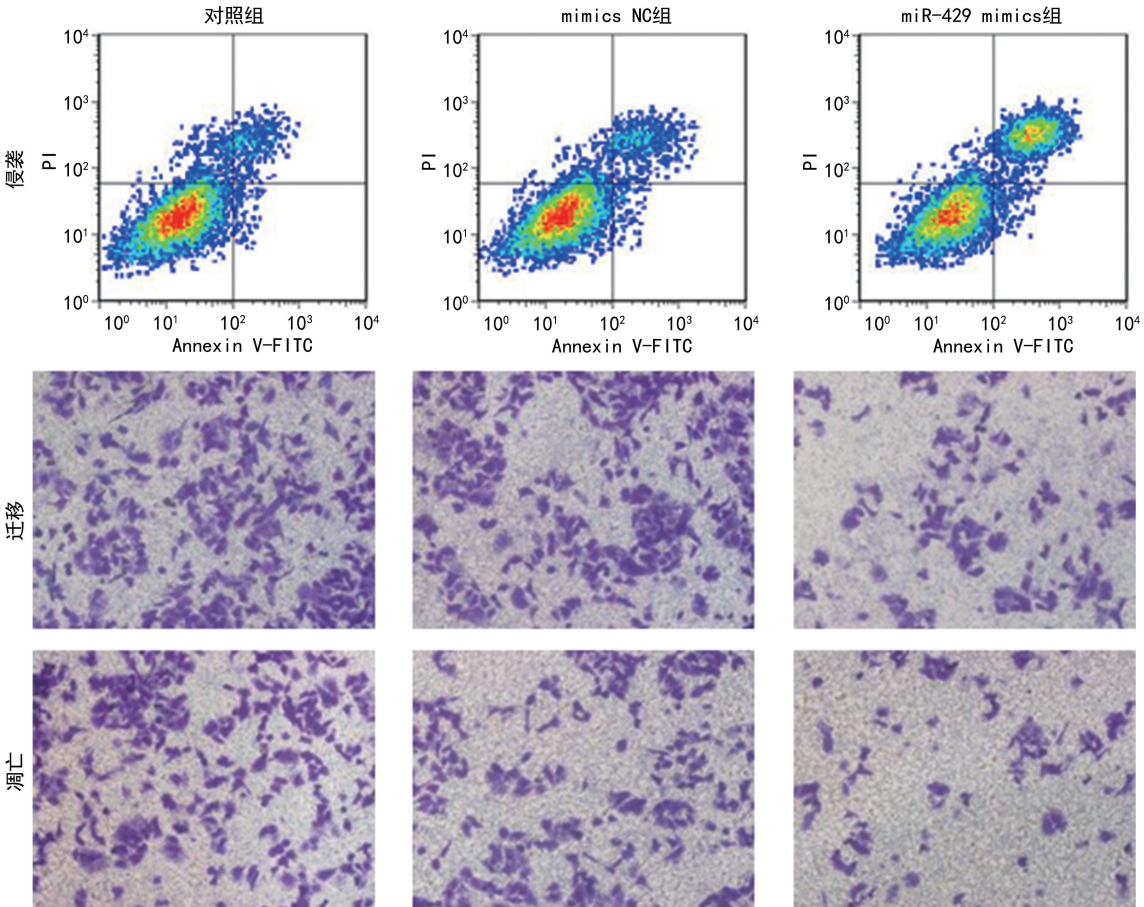


图 3 各组细胞凋亡、迁移与侵袭图 ($\times 400$)

表 2 干扰 MSC-AS1 对细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移、MSC-AS1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MSC-AS1	增殖率(%)	凋亡率(%)	迁移数(个)	侵袭数(个)
对照组	0.77±0.08	100.00±0.00	6.24±0.63	215.34±21.64	164.31±16.48
si-NC 组	0.79±0.08	90.08±9.01	6.27±0.63	214.68±21.58	165.24±16.64
si-MSC-AS1 组	0.29±0.03 ^{ab}	57.34±5.75 ^{ab}	28.34±2.84 ^{ab}	97.42±9.81 ^{ab}	53.48±5.44 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 si-NC 组比较,^b $P<0.05$ 。

表 3 过表达 miR-429 对细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移、miR-429 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	miR-429	增殖率(%)	凋亡率(%)	迁移数(个)	侵袭数(个)
对照组	0.77±0.08	100.00±0.00	6.24±0.63	221.02±22.11	168.06±16.92
mimics NC 组	0.75±0.08	90.21±9.03	6.31±0.64	219.84±22.08	166.37±16.71
miR-429 mimics 组	0.97±0.10 ^{ab}	55.89±5.65 ^{ab}	29.11±2.92 ^{ab}	96.34±9.68 ^{ab}	52.57±5.31 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 mimics NC 组比较,^b $P<0.05$ 。

表 4 抑制 miR-429 减弱了干扰 MSC-AS1 对细胞增殖、凋亡、侵袭与迁移的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	增殖率(%)	凋亡率(%)	迁移数(个)	侵袭数(个)
si-MSC-AS1+inhibitor NC 组	57.46±5.76	28.29±2.91	97.39±9.79	53.39±5.42
si-MSC-AS1+miR-429 inhibitor 组	78.68±7.92 ^a	16.08±1.62 ^a	145.34±15.48 ^a	96.38±9.65 ^a

注:与 si-MSC-AS1+inhibitor NC 组比较,^a $P<0.05$ 。

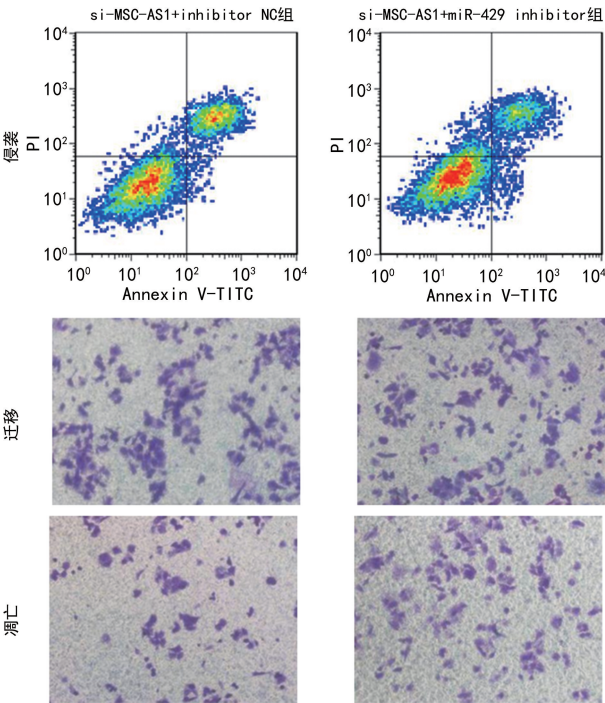


图 4 各组细胞凋亡、迁移与侵袭图($\times 400$)

2.5 验证 miR-429 与 MSC-AS1、RhoA 靶向关系
通过 Starbase 数据库预测 miR-429 与 MSC-AS1、RhoA 均存在结合位点,见图 5、图 7。

荧光素酶相对活性比较:miR-429 mimics+WT-MSC-AS1 组较 mimics NC+WT-MSC-AS1 组显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),miR-429 mimics+MUT-MSC-AS1 组与 mimics NC+MUT-MSC-AS1 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 6;miR-429 mimics+WT-RhoA 组较 mimics NC+WT-RhoA 组显著降低,差异有统计学意义($P<$

0.05),miR-429 mimics+MUT-RhoA 组较 mimics NC+MUT-RhoA 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 8。

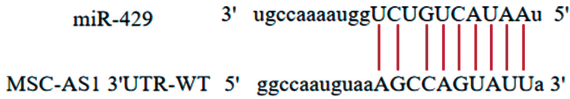
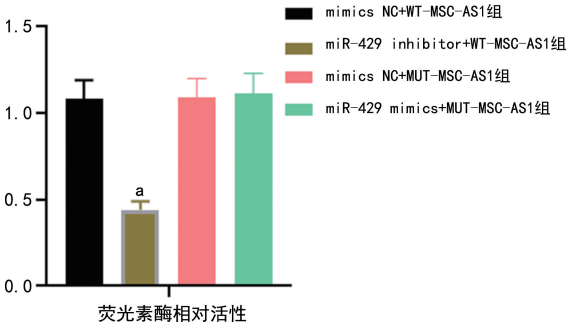


图 5 Starbase 数据库预测 miR-429 与 MSC-AS1 的结合位点



注:与 mimics NC+WT-MSC-AS1 组比较,^a $P<0.05$ 。

图 6 验证 miR-429 与 MSC-AS1 的靶向关系

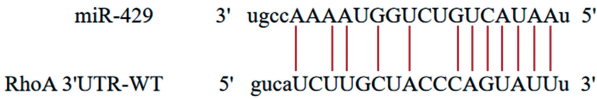
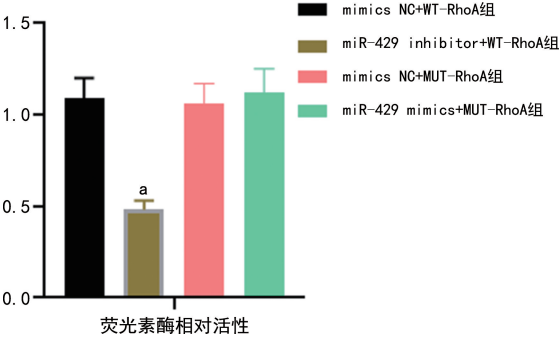


图 7 Starbase 数据库预测 miR-429 与 RhoA 的结合位点

2.6 免疫印迹法检测各组细胞中相关蛋白表达水平
与对照组、si-NC 组相比,si-MSC-AS1 组细胞中 RhoA、N-cadherin、CyclinD1 表达水平显著下降,Bax、E-cadherin 表达显著增加,差异有统计学意义

($P<0.05$)；与对照组、mimics NC 组相比，miR-429 mimics 组细胞中 RhoA、N-cadherin、CyclinD1 表达水平显著下降，Bax、E-cadherin 表达水平显著增加，差异有统计学意义($P<0.05$)；与 si-MSC-AS1 + inhibitor NC 组相比，si-MSC-AS1 + miR-429 inhibitor 组 RhoA、N-cadherin、CyclinD1 表达水平显著增加，Bax、E-cadherin 表达显著降低，差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 9、10。



注：与 mimics NC+WT-RhoA 组比较，^a $P<0.05$ 。

图 8 验证 miR-429 与 RhoA 的靶向关系

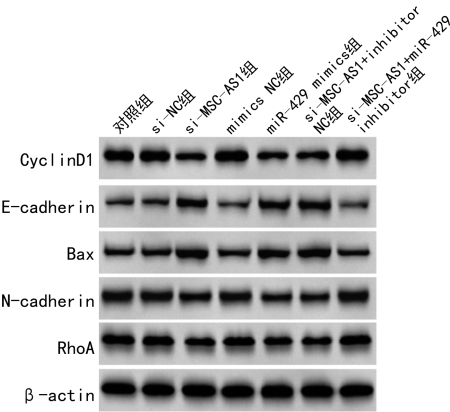
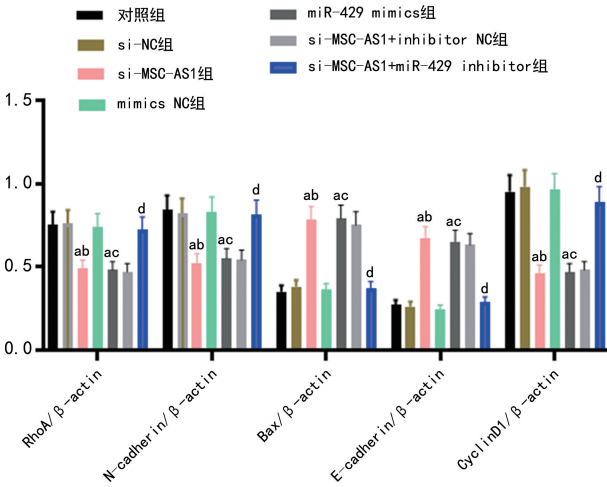


图 9 各组细胞相关蛋白表达 Western blot 结果



注：与对照组比较，^a $P<0.05$ ，与 si-NC 组比较，^b $P<0.05$ ；与 mimics NC 组比较，^c $P<0.05$ ；与 si-MSC-AS1 + inhibitor NC 组比较，^d $P<0.05$ 。

图 10 比较各组细胞中相关蛋白的表达水平

3 讨论

NPC 被认为是高发恶性肿瘤之一，常出现在鼻咽

腔侧壁或顶部，主要症状是鼻塞、听力下降等^[8]。目前的首选治疗方法是放化疗同步实施，但由于诊断时几乎处于中晚期再加之恶性程度较高，故生存率低、预后不佳成为目前 NPC 关注的焦点^[9]。因此明确 NPC 的发病机制对于找寻新靶点、改善 NPC 患者预后意义重大。

有研究发现某些 lncRNA 的表达水平改变与 NPC 的发展过程密切相关，目前已经发现了多种 lncRNA 参与调节 NPC 细胞生长、凋亡、迁移和侵袭^[10]。张余良等^[11]研究发现在 HONE-1 细胞研究中 lncRNA JPX 处于高表达，下调 lncRNA JPX 表达水平可以抑制 HONE-1 细胞增殖、侵袭。MSC-AS1 是新发现的 lncRNA，但却参与许多肿瘤进展。HU 等^[12]报道 MSC-AS1 通过调节 miR-3924/WNT5A/β-catenin 轴参与肾透明细胞癌的增殖和迁移。在卵巢癌研究中^[13]，过表达 MSC-AS1 能够显著促进 A2780 和 SKOV3 细胞凋亡、抑制细胞增殖。值得注意的是，在 NPC 组织和细胞中 MSC-AS1 表达水平呈现上调^[14]，促进 NPC 细胞增殖，阻碍了细胞凋亡，并促进了侵袭和上皮间质转化，提示 MSC-AS1 有望作为 lncRNA 靶向治疗 NPC 的新靶点。YAO 等^[14]研究发现在 NPC 组织及癌细胞系中 MSC-AS1 表达水平上调，可作为治疗 NPC 的潜在靶点。本研究发现与 NP69 细胞相比，MSC-AS1 表达水平在 CNE-1 细胞中最高，干扰 MSC-AS1 抑制了 CNE-1 细胞增殖、迁移和侵袭以及增殖相关蛋白 CyclinD1、间质标记蛋白 N-cadherin 表达水平，提高细胞凋亡率以及上皮标记蛋白 E-cadherin、凋亡相关蛋白 Bax 表达，提示干扰 MSC-AS1 可在 CNE-1 细胞中发挥抑癌作用。

miRNA 是一组具有约 22 个核苷酸的非编码 RNA，通过与 mRNA 的碱基配对，可作为基因表达的调节剂。有研究已经指出 miRNA 与 NPC 进展的相关性^[15]。miR-429 是 miRNA 家族中一员，在膀胱癌、胃癌中均作为肿瘤抑制因子^[16-17]。但 ZHANG 等^[18]研究证明在鼻咽癌患者采集的鼻咽组织中发现 miR-429 下调，miR-429 增加有利于鼻咽癌预后。本研究发现 miR-429 在 CNE-1 细胞中表达水平显著降低，过表达 miR-429 抑制了 CNE-1 细胞增殖、迁移、侵袭以及 N-cadherin、CyclinD1 表达水平，促进细胞凋亡以及 E-cadherin、Bax 表达水平，提示 miR-429 参与 NPC 的发展过程。RhoA 是调节细胞迁移最重要的蛋白质之一，在调节细胞形态、基质黏附方面发挥着至关重要的作用^[19]。WU 等^[20]研究发现汉防己甲素可以通过抑制 RhoA 信号通路，降低鼻咽癌细胞迁移、侵袭。WANG 等^[21]发现 NPC 患者中，RhoA 表达水平增加，与患者不良预后显著相关。本研究结果发现 RhoA mRNA 在 CNE-1 细胞中显著增加，过表达 miR-429 或干扰 MSC-AS1 均使 RhoA 表达水平下降，提示抑制该蛋白表达可能有助于抑制 CNE-1 细

胞的恶性生物学行为。本研究还发现 miR-429 与 MSC-AS1、RhoA 均存在靶向关系,为进一步验证上述猜想,引入 miR-429 inhibitor 做回复实验,结果发现抑制 miR-429 表达可减弱干扰 MSC-AS1 对 CNE-1 细胞恶性生物学行为的影响。

综上所述, MSC-AS1 在 CNE-1 细胞中呈高表达,干扰 MSC-AS1 通过负调控 miR-429,降低 RhoA 表达水平,抑制 CNE-1 细胞的增殖、侵袭和迁移,促进其凋亡,为 NPC 防治的潜在有效靶点,但缺少蛋白质体外结合实验证实靶向关系是文章的不足之处,后续研究中将会将添加该实验,进一步证实实验结论。

参考文献

- [1] YANG J, FENG E, REN Y, et al. Long non-coding (lnc) RNA profiling and the role of a key regulator lnc-PNRC2-1 in the transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of CNE1 nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Int Med Res, 2021, 49(3): 300060521996515.
- [2] CHEN Y P, CHAN A T C, LE Q T, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. Lancet, 2019, 394(10192): 64-80.
- [3] 袁小卫, 王彦君, 熊健, 等. lncRNA PROX1-AS1 负调控 miR-206 对鼻咽癌细胞 SUNE1 增殖、迁移、侵袭的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(11): 1644-1648.
- [4] SUN Y, WANG P, YANG W, et al. The role of lncRNA MSC-AS1/miR-29b-3p axis-mediated CDK14 modulation in pancreatic cancer proliferation and Gemcitabine-induced apoptosis [J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(6): 729-739.
- [5] HAN J Y, GUO S, WEI N, et al. ciRS-7 promotes the proliferation and migration of papillary thyroid cancer by negatively regulating the miR-7/Epidermal growth factor receptor axis [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 9875636.
- [6] YE Z B, MA G, ZHAO Y H, et al. miR-429 inhibits migration and invasion of breast cancer cells in vitro [J]. Int J Oncol, 2015, 46(2): 531-538.
- [7] WANG Z, ZHU Z, LIN Z, et al. miR-429 suppresses cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma by downregulation of TLN1 [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 115.
- [8] BLANCHARD P, NGUYEN F, MOYA-PLANA A, et al. New developments in the management of nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Radiother, 2018, 22(6-7): 492-495.
- [9] 谢天飞, 王凌云, 刘丽, 等. 干扰长链非编码 RNA AFAP1-AS1 抑制人鼻咽癌 HNE2 细胞增殖, 侵袭及体内移植瘤形成的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(22): 2742-2746.
- [10] XUE M Y, CAO H X. Long non-coding RNA CASC15 promotes nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and metastasis by downregulating miR-101-3p [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(20): 8897-8904.
- [11] 张余良, 杨杰, 刘术舟, 等. 长链非编码 RNA JPX 对鼻咽癌增殖和侵袭的影响及机制研究 [J]. 华中科技大学学报, 2021, 50(4): 478-482.
- [12] HU Z, LI L, CHENG P, et al. lncRNA MSC-AS1 activates Wnt/ β -catenin signaling pathway to modulate cell proliferation and migration in kidney renal clear cell carcinoma via miR-3924/WNT5A [J]. J Cell Biochem, 2020, 121(10): 4085-4093.
- [13] ZHAO Y, YUAN D, ZHU D, et al. LncRNA-MSC-AS1 inhibits the ovarian cancer progression by targeting miR-425-5p [J]. J Ovarian Res, 2021, 14(1): 109.
- [14] YAO H, YANG L, TIAN L, et al. LncRNA MSC-AS1 aggravates nasopharyngeal carcinoma progression by targeting miR-524-5p/nuclear receptor subfamily 4 group A member 2 (NR4A2) [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 138.
- [15] GAO C, LU W, LOU W, et al. Long noncoding RNA HOXC13-AS positively affects cell proliferation and invasion in nasopharyngeal carcinoma via modulating miR-383-3p/HMGA2 axis [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 12809-12820.
- [16] WU C L, HO J Y, HUNG S H, et al. miR-429 expression in bladder cancer and its correlation with tumor behavior and clinical outcome [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2018, 34(6): 335-340.
- [17] YANG Y, KANG W, YUAN Y, et al. circ-0007707/miR-429/PDGFR Pathway Regulates the Progression of Gastric Cancer by Modulating the Immune-Gene Signatures [J]. J Oncol, 2022, 2022: 2214686.
- [18] ZHANG T, TANG Y, JIN Y, et al. Downregulation of miRNA-429 and upregulation of SOX2 were unfavorable to the prognosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(16): 8402-8407.
- [19] YUAN J, CHEN L, XIAO J, et al. SHROOM2 inhibits tumor metastasis through RhoA-ROCK pathway-dependent and -independent mechanisms in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 58.
- [20] WU S H, CHUEH F S, CHOU Y C, et al. Tetrandrine inhibits cell migration and invasion in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW 039 cells through inhibiting MAPK and RhoA signaling pathways [J]. J Food Biochem, 2020, e13387.
- [21] WANG J, ZHONG Q, ZHANG H, et al. Nogo-B promotes invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma via RhoA-SRF-MRTFA pathway [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(1): 76.

(收稿日期: 2023-01-30 修回日期: 2023-05-29)