

· 基础研究 ·

lnc-NEAT1通过miR-29c-3p/CSPG4信号轴调节黑色素瘤B16细胞的增殖、迁移和侵袭

谢 奇,樊鑫梅,韩永红,陶 娟,刘 旭,刘家秀*

江苏护理职业学院药学与中药学院,江苏 淮安 223005

[摘要] 目的:探讨长链非编码RNA-核富集转录本1(long non-coding RNA-nuclear enriched abundant transcript 1,lnc-NEAT1)对黑色素瘤(melanoma,MM)细胞增殖、迁移和侵袭的调控机制。方法:体外培养MM细胞系(A375、A875、M14、B16)和人表皮黑色素细胞(HEMa-LP),采用实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR,RT-qPCR)检测细胞中lnc-NEAT1、microRNA-29c-3p(miR-29c-3p)、硫酸软骨素蛋白多糖4(chondroitin sulfate proteoglycan 4,CSPG4)mRNA表达。取对数生长期B16细胞,分为对照组(control组)、si-NC组、si-NEAT1组、si-NEAT1+inhibitor-NC组、si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor组,用Lipofectamine 3000将相应质粒转染到细胞中。RT-qPCR检测转染效率,MTT法检测细胞增殖活力,Transwell小室检测细胞迁移和侵袭能力,蛋白质印迹法检测细胞CSPG4及增殖、迁移与侵袭相关蛋白表达。双荧光素酶报告基因检测miR-29c-3p与lnc-NEAT1、CSPG4的靶向关系。裸鼠移植瘤实验探究lnc-NEAT1敲低对MM细胞体内生长的影响。结果:MM细胞系中lnc-NEAT1和CSPG4 mRNA水平显著高于HEMa-LP细胞,miR-29c-3p水平显著低于HEMa-LP细胞($P < 0.05$)。敲低lnc-NEAT1可显著升高miR-29c-3p表达,降低CSPG4 mRNA和蛋白水平,抑制细胞增殖、迁移和侵袭,并降低Ki-67、N-cadherin与Vimentin蛋白水平,升高E-cadherin蛋白水平($P < 0.05$);下调miR-29c-3p表达可显著升高CSPG4 mRNA和蛋白水平,减弱lnc-NEAT1敲低对MM细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因检测结果显示,转染miR-29c-3p mimic后,细胞中NEAT1-WT和CSPG4-WT的荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$)。裸鼠移植瘤实验结果显示,敲低lnc-NEAT1可显著抑制体内移植瘤生长,而抑制miR-29c-3p可显著减弱lnc-NEAT1敲低对移植瘤生长的抑制作用($P < 0.05$)。结论:lnc-NEAT1可能通过调节miR-29c-3p/CSPG4轴促进MM细胞增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 黑色素瘤;长链非编码RNA核富集转录本1;microRNA-29c-3p;硫酸软骨素蛋白多糖4;增殖;迁移;侵袭

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)04-492-10

doi: 10.7655/NYDXBNS20230407

Lnc-NEAT1 regulates the proliferation, migration and invasion of melanoma B16 cells through the miR-29c-3p/CSPG4 signaling axis

XIE Qi, FAN Xinmei, HANG Yonghong, TAO Juan, LIU Xu, LIU Jiaxiu*

College of Pharmacy and Traditional Chinese Medicine, Jiangsu College of Nursing, Huai'an 223005, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulatory mechanism of long non-coding RNA-nuclear enriched transcript 1 (lnc-NEAT1) on the proliferation, migration and invasion of melanoma (MM) cells. **Methods:** MM cell lines (A375, A875, M14, B16) and human epidermal melanocytes (HEMa-LP) were cultured *in vitro*, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to determine the mRNA expression of lnc-NEAT1, microRNA-29c-3p (miR-29c-3p) and chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4) in cells. B16 cells at logarithmic growth phase were taken and separated into control group, si-NC group, si-NEAT1 group, si-NEAT1+inhibitor-NC group, and si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor group. Lipofectamine 3000 was applied to transfect the corresponding plasmids into cells. RT-qPCR was performed to determine the transfection efficiency. MTT method was used to determine cell proliferation. Transwell assay was performed to determine cell migration and invasion abilities. Western blotting was performed to determine the expression of CSPG4 and proteins related to the proliferation, migration and invasion. Dual-luciferase reporter gene assay was performed to determine miR-29c-3p

[基金项目] 淮安市自然科学研究计划(联合专项)项目(HABL202112)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 1220714088@qq.com

targeting relationship with lnc-NEAT1 and CSPG4. Nude mice xenograft experiment was performed to explore the effect of lnc-NEAT1 knockdown on the growth of MM cells *in vivo*. **Results:** The mRNA levels of lnc-NEAT1 and CSPG4 in MM cell lines were obviously higher than those in HEMa-LP cells, and the levels of miR-29c-3p were obviously lower than those in HEMa-LP cells (all $P < 0.05$). Knockdown of lnc-NEAT1 obviously increased miR-29c-3p expression, decreased CSPG4 mRNA and protein levels, inhibited cell proliferation, migration and invasion, and decreased Ki-67, N-cadherin and Vimentin protein levels as well as increased E-cadherin protein level (all $P < 0.05$). Down-regulation of miR-29c-3p expression obviously increased CSPG4 mRNA and protein levels, and attenuated the inhibitory effects of lnc-NEAT1 knockdown on MM cell proliferation, migration and invasion ($P < 0.05$). The results of dual-luciferase reporter gene assay showed that after the transfection of miR-29c-3p mimic, the luciferase activities of NEAT1-WT and CSPG4-WT in cells were obviously decreased ($P < 0.05$). Nude mouse xenograft experiments showed that knockdown of lnc-NEAT1 obviously inhibited the growth of xenografts *in vivo*, while inhibition of miR-29c-3p was able to obviously attenuate the inhibitory effect of lnc-NEAT1 knockdown on the growth of xenografts (all $P < 0.05$). **Conclusion:** lnc-NEAT1 may promote the proliferation, migration and invasion of MM cells by regulating the miR-29c-3p/CSPG4 axis.

[Key words] melanoma; long non-coding RNA nuclear enriched abundant transcript 1; microRNA-29c-3p; chondroitin sulfate proteoglycan 4; proliferation; migration; invasion

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(04):492-501]

黑色素瘤(melanoma, MM)是一种侵袭性皮肤恶性肿瘤,约占全球皮肤恶性肿瘤相关死亡人数的80%,发病率呈上升趋势^[1]。因此,鉴定MM的新诊断标志物和治疗靶点势在必行。研究表明,长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)可以通过调节靶基因表达调控大多数恶性肿瘤的形成和发展,包括MM^[2]。据报道,lncRNA-核富集转录本1(nuclear enriched abundant transcript 1, lnc-NEAT1)在MM中过度表达,可促进MM细胞的增殖、迁移和侵袭^[3-4]。然而,lnc-NEAT1在MM中作用机制仍未完全阐明。

lncRNA可以作为微小RNA(microRNA, miRNA)海绵或竞争性内源性RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)介导信使RNA(messenger RNA, mRNA)表达以实现其生物学功能。miR-29c-3p是miR-29家族成员,通过调控基因表达参与MM进展,对评估患者预后具有重要价值^[5-6]。硫酸软骨素蛋白多糖4(chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4)是一种在人MM细胞中发现的跨膜蛋白多糖,参与MM的迁移和侵袭,与MM的形成和预后不良有关,是MM中的关键癌基因^[7-8]。生物信息学分析显示lnc-NEAT1和miR-29c-3p之间可能存在靶向调控作用,且miR-29c-3p可与CSPG4的3'-非翻译区(untranslated region, UTR)结合。因此,本研究试图探究lnc-NEAT1、miR-29c-3p和CSPG4之间的关系,并进一步分析lnc-NEAT1/miR-29c-3p/CSPG4调节轴在MM进展中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

人MM细胞系(A375、A875、M14)和小鼠黑色素瘤细胞系(B16)购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号:CL-0014、CL-0255、CL-0287、CL-0029),在含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基中生长。人表皮黑色素细胞(HEMa-LP)购自上海北诺生物科技有限公司(货号:C0245C),培养于含有人黑素细胞生长添加剂-2(HMGS-2)的M254培养基中。以上这些细胞系置于37℃的5% CO₂加湿培养箱中培养。

1.1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(Gibco公司,美国);MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);lnc-NEAT1干扰质粒(si-NEAT1)和对照干扰质粒(si-NC)、miR-29c-3p模拟物(miR-29c-3p mimic)和对照(miR-NC)、miR-29c-3p抑制剂(miR-29c-3p inhibitor)和对照(inhibitor-NC)由上海GenePharma公司构建;Lipofectamine 3000转染试剂(Sigma-Aldrich公司,美国);Transwell小室(Corning公司,美国);兔源—抗CSPG4、Ki-67、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(Abcam公司,英国);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega公司,美

国)。HERAcell 240i CO₂细胞培养箱、Nano-Drop ND-2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific公司,美国);ABI Prism® 7500型荧光定量PCR仪(应用生物系统公司,美国);iMark680多功能酶标仪(Bio-Rad公司,美国);Ts2-FC倒置荧光显微镜(Nikon公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)检测 mRNA 表达

使用 TRIzol 试剂从 HEMa-LP 细胞和 MM 细胞

中提取总 RNA, Nano-Drop ND-2000 分光光度计测量其在 260 nm 与 280 nm 处的吸光度比值, 确认总 RNA 的纯度及浓度。使用 PrimeScript™ RT 试剂盒将总 RNA (1 μg) 逆转录为 cDNA。使用该 cDNA 作为模板, 在荧光定量 PCR 系统上进行 RT-qPCR。热循环条件如下: 95 ℃ 预变性 10 min; 然后 95 ℃ 变性 15 s 和 60 ℃ 退火 1 min, 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行相对定量分析, lnc-NEAT1 和 CSPG4 的相对表达标准化为 GAPDH, U6 作为 miR-29c-3p 的内部对照。

表1 用于RT-qPCR的引物序列
Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
人 lnc-NEAT1	AATGCTTGTTCCAGAGCCCA	AAGAAGGCAGGCAAACAGGT
小鼠 lnc-NEAT1	TGAGTAGTGGAAGCAGGAGGAT	GGAGGCAAGGACGAGACAGA
人 miR-29c-3p	CTGACCTTAGCACCATTGAAATC	TATCGTTGTACTCCACTCCTTGAC
小鼠 miR-29c-3p	GAAGCACCATTGAAATCAG	TTGGCACTAGCACATT
人 CSPG4	CCTCCTGCTGCAGCTCTACT	CTGAGGAGGCGTTCAGAAAC
小鼠 CSPG4	TCTTACCTTGGCCCTGTTGG	ACTCTGGTCAGAGCTGAGGG
人 GAPDH	ACGGATTGTCGTATTGGG	TGATTTTGGAGGGGATCTCGC
小鼠 GAPDH	GAGTCCACTGGCGTCTTCAC	ATCTTGAGGCTGTTGTCATACTTCT
人 U6	CTCGCTTCGGGCAGCACA	AACGCTCTCACGAATTTGCGT
小鼠 U6	CTTCACGAATTTGCGTGTCAAT	GCTTCGGCAGCACATATAC

1.2.2 细胞转染

B16 细胞接种于 6 孔板中 (5×10⁴ 个/孔), 当细胞融合 80% 以上时, 进行转染。实验分为 (control 对照组, 不进行任何转染)、si-NC 组 (转染 si-NEAT1 阴性对照 si-NC)、si-NEAT1 组 (转染 si-NEAT1)、si-NEAT1+inhibitor-NC 组 (共转染 si-NEAT1 和 miR-29c-3p inhibitor 阴性对照 inhibitor-NC)、si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor 组 (共转染 si-NEAT1 和 miR-29c-3p inhibitor)。使用 Lipofectamine 3000 将 si-NEAT1、miR-29c-3p inhibitor 及其阴性对照转染相应孔中的细胞。si-NEAT1 的转染浓度为 50 nmol/L, miR-29c-3p inhibitor 的转染浓度为 100 nmol/L。转染 6 h 后更换培养液, 然后在 37℃、5% CO₂ 下常规培养 48 h, 用 RT-qPCR 检测转染效率, 收集转染细胞用于下一步分析。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖活力

将细胞以 2×10³ 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 转染 6 h 换液后于 37 ℃ 下孵育 0、24、48、72 h。在设定的时间点向每个孔中加入 20 μL MTT 溶液 (5 μg/mL), 在 37 ℃ 下孵育 4 h。然后每孔加入

200 μL 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 使用酶标仪记录 490 nm 处的光密度值。

1.2.4 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力

通过 Transwell 24 孔室检查细胞迁移和侵袭能力。对于迁移能力测定, 细胞转染 48 h 后, 制备无血清细胞悬液, 然后将 200 μL 无血清细胞悬液 (2×10⁴ 个/孔) 接种到 Transwell 小室 (8 μm 孔径) 的上室中, 同时将 500 μL 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基添加到下室。随后, 在 37 ℃ 下孵育 48 h。将迁移到膜下表面的细胞用 4% 多聚甲醛固定 5 min, 再用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 随机选择 5 个视野在倒置显微镜下计数细胞并拍摄图像。对于侵袭能力测定, Matrigel 胶预先涂在 Transwell 小室的上室中, 并在 37 ℃ 的培养箱中固化 1 h, 其余步骤与迁移能力测定的步骤相同。

1.2.5 蛋白质印迹 (Western blot) 法检测蛋白表达

用 RIPA 裂解缓冲液从 MM 细胞中提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。然后将蛋白质经 10%, SDS-PAGE 分离并转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。膜用 5% 脱脂牛奶封闭后, 在

4 ℃下与一抗孵育过夜。使用的一抗如下:CSPG4(1:1 000)、Ki-67(1:1 000)、E-cadherin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)和GAPDH(1:3 000)。然后在室温下,将膜与辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔IgG二抗(1:5 000)孵育1 h。最后,通过增强化学发光试剂进行显色反应,使用Image J软件观察并量化蛋白质条带。

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测

使用生物信息学StarBase v2.0数据库(<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)和TargetScan Humam 7.2(http://www.targetscan.org/vert_72/)分析预测miR-29c-3p与lnc-NEAT1和CSPG4的结合位点。将野生型(WT)和突变型(MUT)lnc-NEAT1的序列克隆到pGL3载体中,构建NEAT1-WT和NEAT1-MUT质粒。类似地,构建了CSPG4-WT和CSPG4-MUT质粒。将B16细胞接种在24孔板中,培养至80%汇合时,使用Lipofectamine 3000转染试剂将这些重组荧光素酶报告质粒分别与miR-29c-3p mimic或miR-NC共转染到B16细胞中。转染48 h后,用PLB细胞裂解缓冲液裂解细胞。然后,通过双荧光素酶报告基因系统检测B16细胞裂解物中萤火虫和海肾的荧光素酶活性。将细胞裂解物的相对双荧光素酶活性标准化为海肾荧光素酶活性。

1.2.7 裸鼠移植瘤实验

20只雄性BALB/c裸鼠(7周龄,体重20~22 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。si-NC、si-NEAT1和si-NEAT1+inhibitor-NC、si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor分别通过慢病毒载体(上海吉玛公司构建)转染B16细胞获得稳定表达。将所有裸鼠随机分成4组(每组5只):si-NC组、si-NEAT1组和si-NEAT1+inhibitor-NC组、si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor组,将转染的B16细胞悬液(浓度为 2×10^7 个/mL)皮下注射到每只裸鼠的右下腹。每周测量并通过公式计算肿瘤体积(V): $V=(长\times宽^2)/2$ 。4周后,通过颈椎脱位法处死裸鼠,切除肿瘤。将肿瘤组织称重,一部分用4%多聚甲醛固定用于免疫组织化学(IHC)染色,另一部分用于提取总RNA和蛋白质,通过RT-qPCR和Western blot检测lnc-NEAT1、miR-29c-3p和CSPG4水平。

1.2.8 IHC法检测肿瘤组织中Ki-67阳性表达

将4%多聚甲醛固定的肿瘤组织包埋在石蜡中并切成4 μm厚的切片。经脱蜡、水化后,用0.3% H₂O₂消除内源性过氧化物酶。5%正常山羊血清封闭后,将切片与Ki-67抗体(1:100)孵育过夜,然后

在室温下用二抗(1:200)孵育30 min。DAB显色后,用苏木精复染30 s。在光学显微镜下观察组织切,并用Image-Pro Plus 6.0软件计算Ki-67阳性表达的积分光密度(integral optical density, IOD)。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。计量数据均符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较用SNK-*q*检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MM细胞中lnc-NEAT1、miR-29c-3p和CSPG4 mRNA水平比较

与HEMa-LP相比,MM细胞系(A375、A875、M14、B16)中lnc-NEAT1和CSPG4 mRNA水平显著升高(*P*<0.05),miR-29c-3p水平显著降低(*P*<0.05),其中,B16细胞中lnc-NEAT1和CSPG4 mRNA水平均高于其他MM细胞(*P*<0.05,表2)。因此,选择B16细胞用于后续实验。

表2 MM细胞中lnc-NEAT1、miR-29c-3p和CSPG4 mRNA水平比较

Table 2 Comparison of lnc-NEAT1, miR-29c-3p and CSPG4 mRNA levels in MM cells

($\bar{x}\pm s, n=6$)			
细胞	lnc-NEAT1	miR-29c-3p	CSPG4 mRNA
HEMa-LP	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
B16	3.25±0.39 [*]	0.34±0.05 [*]	2.89±0.30 [*]
A875	1.47±0.18 ^{*#}	0.80±0.09 ^{*#}	1.56±0.21 ^{*#}
M14	2.04±0.25 ^{*##}	0.51±0.05 ^{*##}	2.03±0.27 ^{*##}
A375	2.38±0.29 ^{*##}	0.46±0.06 ^{*##}	2.45±0.28 ^{*##Δ}

与HEMa-LP细胞相比,^{*}*P*<0.05;与B16细胞相比,[#]*P*<0.05;与A875细胞相比,^{*}*P*<0.05;与M14细胞相比,^Δ*P*<0.05。

2.2 转染后各组细胞中lnc-NEAT1、miR-29c-3p和CSPG4水平比较

与control组、si-NC组相比,si-NEAT1组细胞中lnc-NEAT1、CSPG4的mRNA和蛋白水平显著降低(*P*<0.05),miR-29c-3p水平显著升高(*P*<0.05);与si-NEAT1组、si-NEAT1+inhibitor-NC组相比,si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor组细胞中CSPG4的mRNA和蛋白水平显著升高(*P*<0.05),miR-29c-3p水平显著降低(*P*<0.05,图1,表3)。

2.3 敲低NEAT1对B16细胞增殖活性的影响

在转染后常规培养48、72 h时,与control组、si-NC组相比,si-NEAT1组细胞增殖活性显著降低

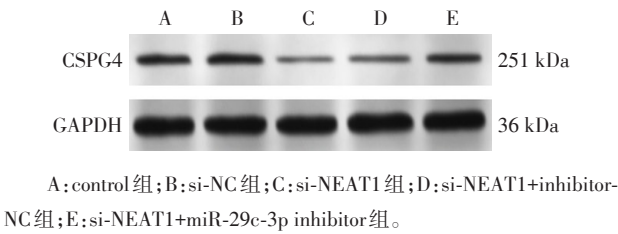


图 1 转染后各组细胞中 CSPG4 蛋白表达
Figure 1 CSPG4 protein expression in cells of each group after transfection

($P < 0.05$); 与 si-NEAT1 组、si-NEAT1+inhibitor-NC 组相比, si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor 组增殖活性

显著升高($P < 0.05$, 表 4)。

2.4 敲低 NEAT1 对 B16 细胞迁移、侵袭能力的影响

Transwell 迁移与侵袭实验结果显示, 与 control 组、si-NC 组相比, si-NEAT1 组迁移与侵袭细胞数显著降低($P < 0.05$); 与 si-NEAT1 组、si-NEAT1+inhibitor-NC 组相比, si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor 组迁移与侵袭细胞数显著增多($P < 0.05$, 图 2, 表 5)。

2.5 敲低 NEAT1 对 B16 细胞中 Ki-67、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响

与 control 组、si-NC 组相比, si-NEAT1 组 Ki-67、N-cadherin 与 Vimentin 蛋白水平显著降低, E-cad-

表 3 转染后各组细胞中 lnc-NEAT1、miR-29c-3p 和 CSPG4 水平比较
Table 3 Comparison of lnc-NEAT1, miR-29c-3p and CSPG4 levels in cells of each group after transfection

组别	($\bar{x} \pm s, n=6$)			
	lnc-NEAT1	miR-29c-3p	CSPG4 mRNA	CSPG4 蛋白
control 组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.42 \pm 0.07
si-NC 组	1.03 \pm 0.14	1.02 \pm 0.11	0.98 \pm 0.12	0.41 \pm 0.06
si-NEAT1 组	0.35 \pm 0.05 [#]	2.15 \pm 0.26 [#]	0.49 \pm 0.07 [#]	0.14 \pm 0.04 [#]
si-NEAT1+inhibitor-NC 组	0.34 \pm 0.06 [#]	2.19 \pm 0.28 [#]	0.46 \pm 0.06 [#]	0.13 \pm 0.03 [#]
si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor 组	0.40 \pm 0.06 [#]	1.35 \pm 0.17 ^{#&Δ}	0.87 \pm 0.09 ^{&Δ}	0.33 \pm 0.06 ^{&Δ}

与 control 组相比, [#] $P < 0.05$; 与 si-NC 组相比, [#] $P < 0.05$; 与 si-NEAT1 组相比, [#] $P < 0.05$; 与 si-NEAT1+inhibitor-NC 组相比, ^Δ $P < 0.05$ 。

表 4 各组细胞增殖活性比较
Table 4 Comparison of the proliferation activity of cells of each group

组别	细胞增殖活性 [$D(490 \text{ nm})$]			
	0 h	24 h	48 h	72 h
control 组	0.25 \pm 0.04	0.39 \pm 0.05	0.77 \pm 0.09	0.96 \pm 0.12
si-NC 组	0.22 \pm 0.03	0.41 \pm 0.04	0.80 \pm 0.10	0.97 \pm 0.13
si-NEAT1 组	0.24 \pm 0.04	0.35 \pm 0.05	0.49 \pm 0.07 [#]	0.60 \pm 0.08 [#]
si-NEAT1+inhibitor-NC 组	0.23 \pm 0.04	0.34 \pm 0.04	0.46 \pm 0.06 [#]	0.58 \pm 0.07 [#]
si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor 组	0.22 \pm 0.03	0.36 \pm 0.05	0.70 \pm 0.08 ^{&Δ}	0.91 \pm 0.10 ^{&Δ}

与 control 组相比, [#] $P < 0.05$; 与 si-NC 组相比, [#] $P < 0.05$; 与 si-NEAT1 组相比, [#] $P < 0.05$; 与 si-NEAT1+inhibitor-NC 组相比, ^Δ $P < 0.05$ 。

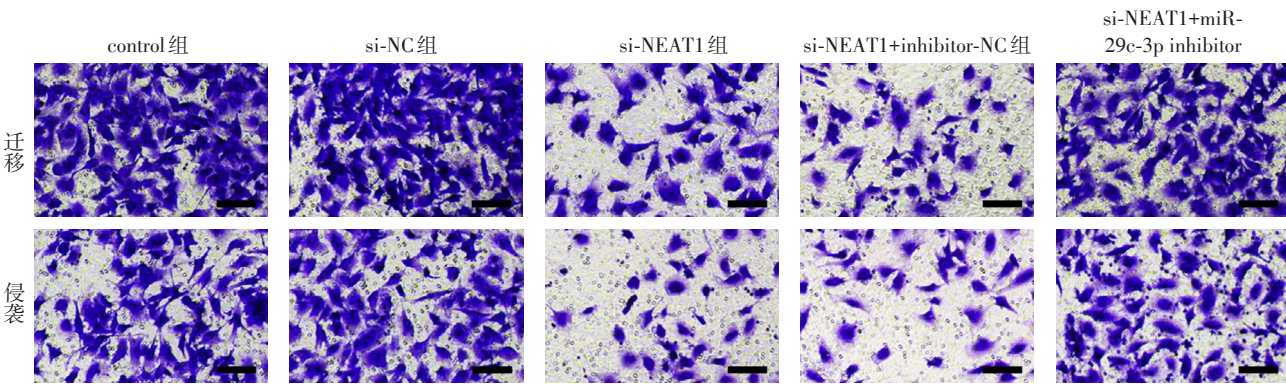


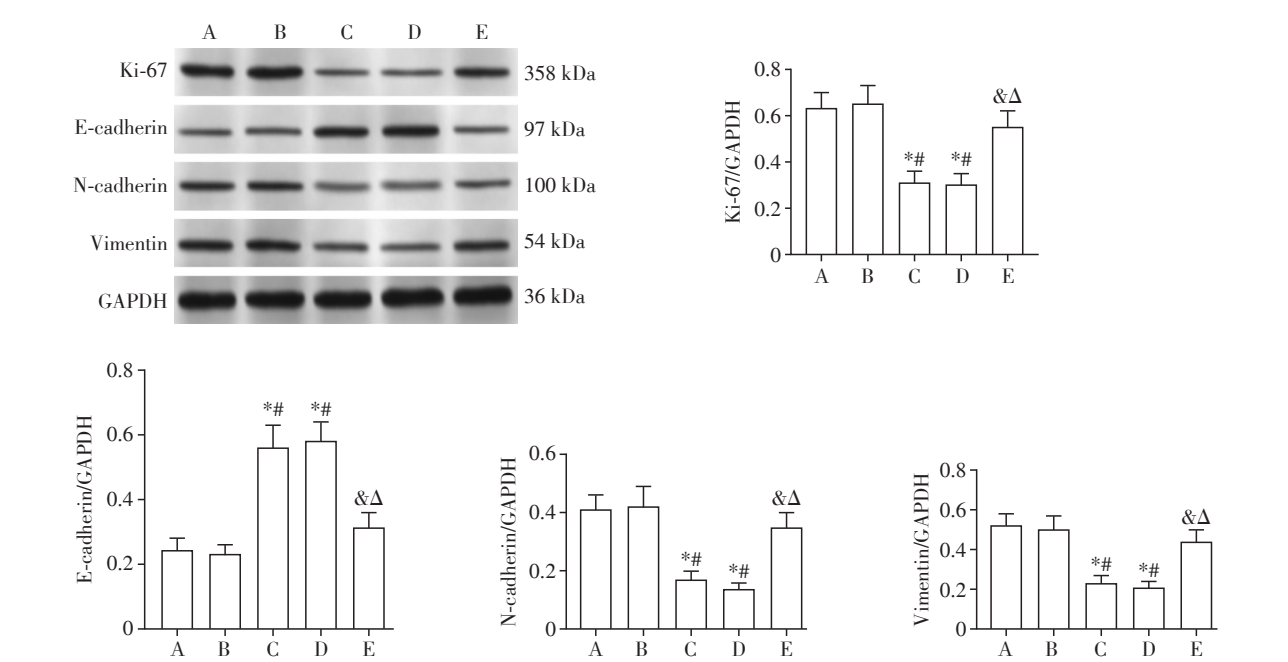
图 2 各组细胞迁移、侵袭能力
Figure 2 Migration and invasion abilities of cells in each group

表5 各组细胞迁移、侵袭能力比较

Table 5 Comparison of migration and invasion abilities in cells of each group			($\bar{x} \pm s, n=6$)
组别	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	
control组	131.28 ± 14.90	107.36 ± 13.58	
si-NC组	134.04 ± 15.26	112.15 ± 14.30	
si-NEAT1组	58.62 ± 7.75 ^{##}	45.84 ± 7.61 ^{##}	
si-NEAT1+inhibitor-NC组	53.54 ± 8.16 ^{##}	42.90 ± 8.02 ^{##}	
si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor组	116.32 ± 13.40 ^{&Δ}	89.26 ± 10.15 ^{&Δ}	

与control组相比,^{*} $P < 0.05$;与si-NC组相比,[#] $P < 0.05$;与si-NEAT1组相比,[&] $P < 0.05$;与si-NEAT1+inhibitor-NC组相比,^Δ $P < 0.05$ 。

herin蛋白水平显著升高($P < 0.05$);与si-NEAT1组、si-NEAT1+inhibitor-NC组相比,si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor组Ki-67、N-cadherin与Vimentin蛋白水平显著升高,E-cadherin蛋白水平显著降低($P < 0.05$,图3)。



A:control组;B:si-NC组;C:si-NEAT1组;D:si-NEAT1+inhibitor-NC组;E:si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor组。与control组相比,^{*} $P < 0.05$;与si-NC组相比,[#] $P < 0.05$;与si-NEAT1组相比,[&] $P < 0.05$;与si-NEAT1+inhibitor-NC组相比,^Δ $P < 0.05$;n=6。

图3 各组细胞中Ki-67、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达

Figure 3 Expression of Ki-67, E-cadherin, N-cadherin and Vimentin proteins in cells of each group

2.6 双荧光素酶报告基因检测结果

使用生物信息学工具预测到miR-29c-3p包含lnc-NEAT1和CSPG4的结合位点(图4A、C)。双荧光素酶报告基因检测结果显示,与转染miR-NC相比,转染miR-29c-3p mimic后,细胞中NEAT1-WT和CSPG4-WT的荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$),而NEAT1-MUT和CSPG4-MUT的荧光素酶活性未受显著影响($P > 0.05$,图4B、D)。

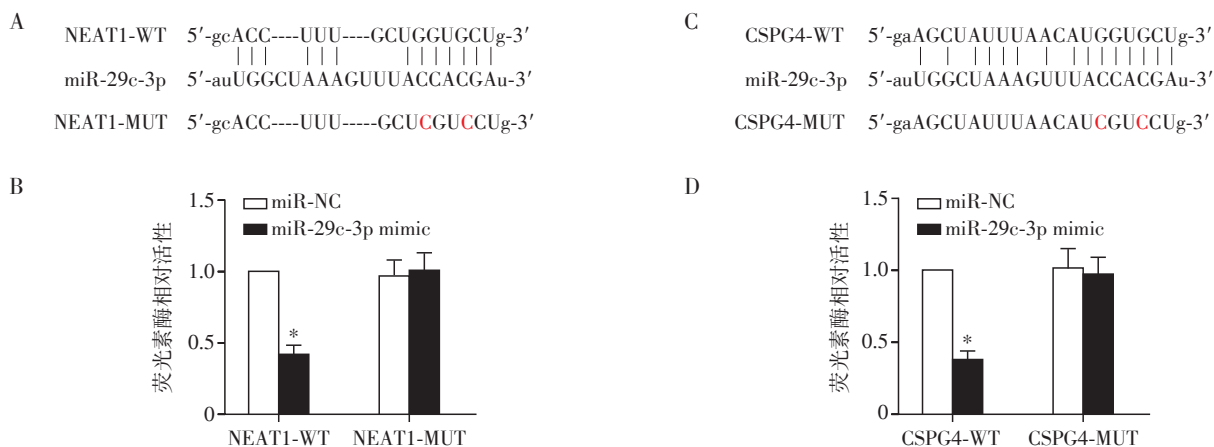
2.7 敲低NEAT1对裸鼠移植瘤生长的影响

裸鼠体内致瘤性实验结果显示,在第2、3、4周时,与si-NC组相比,si-NEAT1组肿瘤体积和重量显

著降低($P < 0.05$);与si-NEAT1组、si-NEAT1+inhibitor-NC组相比,si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor组肿瘤体积和重量显著升高($P < 0.05$,图5)。

2.8 敲低NEAT1对裸鼠移植瘤中lnc-NEAT1、miR-29c-3p、CSPG4表达水平的影响

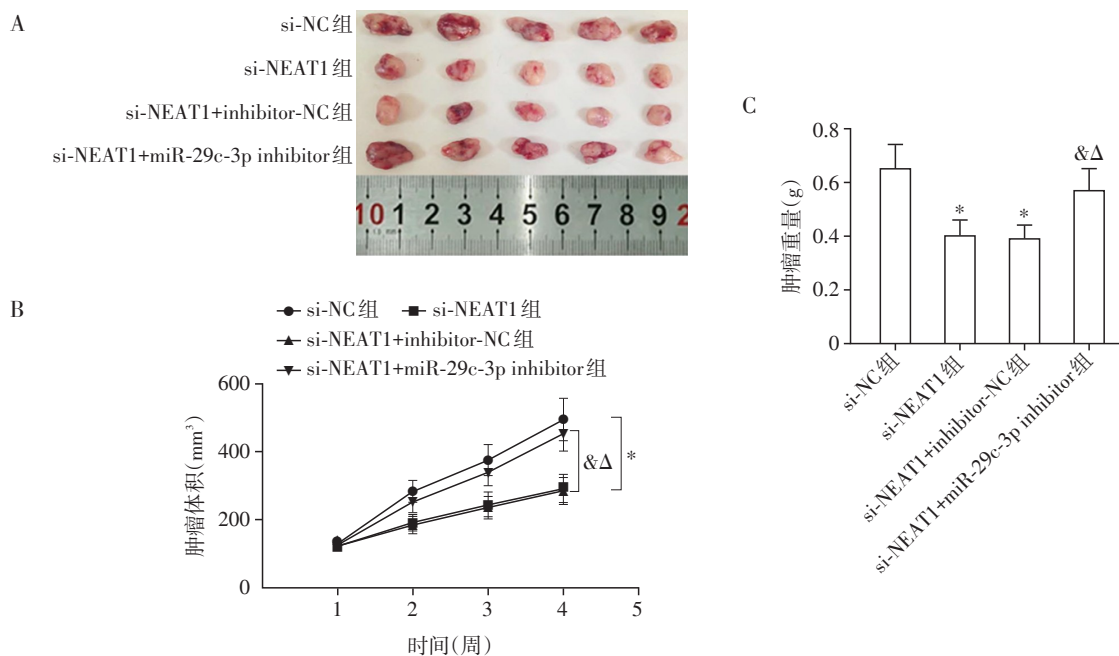
与si-NC组相比,si-NEAT1组肿瘤组织中lnc-NEAT1、CSPG4 mRNA和蛋白水平显著降低,miR-29c-3p水平显著升高($P < 0.05$);与si-NEAT1组、si-NEAT1+inhibitor-NC组相比,si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor组肿瘤组织中CSPG4 mRNA和蛋白水平显著升高,miR-29c-3p水平显著降低($P < 0.05$,图6)。



A:miR-29c-3p与lnc-NEAT的靶向预测结果;B:miR-29c-3p与lnc-NEAT的双荧光素酶报告基因检测结果;C:miR-29c-3p与CSPG4的靶向预测结果;D:miR-29c-3p与CSPG4的双荧光素酶报告基因检测结果;与miR-NC相比,* $P < 0.05$; $n=6$ 。

图4 靶基因预测和细胞中的荧光素酶活性

Figure 4 The target gene prediction and luciferase activity in cells



A:裸鼠肿瘤图像;B:肿瘤体积;C:肿瘤重量;与si-NC组相比,* $P < 0.05$;与si-NEAT1组相比,* $P < 0.05$;与si-NEAT1+inhibitor-NC组相比, $^{\Delta}P < 0.05$; $n=5$ 。

图5 敲低NEAT1对裸鼠移植瘤生长的影响

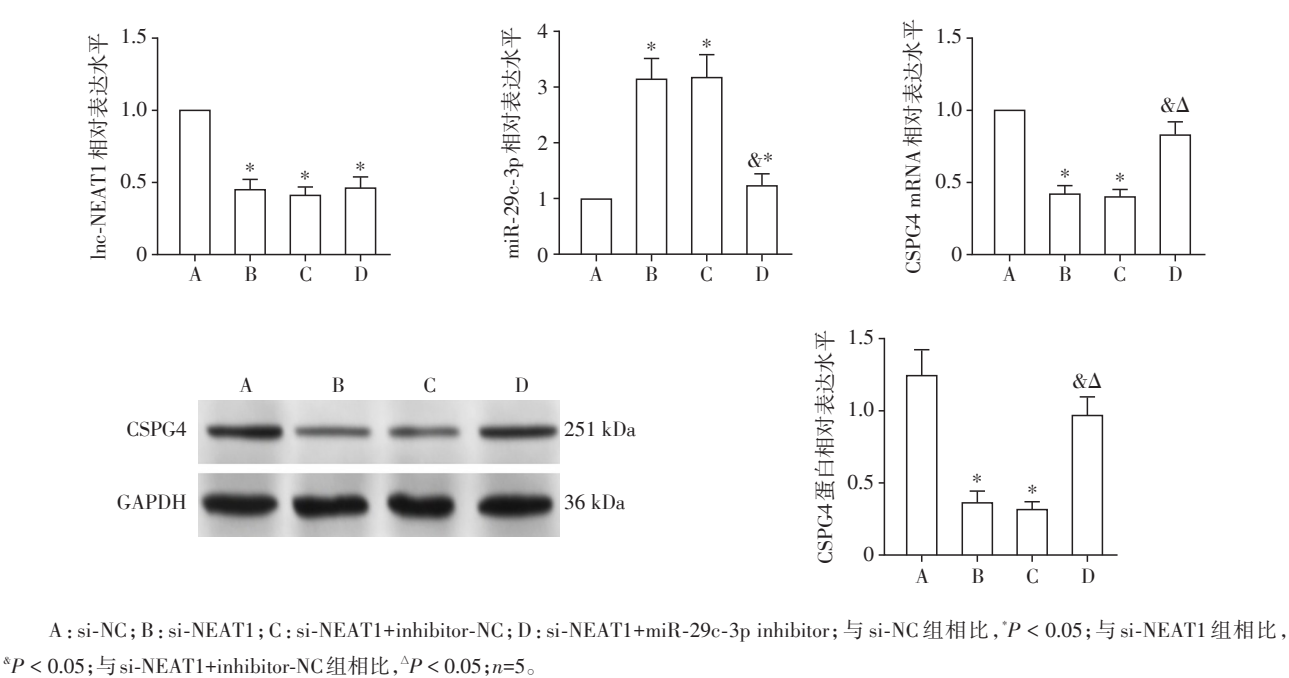
Figure 5 Effect of knockdown of NEAT1 on the growth of xenografted tumors in nude mice

2.9 敲低NEAT1对裸鼠移植瘤中Ki-67阳性表达的影响

与si-NC组相比,si-NEAT1组肿瘤组织中Ki-67阳性表达显著降低($P < 0.05$);与si-NEAT1组、si-NEAT1+inhibitor-NC组相比,si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor组肿瘤组织中Ki-67阳性表达显著升高($P < 0.05$,图7)。

3 讨论

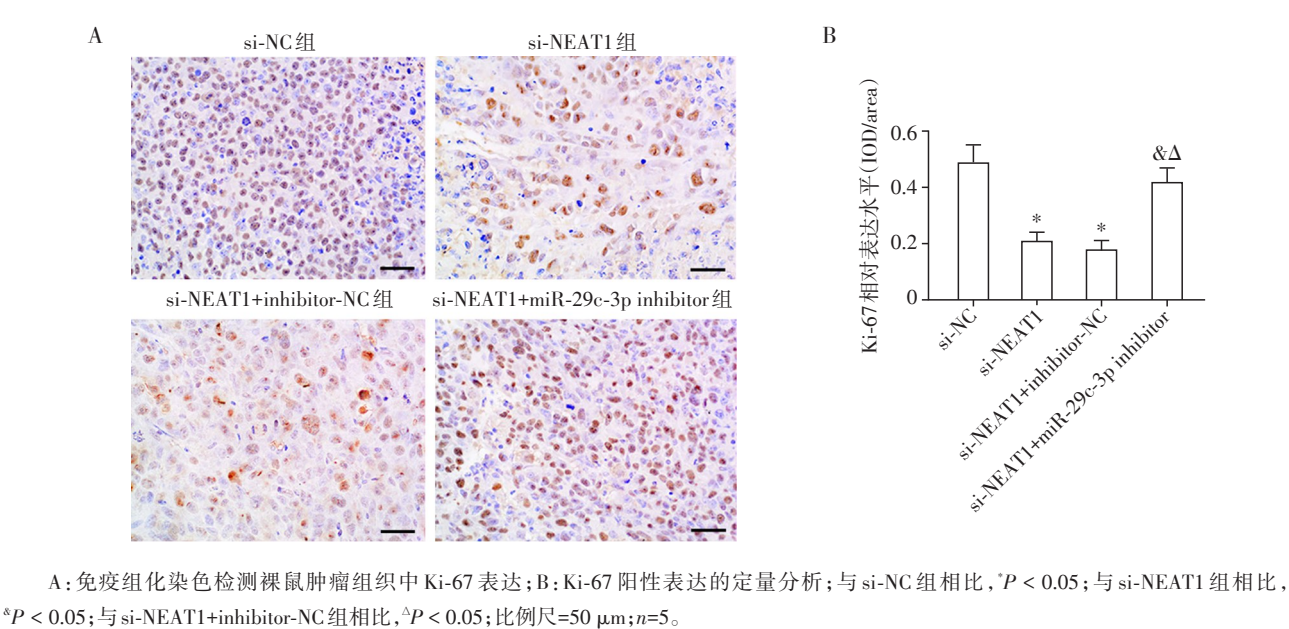
MM是最具侵袭性的皮肤恶性肿瘤类型,其转移能力和病死率高,严重影响人类健康。阐明复杂的分子机制对寻找治疗MM的新型生物靶点至关重要。lncRNA通过调节肿瘤相关基因或通路充当癌基因或肿瘤抑制基因^[9]。本研究阐明了lnc-NEAT1



A: si-NC; B: si-NEAT1; C: si-NEAT1+inhibitor-NC; D: si-NEAT1+miR-29c-3p inhibitor; 与 si-NC 组相比, * $P < 0.05$; 与 si-NEAT1 组相比, ^ $P < 0.05$; 与 si-NEAT1+inhibitor-NC 组相比, & $P < 0.05$; $n=5$ 。

图6 各组裸鼠移植瘤中lnc-NEAT1、miR-29c-3p、CSPG4表达

Figure 6 Expression of lnc-NEAT1, miR-29c-3p and CSPG4 in the transplanted tumors of nude mice in each group



A: 免疫组化染色检测裸鼠肿瘤组织中Ki-67表达; B: Ki-67阳性表达的定量分析; 与 si-NC 组相比, * $P < 0.05$; 与 si-NEAT1 组相比, ^ $P < 0.05$; 与 si-NEAT1+inhibitor-NC 组相比, & $P < 0.05$; 比例尺=50 μm ; $n=5$ 。

图7 各组裸鼠移植瘤中Ki-67阳性表达

Figure 7 Positive expression of Ki-67 in transplanted tumors of nude mice in each group

在MM细胞系中上调,lnc-NEAT1的敲低可能通过miR-29c-3p/CSPG4轴对细胞增殖、迁移、侵袭产生抑制作用;同时,lnc-NEAT1敲低干扰了体内肿瘤的生长,且下调miR-29c-3p可明显减弱lnc-NEAT1敲低对裸鼠移植瘤生长的抑制作用。以上研究表明,lnc-NEAT1在MM进展中充当肿瘤启动子,为lnc-NEAT1促进MM中肿瘤生长的分子机制研究提

供了有力的证据。

本研究探讨了lnc-NEAT1在MM中的作用机制。lncRNA可以在肿瘤的恶性进展中充当ceRNA^[10-11]。ceRNA通过减少miRNA与靶基因的结合,调节特定基因的表达^[12-13]。Ding等^[14]和Liu等^[5]已经发现在MM中lnc-NEAT1上调和miR-29c-3p下调。在本研究中,与HEMa-LP相比,MM细胞中lnc-NEAT1表

达升高,miR-29c-3p表达降低。当lnc-NEAT1下调时miR-29c-3p增加,这表明两者可能通过某些作用共同影响MM细胞。因此,本研究对lnc-NEAT1、miR-29c-3p和MM之间的关系进行了探究,结果显示,lnc-NEAT1和miR-29c-3p之间存在负调控作用,敲低lnc-NEAT1可上调miR-29c-3p表达,抑制MM细胞的增殖、侵袭和迁移。双荧光素酶分析表明lnc-NEAT1靶向并抑制MM细胞中的miR-29c-3p。为了验证lnc-NEAT1通过抑制miR-29c-3p来调节MM进展,本研究在敲低lnc-NEAT1的基础上,采用miR-29c-3p inhibitor转染以下调miR-29c-3p。结果显示,下调miR-29c-3p可阻断lnc-NEAT1敲低对MM细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用。此外,体内实验进一步证实了lnc-NEAT1 siRNA对MM裸鼠移植瘤生长的抑制作用被miR-29c-3p inhibitor逆转。基于上述证据可以得出结论,lnc-NEAT1可能通过下调miR-29c-3p来促进MM进展。

miR-29c-3p在许多人类肿瘤的恶性进展中充当肿瘤抑制因子^[15-16]。特别是,miR-29c-3p是MM患者生存的独立预测因子,其表达水平与MM患者区域淋巴结分期、远处转移、肿瘤直径和病理分化有关;miR-29c-3p过表达可抑制MM细胞的增殖、迁移和侵袭^[5,17]。CSPG4是一种在MM上过度表达的神经嵴糖蛋白^[18],是癌症治疗中一个有吸引力的靶点^[8,19]。生物信息学分析显示miR-29c-3p上存在CSPG4结合位点,并证明CSPG4是miR-29c-3p的潜在靶标。与之前的研究一致,本研究观察到在MM细胞系中miR-29c-3p表达降低而CSPG4表达增加。在敲低lnc-NEAT1上调miR-29c-3p的同时,发现CSPG4的基因和蛋白表达降低,而下调miR-29c-3p可增加CSPG4表达。双荧光素酶结果证实,过表达miR-29c-3p可降低CSPG4-WT的荧光素酶活性。因此,miR-29c-3p与CSPG4之间存在靶向调控关系。提示,miR-29c-3p可能通过靶向MM中CSPG4发挥其抗增殖和抗转移作用。

综上所述,lnc-NEAT1可能通过调节miR-29c-3p/CSPG4轴促进MM的生长和转移。本研究揭示了lnc-NEAT1/miR-29c-3p/CSPG4对MM生物学进展的影响,将有助于更好地了解MM的发病机制,并为MM的治疗提供参考。但本研究尚存在一定局限性,如未过表达CSPG4进一步验证lnc-NEAT1的调控机制,仅使用一种MM细胞系来探究lnc-NEAT1、miR-29c-3p和CSPG4在MM中相互作用,在未来的研究中可通过上调CSPG4表达并结合更多典型的

MM细胞系来验证这一结论。

[参考文献]

- [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):209-249
- [2] SIENA Á D D, BARROS II, STORTI C B, et al. Upregulation of the novel lncRNA U731166 is associated with migration, invasion and vemurafenib resistance in melanoma [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(3):671-683
- [3] HE J H, XU F X, MAN X Y, et al. Long non-coding RNA NEAT1 promotes tumor development and metastasis through targeting RAB9A in malignant melanoma [J]. Minerva Med, 2021, 112(2):308-309
- [4] XIA Y, ZHOU Y, HAN H, et al. lncRNA NEAT1 facilitates melanoma cell proliferation, migration, and invasion via regulating miR-495-3p and E2F3 [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11):19592-19601
- [5] LIU J, TAO G, ZHONG C, et al. Upregulation of miR-29c-3p hinders melanoma progression by inhibiting CDCA4 expression [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021(1):7065963-7065977
- [6] TUNG N, CHRISTINE K, NICHOLL MICHAEL B, et al. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma [J]. Epigenetics, 2011, 6(3):388-394
- [7] PRICE M A, COLVIN WANSHURA L E, YANG J B, et al. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2011, 24(6):1148-1157
- [8] URANOWSKA K, KALIC T, VALTSANIDIS V, et al. Expression of chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4) in melanoma cells is downregulated upon inhibition of BRAF [J]. Oncol Rep, 2021, 45(4):14-26
- [9] HUO J, WANG Y, ZHANG Y, et al. The lncRNA MIR155HG is upregulated by SP1 in melanoma cells and drives melanoma progression via modulating the miR-485-3p/PSIP1 axis [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2022, 22(1):152-159
- [10] DING Y, LI M, TAYIER T, et al. Bioinformatics analysis of lncRNA-associated ceRNA network in melanoma [J]. J Cancer, 2021, 12(10):2921-2932
- [11] HE Z, XIN Z, PENG Y, et al. Construction of competing endogenous RNA interaction network as prognostic markers in metastatic melanoma [J]. PeerJ, 2021, 9(1):12143-12162

[12] AN L F, HUANG J W, HAN X, et al. Downregulation of lncRNA H19 sensitizes melanoma cells to cisplatin by regulating the miR-18b/IGF1 axis[J]. Anticancer Drugs, 2020,31(5):473-482

[13] DUAN B X, GENG X R, WU Y Q. lncRNA RNCR2 facilitates cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in melanoma through HK2-mediated Warburg effect via targeting miR-495-3p[J]. Neoplasma, 2021, 68(4): 692-701

[14] DING F, LAI J D, GAO Y, et al. NEAT1/miR-23a-3p/KLF3: a novel regulatory axis in melanoma cancer progression[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19:217-226

[15] HU Z, CAI M, ZHANG Y, et al. MiR-29c-3p inhibits autophagy and cisplatin resistance in ovarian cancer by regulating FOXP1/ATG14 pathway[J]. Cell Cycle, 2020, 19(2):193-206

[16] ZOU T, GAO Y, QIE M. MiR-29c-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition to inhibit the proliferation, invasion and metastasis of cervical cancer cells by targeting SPARC[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(2):125-137

[17] WANG Y, LIU G, REN L, et al. Long non-coding RNA TUG1 recruits miR-29c-3p from its target gene RGS1 to promote proliferation and metastasis of melanoma cells [J]. Int J Oncol, 2019, 54(4):1317-1326

[18] HOFFMANN R M, CRESCIOLI S, MELE S, et al. A novel antibody-drug conjugate (ADC) delivering a DNA mono-alkylating payload to chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG4) - expressing melanoma [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(4):1029-1050

[19] KOOPMANS I, HENDRIKS M A J M, VAN GINKEL R J, et al. Bispecific antibody approach for improved melanoma-selective PD-L1 immune checkpoint blockade[J]. J Invest Dermatol, 2019, 139(11):2343-2351

[收稿日期] 2022-09-28
(责任编辑:蒋莉)

