

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.03.007
文章编号: 1005-8982 (2023) 03-0038-10

实验研究·论著

LncRNA MALAT-1 靶向 microRNA-370-3p 调节 Akt 通路对肺癌细胞生物学行为影响的机制研究*

李亮, 李建忠, 张丹杰, 马跃峰, 李少民

(西安交通大学第二附属医院 胸外科, 陕西 西安 710004)

摘要: 目的 探讨长链非编码RNA肺腺癌转移相关转录因子-1(LncRNA MALAT-1)是否能靶向调节microRNA-370-3p(miR-370-3p)的表达,以及对Akt通路和肺癌细胞生物学行为的影响。**方法** 选用非小细胞肺癌(NSCLC)A549细胞体外培养,分别抑制LncRNA MALAT-1(转染si-MALAT-1)或过表达miR-370-3p(转染miR-370-3p mimic),抑制LncRNA MALAT-1和干扰miR-370-3p(同时转染si-MALAT-1和anti-miR-370-3p),观察A549细胞的生物学行为和Akt通路蛋白的表达。qRT-PCR检测LncRNA MALAT-1、miR-370-3p mRNA的表达;MMT法检测细胞增殖;流式细胞术检测细胞凋亡;Transwell实验检测细胞迁移与侵袭;Western blotting检测Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K蛋白相对表达量。构建MALAT-1野生型(MALAT-1^{WT}_1uc)与突变型(MALAT-1^{MUT}_1uc)荧光素酶报告基因质粒并分别与miR-370-3p、miR-NC转染至A549细胞,观察荧光结合强度并检测miR-370-3p的表达。**结果** 抑制LncRNA MALAT-1或过表达miR-370-3p能抑制A549细胞迁移、侵袭,促进细胞凋亡,减少A549细胞活性($P < 0.05$),并下调p-Akt和p-PI3K蛋白的表达($P < 0.05$)。与单纯抑制LncRNA MALAT-1比较,抑制LncRNA MALAT-1并干扰miR-370-3p能促进A549细胞迁移、侵袭,抑制细胞凋亡,增加A549细胞活性($P < 0.05$),并上调p-Akt和p-PI3K蛋白的表达($P < 0.05$)。TargetScan靶基因预测发现LncRNA MALAT-1与miR-370-3p存在结合位点,荧光素酶报告基因实验验证发现,与MALAT-1^{WT}_1uc+Control组和MALAT-1^{WT}_1uc+miR-NC组比较,MALAT-1^{WT}_1uc+miR-370-3p组相对荧光强度下降($P < 0.05$),MALAT-1^{MUT}_1uc+miR-370-3p荧光强度无变化($P > 0.05$),进一步qRT-PCR结果发现,与Control组比较,si-MALAT-1组的miR-370-3p mRNA相对表达量升高($P < 0.05$),与si-MALAT-1组比较,si-MALAT-1+anti-miR-370-3p组的miR-370-3p mRNA相对表达量降低($P < 0.05$)。**结论** LncRNA MALAT-1可以靶向负调控miR-370-3p。抑制LncRNA MALAT-1可以上调miR-370-3p的表达,抑制A549细胞的增殖、迁移及侵袭,促进A549细胞的凋亡,并下调Akt通路蛋白的磷酸化。

关键词: 肺癌; microRNA-370-3p; 长链非编码RNA肺腺癌转移相关转录因子-1; 荧光素酶报告基因实验; Akt

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Mechanism research of LncRNA MALAT-1 targeting microRNA-370-3p on biological behavior of lung cancer cells by regulating Akt*

Li Liang, Li Jian-Zhong, Zhang Dan-Jie, Ma Yue-Feng, Li Shao-Min

(Department of Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China)

收稿日期: 2022-09-29

* 基金项目: 陕西省自然科学基金面上项目(No: 2021JM-296)

Abstract: Objective To investigate whether long-non-coding RNA metastasis associated lung adenocarcinoma transcript-1 (LncRNA MALAT-1) can target and regulate the expression of microRNA-370-3p (miR-370-3p) and affect Akt pathway and biological behavior of lung cancer cells. **Methods** A549 NSCLC cells were cultured in vitro, inhibit LncRNA MALAT-1 (transfection of si-MALAT-1), or overexpression of miR-370-3p (transfection of miR-370-3p mimic), and inhibit LncRNA MALAT-1 and interfere with miR-370-3p (transfection of si-LncRNA MALAT-1 and anti-miR-370-3p), respectively. The biological behavior of A549 cells and the expression of Akt pathway protein were observed. RT-PCR was used to detect the expression of RNA, MMT was used to detect cell proliferation, flow cytometry was used to detect cell apoptosis, Transwell experiment was used to detect cell migration and invasion, and Western blotting was used to detect the expression of Akt, p-Akt, PI3K and p-PI3K proteins. MALAT-1 wild type (MALAT-1^{WT}_luc) and mutant (MALAT-1^{MUT}_luc) luciferase reporter gene plasmids were constructed and transfected into A549 cells with miR-370-3p and miR-NC respectively. The fluorescence binding intensity was observed and the expression of miR-370-3p was detected. **Results** Inhibition of LncRNA MALAT-1 or overexpression of miR-370-3p can inhibit the migration and invasion of A549 cells, promote cell apoptosis, reduce the activity of A549 cells ($P < 0.05$), and down-regulate the expression of p-Akt and p-PI3K proteins ($P < 0.05$). Compared with single inhibition of LncRNA MALAT-1, simultaneous inhibition of LncRNA MALAT-1 and interference of miR-370-3p can improve the proliferation, migration, and invasion activities of A549 cells, reduce apoptosis, and up-regulate p-Akt and p-PI3K protein expression ($P < 0.05$). Targetsca target gene prediction found that LncRNA MALAT-1 has a binding site with miR-370-3p, and the luciferase reporter gene experiment verified that the relative fluorescence intensity of MALAT-1^{WT}_luc + miR-370-3p group decreased ($P < 0.05$). Compared with MALAT-1^{WT}_luc + control group and MALAT-1^{WT}_luc + miR-NC group, while the fluorescence intensity of MALAT-1^{MUT}_luc + miR-370-3p did not change ($P > 0.05$). Further qRT-PCR results showed that the relative expression of miR-370-3p mRNA in si-MALAT-1 group was higher than that in control group ($P < 0.05$), and the relative expression of miR-370-3p mRNA in si-MALAT-1 + anti-miR-370-3p group was lower than that in si-MALAT-1 group ($P < 0.05$). **Conclusion** LncRNA MALAT-1 can target and negatively regulate the expression of miR-370-3p. Inhibiting LncRNA MALAT-1 can up regulate miR-370-3p, inhibit the proliferation, migration, and invasion of A549 cells, aggravate the apoptosis of A549 cells, and down regulate the phosphorylation of Akt pathway protein.

Keywords: lung neoplasms; microRNA-370-3p; long-non-coding RNA metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1; luciferase reporter gene experiment; Akt kinase

肺癌是全世界范围内发病率最高的恶性肿瘤,其中85%的肺癌患者为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[1]。肺癌的临床治疗以手术、放疗、化疗、靶向治疗为主,这些方法虽然在一定程度上能延长患者的生存期,但肺癌患者的预后仍然不容乐观,文献报道其5年总生存率仅为15%左右^[2],因此有必要对肺癌的发病机制进行深入研究并寻找新的靶点。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)近年来被发现参与多种恶性肿瘤的增殖和转移,多个文献报道LncRNA在乳腺癌^[3]、肝癌^[4]、胰腺癌^[5]、肺癌^[6]等多种癌组织中高表达,LncRNA肺腺癌转移相关转录因子-1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT-1)是肺癌的特异性标志物,LncRNA MALAT1高表达是肺癌不良预后的预测因素之一^[7]。微小RNA(microRNA, miR)是一种广泛存在于细胞中的非编码RNA,miR是LncRNA MALAT1的靶基因之一,

LncRNA MALAT1可以通过与有靶向结合位点的miR靶基因相结合,调节其转录或翻译水平,进一步参与肿瘤的发生发展。已有相关研究^[8]报道LncRNA可以通过与下游miR结合调控恶性肿瘤的发生、发展。Akt激酶信号通路途径是影响肺癌细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的重要通路。目前关于LncRNA MALAT1与miR-370-3p在肺癌中是否存在相互作用尚不可知,本研究拟观察LncRNA MALAT1是否可以通过靶向结合miR-370-3p影响肺癌细胞的生长与凋亡,并检测下游Akt通路蛋白的表达变化,探究其是否对该通路存在影响作用,以期为肺癌的机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

人肺癌细胞A549由上海细胞资源中心提供,DMEM培养液、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶购自美国

ThermoFisher 公司, 荧光素酶检测试剂盒购自上海汉恒生物科技有限公司, LncRNA MALAT-1 siRNA (si-MALAT-1) 及其阴性对照 (si-MALAT-1-NC)、pcDNA-MALAT-1、miR-370-3p 模拟物 (miR-370-3p mimic) 和抑制剂 (miR-370-3p inhibitor) 及其阴性对照序列 (miR-NC) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 转染试剂盒购自美国 Thermo 公司, Akt 单克隆抗体、p-Akt 单克隆抗体、PI3K 单克隆抗体、p-PI3K 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶购自北京中杉金桥公司, 膜联蛋白 (Annexin) V-FITC/碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。主要仪器: 二氧化碳培养箱购自常州恒隆仪器有限公司, 酶标仪购自美国 Thermo 公司, BSC-1100IIA2-X 生物安全柜购自济南欧莱博科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺癌细胞 A549 培养于含有 10% FBS 的 DMEM 培养液中, 置于 37℃、5% 二氧化碳恒温箱中, 当细胞生长至融合度 80% 以上开始传代实验。收集对数期 A549 细胞制成细胞悬液, 并接种在 24 板孔中。

1.2.2 分组 ①抑制 LncRNA MALAT-1 或过表达 miR-370-3p 对肺癌细胞增殖、迁移、凋亡及 Akt 通路的影响: 随机分为对照组 (Control 组, 不转染)、si-NC 组 (转染 si-MALAT-1 NC)、si-MALAT-1 组 (转染 si-MALAT-1)、mi-NC 组 (转染 miR-NC)、miR-370-3p 组 (转染 miR-370-3p mimic)。②抑制 LncRNA MALAT-1 并干扰 miR-370-3p 对肺癌细胞增殖、迁移、凋亡及 Akt 通路的影响: 随机分为对照组 (Control 组, 不转染)、si-NC 组 (转染 si-MALAT-1 NC)、si-MALAT-1 组 (转染 si-MALAT-1)、si-MALAT-1+anti-miR-NC 组 (同时转染 si-MALAT-1 和 anti-miR-NC)、si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组 (同时转染 si-MALAT-1 和 anti-miR-370-3p)。所有转染操作严格按照 Lipofectmine 2000 说明书进行, 各组细胞转染 6 h 后更换新的含有青霉素/链霉素的 10% FBS DMEM 培养液继续培养 72 h, 分别于 24 h、48 h、72 h 进行细胞收集。

1.2.3 双荧光素酶报告基因检测 首先使用预测软件 TargetScan 和 miRanda 进行靶基因预测, 检查 LncRNA MALAT-1 与 miR-370-3p 是否存在结合位

点, 再分别构建 MALAT-1 野生型 (MALAT-1^{WT}_luc) 与突变型 (MALAT-1^{MUT}_luc) 荧光素酶报告基因质粒。然后将培养的 A549 细胞接种于 24 孔板, 继续培养过夜, 待完全贴壁后采用脂质体转染法进行转染, 分别将带有 MALAT-1^{WT}_luc、MALAT-1^{MUT}_luc 双报告基因质粒和 miR-370-3p、miR-NC 转染至 A549 细胞中, 转染 48 h 后检测萤火虫荧光素酶 (Firefly) 和海肾 (Renilla) 的荧光强度, 以二者的比值 (Firefly/Renilla) 衡量相对活性, 反映 LncRNA MALAT-1 和 miR-370-3p 的结合情况。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 LncRNA MALAT-1、miR-370-3p 表达 细胞培养液 1 000 r/min 离心 5 min, 取下层细胞沉淀, 加入 1 mL TRIzol 液吹打均匀后移入 EP 管, 室温放置 5 min, 然后 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。测定纯度时加入 Buffer 溶解, 计算 A260/A280 比值, 比值处于 1.6 ~ 1.8, 最后调整 RNA 浓度至 100 μg/mL。按照试剂盒说明书配制总反应体系 20 μL (2 μL 逆转录引物、2 μL 逆转录酶、2 μL dNTPs、0.5 μL RNA 酶抑制剂、4 μL RT Buffer、9.5 μL ddH₂O) 进行逆转录, 逆转录条件: 42℃ 逆转录 30 min、85℃ 酶失活反应 5 min, 置入 -20℃ 冰箱冷冻保存。再进行 qRT-PCR, 按照试剂盒说明书配制总反应体系 20 μL (2 μL 正向引物、2 μL 反向引物、2 μL cDNA、10 μL PCR master mix、4 μL ddH₂O), 反应条件: 95℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 15 s, 58℃ 退火 30 s, 58℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。设置 3 个重复孔, GAPDH 为内参对照, 以 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.5 Transwell 实验检测细胞侵袭与迁移 侵袭实

表 1 引物序列

| 基因名称 | 引物序列 | 引物长度/bp |
|----------------|------------------------------------|---------|
| LncRNA MALAT-1 | 正向: 5'-GTCTTTTCAGGCTATTGTCGAG-3' | 22 |
| | 反向: 5'-CTGAAGTGGAGGCCCTTCACCTTC-3' | 24 |
| miR-370-3p | 正向: 5'-TGTAACCAGAGACGGGATGT-3' | 21 |
| | 反向: 5'-TTTTGGCATAACTAAGCCCGAA-3' | 22 |
| GAPDH | 正向: 5'-ACACCCACTCCTCCACCTTT-3' | 20 |
| | 反向: 3'-TTACTCCTTGAGGCCATGT-5' | 20 |

实验:采用含0.1% FBS的DMEM培养基培养细胞24 h,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于含有基质胶的Transwell小室的上室中,在下室中加入500 μL 含有10% FBS的DMEM培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳培养箱中培养24 h,取出小室,弃去培养液,PBS缓冲液冲洗3遍,多聚甲醛固定30 min,0.1%结晶紫染色20 min,棉签擦去上层未迁移细胞,PBS缓冲液冲洗3遍,显微镜下随机选取10个视野进行细胞计数。迁移实验:用不含FBS的DMEM培养基重悬制备细胞悬液,将其重悬后接种于Transwell小室的上室中,其他操作与侵袭实验相同。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 取各组细胞加入0.25%胰蛋白酶消化并制成细胞悬液,以每管 1×10^6 个细胞加入流式离心管,培养48 h后,加入10 μL Annexin V-FITC,混匀后在冰上避光孵育30 min,再加入5 μL PI,涡旋混匀,冰上孵育5 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.7 MMT法检测细胞增殖活性 取对数期细胞加入0.25%胰蛋白酶消化并制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于96孔板(每孔100 μL),培养48 h后于每孔中加入20 μL 的MTT溶液(5 mg/mL),室温下孵育4 h,再加入150 μL 的DMSO,震荡10 min,用酶标仪读取490 nm波长处各孔的光密度值(OD)。细胞存活率= $(\text{OD}_{\text{实验孔}} - \text{OD}_{\text{空白孔}}) / (\text{OD}_{\text{对照孔}} - \text{OD}_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.2.8 Western blotting法检测Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K蛋白相对表达量 Tris法提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,配置10% SDS-PAGE凝胶,取20 μL 样品上样,120 V垂直电泳60 min,转膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育1 h,显影后

进行曝光洗片,以 β -actin为内参,采用Image J软件计算每个条带的光密度值,以目的蛋白的灰度值/GAPDH灰度值表示蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 20.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,进一步两两比较用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制LncRNA MALAT-1或过表达miR-370-3p各组LncRNA MALAT-1 mRNA、迁移细胞数、侵袭细胞数及细胞凋亡率的比较

qRT-PCR结果显示,细胞迁移、侵袭及凋亡实验结果显示,Control组、si-NC组及si-MALAT-1组的LncRNA MALAT-1 mRNA相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$),与Control组和si-NC组比较,si-MALAT-1组的LncRNA MALAT-1 mRNA相对表达量下降($P < 0.05$),见表1。细胞迁移、侵袭及凋亡实验结果显示,Control组、si-NC组、si-MALAT-1组、miR-NC组及miR-370-3p组的迁移细胞数、侵袭细胞数及细胞凋亡率比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);与Control组比较,si-MALAT-1组和miR-370-3p组迁移细胞数、侵袭细胞数减少($P < 0.05$),细胞凋亡率升高($P < 0.05$),与miR-NC组比较,miR-370-3p组迁移细胞数、侵袭细胞数减少($P < 0.05$),细胞凋亡率升高($P < 0.05$)。见表2和图1~3。

2.2 各组不同时间点细胞增殖活性的比较

MMT法检测结果显示,培养24 h、48 h、72 h后,

表2 各组LncRNA MALAT-1 mRNA、迁移细胞数、侵袭细胞数及细胞凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | LncRNA MALAT-1 mRNA | 迁移细胞数/个 | 侵袭细胞数/个 | 细胞凋亡率/% |
|-------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Control组 | 1.00 \pm 0.02 | 156.39 \pm 5.41 | 120.20 \pm 6.38 | 4.08 \pm 0.33 |
| si-NC组 | 0.98 \pm 0.03 | 150.67 \pm 6.52 | 125.88 \pm 7.16 | 4.03 \pm 0.17 |
| si-MALAT-1组 | 0.42 \pm 0.06 ^{①②} | 64.36 \pm 4.73 ^{①②} | 70.53 \pm 5.62 ^{①②} | 12.92 \pm 0.21 ^{①②} |
| miR-NC组 | - | 150.84 \pm 5.23 | 130.99 \pm 6.81 | 4.79 \pm 0.33 |
| miR-370-3p组 | - | 52.68 \pm 4.35 ^{①③} | 60.77 \pm 5.06 ^{①③} | 11.96 \pm 1.17 ^{①③} |
| F值 | 9.206 | 22.015 | 18.902 | 12.569 |
| P值 | 0.021 | 0.001 | 0.002 | 0.009 |

注:①与Control组比较, $P < 0.05$;②与si-NC组比较 $P < 0.05$;③与miR-NC组比较 $P < 0.05$ 。

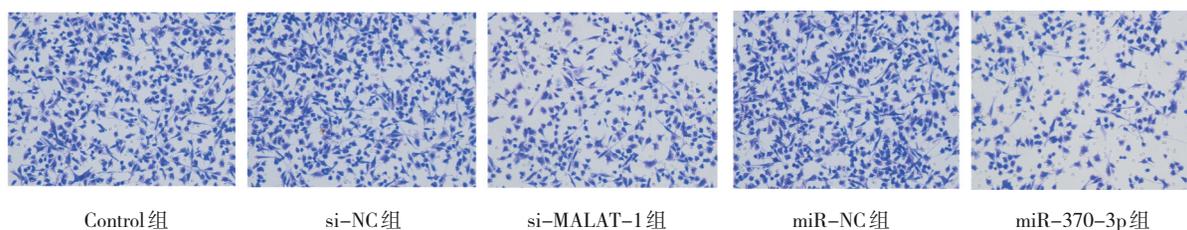


图 1 各组 A549 细胞的迁移情况 (结晶紫染色 × 200)

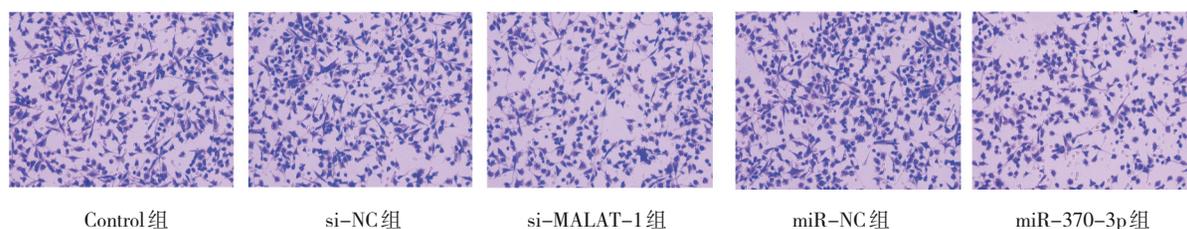


图 2 各组 A549 细胞的侵袭情况 (结晶紫染色 × 200)

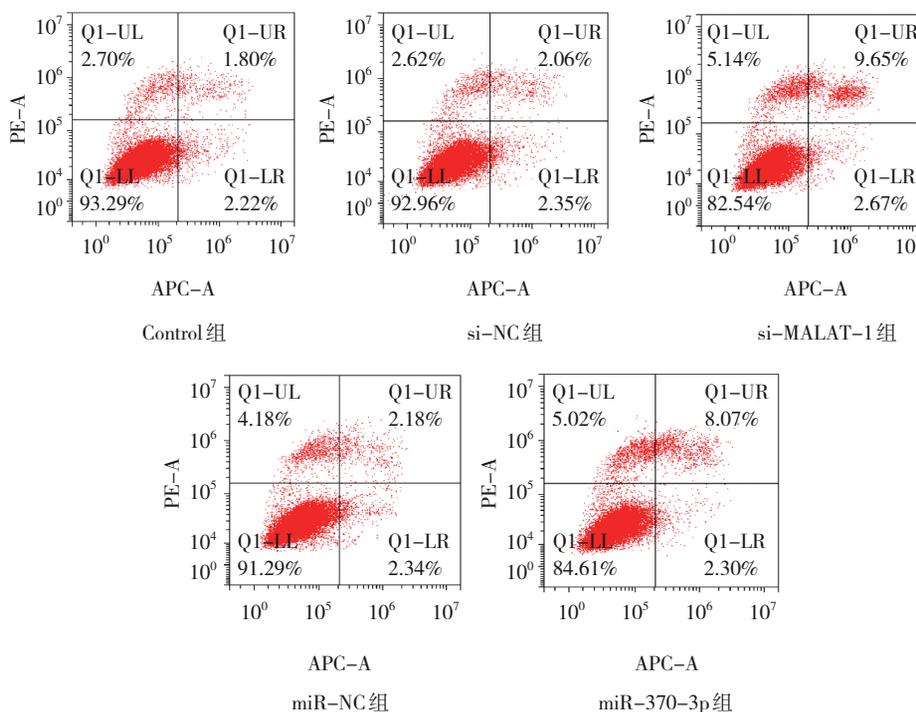


图 3 各组 A549 细胞的凋亡情况

Control 组、si-NC 组、si-MALAT-1 组、miR-NC 组及 miR-370-3p 组的细胞增殖活性比较，采用重复测量设计的方差分析，结果：①不同时间点的细胞增殖活性有差异 ($F=9.308, P=0.020$)；②各组细胞增殖活性有差异 ($F=11.308, P=0.013$)；③各组细胞增殖活性变化趋势有差异 ($F=7.338, P=0.036$)。见表 3。

2.3 各组 A549 细胞的 Akt 通路相关蛋白表达比较

Western blotting 结果显示，Control 组、si-NC 组、si-MALAT-1 组、miR-NC 组及 miR-370-3p 组

表 3 各组不同时间点细胞增殖活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Control 组 | 0.35 ± 0.04 | 0.67 ± 0.07 | 1.33 ± 0.16 |
| si-NC 组 | 0.34 ± 0.03 | 0.64 ± 0.07 | 1.29 ± 0.15 |
| si-MALAT-1 组 | 0.32 ± 0.05 | 0.44 ± 0.06 ^{①②} | 0.75 ± 0.11 ^{①②} |
| miR-NC 组 | 0.36 ± 0.08 | 0.62 ± 0.10 | 1.27 ± 0.22 |
| miR-370-3p 组 | 0.31 ± 0.09 ^{①③} | 0.39 ± 0.11 ^{①③} | 0.68 ± 0.14 ^{①③} |

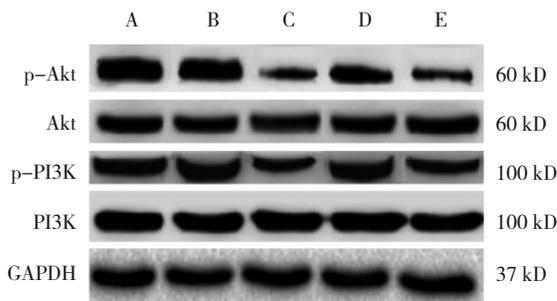
注：①与 Control 组比较, $P < 0.05$ ；②与 si-NC 组比较 $P < 0.05$ ；③与 miR-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

细胞 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与 Control 组比较, si-MALAT-1 组和 miR-370-3p 组细胞的 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$),与 miR-NC 组比较, miR-370-3p 组细胞的 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$)。见表 4 和图 4。

表 4 各组 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | p-Akt/Akt | p-PI3K/PI3K |
|--------------|---------------------------|---------------------------|
| Control 组 | 1.16 ± 0.04 | 0.97 ± 0.06 |
| si-NC 组 | 1.08 ± 0.06 | 0.93 ± 0.18 |
| si-MALAT-1 组 | 0.46 ± 0.09 ^{①②} | 0.33 ± 0.05 ^{①②} |
| miR-NC 组 | 0.99 ± 0.02 | 0.88 ± 0.09 |
| miR-370-3p 组 | 0.28 ± 0.07 ^{①③} | 0.25 ± 0.04 ^{①③} |
| F 值 | 6.569 | 7.235 |
| P 值 | 0.008 | 0.003 |

注: ①与 Control 组比较, $P<0.05$; ②与 si-NC 组比较 $P<0.05$; ③与 miR-NC 组比较, $P<0.05$ 。



A: control 组; B: si-NC 组; C: si-MALAT-1 组; D: miR-NC 组; E: miR-370-3p 组。

图 4 各组 A549 细胞的 Akt 通路相关蛋白的表达

表 5 各组 miR-370-3p mRNA、迁移细胞数、侵袭细胞数及细胞凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | miR-370-3p mRNA | 迁移细胞数/个 | 侵袭细胞数/个 | 细胞凋亡率/% |
|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Control 组 | 1.00 ± 0.03 | 95.22 ± 7.63 | 100.44 ± 5.93 | 2.63 ± 0.16 |
| si-NC 组 | 1.01 ± 0.01 | 93.79 ± 7.55 | 98.35 ± 6.64 | 3.04 ± 0.28 |
| si-MALAT-1 组 | 4.84 ± 0.09 ^{①②} | 30.60 ± 3.02 ^{①②} | 30.60 ± 4.12 ^{①②} | 9.27 ± 0.68 ^{①②} |
| si-MALAT-1+anti-miR-NC 组 | 4.77 ± 0.05 ^{①②} | 33.69 ± 4.11 ^{①②} | 24.39 ± 5.04 ^{①②} | 7.94 ± 0.54 ^{①②} |
| si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组 | 2.29 ± 0.04 ^{①②③} | 60.35 ± 3.62 ^{①②③} | 50.02 ± 4.91 ^{①②③} | 3.87 ± 0.25 ^{①②③} |
| F 值 | 12.332 | 22.891 | 23.298 | 7.231 |
| P 值 | 0.006 | 0.001 | 0.000 | 0.036 |

注: ①与 Control 组比较, $P<0.05$; ②与 si-NC 组比较, $P<0.05$; ③与 si-MALAT-1 组比较 $P<0.05$ 。

2.4 LncRNA MALAT-1 对 miR-370-3p 的靶向调控作用

TargetScan 靶基因预测发现 LncRNA MALAT-1 与 miR-370-3p 存在结合位点 (见图 5)。荧光素酶报告基因实验检测发现, MALAT-1^{WT}_luc+Control 组、MALAT-1^{WT}_luc+miR NC 组、MALAT-1^{WT}_luc+miR-370-3p 组相对荧光强度分别为 (1.00 ± 0.12)、(0.98 ± 0.11)、(0.35 ± 0.09), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=7.521, P=0.008$); 与 MALAT-1^{WT}_luc+Control 组和 MALAT-1^{WT}_luc+miR NC 组比较, LncRNA MALAT-1^{WT}_luc+miR-370-3p 组的相对荧光强度降低 ($P<0.05$)。MALAT-1^{MUT}_luc+Control 组、MALAT-1^{MUT}_luc+miR NC 组、MALAT-1^{MUT}_luc+miR-370-3p 组相对荧光强度分别为 (1.02 ± 0.14)、(0.93 ± 0.10)、(0.96 ± 0.13), 经方差分析, 差异无统计学意义 ($F=1.013, P=0.092$)。

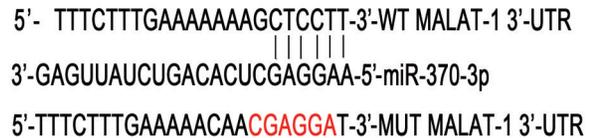


图 5 LncRNA MALAT-1 与 miR-370-3p 的结合位点

进一步 qRT-PCR 检测发现, Control 组、si-NC 组、si-MALAT-1 组、si-MALAT-1+anti-miR-NC 组及 si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组的 miR-370-3p mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=12.332, P=0.006$); 与 Control 组比较, si-MALAT-1 组的 miR-370-3p mRNA 相对表达量升高 ($P<0.05$); 与 si-MALAT-1 组比较, si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组的 miR-370-3p mRNA 相对表达量降低 ($P<0.05$)。见表 5。

2.5 抑制 LncRNA MALAT-1 并干扰 miR-370-3p 各组 miR-370-3p 表达、迁移细胞数、侵袭细胞数及细胞凋亡率的比较

细胞迁移、侵袭及凋亡实验结果显示，Control 组、si-NC 组、si-MALAT-1 组、si-MALAT-1+anti-miR-NC 组及 si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组的迁移细胞数、侵袭细胞数及细胞凋亡率比较，经方

差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；与 Control 组比较，si-MALAT-1 组迁移细胞数、侵袭细胞数减少 ($P < 0.05$)，细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$)。与 si-MALAT-1 组比较，si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组的迁移细胞数、侵袭细胞数增加 ($P < 0.05$)，细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 6 ~ 8。

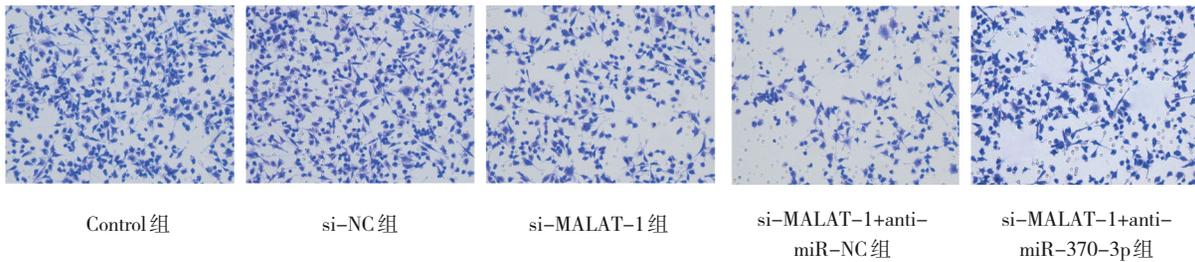


图 6 各组 A549 细胞的迁移情况 (结晶紫染色 × 200)

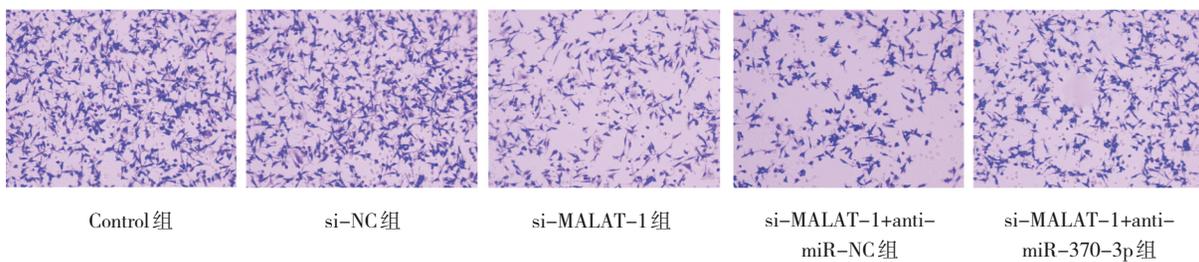


图 7 各组 A549 细胞的侵袭情况 (结晶紫染色 × 200)

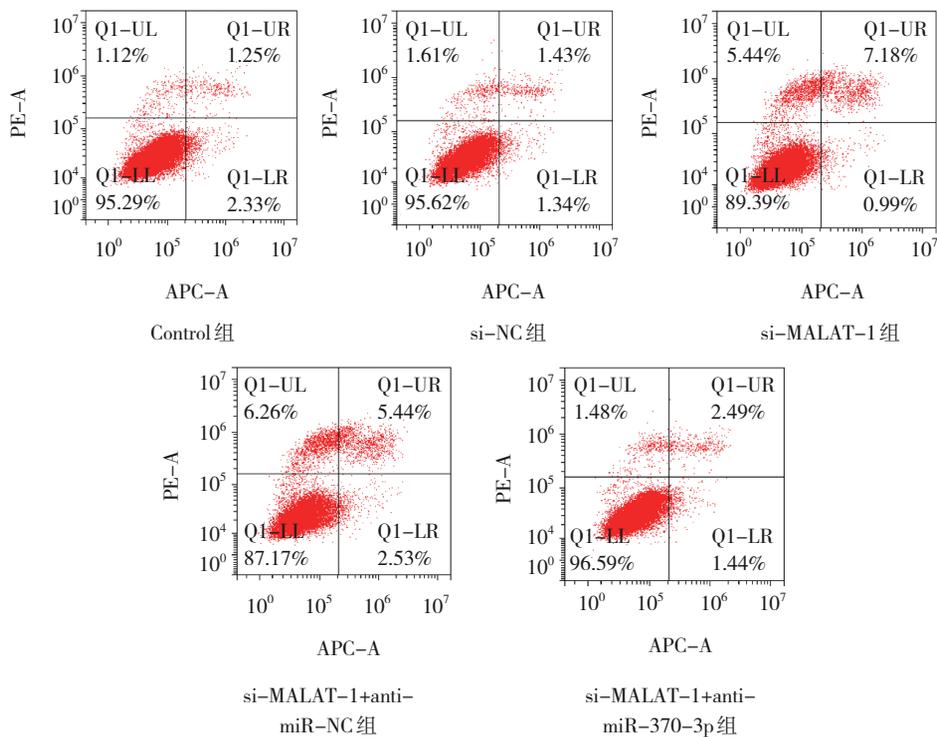


图 8 各组 A549 细胞的凋亡情况

2.6 各组不同时间点细胞增殖活性的比较

培养 24 h、48 h、72 h 后, Control 组、si-NC 组、si-MALAT-1 组、si-MALAT-1+anti-miR-NC 组及 si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组的细胞增殖活性比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞增殖活性有差异 ($F=8.137, P=0.027$); ②各组细胞增殖活性有差异 ($F=13.108, P=0.005$); ③各组细胞增殖活性变化趋势有差异 ($F=9.086, P=0.022$)。见表 6。

表 6 各组不同时间点细胞活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h |
|------------------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|
| Control 组 | 0.37 ± 0.03 | 0.85 ± 0.09 | 1.56 ± 0.22 |
| si-NC 组 | 0.33 ± 0.06 | 0.81 ± 0.08 | 1.61 ± 0.27 |
| si-MALAT-1 组 | 0.34 ± 0.08 | 0.48 ± 0.07 ^{①②} | 0.83 ± 0.16 ^{①②} |
| si-MALAT-1+anti-miR-NC 组 | 0.36 ± 0.08 | 0.52 ± 0.11 ^{①②} | 0.80 ± 0.20 ^{①②} |
| si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组 | 0.35 ± 0.10 | 0.70 ± 0.14 ^{①②③} | 1.15 ± 0.17 ^{①②③} |

注: ①与 Control 组比较, $P < 0.05$; ②与 si-NC 组比较, $P < 0.05$; ③与 si-MALAT-1 组比较, $P < 0.05$ 。

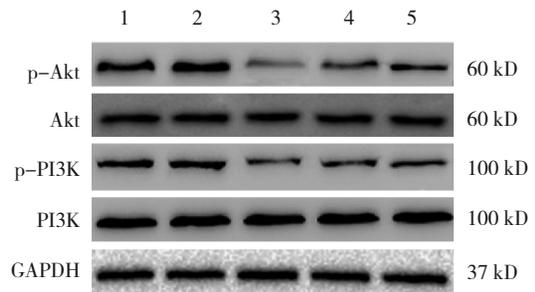
2.7 各组 A549 细胞的 Akt 通路相关蛋白表达的比较

Western blotting 结果显示, Control 组、si-NC 组、si-MALAT-1 组、si-MALAT-1+anti-miR-NC 组及 si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组的 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Control 组比较, si-MALAT-1 组 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)。与 si-MALAT-1 组比较, si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组的细胞 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。见表 7 和图 9。

表 7 各组 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | p-Akt/Akt | p-PI3K/PI3K |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Control 组 | 0.93 ± 0.10 | 0.71 ± 0.11 |
| si-NC 组 | 1.02 ± 0.08 | 0.64 ± 0.13 |
| si-MALAT-1 组 | 0.23 ± 0.06 ^{①②} | 0.21 ± 0.07 ^{①②} |
| si-MALAT-1+anti-miR-NC 组 | 0.26 ± 0.04 ^{①②} | 0.23 ± 0.09 ^{①②} |
| si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组 | 0.48 ± 0.09 ^{①②③} | 0.38 ± 0.11 ^{①②③} |
| F 值 | 8.299 | 9.236 |
| P 值 | 0.008 | 0.006 |

注: ①与 Control 组比较, $P < 0.05$; ②与 si-NC 组比较 $P < 0.05$; ③与 si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组比较 $P < 0.05$ 。



1: Control 组; 2: si-NC 组; 3: si-MALAT-1 组; 4: si-MALAT-1+anti-miR-NC 组; 5: si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组。

图 9 各组 A549 细胞的 Akt 通路相关蛋白的表达

3 讨论

LncRNA 是一种非编码 RNA, 其长度大约为 200 个核苷酸, 研究^[9]发现 LncRNA 不仅参与人类的生长发育, 还与肿瘤等多种疾病的发生、发展密切相关。肺癌是一种极其复杂的疾病, 癌变过程涉及多种基因和蛋白的表达变化, 这种变化不仅可以影响癌细胞的增殖和凋亡, 还能影响其侵袭和迁移。越来越多的体外研究和临床研究均发现 LncRNA 可以通过多通路、多水平、多机制、多联合等多种途径干预肿瘤细胞的生长、浸润、转移以及耐药性^[10-12]。LncRNA-MALAT1 是一种广泛表达于真核生物的 LncRNA, 研究发现 LncRNA-MALAT1 在包括肺癌在内的多种癌症中呈高表达, 被认为是一种促癌基因。非小细胞肺癌 (NSCLC) 是世界上发病率和病死率最高的最常见恶性肿瘤之一。张进儒等^[13]经过临床研究发现 LncRNA-MALAT1 不仅与肺癌密切相关, 其高表达还是 NSCLC 不良预后的危险因素。MA 等^[14]经过体外细胞培养发现 A549 细胞可以高表达 LncRNA-MALAT1, 以上研究都提示 LncRNA-MALAT1 与肺癌密切相关。miR 是一种单链非编码 RNA, 现已有不少证据^[15-16]表明 LncRNA 可以通过靶向结合位点与多种 miR 基因靶向结合, 通过竞争性抑制降低 miR 的表达, 以此来调控下游靶基因的表达。但关于 LncRNA-MALAT1 与 miR-370-3p 之间是否存在靶向作用还不清楚。

WANG 等^[17]通过体外细胞实验发现 miR-370-3p 参与了 NSCLC 的进展, 为了探究 LncRNA-MALAT1、miR-370-3p 与肺癌之间的相互关系, 本研究选取 A549 NSCLC 细胞系进行体外实验, 结果发现抑制

LncRNA MALAT-1 或过表达 miR-370-3p 都能抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,同时增加癌细胞的凋亡,提示 LncRNA MALAT-1 和 miR-370-3p 都能影响肺癌细胞的生物学行为,这为肺癌的临床研究提供了新的靶点。但是关于 LncRNA MALAT-1 和 miR-370-3p 之间的相互关系及具体的作用机制尚不清楚。通过靶基因预测笔者发现 LncRNA MALAT-1 与 miR-370-3p 存在结合位点,为了探究 LncRNA MALAT-1 是否对 miR-370-3p 存在靶向调控作用,本研究进一步进行了荧光素酶报告基因实验,发现野生型 LncRNA MALAT-1+miR-370-3p 的荧光强度显著低于突变型,提示 LncRNA MALAT-1 对 miR-370-3p 有靶向负调控作用,RT-PCR 结果发现抑制 MALAT-1 后 miR-370-3p 表达显著升高,pc-DNA-MALAT-1 组 miR-370-3p 表达显著下降,这进一步证实了 LncRNA MALAT-1 对 miR-370-3p 具有负调控作用。与单纯抑制 LncRNA MALAT-1 相比,si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 在培养 48 h 和 72 h 时 A549 细胞的增殖以及迁移和侵袭显著升高但仍显著低于 si-NC 组,si-MALAT-1+anti-miR-370-3p 组的细胞凋亡率则显著下降但仍然显著高于 si-NC 组,这更加印证了 MALAT-1 和 miR-370-3p 之间的负向关系。

PI3K/Akt 信号途径(又称为 Akt 通路)是一条与细胞增殖和凋亡密切相关的络氨酸激酶级联信号传导途径,多项研究^[18-19]证实该途径参与肺癌的发生、发展和预后。本研究中,抑制 LncRNA MALAT-1 或过表达 miR-370-3p 时 p-Akt 和 p-PI3K 表达均显著下降,但 Akt 和 PI3K 无显著变化,同时抑制 LncRNA MALAT-1 和干扰 miR-370-3p 时,p-Akt 和 p-PI3K 表达均有所上升但仍显著低于单纯抑制 LncRNA MALAT-1。说明单纯沉默 LncRNA MALAT-1 或提高 miR-370-3p 的表达都能抑制 Akt 和 PI3K 的磷酸化,而沉默 LncRNA MALAT-1 并干扰 miR-370-3p,对 Akt 和 PI3K 磷酸化的抑制作用被减弱。PI3K/Akt 信号通路的磷酸化能促进恶性肿瘤的发生与发展,WU 等^[20]发现可以通过调节 LncRNA WT1-AS 来调控其靶向基因 miR-494-3p,并最终抑制 PI3K/Akt 通路的激活,起到抑制 A549 和 NCI-H1975 细胞的增殖、迁移和侵袭作用。磷酸化的 PI3K/Akt 可以下调促凋亡蛋白 Bax 的表达以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的降解,发挥抑制肿瘤细胞凋亡的作

用,还可以通过激活酶激酶-3 β 来加重癌细胞的侵袭和转移。

综上所述,LncRNA MALAT-1 可以与 miR-370-3p 靶向结合且对 miR-370-3p 的表达具有负调控作用。抑制 LncRNA MALAT-1 可以上调 miR-370-3p 的表达,抑制 549 细胞的增殖、迁移及侵袭能力,促进 A549 细胞的凋亡,并下调 Akt 通路蛋白的磷酸化。

参 考 文 献 :

- [1] LIEVERSE R I Y, van LIMBERGEN E J, OBERIJE C J G, et al. Stereotactic ablative body radiotherapy (SABR) combined with immunotherapy (L19-IL2) versus standard of care in stage IV NSCLC patients, ImmunoSABR: a multicentre, randomised controlled open-label phase II trial[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 557.
- [2] ZEHENTMAYR F, GRAMBOZOV B, KAISER J, et al. Radiation dose escalation with modified fractionation schedules for locally advanced NSCLC: a systematic review[J]. Thorax Cancer, 2020, 11(6): 1375-1385.
- [3] ALIPOOR F J, ASADI M H, TORKZADEH-MAHANI M. MIAT lncRNA is overexpressed in breast cancer and its inhibition triggers senescence and G1 arrest in MCF7 cell line[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(8): 6470-6481.
- [4] ZHANG Y, ZHOU H Y. LncRNA BCAR4 promotes liver cancer progression by upregulating ANAPC11 expression through sponging miR-1261[J]. Int J Mol Med, 2020, 46(1): 159-166.
- [5] ZHAO L, KONG H R, SUN H W, et al. LncRNA-PVT1 promotes pancreatic cancer cells proliferation and migration through acting as a molecular sponge to regulate miR-448[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(5): 4044-4055.
- [6] SHE K L, YAN H, HUANG J, et al. miR-193b availability is antagonized by LncRNA-SNHG7 for FAIM2-induced tumour progression in non-small cell lung cancer[J]. Cell Prolif, 2018, 51(1): e12406.
- [7] 贾艳云, 苏冬菊, 邵路. LncRNA MALAT-1 与非小细胞肺癌的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(4): 755-757.
- [8] ZHU D, HUANG X S, LIANG F, et al. LncRNA miR503HG interacts with miR-31-5p through multiple ways to regulate cancer cell invasion and migration in ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2020, 13(1): 3.
- [9] ZHOU X J, LU H T, LI F J, et al. LncRNA cancer susceptibility candidate (CASC7) upregulates phosphatase and tensin homolog by downregulating miR-10a to inhibit neuroblastoma cell proliferation[J]. Neuroreport, 2020, 31(5): 381-386.
- [10] ABDI E, LATIFI-NAVID S, LATIFI-NAVID H, et al. LncRNA polymorphisms and upper gastrointestinal cancer risk[J]. Pathol Res Pract, 2021, 218: 153324.
- [11] LIU X, ZHAO Y T, LI Y, et al. Quantitative assessment of lncRNA H19 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis

- based on 48,166 subjects[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 15-27.
- [12] ALIPOOR B, PARVAR S N, SABATI Z, et al. An updated review of the H19 lncRNA in human cancer: molecular mechanism and diagnostic and therapeutic importance[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(8): 6357-6374.
- [13] 张进儒, 刘海明, 宁鹏. LncRNA MALAT1对晚期非小细胞肺癌三维适形放疗疗效及预后评估的价值[J]. *实用癌症杂志*, 2020, 35(7): 1063-1066.
- [14] MA J, WU K M, LIU K Z, et al. Effects of MALAT1 on proliferation and apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells *in vitro* and tumor xenograft growth *in vivo* by modulating autophagy[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(1): 63-72.
- [15] ZHANG C, LI J, LI H J, et al. lncRNA MIR155HG accelerates the progression of sepsis via upregulating MEF2A by sponging miR-194-5p[J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(6): 811-820.
- [16] 艾合买提江·艾海提, 谢有强, 陈智全. lncRNA SND1-IT1靶向miR-185-5p调控胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究[J]. *河北医药*, 2021, 43(11): 1635-1639.
- [17] WANG X, LV J, HE B, et al. CircFBXW8 acts an oncogenic role in the malignant progression of non-small cell lung carcinoma by miR-370-3p-dependent regulation of TRIM44[J]. *Biochem Genet*, 2022, 60(4): 1313-1332.
- [18] HAMZEZHAADEH L, ATKIN S L, MAJEED M, et al. The versatile role of curcumin in cancer prevention and treatment: a focus on PI3K/AKT pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(10): 6530-6537.
- [19] YAN G, RU Y, WU K R, et al. GOLM1 promotes prostate cancer progression through activating PI3K-AKT-mTOR signaling[J]. *Prostate*, 2018, 78(3): 166-177.
- [20] WU C H, YANG J S, LI R B, et al. LncRNA WT1-AS/miR-494-3p regulates cell proliferation, apoptosis, migration and invasion via PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Oncotargets Ther*, 2021, 14: 891-904.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 李亮, 李建忠, 张丹杰, 等. LncRNA MALAT-1靶向microRNA-370-3p调节Akt通路对肺癌细胞生物学行为影响的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(3): 38-47.

Cite this article as: LI L, LI J Z, ZHANG D J, et al. Mechanism research of LncRNA MALAT-1 targeting microRNA-370-3p on biological behavior of lung cancer cells by regulating Akt[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(3): 38-47.