doi:10.11659/jjssx.10E022108

·基础研究·

lncRNA NEAT1通过抑制miR-let-7a激活BZW2促进喉乳头状瘤细胞的增殖和凋亡逃逸

张 波,王 松,阿依恒·曲库尔汗 (新疆医科大学第一附属医院耳鼻喉科,新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘 要] **目的** 探讨长链非编码RNA核富集转录本1(lncRNA NEAT1)对喉乳头状瘤(LP)细胞的增殖和凋亡逃逸的调控作用和机制。**方法** 培养人喉乳头状瘤细胞Hs840.T,将正常人口腔上皮细胞(HOECs)作为对照。将Hs840.T分为lncRNA NEAT1过表达载体(pcDNA-NEAT1)组、pcDNA-NEAT1阴性对照(pcDNA-NC)组、沉默lncRNA NEAT1的小干扰RNA载体(siNEAT1)组、siNEAT1的阴性对照(siNC)组、miR-let-7a的模拟物(mimic)组、mimic阴性对照(mimic-NC)组、miR-let-7a抑制剂(inhibitor)组、inhibitor阴性对照(inhibitor-NC)组、沉默碱性亮氨酸拉链和W2结构域2(BZW2)的小干扰RNA载体(siBZW2)组、siBZW2的阴性对照(siBZW2-NC)组、pcDNA-NEAT1联合siBZW2给药(pcDNA-NEAT1+siBZW2)组、pcDNA-NEAT1联合siBZW2-NC给药(pcDNA-NEAT1+siBZW2-NC)组。qRT-PCR检测各组中lncRNA NEAT1及其预测靶分子miR-let-7a的表达。Western blot和qRT-PCR检测BZW2的表达。双荧光素酶报告基因实验检测Hs840.T中lncRNA NEAT1和miR-let-7a以及miR-let-7a和BZW2的靶向关系。MTT实验测定Hs840.T的增殖能力。Annexin V-FITC/PI双染法检测Hs840.T的凋亡逃逸能力。**结果** Hs840.T中的lncRNA NEAT1和BZW2表达高于HOECs($P<0.05$),而miR-let-7a表达低于HOECs($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验结果表明,Hs840.T中lncRNA NEAT1吸附抑制miR-let-7a并上调BZW2的表达($P<0.05$),且BZW2是miR-let-7a的靶基因。与pcDNA-NC组相比,pcDNA-NEAT1组Hs840.T的增殖率增加($P<0.05$),早期、晚期凋亡率均降低($P<0.05$);与siNC组相比,siNEAT1组Hs840.T的增殖率降低($P<0.05$),早期、晚期凋亡率均增加($P<0.05$)。另外,与pcDNA-NEAT1+siBZW2-NC组相比,pcDNA-NEAT1+siBZW2组Hs840.T的增殖率降低($P<0.05$),早期、晚期凋亡率均增高($P<0.05$)。**结论** lncRNA NEAT1通过抑制miR-let-7a激活BZW2促进LP细胞的增殖和凋亡逃逸。

[关键词] 喉乳头状瘤;长链非编码RNA核富集转录本1;miR-let-7a;碱性亮氨酸拉链和W2结构域2;细胞凋亡;细胞增殖
[中图分类号] R739.65 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-10-21

lncRNA NEAT1 promoting the proliferation and apoptosis escape of laryngeal papilloma cells by activating BZW2 through the inhibition of miR-let-7a

ZHANG Bo,WANG Song,Ayiheng·Qukuerhan (Department of Otolaryngology,First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,Urumqi Xinjiang 830054,China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of long non-coding RNA nuclear enriched abundant transcript 1 (lncRNA NEAT1) on the proliferation and apoptosis escape of laryngeal papilloma (LP) cells and its mechanism. **Methods** Human laryngeal papilloma cells Hs840.T were cultured,and the normal human oral epithelial cells (HOECs) were used as the control.Then,the Hs840.T were divided into the lncRNA NEAT1 over-expression vector (pcDNA-NEAT1) group, pcDNA-NEAT1 negative control (pcDNA-NC) group, lncRNA NEAT1 silencing small interfering RNA vector (siNEAT1) group, siNEAT1 negative control (siNC) group, mimic of miR-let-7a (mimic) group, mimic negative control (mimic-NC) group, inhibitor of miR-let-7a (inhibitor) group, inhibitor negative control (inhibitor-NC) group, basic leucine zipper and W2 domains 2 (BZW2) silencing small interfering RNA vector (siBZW2) group, siBZW2 negative control (siBZW2-NC) group, combined administration of pcDNA-NEAT1 and siBZW2 (pcDNA-NEAT1+siBZW2) group, and combined administration of pcDNA-NEAT1 and siBZW2-NC (pcDNA-NEAT1+siBZW2-NC) group. qRT-PCR was used to detect the expression of lncRNA NEAT1 and its predicted target molecule miR-let-7a in each group. Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression of BZW2. Dual-luciferase reporter gene assay was used to investigate the targeting relationship between lncRNA NEAT1 and miR-let-7a and the targeting relationship between miR-let-7a and BZW2 in Hs840.T. MTT assay was used to determine the proliferation ability of Hs840.T. Annexin V-FITC/PI double staining assay was used to determine the apoptosis escape ability of Hs840.T. **Results** The expression of lncRNA NEAT1 and BZW2 in Hs840.T were higher than those in HOECs ($P<0.05$),while the expression of miR-let-7a in Hs840.T was lower than that in HOECs ($P<0.05$).The results of dual-luciferase reporter gene assay showed that lncRNA NEAT1 sponged and inhibited miR-let-7a,thereby up regulating the expression of BZW2 in Hs840.T ($P<0.05$),and BZW2 was a target gene of miR-let-7a.Compared with the pcDNA-NC group,the

[基金项目] 新疆维吾尔自治区区域协同创新专项项目(2020E01055)
[通信作者] 阿依恒·曲库尔汗,E-mail:ayhen979@sina.com

pcDNA-NEAT1 group showed a higher proliferation rate of Hs840.T(P<0.05),and lower early and later apoptosis rates (P<0.05);compared with the siNC group,the siNEAT1 group showed a lower proliferation rate of Hs840.T (P<0.05),and higher early and later apoptosis rates (P<0.05).In addition,compared with the pcDNA-NEAT1+siBZW2-NC group,the pcDNA-NEAT1+siBZW2 group showed a lower proliferation rate of Hs840.T (P<0.05),and higher early and later apoptosis rates (P<0.05).**Conclusion** lncRNA NEAT1 promotes the proliferation and apoptosis escape of LP cells by activating BZW2 through the inhibition of miR-let-7a.

Keywords: laryngeal papilloma;long non-coding RNA nuclear enriched abundant transcript 1;miR-let-7a;basic leucine zipper and W2 domains 2;cell apoptosis;cell proliferation

喉乳头状瘤(laryngeal papilloma,LP)是一种常见的良性肿瘤,主要影响10岁以下儿童[1],一般认为人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)感染是主要原因[2]。LP患者可能出现异物感、吞咽困难、呼吸困难或口齿不清等症状[1]。目前,手术是LP的标准治疗方法,包括手术切除、CO_2激光切除和内镜下切除。LP虽然是良性肿瘤,但在儿童中肿瘤生长较快,易复发,且其发展机制尚不清楚[3]。因此,有必要深入研究LP发生发展的分子机制。

长链非编码RNA(long non-coding RNA,lncRNA)是由200多个核苷酸组成且不编码蛋白的RNA分子[4],在肿瘤发生和进展中具有关键作用[5-7]。研究表明,长链非编码RNA核富集转录本1(nuclear enriched abundant transcript 1,lncRNA NEAT1)在喉癌中通过吸附抑制miR-204-5p促进其靶基因轴突导向因子4B(semaphorin 4B,SEMA4B)的表达从而诱导喉癌细胞的增殖和侵袭[8]。然而,lncRNA NEAT1在LP中的作用和调控机制仍不清楚。

miR-let-7a最早是在线虫研究过程中发现的一种高度保守的微小RNA,已被证明可抑制宫颈癌和肝癌等多种肿瘤的进展[9-10]。研究显示,miR-let-7a可靶向抑制碱性亮氨酸拉链和W2结构域2(basic leucine zipper and W2 domains 2,BZW2)的表达,从而抑制肝癌细胞的迁移和侵袭[10]。然而,miR-let-7a/BZW2轴是否在LP中起作用尚不清楚。

本研究从lncRNA NEAT1在LP细胞中的表达以及对miR-let-7a和BZW2的作用入手,探讨lncRNA NEAT1对LP细胞的增殖和凋亡逃逸的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与耗材

人喉乳头状瘤细胞Hs840.T及人口腔上皮细胞(human oral epithelial cells,HOECs)均购于美国典型培养物保藏中心。DMEM购于美国Gibco公司。10%胎牛血清购于美国Thermo Fisher Scientific公司。TaqMan human miRNA检测试剂盒、TRIzol购于美国Invitrogen公司。Power SYBR Green购于日本Takara公司。lncRNA NEAT1的过表达重组载体pcDNA3.1(+)-lncRNA NEAT1(pcDNA-NEAT1)以及pcDNA-NEAT1阴性对照(pcDNA-NC)、沉默lncRNA NEAT1的小干扰RNA载体(siNEAT1)以及siNEAT1的阴性对照(siNC)、miR-let-7a的模拟物(mimic)、mimic的阴性对照(mimic-NC)、miR-let-7a抑制剂(inhibitor)、inhibitor阴性对照(inhibitor-NC)、BZW2的小干扰RNA载体(siBZW2)以及siBZW2的阴性对照(siBZW2-NC)均购于上海Genepharm公司。lipofectamine 3000转染试剂盒购于美国Invitrogen公司。Prime Script RT试剂盒和SYBR Green Real Time PCR试剂盒均购于日本Takara公司。RIPA缓冲液和MTT测定试剂盒购于上海Beyotime公司。细胞裂解缓冲液购于美国Sigma公司。PVDF膜购于美国Millipore公司。ECL试剂盒购于美国Bio-Rad公司。兔抗BZW2、GAPDH的一抗和相应的羊抗兔二抗均购于英国Abcam公司。

1.2 细胞培养和转染

Hs840.T和HOECs用DMEM培养基培养,HOECs作为Hs840.T中lncRNA NEAT1、miR-let-7a、BZW2表达检测的对照细胞。

pcDNA-NEAT1、siNEAT1、siNEAT1、mimic、inhibitor、siBZW2以及各自的阴性对照组均基于lipofectamine 3000转染试剂盒说明书转染指定的质粒。针对lncRNA NEAT1特定的siRNA序列是5′-GAGGGAUGAGGGUGAAGAA-3′。将Hs840.T分为pcDNA-NEAT1组、pcDNA-NC组、siNEAT1组、siNC组、mimic组、mimic-NC组、inhibitor组、inhibitor-NC组、siBZW2组、siBZW2-NC组、pcDNA-NEAT1联合siBZW2给药(pcDNA-NEAT1+siBZW2)组和pcDNA-NEAT1联合siBZW2-NC给药(pcDNA-NEAT1+siBZW2-NC)组。

1.3 qRT-PCR检测lncRNA NEAT1和miR-let-7a的表达

收集正常培养的Hs840.T和HOECs以及1.2中Hs840.T的各处理组细胞,按照说明书用TRIzol试剂提取总RNA。根据Prime Script RT试剂盒说明书合成互补DNA(cDNA),采用茎环法合成miR-let-7a的cDNA。并根据SYBR Green Real Time PCR Kit的说明书检测lncRNA NEAT1、miR-let-7a和BZW2的相对表达水平,反应体系:1 μL cDNA、上下游引物各0.5 μL、10 μL SYBR Premix Ex Taq、8 μL ddH_2O。反应条件:95 ℃预变性5 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 34 s,共40个循环。GAPDH为lncRNA NEAT1和BZW2的内参,U6为miR-let-7a RNA的内参。相对表达量采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列(5′-3′)
lncRNA NEAT1	Forward GGAGAGGGTTGGTTAGAGAT
	Reverse CCTTCAACCTGCATTTCCTA
BZW2	Forward GGAGCTTTCCGACTTCCTCC
	Forward GGAGCTTTCCGACTTCCTCC
GAPDH	Forward TGCCATGTAGACCCCTTGAAG
	Reverse ATGGTACATGACAAGGTGCGG
miR-let-7a	Forward GGACUUUCUUCAUUCACACCG
	Reverse GACCACUGAGGUUAGAGCCA
U6	Forward CTCGCTTCGGCAGCACA
	Reverse AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.4 Western blot检测BZW2的表达

收集正常培养的Hs840.T和HOECs以及1.2中Hs840.T的各处理组细胞,用RIPA缓冲液进行裂解,使用SDS-PAGE凝胶电泳(90 V 30 min,120 V 1 h)分离收集的细胞裂解物,然后用湿法转移至PVDF膜上(400 mA,2 h)。使用5%脱脂牛奶封闭2 h,洗涤后用BZW2一抗(1∶500)4 ℃孵育16 h。洗涤后用辣根过氧化物酶偶联的二抗室温孵育2 h。内参蛋白为GAPDH。采用ECL对蛋白条带进行显色并成像。Image J分析各组条带的灰度值。

1.5 双荧光素酶报告基因实验

lncRNA NEAT1和miR-let-7a及miR-let-7a和BZW2的碱基结合位点用StarBase数据库进行预测分析。进一步验证lncRNA NEAT1和miR-let-7a及miR-let-7a和BZW2的靶向关系。含预测miR-let-7a结合位点的野生型(WT)和突变型(MUT)lncRNA NEAT1和BZW2 3′-非翻译区(UTR)片段的荧光素酶转染载体均由上海吉玛公司构建。根据说明书将Hs840.T接种在6孔板中并使用lipofectamine 3000联合转染mimic和NEAT1 WT/NEAT1 MUT以及mimic和BZW2-WT/BZW2-MUT。转染后48 h收集细胞,使用双荧光素酶报告基因分析系统(美国Promega公司)分析lncRNA NEAT1和BZW2的荧光素酶活性。

1.6 细胞增殖实验

采用MTT测定细胞增增殖率。将各组处理好的Hs840.T接种于96孔板,培养4 h后与MTT试剂混合再维持4 h,弃上清,加DMSO溶解甲瓒。使用多板读数器(美国Bio-Rad公司,680型)检测570 nm波长处的吸光度。

1.7 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞的凋亡情况

采用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测Hs840.T的凋亡情况。将每组1×10^5个Hs840.T重悬于500 μL Annexin结合缓冲液,然后用5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI标记,室温下避光孵育15 min。用流式细胞仪(美国MilliporeSigma公司)检测绿色(Annexin V-FITC)和红色(PI)荧光。检测波长为488 nm,发射波长为530 nm。

1.8 统计学分析

采用GraphPad PRISM 5.01软件对数据进行统计学分析,符合正态分布的数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。*Pearson*相关性分析法分析Hs840.T中lncRNA NEAT1与miR-let-7a表达的相关性。2组间的数据差异采用*t*检验。多组间比较采用单因素方差分析(*ANOVA*),然后进行*LSD-t*多重比较。检验水准为$\alpha=0.05$,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA NEAT1、miR-let-7a、BZW2在HOECs和Hs840.T中的表达

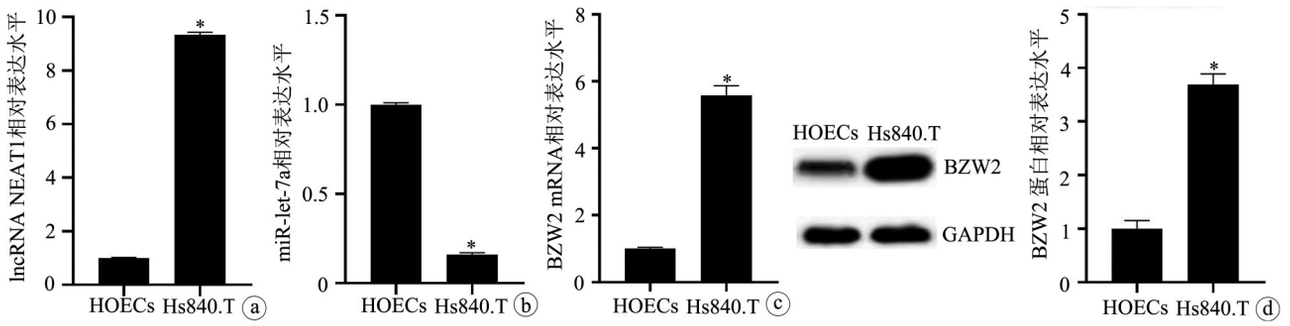
qRT-PCR实验结果显示,Hs840.T中的lncRNA NEAT1、BZW2 mRNA表达高于HOECs($P<0.05$),而Hs840.T中miR-let-7a的表达低于HOECs($P<0.05$),见图1a~c。Hs840.T中BZW2蛋白水平高于HOECs($P<0.05$),见图1d。

2.2 LP细胞中lncRNA NEAT1作为分子海绵吸附miR-let-7a

Hs840.T中lncRNA NEAT1与miR-let-7a的表达呈负相关,见图2a。与pcDNA-NC组比较,pcDNA-NEAT1组中lncRNA NEAT1的表达水平显著升高($P<0.05$),

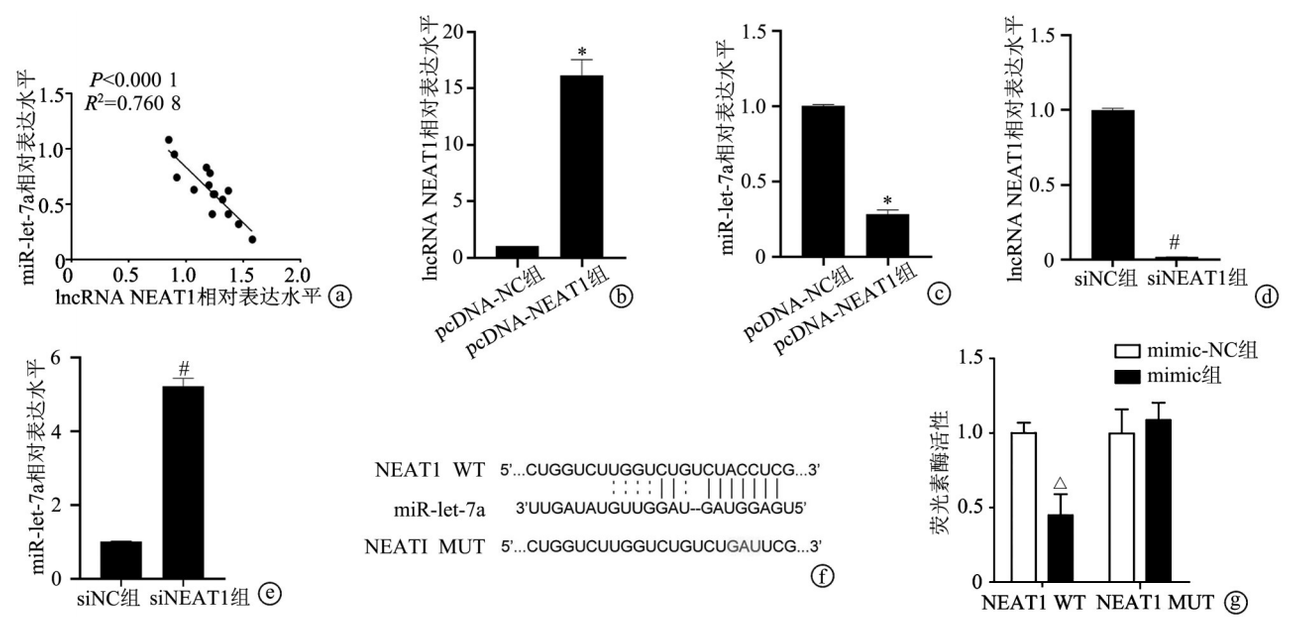
而miR-let-7a的表达水平显著降低(P<0.05),见图2b、c。而与siNC组比,siNEAT1组中lncRNA NEAT1的表达水平显著降低(P<0.05),miR-let-7a的表达水平显著升高(P<0.05),见图2d、e。

从StarBase数据库中查询到lncRNA NEAT1包含miR-let-7a的互补位点,见图2f。双荧光素酶报告基因实验结果显示,Hs840.T中转染mimic导致NEAT1 WT的荧光素酶活性被抑制(P<0.05),而NEAT1 MUT的荧光素酶活性无显著变化(P>0.05),见图2g。



a~c:qRT-PCR法检测Hs840.T和HOECs中lncRNA NEAT1、miR-let-7a和BZW2 mRNA的表达水平;d:Western blot检测HOECs和Hs840.T中BZW2蛋白的表达水平　*:与HOECs相比,P<0.05

图1　Hs840.T和HOECs中lncRNA NEAT1、miR-let-7a和BZW2的表达



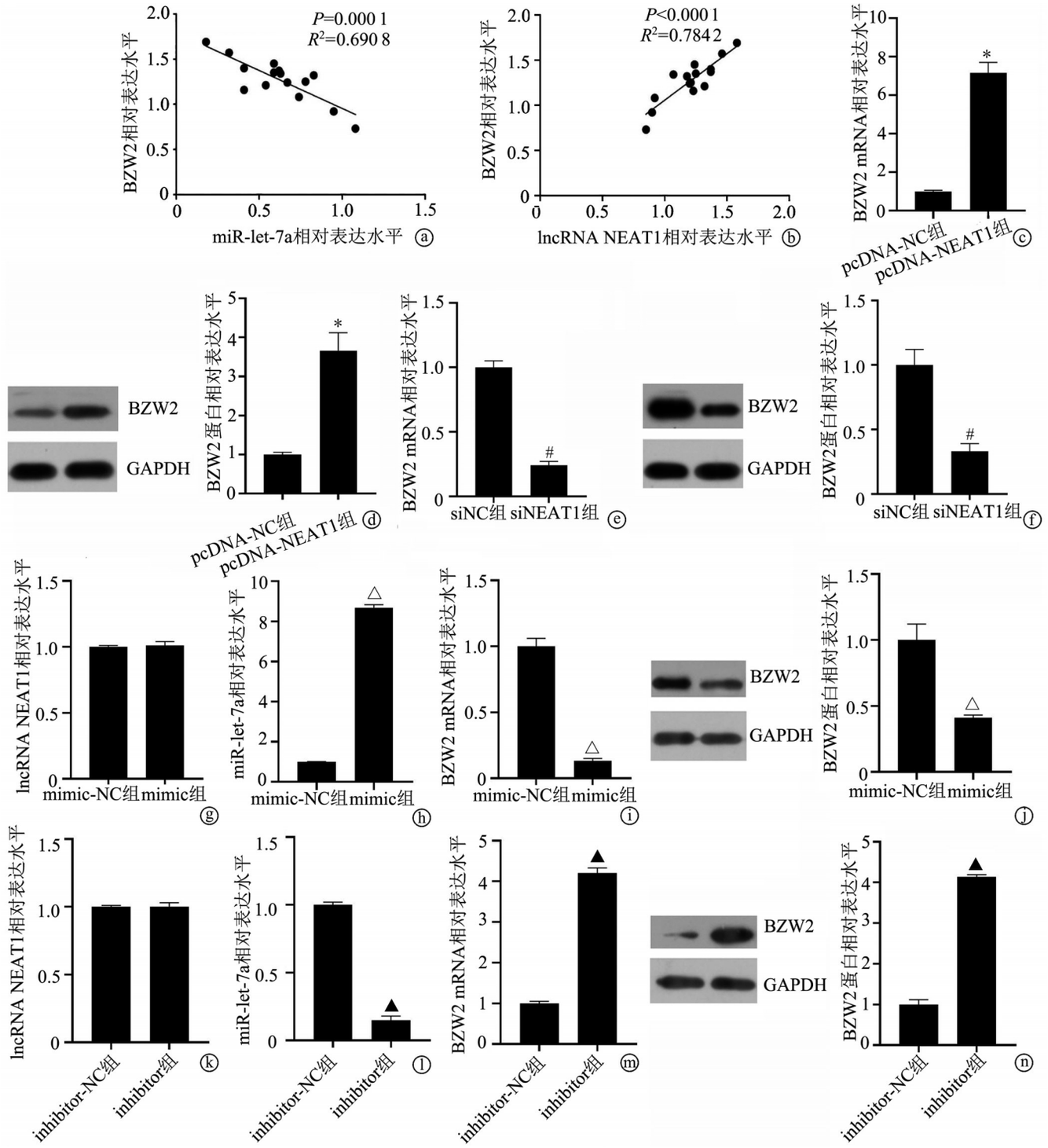
a:*Pearson*相关性分析法分析Hs840.T中lncRNA NEAT1与miR-let-7a的相关性;b~e:qRT-PCR法检测过表达或沉默lncRNA NEAT1对lncRNA NEAT1和miR-let-7a表达的影响;f:StarBase在线预测lncRNA NEAT1和miR-let-7a的互补序列;g:双荧光素酶报告基因实验确认lncRNA NEAT1对miR-let-7a的吸附作用　*:与pcDNA-NC组相比,P<0.05;#:与siNC组相比,P<0.05;△:与mimic-NC组相比,P<0.05

图2　lncRNA NEAT1吸附抑制Hs840.T中的miR-let-7a

2.3　lncRNA NEAT1通过抑制miR-let-7a上调BZW2

Hs840.T中BZW2与miR-let-7a表达呈负相关(P<0.05),而与lncRNA NEAT1呈正相关(P<0.05),见图3a、b。与pcDNA-NC组比,pcDNA-NEAT1组中BZW2的表达显著增加(P<0.05),见图3c、d。与siNC组比,siNEAT1组中BZW2的表达显著减少(P<0.05),见图3e、f。与mimic-NC组比,mimic组中lncRNA NEAT1的表达无显著变化(P>0.05),miR-let-7a的表达显著增加(P<0.05),而BZW2的表达显著减少(P<0.05),见图3g~j。与inhibitor-NC组比,inhibitor组lncRNA NEAT1的表达无显著变化(P>0.05),miR-let-7a的表达显著减少(P<0.05),而BZW2的表达显著增加(P<0.05),见图3k~n。

从StarBase数据库中查询到BZW2的3′UTR序列包含miR-let-7a的互补位点,见图4a。另外,双荧光素酶报告基因实验结果显示,Hs840.T中转染mimic导



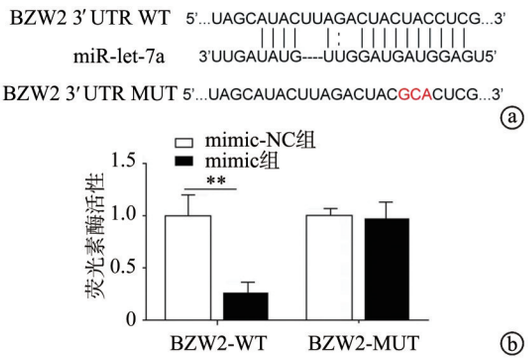
a、b：*Pearson* 相关性分析法分析 miR-let-7a 和 BZW2 以及 lncRNA NEAT1 与 BZW2 的相关性；c~f：过表达或沉默 lncRNA NEAT1 对 BZW2 mRNA 及其蛋白表达的影响；g~j：过表达 miR-let-7a 对 lncRNA NEAT1、miR-let-7a、BZW2 mRNA 及其蛋白表达的影响；k~n：沉默 miR-let-7a 对 lncRNA NEAT1、miR-let-7a、BZW2 mRNA 及其蛋白表达的影响 *：与 pcDNA-NC 组相比，$P<0.05$；#：与 siNC 组相比，$P<0.05$；△：与 mimic-NC 组相比，$P<0.05$；▲：与 inhibitor-NC 组相比，$P<0.05$

图3 Hs840.T 中 lncRNA NEAT1、miR-let-7a、BZW2 的表达调控关系

致 BZW2-WT 的荧光素酶活性被抑制（$P<0.05$），而 BZW2-MUT 的荧光素酶活性无显著变化（$P>0.05$），见图4b。说明 BZW2 是 miR-let-7a 的靶基因。

2.4 lncRNA NEAT1 促进 LP 细胞增殖及凋亡逃逸

pcDNA-NEAT1 组 Hs840.T 的增殖率为（97.33±4.12）%，高于 pcDNA-NC 组的（91.56±2.63）%（$t=$



a:StarBase在线预测lncRNANEAT1和miR-let-7a的互补序列;b:双荧光素酶报告基因实验确认miR-let-7a和BZW2的靶向作用 **:P<0.05

图4 lncRNA NEAT1吸附抑制Hs840.T中的miR-let-7a

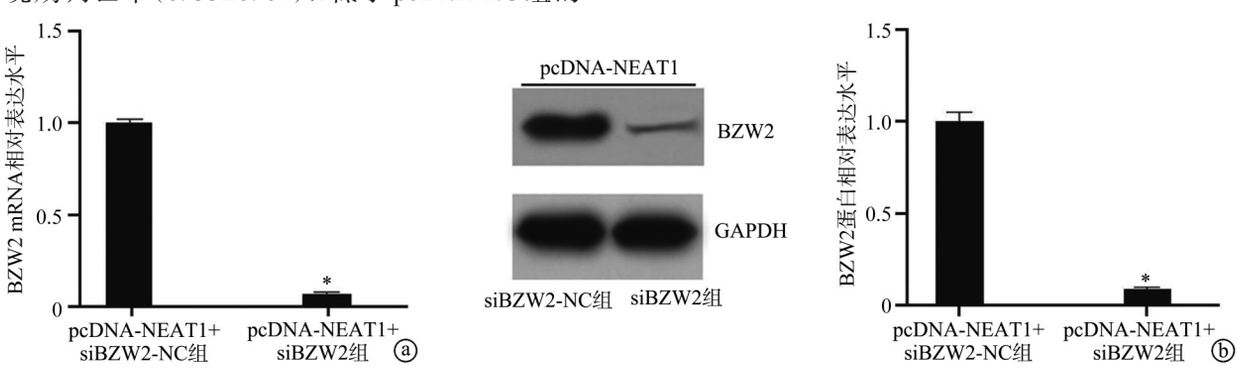
6.369,P=0.009)。siNEAT1组Hs840.T的增殖率为(76.89±4.58)%,低于siNC组的(92.03±5.32)%(t=10.230,P=0.001)。

Annexin-V FITC/PI实验结果显示,pcDNA-NEAT1组的早期凋亡率(0.16 ±0.02)%低于pcDNA-NC组的(0.43±0.02)%(t=5.966,P=0.031)。pcDNA-NEAT1组的晚期凋亡率(0.33±0.04)%低于pcDNA-NC组的(0.62±0.05)%(t=6.230,P=0.011)。另外,siNEAT1组的早期凋亡率(30.07±2.01)%高于siNC组的(0.46±0.03)%(t=10.330,P=0.001);siNEAT1组的晚期凋亡率(7.12±0.95)%高于siNC组的(0.54±0.07)%(t=9.623,P=0.002)。

2.5 lncRNA NEAT1通过激活BZW2促进LP细胞增殖及凋亡逃逸

与pcDNA-NEAT1+siBZW2-NC组比较,pcDNA-NEAT1+siBZW2组的BZW2 mRNA和蛋白表达都明显降低(P<0.001),见图5a、b。MTT结果显示,pcDNA-NEAT1+siBZW2组中Hs840.T的增殖率(68.26±7.11)%明显低于pcDNA-NEAT1+siBZW2-NC组的(96.30±4.62)%(t=8.569,P=0.002)。

pcDNA-NEAT1+siBZW2组中Hs840.T的早期凋亡率(2.45±0.31)%明显高于pcDNA-NEAT1+siBZW2-NC组的(0.11±0.01)%(t=9.882,P=0.001)。pcDNA-NEAT1+siBZW2组中Hs840.T的晚期凋亡率(12.35±0.95)%明显高于pcDNA-NEAT1+siBZW2-NC组的(0.28±0.02)%(t=9.882,P=0.001)。



a~b:siBZW2对pcDNA-NEAT1转染的Hs840.T中BZW2表达水平的影响 *:与pcDNA-NEAT1+siBZW2-NC组比较,P<0.05

图5 lncRNA NEAT1通过激活BZW2促进LP细胞增殖及凋亡逃逸

3 讨论

lncRNA NEAT1是癌症进展的关键分子,与HPV引起的多种肿瘤密切相关[11-12]。本研究通过体外实验发现了lncRNA NEAT1促进LP发展的关键证据。通过qRT-PCR、MTT、Western blot、流式细胞术等实验确定了lncRNA NEAT1过表达可以促进LP细胞增殖并抑制细胞的早期凋亡和晚期凋亡。通过StarBase数据库、qRT-PCR、Western blot实验以及双荧光素酶报告基因实验发现,lncRNA NEAT1通过分子海绵的作用直接吸附miR-let-7a并激活LP细胞中的BZW2。而敲低BZW2则阻断了lncRNA NEAT1诱导的LP细胞增殖,并挽救了细胞凋亡,敲低BZW2可以明显促进LP细胞的早期凋亡和晚期凋亡。表明lncRNA NEAT1通过调控miR-let-7a/BZW2轴促进细胞增殖和凋亡逃逸从而在LP中发挥致癌作用,本研究为LP的治疗提供了潜在的靶点。

目前,关于lncRNA在LP中的作用报道极少。有研究表明,lncRNA LINC00174可以通过吸附抑制miR-4500促进BZW2表达,从而加速LP细胞增殖并抑制细胞凋亡[13]。在本研究中,lncRNA NEAT1在LP细胞中高表达,而且lncRNA NEAT1过表达促进了LP细胞增殖并阻碍了细胞凋亡,而lncRNA NEAT1沉默则显著阻止了细胞增殖,明显加剧了细胞的凋亡。证实了lncRNA NEAT1在LP中的致癌作用,表明lncRNA NEAT1与LP进展的调节有关。研究显示,lncRNA NEAT1在多种癌症中发挥关键作用。例如,癌症相关

的成纤维细胞分泌的外泌体携带lncRNA NEAT1可以通过上调miR-26a/b-5p靶向STAT3信号通路促进子宫内膜癌的发展[14];Shen等[15]证明了lncRNA NEAT1通过介导KDM5A/Cul4A和Wnt通路加速结直肠癌的恶性进展。本研究结果也证实lncRNA NEAT1在LP中具有致癌作用。

lncRNA通过分子海绵的作用吸附抑制miRNA从而发挥生物学作用。据报道,lncRNA 408通过海绵化miR-654-5p激活LIMK1信号通路,从而加速乳腺癌的转移和侵袭[16],lncRNA MT1JP已被证明通过海绵化miR-24-3p增强肝癌细胞对乐伐替尼的耐药性[17]。此外,lncRNA ISG20通过抑制miR-486-5p促进活化T细胞核因子5的表达并诱导糖尿病肾病的肾纤维化[18]。

本研究也证实了lncRNA NEAT1含有miR-let-7a的互补位点。此外,本研究通过生物信息学分析、lncRNA NEAT1对miR-let-7表达的调控作用分析以及双荧光素酶报告基因实验,证明了LP中lncRNA NEAT1在功能上吸附miR-let-7a从而抑制miR-let-7a的表达。此外,本研究发现,BZW2是miR-let-7a的靶基因,也可以被lncRNA NEAT1直接上调。在过表达lncRNA NEAT1的基础上沉默BZW2明显抑制了过表达lncRNA NEAT1导致的LP细胞增殖和凋亡逃逸,证实BZW2是lncRNA NEAT1和miR-let-7a的关键功能性下游靶点,表明lncRNA NEAT1通过促进BZW2信号通路激活了LP的恶性行为。

综上所述,本研究发现lncRNA NEAT1在LP细胞中发挥致癌作用,并通过直接调控miR-let-7a/BZW2轴促进细胞增殖并加快细胞凋亡逃逸,可作为诊断和治疗LP的潜在靶点。

[参考文献]

[1] Kurita T, Chitose S, Sato K, et al. Pathological mechanisms of laryngeal papillomatosis based on laryngeal epithelial characteristics[J]. Laryngoscope Investig Otolaryngol, 2019, 4(1): 89-94. doi: 10.1002/lio2.242.

[2] Matsuzaki H, Makiyama K, Hirai R, et al. Multi-year effect of human papillomavirus vaccination on recurrent respiratory papillomatosis[J]. Laryngoscope, 2020, 130(2): 442-447. doi: 10.1002/lary.27993.

[3] Ouda AM, Elsabagh AA, Elmakaty IM, et al. HPV and recurrent respiratory papillomatosis: a brief review[J]. Life, 2021, 11(11): 1279-1285. doi: 10.3390/life11111279.

[4] Fernandes JCR, Acuña SM, Aoki JI, et al. Long non-coding RNAs in the regulation of gene expression: physiology and disease[J]. Noncoding RNA, 2019, 5(1): 17-23. doi: 10.3390/ncrna5010017.

[5] Wang L, Ren C, Xu Y, et al. The LINC00922 aggravates ovarian cancer progression via sponging miR-361-3p[J]. J Ovarian Res, 2021, 14: 77. doi: 10.1186/s13048-021-00828-7.

[6] Dong H, Hu J, Zou K, et al. Correction to: activation of LncRNA TINCR by H3K27 acetylation promotes Trastuzumab resistance and epithelial-mesenchymal transition by targeting MicroRNA-125b in breast cancer[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 87. doi: 10.1186/s12943-021-01385-9.

[7] Su Z, Chen M, Ding R, et al. Long noncoding RNA HCG11 suppresses the malignant phenotype of nonsmall cell lung cancer cells by targeting a miR875/SATB2 axis[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(2): 552. doi: 10.3892/mmr.2021.12191.

[8] Han L, Zheng C, Wu S. Long noncoding RNA NEAT1 promotes the malignancy of laryngeal squamous cell carcinoma by regulating the microRNA2045p/SEMA4B axis[J]. Oncol Lett, 2021, 22(5): 1-16. doi: 10.3892/ol.2021.13063.

[9] Shishodia G, Verma G, Srivastava Y, et al. Deregulation of microRNAs Let-7a and miR-21 mediate aberrant STAT3 signaling during human papillomavirus-induced cervical carcinogenesis: role of E6 oncoprotein[J]. BMC Cancer, 2014, 23(14): 996. doi: 10.1186/1471-2407-14-996.

[10] Liu L, Zhao J, Peng Y, et al. MiR-let-7a-5p inhibits invasion and migration of hepatoma cells by regulating BZW2 expression[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13(1): 12269-12279. doi: 10.2147/OTT.S278954.

[11] Geng F, Jia WC, Li T, et al. Knockdown of lncRNA NEAT1 suppresses proliferation and migration, and induces apoptosis of cervical cancer cells by regulating the miR377/FGFR1 axis[J]. Mol Med Rep, 2022, 25(1): 10. doi: 10.3892/mmr.2021.12526.

[12] Zhao D, Hou Y. Long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1 (LncRNA NEAT1) upregulates Cyclin T2 (CCNT2) in laryngeal papilloma through sponging miR-577/miR-1224-5p and blocking cell apoptosis[J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 1828-1837. doi: 10.1080/21655979.2021.2017653.

[13] Liu J, Yang T, Zhang Y, et al. Promotion of BZW2 by LINC00174 through miR-4500 inhibition enhances proliferation and apoptosis evasion in laryngeal papilloma[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 471. doi: 10.1186/s12935-020-01559-3.

[14] Fan JT, Zhou ZY, Luo YL, et al. Exosomal lncRNA NEAT1 from cancer-associated fibroblasts facilitates endometrial cancer progression via miR-26a/b-5p-mediated STAT3/YKL-40 signaling pathway[J]. Neoplasia, 2021, 23(7): 692-703. doi: 10.1016/j.neo.2021.05.004.

[15] Shen X, Ye Z, Wu W, et al. lncRNA NEAT1 facilitates the progression of colorectal cancer via the KDM5A/Cul4A and Wnt signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2021, 59(1): 51. doi: 10.3892/ijo.2021.5231.

[16] Qiao Y, Jin T, Guan S, et al. Long non-coding RNA Lnc-408 promotes invasion and metastasis of breast cancer cell by regulating LIMK1[J]. Oncogene, 2021, 40(24): 4198-4213. doi: 10.1038/s41388-021-01845-y.

[17] Yu T, Yu J, Lu L, et al. MT1JP-mediated miR-24-3p/BCL2L2 axis promotes Lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma cells by inhibiting apoptosis[J]. Cell Oncol (Dordr), 2021, 44(4): 821-834. doi: 10.1007/s13402-021-00605-0.

[18] Duan YR, Chen BP, Chen F, et al. LncRNA lnc-ISG20 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by inducing AKT phosphorylation through miR-486-5p/NFAT5[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(11): 4922-4937. doi: 10.1111/jcmm.1628.

(编辑:刘 艺)