doi:10.11659/jjssx.06E022051

·基础研究·

# lncRNA NNT-AS1 对膀胱癌细胞增殖、转移及肿瘤干细胞干性的影响与机制研究

廖林辉[1],陈华平[1],范国斌[1],段钰泽[2] (1.海南省万宁市人民医院泌尿外科,海南 万宁 571500;2.海南医学院基础医学与生命科学学院,海南 海口 571199)

[摘 要] **目的** 探究长链非编码 RNA(lncRNA) NNT-AS1 对膀胱癌细胞增殖、转移及肿瘤干细胞干性的影响和机制。**方法** qRT-PCR 检测 lncRNA NNT-AS1 在膀胱癌细胞 T24、5637、UM-UC-3、TCC-SUP 和膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 中的表达,将 T24 细胞和膀胱癌干细胞分为 sh-NC 组(转染 sh-NC)、sh-NNT-AS1 组(转染 sh-NNT-AS1)、Control 组(共转染 sh-NC、inh-NC 和 si-NC)、sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组(共转染 sh-NNT-AS1、inh-NC 和 si-NC)、sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组(共转染 sh-NNT-AS1、miR-582-5p 抑制物和 si-NC)、sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NCKAP1 组(共转染 sh-NNT-AS1、miR-582-5p 抑制物和 NCKAP1 小干扰 RNA)。CCK8 检测各组细胞增殖能力;Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力;细胞成球实验检测各组干细胞干性;流式细胞术检测 CD133 和 CD44 表达;双荧光素酶报告基因实验检测 lncRNA NNT-AS1 与 miR-582-5p 及 miR-582-5p 与 NCKAP1 的靶向关系;体内成瘤实验检测 lncRNA NNT-AS1 对体内成瘤的影响;Western blot 检测 NCKAP1、YAP、TAZ、CD44、ALDH1A1、Oct4、Nanog 蛋白表达。**结果** lncRNA NNT-AS1 高表达于 T24、5637、UM-UC-3、TCC-SUP 细胞。与 sh-NC 组比较,sh-NNT-AS1 组 T24 细胞增殖、迁移和侵袭能力显著下降($P<0.05$),膀胱癌干细胞成球数、CD44、ALDH1A1、Oct4、Nanog 蛋白表达及 $CD133^+CD44^+$ 细胞比例显著减少($P<0.05$)。lncRNA NNT-AS1 调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴。与 Control 组比较,sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组细胞光密度(OD)值显著降低($P<0.05$),细胞迁移和侵袭数显著减少($P<0.05$),膀胱癌干细胞干性显著降低($P<0.05$),肿瘤体积显著减小($P<0.05$),YAP 和 TAZ 表达显著下调($P<0.05$)。与 sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组比较,sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组细胞 OD 值、细胞迁移数和侵袭数均显著升高/增加($P<0.05$),膀胱癌干细胞干性、肿瘤体积显著增加($P<0.05$),YAP 和 TAZ 表达均显著升高($P<0.05$)。与 sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组比较,sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NCKAP1 组细胞 OD 值、细胞迁移数和侵袭数均显著降低/减少($P<0.05$),膀胱癌干细胞干性、肿瘤体积显著减小($P<0.05$),YAP 和 TAZ 表达均显著降低($P<0.05$)。**结论** lncRNA NNT-AS1 通过调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴影响膀胱癌细胞的增殖、转移及肿瘤干细胞干性,并激活 Hippo-YAP/TAZ 信号通路。

[关键词] 膀胱癌;lncRNA NNT-AS1;增殖;转移;肿瘤干细胞干性

[中图分类号] R394.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-06-17

## Effect and mechanism of lncRNA NNT-AS1 on the proliferation, metastasis and stemness of cancer stem cells of bladder cancer cells

LIAO Lin-hui[1], CHEN Hua-ping[1], FAN Guo-bin[1], DUAN Yu-ze[2] (1. Department of Urology, Wanning People's Hospital in Hainan, Wanning Hainan 571500, China; 2. School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical College, Haikou Hainan 571199, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect and mechanism of lncRNA NNT-AS1 on the proliferation, metastasis and stemness of tumor stem cells of bladder cancer cells. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of lncRNA NNT-AS1 in bladder cancer cells T24, 5637, UM-UC-3, TCC-SUP and bladder epithelial cells SV-HUC-1. T24 cells and bladder cancer stem cells were divided into the sh-NC group (transfected with sh-NC), the sh-NNT-AS1 group (transfected with sh-NNT-AS1), the Control group (co-transfected with sh-NC, inh-NC and si-NC), the sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC group (co-transfected with sh-NNT-AS1, inh-NC and si-NC), the sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC group (co-transfected with sh-NNT-AS1, miR-582-5p inhibitor and si-NC), the sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NCKAP1 group (co-transfected with sh-NNT-AS1, miR-582-5p inhibitor and NCKAP1 small interfering RNA). CCK8 was used to detect the cell proliferation ability in each group. Transwell method was used to detect the cell migration and invasion abilities. Cell spheroidization test was used to detect the stemness of stem cells in each group. Flow cytometry was used to detect the expression of CD133 and CD44. Dual luciferase reporter gene assay was used to detect the targeting relationship between lncRNA NNT-AS1 and miR-582-5p, targeting relationship between miR-582 -5p and NCKAP1. In vivo tumorigenesis assay was used to detect the effect of lncRNA NNT-AS1 on in vivo tumorigenesis. Western blot was used to detect the expression of NCKAP1, YAP, TAZ, CD44, ALDH1A1, Oct4, Nanog proteins. **Results** lncRNA NNT-AS1 was highly expressed in T24, 5637, UM-UC-3, TCC-SUP cells. Compared with the sh-NC group, the abilities of proliferation, migration and invasion of T24 cells in the sh-NNT-AS1 group were significantly decreased ($P<0.05$), the number of bladder cancer stem cells, the expression

[基金项目] 海南省卫生健康行业科研项目(21A200356)

[通信作者] 廖林辉,E-mail:jy19811123@163.com

of CD44, ALDH1A1, Oct4, Nanog proteins, and the proportion of CD133 + CD44 + cells were significantly reduced ($P < 0.05$). lncRNA NNT-AS1 regulated the miR-582-5p/NCKAP1 molecular axis. Compared with the Control group, the optical density (OD) value of cells in the sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC group was significantly decreased ($P < 0.05$), the number of cell migration and invasion was significantly reduced ($P < 0.05$), the stemness of bladder cancer stem cells were significantly reduced ($P < 0.05$), the tumor volume was significantly reduced ($P < 0.05$), and the expression of YAP and TAZ were significantly down-regulated ($P < 0.05$). Compared with the sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC group, the OD value of cells, the number of cell migration and invasion in the sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC group were significantly higher ($P < 0.05$), the stemness of bladder cancer stem cells and tumor volume was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression of YAP and TAZ were significantly higher ($P < 0.05$). Compared with the sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC group, the OD value of cells, the number of cell migration and invasion in the sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NCKAP1 group were significantly reduced ($P < 0.05$), the stemness of bladder cancer stem cells and tumor volume were significantly reduced ($P < 0.05$), and the expression of YAP and TAZ were significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA NNT-AS1 affects the proliferation, metastasis and stemness of tumor stem cells of bladder cancer cells by regulating the miR-582-5p/NCKAP1 molecular axis, and activates the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway.

**Keywords**: bladder cancer; lncRNA NNT-AS1; proliferation; metastatic; stemness of tumor stem cells

膀胱癌是起源于膀胱上皮黏膜组织的泌尿系统恶性肿瘤,男性发病率高,且发病率在逐年升高,虽然目前肿瘤的治疗技术在不断进步,但是膀胱癌容易复发和转移,患者预后较差,并且膀胱癌的发病机制复杂,但其具体机制尚不清楚,因此,需要进一步探究其发生发展的机制,发现膀胱癌诊断和治疗的新靶点[1-3]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)是一类长度大于 200 bp 的非编码 RNA,不具备编码功能,但是可通过多种途径调控肿瘤等疾病的病理进程,包括肿瘤的血管新生、生长和转移、免疫逃逸、肿瘤干性等[4-6]。目前,已有多种 lncRNA 被发现可调控膀胱癌的发生发展,如 lncRNA CASC1 和lncRNA GClnc1 具有调控膀胱癌生长和转移的能力,并有研究指出 lncRNA 具有诊断和治疗膀胱癌的潜力,因此需要挖掘更多对膀胱癌具有调控功能的lncRNA[7-8]。lncRNA NNT-AS1 是一类在多种肿瘤中高表达的 lncRNA,有研究指出其对肺癌、胶质瘤等在多种肿瘤进程均有调控作用[9-10]。而 lncRNA NNT-AS1 对膀胱癌的复发和转移的影响目前尚不清楚,本研究探究 lncRNA NNT-AS1 对膀胱癌细胞增殖、转移、肿瘤干细胞干性的影响,旨在为膀胱癌的复发和转移研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人正常膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 和人膀胱癌细胞 UM-UC-3、5637、TCC-SUP、T24 购自美国 ATCC 细胞库;PrimeScript™ 试剂盒购自日本 TAKARA 公司(批号:AI21034A)、PowerUp™ SYBRTM Green Master Mix(批号:A25741)购自购自美国 ThermoFisher 公司;Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒(批号:11668030)购自美国 Invitrogen 公司;CCK8 试剂盒(批号:WLA074)购自沈阳万类生物科技有限公司;CD44(批号:37259)、CD133(批号:64326)、NCKAP1(批号:34325)、YAP(批号:14074)、TAZ(批号:83669)、ALDH1A1(批号:36671)、Oct4(批号:2750)、Nanog(批号:8822)、GAPDH(批号:5174)抗体和山羊抗兔 IgG(批号:4417)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。4~6 周龄的雌性 Balb/c 裸鼠 12 只购自卡文斯实验动物技术有限公司[实验动物质量合格证:SCXK(琼)2019-0016]。

### 1.2 细胞培养

将细胞 SV-HUC-1、UM-UC-3、5637、TCC-SUP、T24 培养于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中,置于 37 ℃、5% $CO_2$ 的细胞培养箱中培养,待细胞汇合率达 80% 时进行细胞传代。

### 1.3 膀胱癌干细胞的分离、培养和鉴定

T24 细胞培养于 DMEM/F12 培养液中,添加 20 ng/mL碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、20 ng/mL 表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、5 μg/mL 胰岛素和 2% 无血清添加剂 B27,培养至形成大体积悬浮球体时进行传代。

### 1.4 qRT-PCR

使用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,根据 PrimeScript™ 试剂盒和 PowerUp™ SYBRTM Green Master Mix 分别进行逆转录反应和 qRT-PCR 反应,记录 CT 值,使用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算 lncRNA NNT-AS1 和 miR-582-5p 的相对表达量,引物序列见表 1。

### 1.5 细胞转染与分组

将 T24 细胞和膀胱癌干细胞分为 sh-NC 组(转染 sh-NC)、sh-NNT-AS1 组(转染 sh-NNT-AS1)、Control 组(共转染 sh-NC、inh-NC 和 si-NC)、sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组(共转染 sh-NNT-AS1、inh-NC 和 si-NC)、sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组(共转染 sh-NNT-AS1、miR-582-5p 抑制物和 si-NC)、sh-NNT-

**表1 基因引物序列**

| 基因 | 引物序列 |
|---|---|
| lncRNA NNT-AS1 | 上游引物:AGTTCCACCAAGTTTCTTCA |
| | 下游引物:AGGTTTTGCCAGCATAGAC |
| miR-582-5p | 上游引物:GCGGTTACAGTTGTTCAACC |
| | 下游引物:CTCAACTGGTGTCGTGGA |
| U6 | 上游引物:CTCGCTTCGGCAGCACA |
| | 下游引物:AACGCTTCACGAATTTGCGT |
| GAPDH | 上游引物:AGAAGGCTGGGGCTCATTTG |
| | 下游引物:AGGGGCCATCCACAGTCTTC |

AS1 + inh-582-5p + si-NCKAP1 组(共转染 sh-NNT-AS1、miR-582-5p 抑制物和 NCKAP1 小干扰 RNA),根据 Lipofectamine™2000 转染试剂盒,按照上述分组进行转染,转染 24 h 后,将各组细胞培养液更换为新鲜的 RPMI-1640 培养液。

### 1.6 CCK8 检测各组细胞增殖能力

将各组细胞稀释至 $2\times10^4$/mL,96 孔板每孔接种 100 μL,细胞置于培养箱中,分别在 0 h、24 h、48 h 和 72 h 取出对应的孔板,每孔加入 10 μL CCK8 溶液,孵育 4 h,使用酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔光密度(optical density,OD)值。

### 1.7 Transwell 小室法检测细胞迁移和侵袭能力

将各组细胞用不含血清的 RPMI-1640 培养液稀释至 $1\times10^5$/mL,取 100 μL 接种至 Transwell 小室中,小室下层浸没于含 600 μL 10% FBS 的 RPMI-1640 的 24 孔板中,24 孔板置于培养箱中培养 24 h,然后将小室底部用无水甲醛固定 30 min,结晶紫染色,清洗后观察细胞迁移和侵袭数。

### 1.8 膀胱癌干细胞成球实验

将膀胱癌干细胞用不含 FBS 的 DMEM/F12 培养液稀释至 $5\times10^3$/mL,在吸附性低的 24 孔板中每孔接种 600 μL,继续培养,每周更换 1 次培养液,显微镜下观察并记录各组细胞成球能力。

### 1.9 流式细胞术检测 CD133 和 CD44 表达

膀胱癌干细胞重悬成单细胞悬液,每管中加入 $1\times10^5$个细胞,加入 5 μL FITC-CD44 和 PE-CD133 抗体并设置单染对照管,避光孵育 30 min,检测各组细胞 CD133 和 CD44 表达。

### 1.10 双荧光素酶报告基因实验

StarBase 数据库预测 lncRNA NNT-AS1 与 miR-582-5p 的结合位点,用 Lipofectamine™2000 转染试剂盒将 lncRNA NNT-AS1 过表达质粒(lncRNA NNT-AS1 WT)、突变质粒(lncRNA NNT-AS1 MUT)及空白质粒(Vector)转染至 HEK 293T 细胞,然后分别将 miR-NC 和 miR-582-5p mimic 转染至上述细胞,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光强度。

TargetScan 数据库预测 miR-582-5p 与 NCKAP1 的结合位点,用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒将 NCKAP1 质粒(NCKAP1 WT)、突变质粒(NCKAP1 MUT)及空白质粒(Vector)转染至 HEK 293T 细胞,然后分别将 miR-NC 和 miR-582-5p mimic 转染至上述细胞,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光强度。

### 1.11 Western blot

RIPA 蛋白提取试剂盒提取各组细胞的总蛋白,取 10 μg 蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白(80 V 电泳 2 h),转膜(300 mA 转膜 1 h),封闭 2 h,PVDF 膜与 NCKAP1、YAP、TAZ、CD44、ALDH1A1、Oct4、Nanog 和 GAPDH 一抗(均按 1∶1 000 的比例稀释)于 4 ℃孵育过夜,TBST 清洗,按 1∶2 000 的比例稀释二抗,室温孵育 1 h,洗膜,ECL 试剂盒显影,拍照,并对曝光结果进行定量分析。

### 1.12 小鼠体内成瘤实验

4~6 周龄的雌性 Balb/c 裸鼠 12 只,随机分为 4 组,每组 3 只,饲养于温度 25 ℃、湿度 50%、12 h 明暗交替的 SPF 级动物房中,隔天更换垫料及饮用水。取 Control 组、sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组、sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组、sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NCKAP1 组 T24 细胞用生理盐水稀释至 $1\times10^8$/mL,然后于各组小鼠右侧腋下接种 100 μL 细胞悬液。接种后,每 2 d 使用游标卡尺测量肿瘤长(a)和宽(b),计算小鼠肿瘤体积(V),肿瘤体积计算公式为:$V=0.5\times a\times b^2$。接种 20 d 后,颈椎脱臼处死小鼠,解剖取瘤组织。

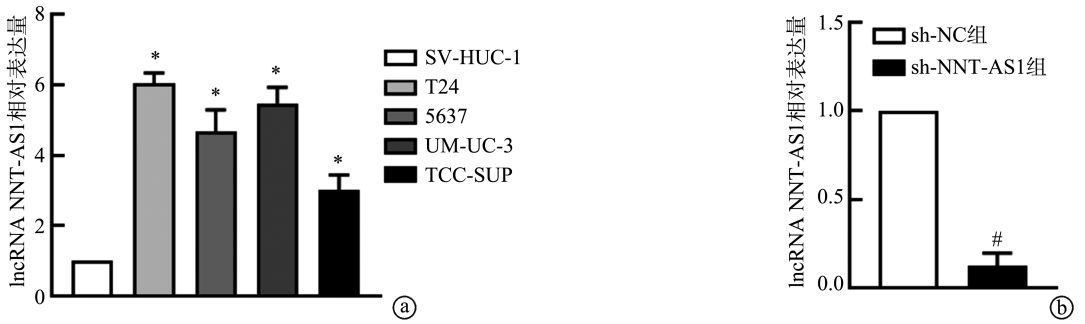
### 1.13 统计学方法

采用 Graphpad Prism 软件进行统计学分析,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间差异使用方差分析(*one-way ANOVA*),2 组间比较采用 $t$ 检验。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 lncRNA NNT-AS1 在膀胱癌细胞中高表达

qRT-PCR 检测结果显示,与人正常膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 比较,人膀胱癌细胞 T24、5637、UM-UC-3、TCC-SUP 中 lncRNA NNT-AS1 显著增加($P<0.001$),见图 1a。说明 lncRNA NNT-AS1 高表达于膀胱癌细胞。为了探究 lncRNA NNT-AS1 对膀胱癌的影响,在 lncRNA NNT-AS1 表达最高的 T24 细胞中转染 lncRNA NNT-AS1 shRNA(sh-NNT-AS1 组)和 si-lncRNA NNT-AS1 negative control(sh-NC 组),与 sh-NC 组比较,sh-NNT-AS1 组 T24 细胞中 lncRNA NNT-AS1 表达显著下调($P<0.05$),见图 1b。

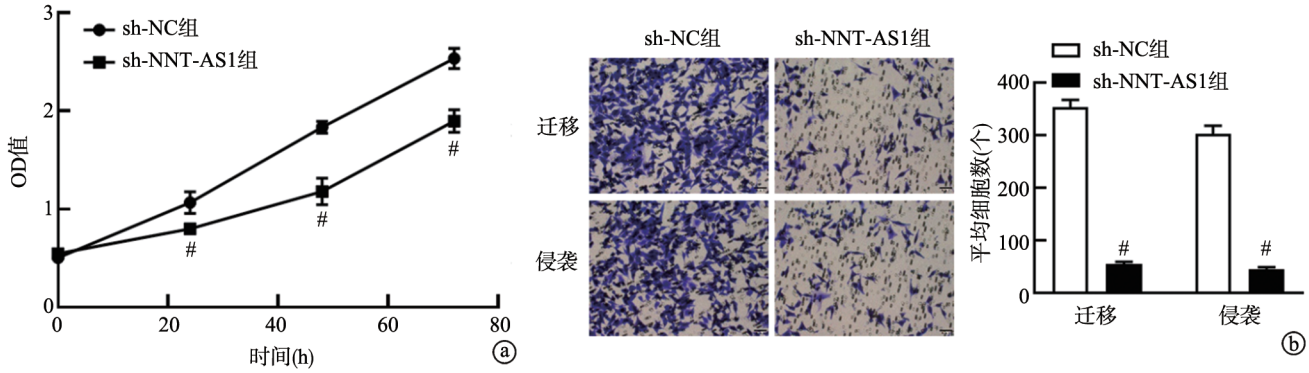



a:qRT-PCR 检测各细胞中 lncRNA NNT-AS1 表达;b:qRT-PCR 检测转染后各组细胞中 lncRNA NNT-AS1 表达 *:与 SV-HUC-1 比较,$P<0.05$;#:与 sh-NC 组比较,$P<0.05$

**图 1 qRT-PCR 检测 lncRNA NNT-AS1 表达**

2.2 lncRNA NNT-AS1 调控膀胱癌细胞的增殖和迁移能力

与 sh-NC 组比较,sh-NNT-AS1 组 T24 细胞的 OD 值在 24 h、48 h 和 72 h 均显著降低($P<0.05$),见图 2a。说明抑制 lncRNA NNT-AS1 可显著抑制膀胱癌细胞的增殖能力。细胞迁移和侵袭检测结果显示,与 sh-NC组比较,sh-NNT-AS1 组 T24 细胞的迁移数和侵袭数显著减少($P<0.05$),见图 2b。说明抑制 lncRNA NNT-AS1 表达可抑制膀胱癌细胞的迁移和侵袭能力。




a:CCK8 检测各细胞增殖能力;b:Transwell 小室法检测各组细胞迁移和侵袭能力(×20) #:与 sh-NC 组比较,$P<0.05$

**图 2 lncRNA NNT-AS1 调控膀胱癌细胞的增殖和迁移能力**

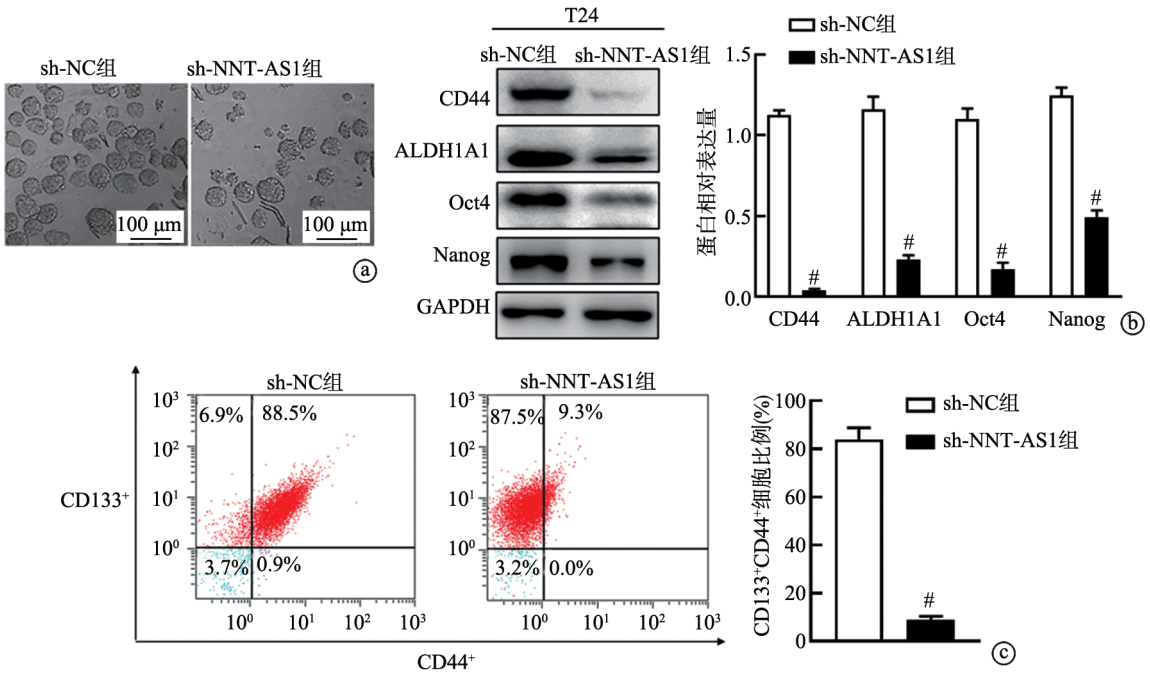
2.3 抑制 lncRNA NNT-AS1 对膀胱癌干细胞干性的影响

干细胞成球实验检测结果显示,与 sh-NC 组比较,sh-NNT-AS1 组膀胱癌干细胞成球数显著减少(图 3a)。Western blot 检测结果显示,sh-NNT-AS1 组膀胱癌干细胞标志物 CD44、ALDH1A1、Oct4、Nanog 蛋白表达显著低于 si-NC 组($P<0.05$),见图 3b。流式细胞术检测结果显示,sh-NNT-AS1 组 $CD44^+CD133^+$ 的细胞比例显著低于 sh-NC 组($P<0.05$),见图 3c。说明抑制 lncRNA NNT-AS1 可抑制膀胱癌干细胞干性。

2.4 lncRNA NNT-AS1 对 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴的影响

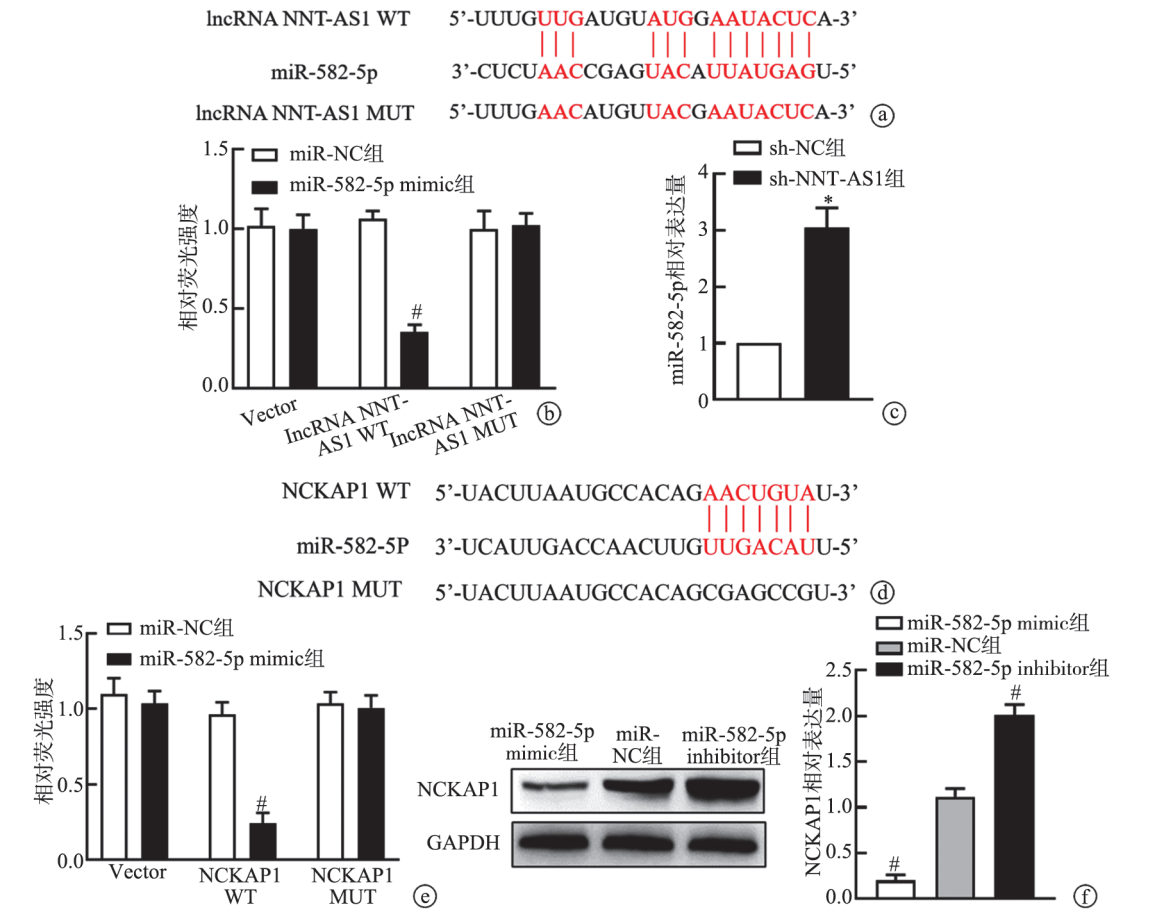
通过数据库 StarBase 预测到 lncRNA NNT-AS1 与 miR-582-5p 的结合位点(图 4a)。双荧光素酶报告基因实验检测结果显示,在 lncRNA NNT-AS1 WT 细胞中,与 miR-NC 组比较,转染 miR-582-5p mimic 细胞荧光强度显著下降($P<0.05$);而在 Vector 和 lncRNA NNT-AS1 MUT 细胞中,转染 miR-NC 和 miR-582-5p mimic 后细胞荧光强度无显著变化($P>0.05$),见图 4b。qRT-PCR 检测结果显示,抑制 T24 细胞中 lncRNA NNT-AS1 表达后,细胞中 miR-582-5p 表达显著上调($P<0.05$),见图 4c。说明 lncRNA NNT-AS1 可靶向调控 miR-582-5p 的表达。

通过 TargetScan 数据库预测到 miR-582-5p 与 NCKAP1 结合位点(图 4d)。双荧光素酶报告基因实验检测结果显示,在 NCKAP1 WT 细胞中,与 miR-NC 组比较,转染 miR-582-5p mimic 细胞荧光强度显著下降($P<0.05$);而在 Vector 和 NCKAP1 MUT 细胞中,转染 miR-NC 和 miR-582-5p mimic 后细胞荧光强度无显著变化($P>0.05$),见图 4e。转染 miR-582-5p mimic 后 T24 细胞中 NCKAP1 表达显著下调($P<0.05$),转染 miR-582-5p inhibitor 后 T24 细胞中 NCKAP1 表达显著上调 $P<0.05$),见图 4f。说明 miR-582-5p 可靶向调控 NCKAP1 的表达。




a:细胞成球实验检测膀胱癌干细胞干性(×10);b:Western blot 检测各组细胞 CD44、ALDH1A1、Oct4、Nanog 蛋白表达;c:流式细胞术鉴定 $CD44^+CD133^+$ 的细胞比例 #:与 sh-NC 组比较,$P<0.05$

**图 3 lncRNA NNT-AS1 调控膀胱癌干细胞干性**

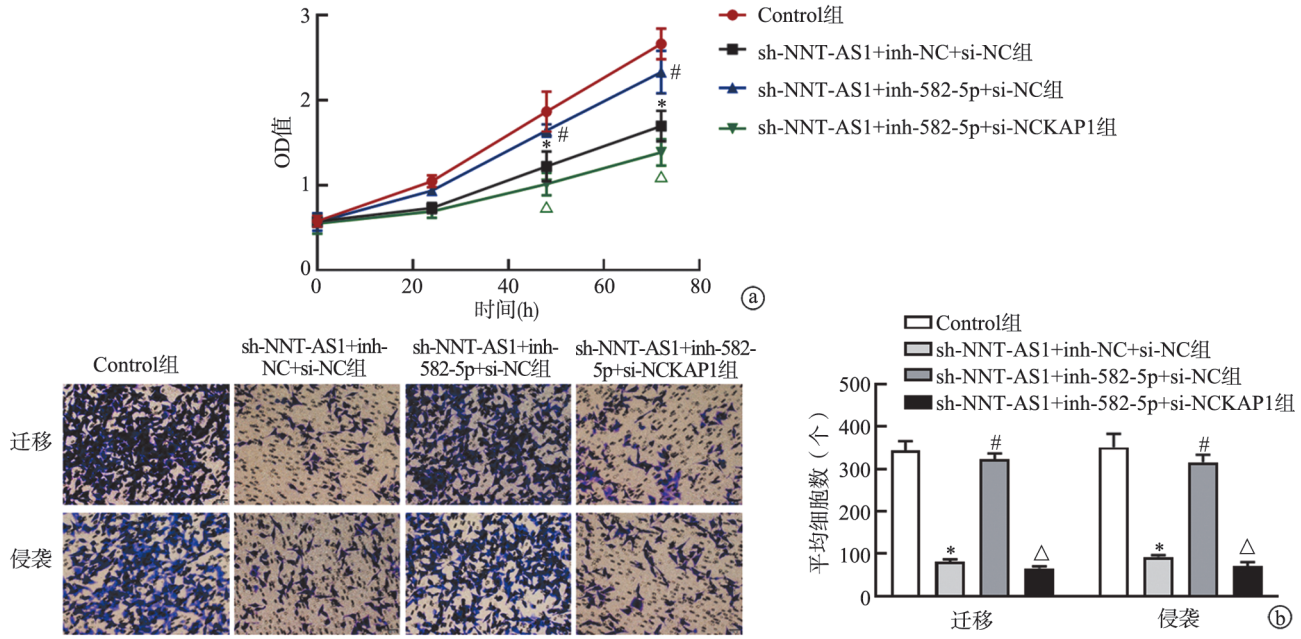



a:lncRNA NNT-AS1 与 miR-582-5p 结合位点的预测;b:双荧光素酶报告基因实验验证 lncRNA NNT-AS1 与 miR-582-5p 的靶向关系;c:qRT-PCR检测各组细胞中 miR-582-5p 的表达;d:miR-582-5p 与 NCKAP1 结合位点的预测;e:双荧光素酶报告基因实验验证 miR-582-5p 与 NCKAP1的靶向关系;f:Western blot 检测各组细胞中 NCKAP1 表达 *:与 sh-NC 组比较,$P<0.05$;#:与 miR-NC 组比较,$P<0.05$

**图 4 lncRNA NNT-AS1 调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴**

### 2.5　lncRNA NNT-AS1/miR-582-5p/NCKAP1 分子轴对膀胱癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

细胞增殖、迁移和侵袭检测结果显示，与 Control 组比较，sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组细胞 OD 值显著下调（$P<0.05$），细胞迁移和侵袭数显著减少（$P<0.05$）；与 sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组比较，sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组细胞 OD 值上调（$P<0.05$），细胞迁移和侵袭数显著增加（$P<0.05$）；与 sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组比较，sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NCKAP1 组细胞 OD 值显著下调（$P<0.05$），细胞迁移和侵袭数显著减少（$P<0.05$），见图 5。说明 lncRNA NNT-AS1 通过调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴而影响膀胱癌细胞的增殖和迁移。




a：CCK8 检测各组细胞增殖能力；b：Transwell 小室法检测各组细胞迁移和侵袭能力（×20）　*：与 Control 组比较，$P<0.05$；#：与 sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组比较，$P<0.05$；△：与 sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组比较，$P<0.05$

**图 5　lncRNA NNT-AS1 调控膀胱癌细胞增殖和迁移的能力**

### 2.6　lncRNA NNT-AS1/miR-582-5p/NCKAP1 分子轴对膀胱癌干细胞干性的影响

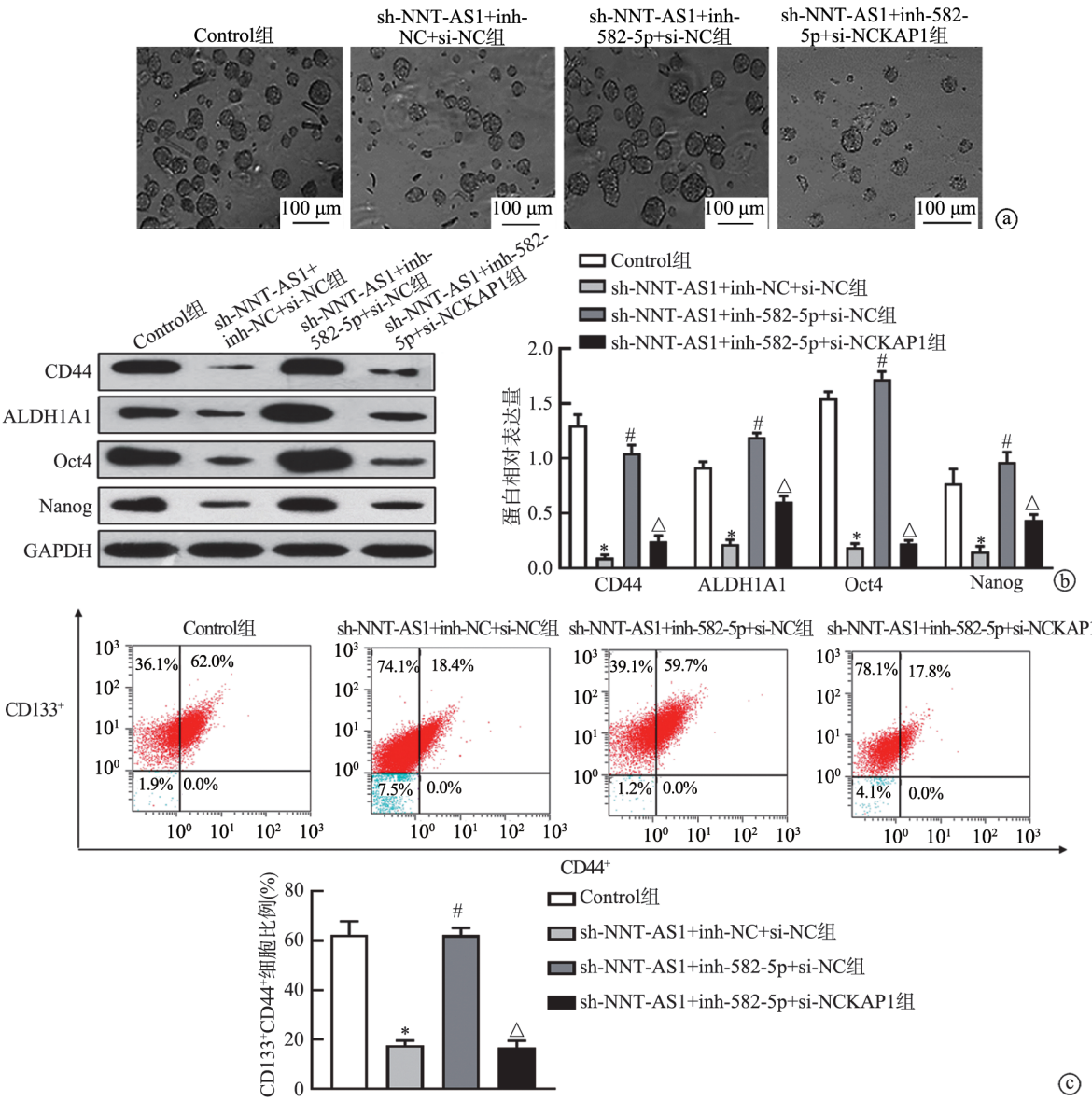
干细胞成球实验结果显示，sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组膀胱干细胞成球数，膀胱癌干细胞标志物 CD44、ALDH1A1、Oct4、Nanog 表达及 $CD44^+CD133^+$ 的细胞比例均显著低于 Control 组（$P<0.05$）；sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组膀胱干细胞成球数，CD44、ALDH1A1、Oct4、Nanog 表达及 $CD44^+CD133^+$ 的细胞比例均显著高于 sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组（$P<0.05$）；sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NCKAP1 组膀胱干细胞成球数，CD44、ALDH1A1、Oct4、Nanog 表达及 $CD44^+CD133^+$ 的细胞比例均显著低于 sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组（$P<0.05$），见图 6。说明 lncRNA NNT-AS1 通过调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴而影响膀胱癌干细胞干性。

### 2.7　lncRNA NNT-AS1/miR-582-5p/NCKAP1 分子轴对小鼠体内成瘤的影响

小鼠体内成瘤实验检测结果显示，与 Control 组比较，sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组小鼠肿瘤体积显著减小（$P<0.05$），sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组小鼠肿瘤体积显著大于 sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组（$P<0.05$），sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NCKAP1 组小鼠肿瘤体积显著小于 sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组（$P<0.05$），见图 7。说明 lncRNA NNT-AS1 调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴而影响膀胱癌细胞在小鼠体内的增殖。

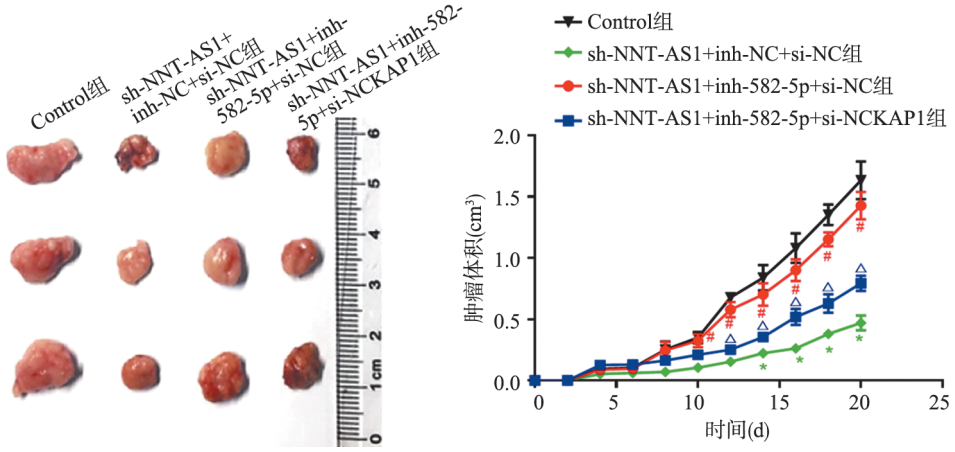
### 2.8　lncRNA NNT-AS1/miR-582-5p/NCKAP1 分子轴对 Hippo-YAP/TAZ 信号通路的影响

Western blot 检测结果显示，与 Control 组比较，sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组 T24 细胞 NCKAP1、YAP、TAZ 表达显著降低（$P<0.05$）；sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组细胞 NCKAP1、YAP、TAZ 表达显著高于 sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组（$P<0.05$）；sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NCKAP1 组细胞 NCKAP1、YAP、TAZ 表达显著低于 sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组（$P<0.05$），见图 8。说明 lncRNA NNT-AS1 调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴而激活 Hippo-YAP/TAZ 信号通路。



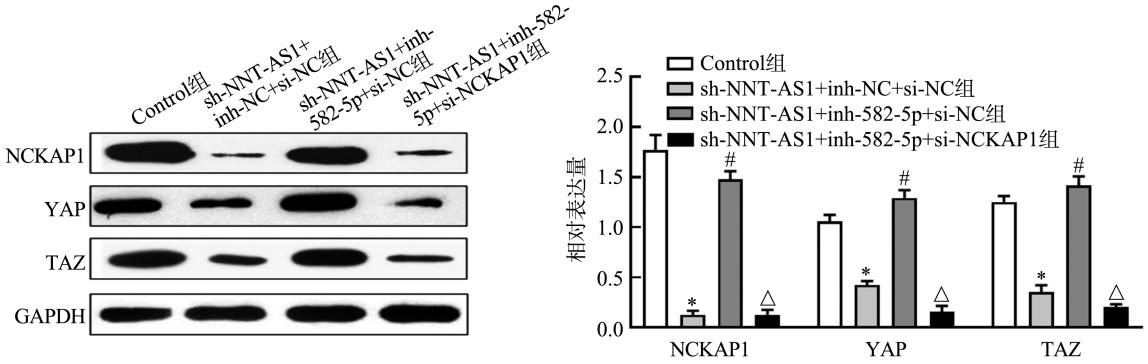

a:细胞成球实验检测膀胱癌干细胞干性;b:Western blot 检测各组细胞 CD44、ALDH1A1、Oct4、Nanog 蛋白表达;c:流式细胞术鉴定 $CD44^+CD133^+$ 的细胞比例 *:与 Control 组比较,$P<0.05$;#:与 sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组比较,$P<0.05$;△:与 sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组比较,$P<0.05$

**图 6 lncRNA NNT-AS1 调控 miR-582-5p/NCKAP1 分子轴而促进膀胱癌干细胞干性**




*:与 Control 组比较,$P<0.05$;#:与 sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组比较,$P<0.05$;△:与 sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组比较,$P<0.05$

**图 7 小鼠体内成瘤实验检测结果**




*:与 Control 组比较,$P<0.05$;#:与 sh-NNT-AS1 + inh-NC + si-NC 组比较,$P<0.05$;△:与 sh-NNT-AS1 + inh-582-5p + si-NC 组比较,$P<0.05$

**图 8 lncRNA NNT-AS1 激活 Hippo-YAP/TAZ 信号通路**

## 3 讨论

膀胱癌是一类多发于男性的泌尿系统恶性肿瘤,尤其早期的病理特征不明显,并且缺乏有效的肿瘤诊断标志物,使得其常在确诊时就已经处于中晚期,因此需要探究更多用于膀胱癌诊断和治疗的新靶点以及标志物[11-12]。近年来,许多非编码 RNA 被发现能够促进或者抑制多种肿瘤的病理进程,其中 lncRNA 是一类对肿瘤具有广泛的调节作用、且有望成为肿瘤诊断和治疗新靶点的非编码 RNA[13]。lncRNA 不具备编码蛋白质的功能,但是可在表观遗传的层面调控肿瘤细胞的恶性生物学行为,包括肿瘤的生长、转移、免疫逃逸、肿瘤耐药、放疗抗性等[14-15]。在膀胱癌的研究中,也有多种 lncRNA 被发现具有重要的调控功能,如 Wang 等[16]和 Zhang 等[17]发现,lncRNA GClnc1 和lncRNA CCAT1 均在膀胱癌中高表达,并且可促进膀胱癌的生长和转移,发现更多具有调控功能的 lncRNA 有助于膀胱癌诊断和治疗靶点的筛选。

lncRNA NNT-AS1 在多种肿瘤中差异表达,lncRNA NNT-AS1 高表达于肺癌、胶质瘤[9-10]。本研究也发现,lncRNA NNT-AS1 在膀胱癌细胞 T24、5637、UM-UC-3、TCC-SUP 中高表达,提示lncRNA NNT-AS1 也可能具有调控膀胱癌发生发展的能力。所以本研究选择 lncRNA NNT-AS1 表达水平最高的 T24 细胞进行后续实验,发现转染 shRNA 抑制 T24 细胞中 lncRNA NNT-AS1 的表达后,T24 细胞增殖、迁移和侵袭能力以及膀胱癌干细胞的干性亦显著降低,说明 lncRNA NNT-AS1 能够调控膀胱癌细胞恶性生物学行为。He 等[18]和 Huang 等[19]等也发现 lncRNA NNT-AS1 可促进非小细胞肺癌和胆管癌的增殖、迁移和侵袭。

在调控机制上,lncRNA NNT-AS1 可结合于其靶向的 miRNA 抑制靶基因的表达,而 miRNA 又可结合于其靶基因的 3'UTR 区,进而抑制靶基因的翻译,即 lncRNA 能够调控 miRNA/mRNA 信号轴[20]。有研究表明,lncRNA NNT-AS1 可调控 miR-142-5p/SOX4 分子轴从而调控胃癌的发展[21]。本研究发现,lncRNA NNT-AS1 可调控 miR-582-5p/NCKAP1 轴,并且 lncRNA NNT-AS1 可通过抑制 miR-582-5p 而上调 NCKAP1 的表达,进而调控 T24 细胞增殖、迁移、侵袭以及干细胞干性。同样,此类调控机制也在肝癌中被发现,如 Lu 等[22]发现,lncRNA NNT-AS1 可调控 miR-363/CDK6 轴进而影响肝癌细胞的生长。

NCKAP1 可通过多种途径调控肿瘤的发生发展,Zhu 等[23]研究发现 NCKAP1 可调控 Hippo-YAP/TAZ 信号通路而影响非小细胞肺癌的生长和转移。Hippo 信号通路具有高保守性,YAP 和 TAZ 是重要的同源转录共刺激因子,二者可在 Hippo 信号通路下游发挥关键的作用,Hippo 信号通路激活后,通过激酶的级联反应磷酸化 YAP 和 TAZ,进而抑制 YAP 和 TAZ 转移至细胞核,而 Hippo 信号通路的抑制可促进非磷酸化的 YAP 和 TAZ 转移至细胞核内,并与细胞核内 TEAD 等下游靶基因结合,进而促进细胞的增殖和转移[24]。本研究预测并验证后发现,lncRNA NNT-AS1 可调控 miR-582-5p/NCKAP1 轴进而激活 Hippo-YAP/TAZ 信号通路。有研究表明,Linc00673 可调控 miR-515-5p/MARK4/Hippo 信号通路而影响乳腺癌的增殖[25]。因此,本研究推测 lncRNA NNT-AS1 可通过激活 Hippo-YAP/TAZ 信号通路而调控膀胱癌细胞的增殖、迁移、侵袭以及肿瘤干细胞干性。但是 lncRNA NNT-AS1 是否能成为膀胱癌诊断和治疗的新靶点,还需进一步验证。

## [参考文献]

[1] Lai H,Cheng X,Liu Q,et al. Single-cell RNA sequencing reveals the epithelial cell heterogeneity and invasive subpopulation in human bladder cancer[J]. Int J Cancer,2021,149(12):2099 - 2115. doi:10.1002/ijc.33794.

[2] Teoh JY,Kamat AM,Black PC,et al. Recurrence mechanisms of non-

muscle-invasive bladder cancer-a clinical perspective[J]. Nat Rev Urol, 2022,19(5):280-294. doi:10.1038/s41585-022-00578-1.

[3] Lonati C, Simeone C, Suardi N, et al. Micropapillary bladder cancer: an evolving biology[J]. Curr Opin Urol, 2022, 32(5):504-510. doi:10.1097/MOU.0000000000001023.

[4] Zhang G, Sun J, Zhang X. A novel Cuproptosis-related LncRNA signature to predict prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Sci Rep, 2022, 12(1):11325-11337. doi:10.1038/s41598-022-15251-1.

[5] Yang M, Lu H, Liu J, et al. lncRNAfunc: a knowledgebase of lncRNA function in human cancer[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(D1): D1295-D1306. doi:10.1093/nar/gkab1035.

[6] Yao ZT, Yang YM, Sun MM, et al. New insights into the interplay between long non-coding RNAs and RNA-binding proteins in cancer[J]. Cancer Commun, 2022, 42(2):117-140. doi:10.1002/cac2.12254.

[7] Luo H, Xu C, Le W, et al. lncRNA CASC11 promotes cancer cell proliferation in bladder cancer through miRNA-150[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8):13487-13493. doi:10.1002/jcb.28622.

[8] Zhuang C, Ma Q, Zhuang C, et al. LncRNA GClnc1 promotes proliferation and invasion of bladder cancer through activation of MYC[J]. FASEB J, 2019, 33(10): 11045-11059. doi: 10.1096/fj.201900078RR.

[9] Huang JW, Luo XY, Li ZH, et al. LncRNA NNT-AS1 regulates the progression of lung cancer through the NNT-AS1/miR-3666/E2F2 axis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(1):238-248. doi:10.26355/eurrev_202001_19916.

[10] Zheng D, Chen D, Lin F, et al. LncRNA NNT-AS1 promote glioma cell proliferation and metastases through miR-494-3p/PRMT1 axis[J]. Cell Cycle, 2020, 19(13): 1621-1631. doi: 10.1080/15384101.2020.1762037.

[11] Bouchelouche K. PET/CT in bladder cancer: an update[J]. Semin Nucl Med, 2022, 52(4):475-485. doi:10.1053/j.semnuclmed.

[12] Phé V. Bladder cancer in neurogenic patients[J]. World J Urol, 2022, 40(8):1895-1896. doi:10.1007/s00345-022-04089-x.

[13] Abdi E, Latifi-Navid S. LncRNA polymorphisms and urologic cancer risk[J]. Environ Mol Mutagen, 2022, 63(4): 190-203. doi: 10.1002/em.22472.

[14] Shetty A, Venkatesh T, Kabbekodu SP, et al. LncRNA-miRNA-mRNA regulatory axes in endometrial cancer: a comprehensive overview[J]. Arch Gynecol Obstet, 2022, 306(5): 1431-1447. doi: 10.1007/s00404-022-06423-5.

[15] Sur S, Ray RB. Emerging role of lncRNA ELDR in development and cancer[J]. FEBS J, 2022, 289(11):3011-3023.

[16] Wang Y, Sun Q, Ji L, et al. lncRNA MORT regulates bladder cancer behaviors by downregulating microRNA-146a-5p[J]. Nephron, 2020, 144(7):351-357. doi:10.1159/000506291.

[17] Zhang C, Wang W, Lin J, et al. lncRNA CCAT1 promotes bladder cancer cell proliferation, migration and invasion[J]. Int Braz J Urol, 2019, 45(3):549-559. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2018.0450.

[18] He W, Zhang Y, Xia S. LncRNA NNT-AS1 promotes non-small cell lung cancer progression through regulating miR-22-3p/YAP1 axis[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(3):549-560. doi:10.1111/1759-7714.13280.

[19] Huang L, Jiang X, Kang P, et al. Long non-coding RNA NNT-AS1 functions as an oncogenic gene through modulating miR-485/BCL9 in cholangiocarcinoma[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11:7739-7749. doi:10.2147/CMAR.S207801.

[20] Ouyang J, Zhong Y, Zhang Y, et al. Long non-coding RNAs are involved in alternative splicing and promote cancer progression[J]. Br J Cancer, 2022, 126(8):1113-1124. doi:10.1038/s41416-021-01600-w.

[21] Zhang J, Zhang K, Hou Y. Long non-coding RNA NNT-AS1 knockdown represses the progression of gastric cancer via modulating the miR-142-5p/SOX4/Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(2):687-696. doi:10.3892/mmr.2020.11158.

[22] Lu YB, Jiang Q, Yang MY, et al. Long noncoding RNA NNT-AS1 promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis through miR-363/CDK6 axis[J]. Oncotarget, 2017, 8(51):88804-88814. doi:10.18632/oncotarget.21321.

[23] Zhu B, Finch-Edmondson M, Lee Y, et al. miR-582-5p is a tumor suppressor microRNA targeting the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. Cancer (Basel), 2021, 13(4):756. doi:10.3390/cancers13040756.

[24] Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation[J]. Genes Dev, 2016, 30(1):1-17. doi:10.1101/gad.274027.115.

[25] Qiao K, Ning S, Wan L, et al. LINC00673 is activated by YY1 and promotes the proliferation of breast cancer cells via the miR-515-5p/MARK4/Hippo signaling pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):418. doi:10.1186/s13046-019-1421-7.

(编辑:贺绍梅)