

lncRNA-MIAT 通过靶向调控 miR-584/EZH2 轴促进 DLBCL 细胞的自噬^{*}

张红莉 徐晓玮 阿迪娜·乌提库尔 石雨薇

(新疆医科大学第二附属医院血液科, 新疆 乌鲁木齐 830062)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)-MIAT 通过调控微小 RNA(miR)-584/ZESTE 同源物增强子 2 (EZH2)轴对弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)细胞自噬的影响。方法 将 DLBCL 细胞系 Raji 分为 siMIAT 组[lncRNA-MIAT 的小干扰 RNA(siRNA)构建沉默组]、沉默阴性对照组(siNC 组)、miR-584 的模拟物组(mimic 组)、模拟物阴性对照组(mimic-NC 组)。将 siMIAT 组的 Raji 继续分为 miR-584 的 inhibitor 组(inhibitor 组)、inhibitor 的阴性对照组(inhibitor-NC 组)、EZH2 过表达组(pcDNA-EZH2 组)以及过表达空载体组(pcDNA-null 组)。用实时定量 PCR 法(qRT-PCR)检测 lncRNA-MIAT 和 miR-584 的表达,用荧光原位杂交(FISH)实验检测 lncRNA-MIAT 在 Raji 中的定位。用 Western blot 法检测 EZH2 和细胞自噬标志物 LC3-I、LC3-II、Atg5、Beclin-1 和 p62 的表达。CCK-8 法检测细胞的增殖活性。用双荧光素酶报告基因分析 miR-584 与 EZH2 的靶向调控作用以及 miR-584 与 lncRNA-MIAT 的靶向调控作用。结果 与 B 淋巴细胞系 MAO 比, lncRNA-MIAT 在 Raji 中高表达($P < 0.05$), lncRNA-MIAT 的表达主要定位在 MAO 和 Raji 的细胞质中。沉默 lncRNA-MIAT 抑制细胞的增殖活性并抑制细胞的自噬(均 $P < 0.05$), 沉默 lncRNA-MIAT 还抑制 EZH2 的表达并促进 miR-584 的表达(均 $P < 0.05$)。生信分析预测 lncRNA-MIAT 与 miR-584 具有多个结合位点, 以及 EZH2 与 miR-584 也具有多个结合位点, 双荧光素酶报告基因实验证实 EZH2 是 miR-584 的靶基因, 且 miR-584 与 lncRNA-MIAT 也具有靶向调控作用。在沉默 lncRNA-MIAT 的细胞中, 与 inhibitor-NC 组比, inhibitor 组中细胞的增殖活性以及细胞的自噬均增加($P < 0.05$)。在沉默 lncRNA-MIAT 的细胞中, 与 pcDNA-null 组比, pcDNA-EZH2 组中细胞的增殖活性以及细胞的自噬均增加($P < 0.05$)。结论 lncRNA-MIAT 通过靶向调控 miR-584/EZH2 轴促进 DLBCL 的增殖, 增强 DLBCL 细胞的自噬。

【关键词】 长链非编码 RNA-MIAT; 微小 RNA-584; ZESTE 同源物增强子 2; 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤细胞; 自噬

【中图分类号】 R 733.1 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 10. 002

lncRNA-MIAT promotes autophagy of lymphoma cells by targeting miR-584/EZH2 axis

ZHANG Hongli, XU Xiaowei, ADINA Wutikuer, SHI Yuwei

(Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830062, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA) -MIAT on autophagy in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) cells by regulating micRNA (miR) -584/ ZESTE homolog enhancer 2 (EZH2) axis. **Methods** DLBCL cell line Raji was divided into a silenced group for lncRNA-MIAT using small interfering RNA (siMIAT group), a silenced negative control group (siNC group), a mimic group for miR-584 (mimic group), and a mimic negative control group (mimic-NC group). The siMIAT group of Raji was further divided into an inhibitor group for miR-584 (inhibitor group), an inhibitor negative control group (inhibitor-NC group), an EZH2 overexpression group (pcDNA-EZH2 group), and an overexpression empty vector group (pcDNA-null group). Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of lncRNA-MIAT and miR-584, while fluorescence in situ hybridization

基金项目:新疆神经系统疾病研究重点实验室项目(XJDX1711-2247)

通讯作者:石雨薇,主任医师,硕士生导师,E-mail:bitterr00@163.com

引用本文:张红莉,徐晓玮,阿迪娜·乌提库尔,等. lncRNA-MIAT 通过靶向调控 miR-584/EZH2 轴促进 DLBCL 细胞的自噬[J]. 西部医学, 2024,36(10):1412-1418,1426. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 10. 002

(FISH) experiment was used to detect the localization of lncRNA-MIAT in Raji. Western blot was used to detect the expression of EZH2 and autophagy markers LC3-I, LC3-II, Atg5, Beclin-1, and p62. CCK-8 assay was used to detect cell proliferation activity. Dual luciferase reporter gene analysis was used to analyze the targeted regulation of miR-584 and EZH2, as well as the targeted regulation of miR-584 and lncRNA-MIAT. **Results** The results showed that compared with normal human B lymphocyte cell line MAO, lncRNA-MIAT was highly expressed in Raji ($P < 0.05$) and was mainly located in the cytoplasm. Silencing lncRNA-MIAT inhibited cell proliferation activity and autophagy (both $P < 0.05$), while also inhibiting EZH2 expression and promoting miR-584 expression (both $P < 0.05$). Bioinformatics analysis predicted that lncRNA-MIAT and miR-584 had multiple binding sites, as well as EZH2 and miR-584. Dual luciferase reporter gene experiments confirmed that EZH2 was a target gene of miR-584, and that lncRNA-MIAT also had a targeted regulatory effect on miR-584. In cells with silenced lncRNA-MIAT, cell proliferation activity and autophagy increased in the inhibitor group compared with the inhibitor negative control group (both $P < 0.05$). In cells with silenced lncRNA-MIAT, cell proliferation activity and autophagy increased in the pcDNA-EZH2 group compared with the pcDNA-null group (both $P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA-MIAT promotes autophagy in lymphoma cells by targeting the miR-584/EZH2 axis.

【Key words】 Long non-coding RNA-MIAT; microRNA-584; ZESTE homolog enhancer 2; Diffuse large B-cell lymphoma cells; Autophagy

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是非霍奇金淋巴瘤(Non Hodgkin Lymphoma, NHL)中最普遍的亚型,是淋巴瘤中一种高度侵袭性弥漫性疾病^[1]。但其临床治疗效果并不十分理想^[2],主要原因是 DLBCL 早期无明显症状。此外,目前对 DLBCL 发病机制的研究还不充分。因此,探讨影响 DLBCL 发展的因素,为 DLBCL 提供更有效的治疗方案具有重要意义。

长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, lncRNA)被定义为一种核苷酸超过 200 且不能翻译成蛋白质的长链 RNA^[3]。越来越多的证据表明,lncRNA 作为致癌因子在肿瘤进展中发挥重要作用^[4]。大量研究^[5-7]证实 lncRNA 在肿瘤中具有细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和自噬等功能。lncRNA-MIAT 是一种与癌症相关的新型 lncRNA,可以预测人类甲状腺乳头状癌的复发^[8-10]。然而,lncRNA-MIAT 在 DLBCL 中的作用还鲜少报道过。

自噬是一种满足细胞代谢需要和某些细胞器更新的过程,在此过程中,蛋白或细胞器被吞噬到自噬体中,自噬体与溶酶体融合形成自噬体并降解被包裹的内容物。既往文献^[11]表明,lncRNA 可以通过影响淋巴瘤细胞自噬来影响其表型。例如,lncRNA-BCYRN1 可通过自噬促进 NK/T 细胞淋巴瘤的天冬酰胺酶抗性。lncRNA 转移相关肺腺癌转录本(MALAT)-1,即 MALAT-1 在多发骨髓瘤中通过增强 HMGB1 表达促进自噬,从而抑制细胞凋亡^[12]。ARRDC1-AS1 在 DLBCL 中通过海绵化微小 RNA(microRNA, miR)-2355-5p 调控自噬相关蛋白 Atg5,加速 DLBCL 的自噬和进展^[13]。然而,lncRNA-MIAT 是否与 DLBCL 细胞的自噬有关尚不清楚。因此,本研究旨在揭示 lncRNA-MIAT 在 DLBCL 细胞系 Raji 的自噬中的作用及机制,为诊断和治疗 DLBCL 提供一个新生物学靶点。

因此,本研究旨在揭示 lncRNA-MIAT 在 DLBCL 细胞系 Raji 的自噬中的作用及机制,为诊断和治疗 DLBCL 提供一个新生物学靶点。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集于我院治疗的 DLBCL 患者的外周血标本 6 例为 DLBCL 组($n=6$,男 3 例,女 3 例,平均年龄:35.82±5.88 岁)。取 6 例于我院体检的健康者外周血标本为健康组($n=6$,男 3 例,女 3 例,平均年龄 34.95±6.42 岁)。本研究获得新疆医科大学第二附属医院伦理委员会的批准(批号:S19258406),所有涉及人体标本的实验工作均获得受试者的书面知情同意。

1.2 细胞和试剂 DLBCL 细胞系 Raji 购于武汉普诺赛生命科技有限公司,B 淋巴细胞系 MAO 购于上海盈湾生物科技有限公司。miR-584 的模拟物 mimic 和阴性对照 mimic-NC 以及 miR-584 的 inhibitor 和阴性对照 inhibitor-NC 均购于上海吉玛公司。细胞培养基和胎牛血清购于美国 Gibco 公司。siMIAT、siNC、pcDNA3.1 质粒均由上海吉玛公司。miRNeasy Mini Kit 试剂盒购于美国 Qiagen 公司。cDNA Synthesis Kit 试剂盒和 All-In-One RT Master Mix 试剂盒购于美国 abm 公司。FISH 探针购于德诺杰亿(北京)生物科技有限公司。ZESTE 同源物增强子 2(EZH2)、LC3-I、LC3-II、Atg5、Beclin-1、p62、GAPDH 的一抗和对应的二抗均购于英国 Abcam 公司。CCK-8 试剂盒购于上海碧云天生物科技有限公司。双荧光素酶报告基因载体均由武汉 BioRun 公司构建。

1.3 方法

1.3.1 细胞的转染和分组 Raji 和 MAO 均在 RPMI-1640 培养基中培养。所有细胞的培养基中均含有 10% 的胎牛血清,并在 37 °C 和 5% CO₂ 的环境下进行培养。用靶向 lncRNA-MIAT 的小干扰 RNA (siRNA) (siMIAT) 敲低 lncRNA-MIAT, siNC 作为对照。构建 EZH2 的 pcDNA3.1 重组质粒 (pcDNA-EZH2) 过表达 EZH2, pcDNA-null 作为对照。用 miR-584 的模拟物 mimic 过表达 miR-584, mimic-NC 作为对照,用 miR-584 的 inhibitor 沉默 miR-584, inhibitor-NC 为对照。将 Raji 分为 siMIAT 组 (用 7.5 μL Lipofectamine 2000 和 20 μmol/L siMIAT 孵育细胞)、siNC 组 (用 7.5 μL Lipofectamine 2000 和 20 μmol/L siNC 孵育细胞)、mimic 组 (用 7.5 μL Lipofectamine 2000 和 35 μmol/L mimic 孵育细胞)、mimic-NC 组 (用 7.5 μL Lipofectamine 2000 和 35 μmol/L mimic-NC 孵育细胞)。并将 siMIAT 组的 Raji 分为 inhibitor 组 (用 7.5 μL Lipofectamine 2000 和 12.5 μmol/L inhibitor 孵育细胞) (siMIAT+inhibitor 组)、inhibitor-NC 组 (用 7.5 μL Lipofectamine 2000 和 12.5 μmol/L inhibitor-NC 孵育细胞) (siMIAT+inhibitor-NC 组)、pcDNA-EZH2 组 (用 7.5 μL Lipofectamine 2000 和 25 μg/L pcDNA-EZH2 质粒孵育细胞) (siMIAT+pcDNA-EZH2 组) 和 pcDNA-null 组 (用 7.5 μL Lipofectamine 2000 和 25 μg/L pcDNA-null 质粒孵育细胞) (siMIAT+pcDNA-null 组)。将 Raji 或将 siMIAT 组的 Raji 置于 6 孔板中 24 h,然后用说明书中指定方法依照上述对应的质粒或阴性对照用 Lipofectamine 2000 转染 48 h。

1.3.2 实时定量 PCR 法 (qRT-PCR) 检测 lncRNA-MIAT 和 miR-584 的表达 采用 TRIzol 法/miR-Neasy Mini 试剂盒分离血液细胞、MAO 细胞以及各组 Raji 细胞的总 RNA/总 miRNA,采用 cDNA Synthesis Kit 和 5X All-In-One RT Master Mix 进行定量实时聚合酶链反应。miR-584 的表达水平使用 TaqMan 人 miRNA 检测试剂盒,内参基因为 U6 基因。lncRNA-MIAT 的内参基因为 GAPDH。lncRNA-MIAT 的引物为正向 5'-GAGGGAAGTTCT-GAGCTTGG-3' 和反向 5'-CCTTTCTTCTGGGCT-GAGAC-3'。miR-584 的引物为正向 5'-TTATG-GTTTGCCTGGGACTGAG-3' 和反向 5'-GCGAG-CACAGAATTAATACGAC-3'。相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。

1.3.3 荧光原位杂交 (FISH) 实验检测 lncRNA-MIAT 的定位 用冷的 PBS 洗涤 Raji 或 MAO,然后在室温下用 4% 甲醛固定 10 min。细胞在含 0.5%

Triton X-100 的 PBS 中在 4 °C 下通透化 5 min,然后在 PBS 中清洗 3 次,每次 5 min。根据 FISH 探针制造商提供的方案,在 37 °C 湿润的暗室环境中使用 FISH 探针进行杂交。RNA 原位杂交结束后,使用蔡司 LSM800 共聚焦显微镜获得所有图像。

1.3.4 Western blot 法检测 EZH2 和细胞自噬标志物 LC3-I、LC3-II、Atg5、Beclin-1 和 p62 的表达 用冷的 PBS 缓冲液洗涤各组 Raji,然后用裂解缓冲液冰裂解 30 min。从细胞裂解液中提取蛋白并测定。将每个样品中等量的蛋白质装入聚丙烯酰胺凝胶中,并转移到聚偏二氟乙烯膜上。膜在室温下用 5% 脱脂牛奶密封 1 h。随后,将膜和一抗在 4 °C 下孵育过夜。用辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联二抗在室温下孵育 1 h。用 ECL 试剂进行显色,在凝胶成像仪上获取蛋白条带的图片,用 ImageJ 软件分析条带的灰度值。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞的增殖活性 CCK-8 试剂盒检测 Raji 增殖活性。在 96 孔板中培养 100 μL Raji。每孔于孵育 24、48、72 h 接种 CCK-8 试剂,再孵育 3 h。在 450 nm 分光光度计下获取光密度 (OD) 值。

1.3.6 双荧光素酶报告基因实验检测基因之间的靶向关系 为进行双荧光素酶报告基因实验,分别将 lncRNA-MIAT 的野生型 (WT) (lncRNA-MIAT-WT) 和突变型 (MUT) (lncRNA-MIAT-MUT) 或者 EZH2 3' UTR 的野生型 (WT) (EZH2-WT) 和突变型 (MUT) (EZH2-MUT) 克隆到报告载体 pmiR-report TM 荧光素酶中。分别用上述荧光素酶载体和 mimic 或 mimic-NC 共转染 Raji 细胞。在 GloMax[®] Discover Microplate Reader 上测定双荧光素酶活性。

1.4 统计学分析 本研究数据使用 GraphPad PRISM 5.01 进行数据录入和统计学分析,正态分布的数据用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用单因素方差分析 (ANOVA) 评估平均值之间的差异,并进行 LSD-*t* 的多重比较,以评估两组之间的统计差异。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-MIAT 在淋巴瘤细胞中的表达 RT-qPCR 检测结果显示,与健康组血液相比,lncRNA-MIAT 在 DLBCL 组血液中的表达显著增加,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与 MAO 细胞相比,lncRNA-MIAT 在 Raji 中的表达都显著增加,上调约 4.5 倍,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。另外,通过 FISH 实验检测到 lncRNA-MIAT 定位在 MAO 和 Raji 的细胞质。见图 1A~C。

2.2 沉默 lncRNA-MIAT 抑制淋巴瘤细胞的增殖和自噬 用 siRNA 转染沉默 Raji 细胞 lncRNA-MIAT,

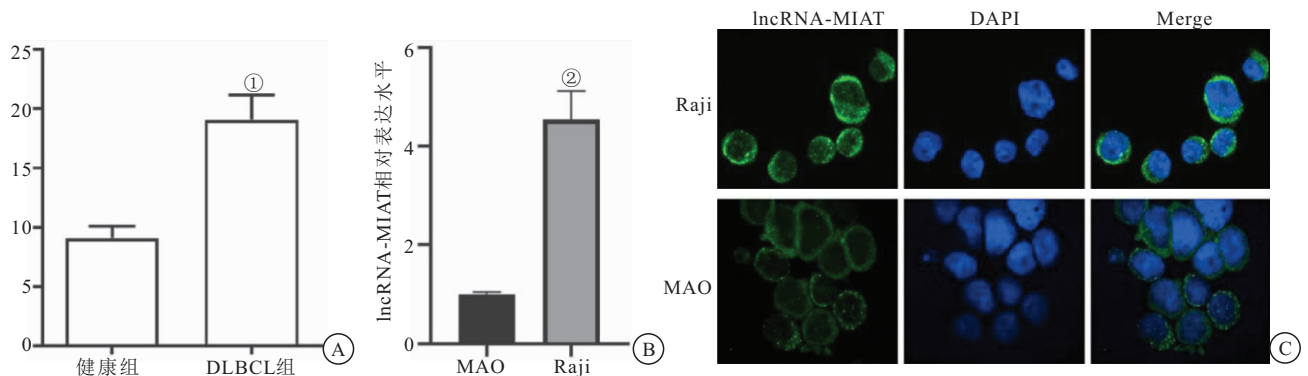


图 1 lncRNA-MIAT 在淋巴瘤细胞中的表达

Figure 1 Expression of lncRNA-MIAT in lymphoma

注: A. RT-qPCR 检测 lncRNA-MIAT 在健康组和 DLBCL 组血液中的表达水平; B. RT-qPCR 检测 lncRNA-MIAT 在细胞中的表达水平; C. FISH 实验检测 lncRNA-MIAT 的表达定位。与健康组相比, ① $P < 0.05$; 与 MAO 相比, ② $P < 0.05$ 。

与 siNC 组相比, siMIAT 组中 lncRNA-MIAT 的表达均显著下调, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。CCK-8 实验显示, 与 siNC 组相比, siMIAT 组细胞在 48、72 h 时 OD 值降低。此外, Western blot 结果显示, 与 siNC 组相比, siMIAT 组的 Raji 的自噬标志物蛋白

LC3-I、LC3-II、Atg5 和 Beclin-1 的蛋白表达水平显著下调, 而且 LC3-II/I 的比值也下调, 与 siNC 组相比, siMIAT 组的自噬降解蛋白 p62 的表达水平显著上调, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 2A~D。

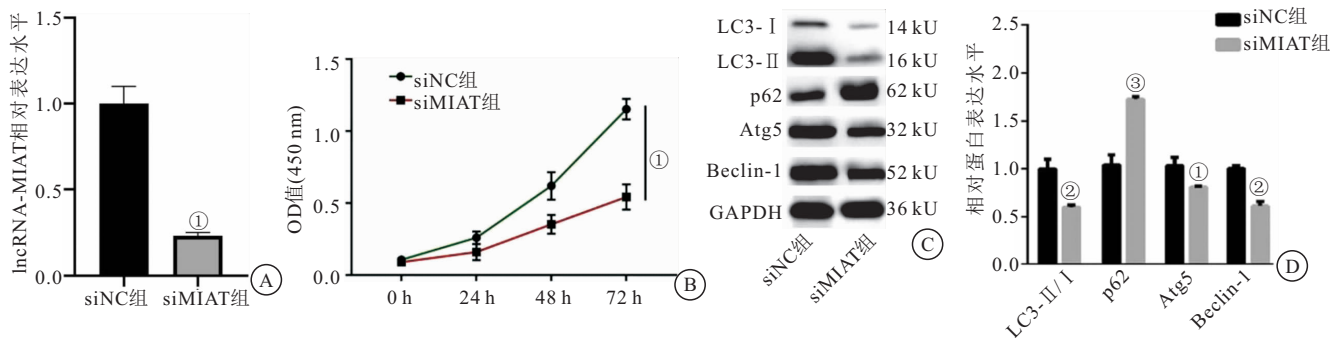


图 2 lncRNA-MIAT 调控淋巴瘤细胞的增殖与自噬

Figure 2 Proliferation and autophagy of lymphoma regulated and controlled by lncRNA-MIAT

注: A. RT-qPCR 检测 lncRNA-MIAT 的表达水平; B. CCK-8 实验检测 lncRNA-MIAT 对细胞增殖的影响。C、D. Western blot 实验检测 lncRNA-MIAT 对自噬标志物蛋白表达的影响。与 siNC 相比, ① $P < 0.05$; ② $P < 0.01$; ③ $P < 0.001$ 。

2.3 沉默 lncRNA-MIAT 上调 miR-584 并抑制 EZH2 首先我们检测了 lncRNA-MIAT 对 miR-584 的调控。与 siNC 组相比, siMIAT 组的 miR-584 的表达均显著上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。其次检测了 lncRNA-MIAT 对 EZH2 的调控。与 siNC 组相比, siMIAT 组的 EZH2 的蛋白表达显著下调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明沉默 lncRNA-MIAT 可以上调 miR-584 并抑制 EZH2 的表达。见图 3A~B。

进一步研究 lncRNA-MIAT 是否直接调控 miR-584, 从而抑制 EZH2 的表达。双荧光素酶报告基因实验结果显示在转染 lncRNA-MIAT-WT 的细胞中, 与 mimic-NC 组相比, mimic 组的相对荧光素酶活性值显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而在转染 lncRNA-MIAT-MUT 的细胞中, 与 mimic-NC 组相

比, mimic 组的相对荧光素酶活性的差异无统计学意义($P > 0.05$)。另外, Western blot 结果显示, 与 mimic-NC 组相比, mimic 组细胞中的 EZH2 蛋白表达水平都显著下调, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而且在转染 EZH2-WT 的细胞中, 与 mimic-NC 组相比, mimic 组的相对荧光素酶活性值显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而在转染 EZH2-MUT 的细胞中, 与 mimic-NC 组相比, mimic 组的相对荧光素酶活性的差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明 lncRNA-MIAT 可直接调控 miR-584 并且 EZH2 是 miR-584 的靶基因, 因此 lncRNA-MIAT 可直接调控 miR-584 从而促进 EZH2 的表达。见图 3C~E。

2.4 抑制 miR-584 部分逆转沉默 lncRNA-MIAT 对淋巴瘤细胞自噬的影响 用外源抑制剂 inhibitor 来

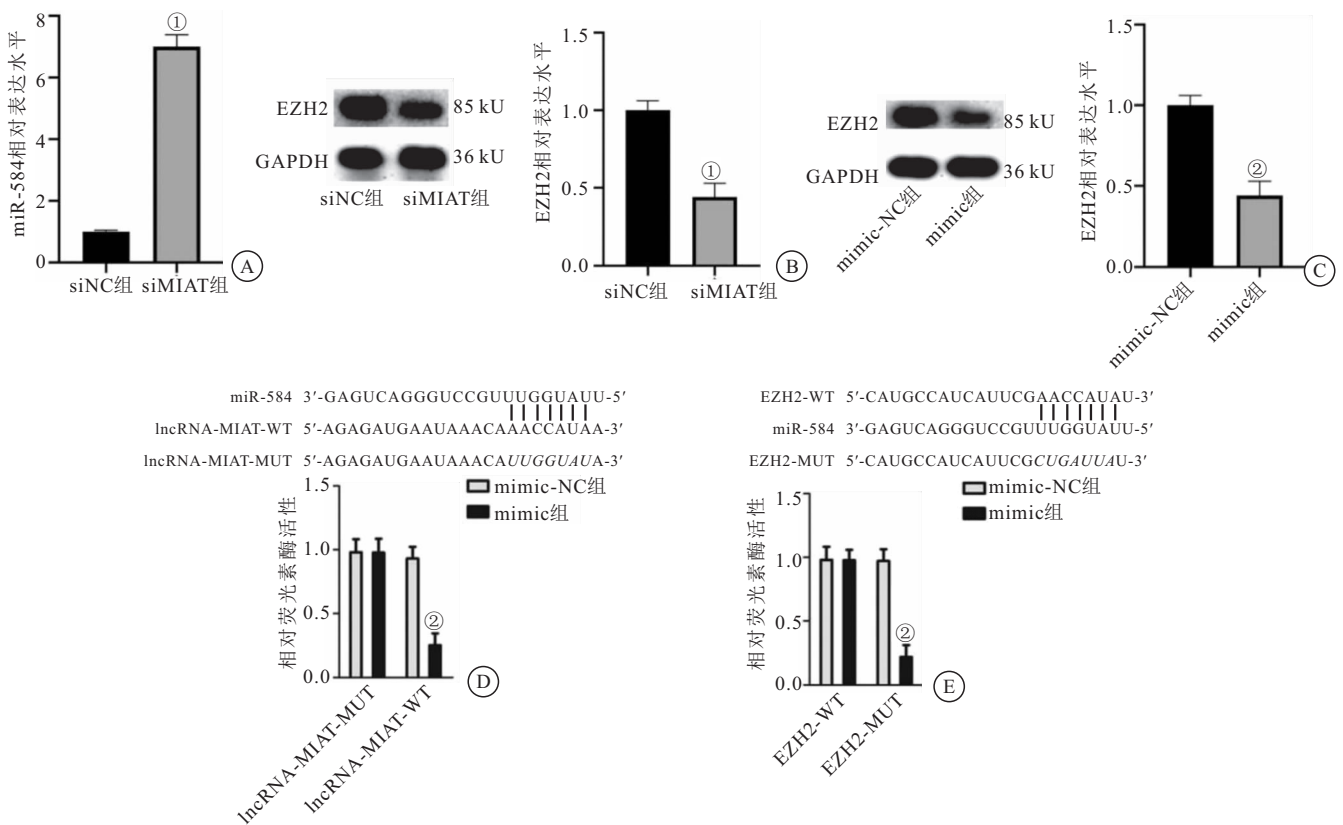


图 3 沉默 lncRNA-MIAT 上调 miR-584 并抑制 EZH2

Figure 3 Silencing lncRNA-MIAT upregulates miR-584 and inhibits EZH2

注: A. RT-qPCR 检测 miR-584 的表达水平; B. Western blot 实验检测 lncRNA-MIAT 对 EZH2 蛋白表达的影响。 C. Western blot 实验检测 miR-584 对 EZH2 蛋白表达的影响。 D. 双荧光素酶报告基因实验检测转染突变型 lncRNA-MIAT 质粒(lncRNA-MIAT-MUT)或野生型 lncRNA-MIAT 质粒(lncRNA-MIAT-WT)的 Raji 细胞中 mimic-NC 组和 mimic 组的相对荧光素酶活性。 E. 双荧光素酶报告基因实验检测转染突变型 EZH2 质粒(EZH2-MUT)或野生型 EZH2 质粒(EZH2-WT)的 Raji 细胞中 mimic-NC 组和 mimic 组的相对荧光素酶活性。与 siNC 相比, ① $P < 0.05$; 与 mimic-NC 组相比, ② $P < 0.05$ 。

抑制 miR-584 的表达。结果显示, 与 inhibitor-NC 组相比, inhibitor 组中 miR-584 的表达显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。另外, 与 siMIAT+inhibitor-NC 组相比, siMIAT+inhibitor 组中的细胞在 72 h 的增殖率明显上调。另外, 与 siMIAT+inhibitor-NC 组相比, siMIAT+inhibitor 组的 Raji 的 LC3-II/I 的比值以及 Atg5 和 Beclin-1 的蛋白表达水平显著上调(均 $P < 0.05$), 与 siMIAT+inhibitor-NC 组比, siMIAT+inhibitor 组的 p62 蛋白表达水平都显著下调, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 4A~G。

2.5 过表达 EZH2 部分逆转沉默 lncRNA-MIAT 对淋巴瘤细胞自噬的影响用外源过表达 EZH2 的质粒 pcDNA-EZH2 来上调 EZH2 的表达(见图 4A)。结果显示, 与 pcDNA-null 组相比, pcDNA-EZH2 组中 EZH2 的表达显著上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。另外, 与 siMIAT+pcDNA-null 组相比, siMIAT+pcDNA-EZH2 组中细胞在 72 h 的增殖率明显上调。另外, 与 siMIAT+pcDNA-null 组相比, siMI-

AT+pcDNA-EZH2 组的 Raji 的 LC3-I、LC3-II、Atg5 和 Beclin-1 的蛋白表达水平都显著上调, 且 LC3-II/I 的比值也上调, 与 siMIAT+pcDNA-null 组比, siMIAT+pcDNA-EZH2 组的 p62 蛋白表达水平显著下调, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 5A~H。

3 讨论

lncRNA-MIAT 是一种新发现的肿瘤相关 lncRNA, 参与多种实体肿瘤细胞的癌变和恶性发展^[14-16]。此外, 在淋巴瘤中也观察到其失调^[17]。如 lncRNA 微阵列分析和 qRT-PCR 研究^[17]表明, lncRNA-MIAT 在侵袭性慢性淋巴细胞白血病中显著上调。一致的是, 本研究在 DLBCL 细胞中同样发现 lncRNA-MIAT 表达上调, 并且主要定位在 Raji 的细胞质内。这些发现一致显示 lncRNA-MIAT 在 DLBCL 中的潜在诊断和预后价值。此外, 进一步研究表明 lncRNA-MIAT 可能促进 Raji 的增殖和自噬, 从而促进恶性行为。

自噬是肿瘤的关键细胞过程, 包括 DLBCL 细

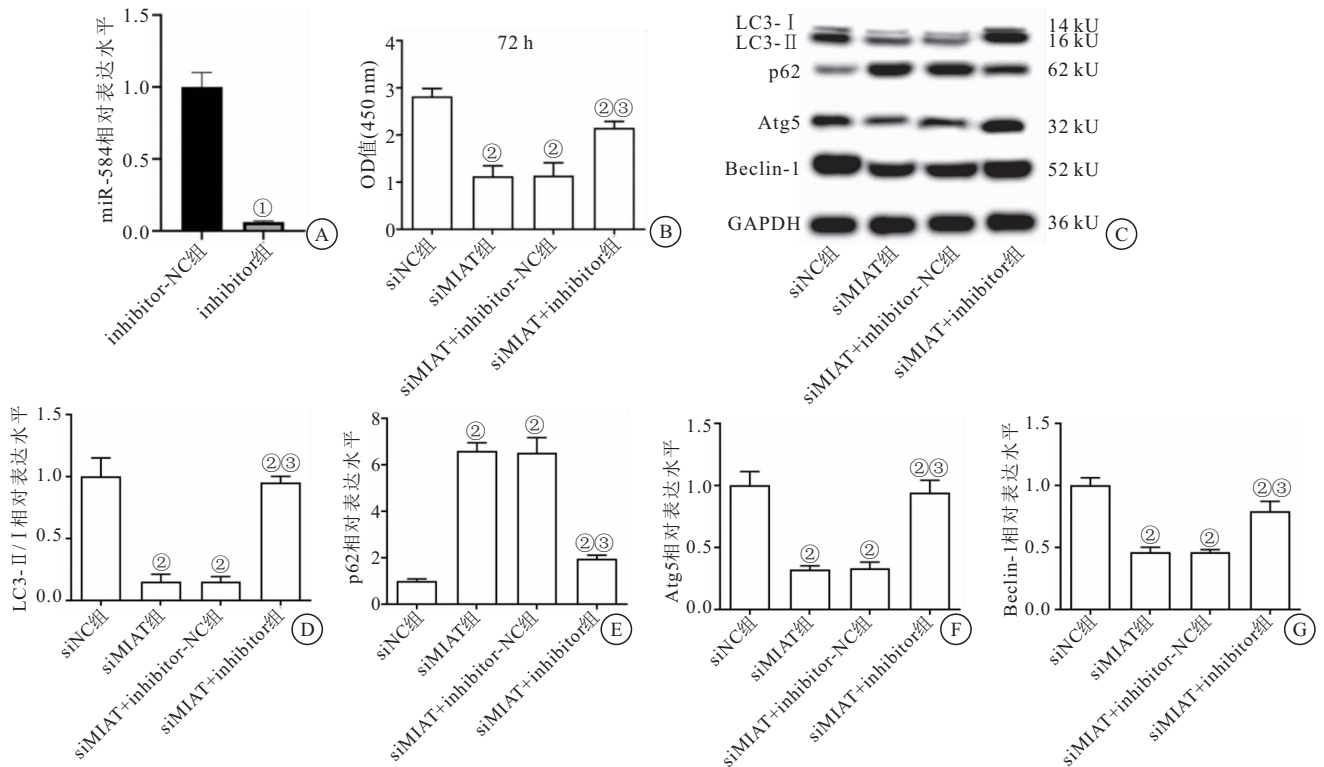


图 4 miR-584 的 inhibitor 逆转沉默 lncRNA-MIAT 对 Raji 细胞增殖和自噬的影响

Figure 4 Influence of silencing lncRNA-MIAT on proliferation and autophagy of Raji cells

注: A. RT-qPCR 检测 miR-584 的表达水平; B. CCK-8 实验检测细胞增殖。C~G. Western blot 实验检测自噬标志物蛋白表达的影响。与 inhibitor-NC 组相比, ① $P < 0.05$; 与 siNC 组比, ② $P < 0.05$; 与 siMIAT+inhibitor-NC 组相比, ③ $P < 0.05$ 。

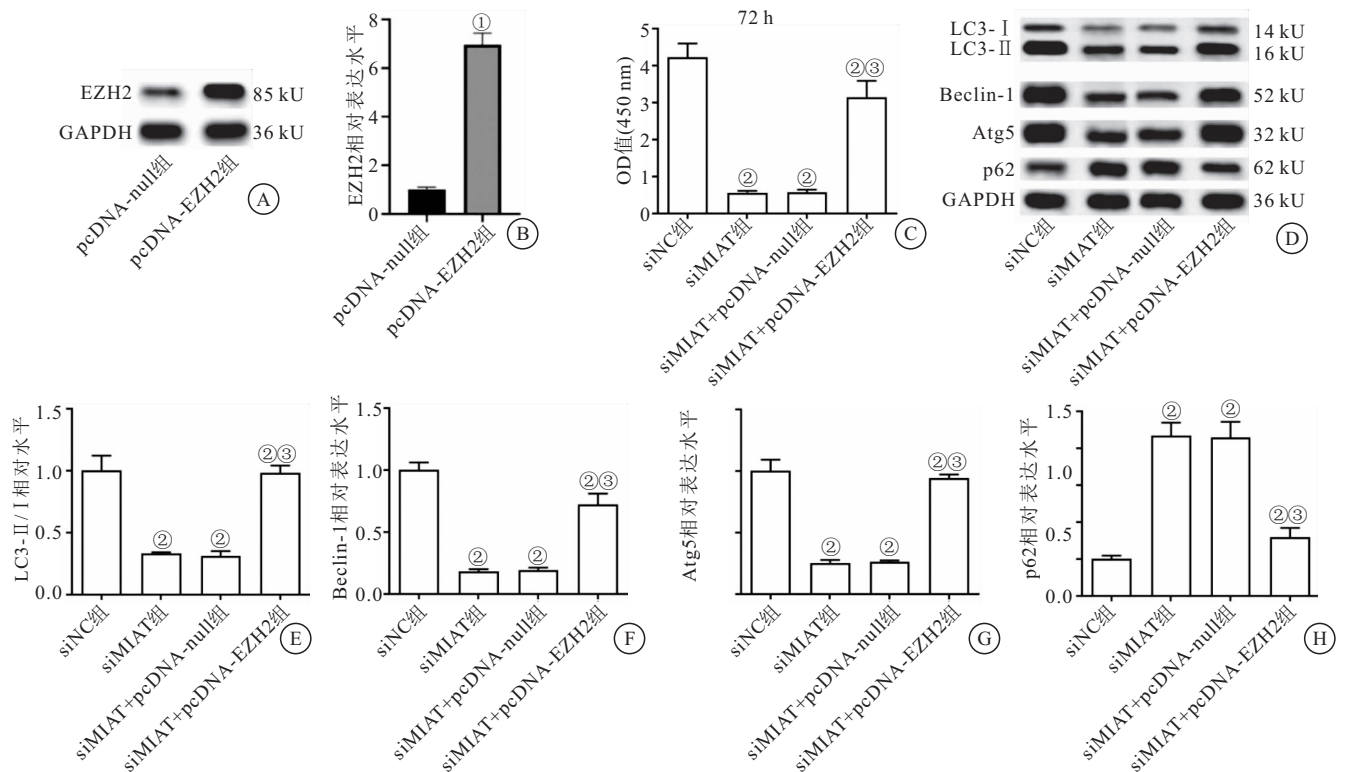


图 5 EZH2 过表达逆转沉默 lncRNA-MIAT 对 Raji 细胞增殖和自噬的影响

Figure 5 Influence of over expression of EZH2 on silencing of lncRNA-MIAT on proliferation and autophagy of Raji cells

注: A~B. Western blot 检测 EZH2 过表达后的水平; C. CCK-8 实验检测细胞增殖。D~H. Western blot 实验检测自噬标志物蛋白表达的影响。与 pcDNA-null 组相比, ① $P < 0.05$; 与 siNC 组相比, ② $P < 0.05$; 与 siMIAT+pcDNA-null 组相比, ③ $P < 0.05$ 。

胞^[18-19]。既往研究^[13]表明 lncRNA ARRDC1-AS1 通过激活 Atg5 从而加重 DLBCL 细胞的自噬从而促进肿瘤发生,这表明促进自噬可促进 DLBCL 的恶性发展。与此一致的是,本研究发现 lncRNA-MIAT 被沉默后可抑制 DLBCL 细胞的自噬,包括下调了 LC3-II/I 的比值和 Beclin-1 及 Atg5 的蛋白表达,并且促进了细胞中 p62 的表达并抑制了细胞的增殖活力。这些数据提示 lncRNA-MIAT 可加重 DLBCL 细胞的自噬。

此外,细胞质 lncRNA 可以通过与 miRNA 竞争结合,调控靶基因蛋白的表达,从而在癌症中充当 ceRNA。例如研究发现 lncRNA ARRDC1-AS1 在细胞质中高表达,并发现 miR-2355-5p 在 DLBCL 细胞中与 ARRDC1-AS1 直接结合^[13]。另外,研究^[20]表明 lncRNA SMAD5-AS1 可以作为 ceRNA 通过靶向抑制 miR-135b-5p 上调 APC 的表达,并通过 Wnt/ β -catenin 途径抑制弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的增殖。另外,已有研究^[21-22]表明,miR-584 被 lncRNA DUXAP8 以及 lncRNA DUXAP8 直接吸附抑制后,对鼻窦鳞状细胞癌和肝细胞癌都具有正调控作用,说明 miR-584 可被 lncRNA 吸附后表达受到抑制,并且其在肿瘤中具有抑癌的功能。本研究的双荧光素酶报告基因实验结果显示 miR-584 可以被 lncRNA-MIAT 直接吸附,而且抑制 miR-584 后显著恢复了沉默 lncRNA-MIAT 对 DLBCL 细胞增殖和自噬的抑制作用。这些结果表明,miR-584 在 DLBCL 细胞能够负调节增殖和自噬,并被 lncRNA-MIAT 靶向抑制。

miRNA 已被认为在转录后水平上通过改变靶基因的蛋白翻译或稳定性来调节基因表达^[23]。在本研究中,我们通过双荧光素酶报告基因实验发现 EZH2 是 miR-584 的靶基因,而且研究已经表明 EZH2 是一种关键的癌症驱动剂并诱导癌细胞的自噬^[24]。本研究同样发现过表达 EZH2 可以逆转沉默 lncRNA-MIAT 对 Raji 增殖活性和细胞自噬的抑制作用,包括促进了 LC3-II/I 的比值,Beclin-1、Atg5 的表达抑制了 p62 的表达。因此,本研究表明 lncRNA-MIAT 通过促进 EZH2 激活 DLBCL 细胞的自噬和增殖活性。

4 结论

本研究结果表明,DLBCL 细胞中 lncRNA-MIAT 表达上调,并且属于细胞质表达基因,其可以靶向调控 miR-584/EZH2 轴促进 DLBCL 的增殖,增强 DLBCL 细胞的自噬。lncRNA-MIAT 的沉默可抑制 DLBCL 细胞的自噬和细胞活性,而且 lncRNA-MIAT 靶向抑制 miR-584p 上调 DLBCL 细胞中癌症驱动基因 EZH2 的蛋白表达。提示 lncRNA-MIAT 可能是

DLBCL 进展的一个新标志物,为 DLBCL 发病机制的深入研究和临床基因药物的研发奠定了新的实验基础。

【参考文献】

- [1] SEHN L H, SALLES G. Diffuse large B-cell lymphoma[J]. *New England Journal of Medicine*, 2021, 384(9): 842-858.
- [2] SUSANIBAR-ADANIYA S, BARTA S K. 2021 Update on Diffuse large B cell lymphoma: A review of current data and potential applications on risk stratification and management[J]. *American journal of hematology*, 2021, 96(5): 617-629.
- [3] LIANG Y, ZHU H, CHEN J, *et al.* Construction of relapse-related lncRNA-mediated ceRNA networks in Hodgkin lymphoma[J]. *Archives of Medical Science*, 2020, 16(6): 1411-1418.
- [4] LORENZI L, AVILA COBOS F, DECOCK A, *et al.* Long noncoding RNA expression profiling in cancer: challenges and opportunities[J]. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2019, 58(4): 191-199.
- [5] LI Z, QIN X, BIAN W, *et al.* Exosomal lncRNA ZFAS1 regulates esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation, invasion, migration and apoptosis via microRNA-124/STAT3 axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 1-13.
- [6] HUANG W, HUANG F, LEI Z, *et al.* lncRNA SNHG11 promotes proliferation, migration, apoptosis, and autophagy by regulating hsa-miR-184/AGO2 in HCC[J]. *OncoTargets and therapy*, 2020, 13: 413.
- [7] LI P, ZHANG K, TANG S, *et al.* Knockdown of lncRNA HAGLROS inhibits metastasis and promotes apoptosis in nephroblastoma cells by inhibition of autophagy[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 7552-7562.
- [8] SUN C, HUANG L, LI Z, *et al.* Long non-coding RNA MIAT in development and disease: a new player in an old game[J]. *Journal of biomedical science*, 2018, 25(1): 1-7.
- [9] DA C, GONG C Y, NAN W, *et al.* The role of long non-coding RNA MIAT in cancers[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 129: 110359.
- [10] LIN R X, YANG S L, JIA Y, *et al.* Epigenetic regulation of papillary thyroid carcinoma by long non-coding RNAs[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 33: 253-260.
- [11] WANG L, YANG J, WANG H, *et al.* lncRNA BCYRN1-induced autophagy enhances asparaginase resistance in extranodal NK/T-cell lymphoma[J]. *Theranostics*, 2021, 11(2): 925.
- [12] LI L J, CHAI Y, GUO X J, *et al.* The effects of the long non-coding RNA MALAT-1 regulated autophagy-related signaling pathway on chemotherapy resistance in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2017, 89: 939-948.
- [13] XU H, YU X, YANG Z, *et al.* PAX5-activated lncRNA ARRDC1-AS1 accelerates the autophagy and progression of DLBCL through sponging miR-2355-5p to regulate ATG5[J]. *Life Sciences*, 2021, 286: 119932.
- [14] GUO K, QIAN K, SHI Y, *et al.* lncRNA-MIAT promotes thyroid cancer progression and function as ceRNA to target EZH2 by sponging miR-150-5p[J]. *Cell Death Disease*, 2021, 12(12): 1097.

- [J]. *Pharmacol Res*, 2022,179:106222.
- [10] 王瑾,宋珂珂,马肖容,等. CpG ODN 对急性单核细胞白血病细胞株 U937 化疗敏感性的影响及其机制研究[J]. *西部医学*, 2019,31(12):1814-1819,1825.
- [11] FENG P, CHEN D, WANG X, *et al.* Inhibition of the m6A reader IGF2BP2 as a strategy against T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2022,36(9):2180-2188.
- [12] 郭利培,刘洁,张文青,等. 吴茱萸碱调控 PI3K/AKT 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖和诱导凋亡[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023,43(4):612-618.
- [13] XU X, LAI Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials[J]. *Biosci Rep*, 2019,39(1):BSR20180992.
- [14] 赖福平,胡杰,陆元兰,等. ROS 激活 P53 调控线粒体凋亡途径在 α -鹅膏蕈肽中毒肝损害中作用的研究进展[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2022,41(5):734-739.
- [15] ZENG L, TANG M, PI C, *et al.* Novel Ferrocene Derivatives Induce Apoptosis through Mitochondria-Dependent and Cell Cycle Arrest via PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia[J]. *Cancers (Basel)*, 2021,13(18):4677.
- [16] LIU W Y, TANG Q, ZHANG Q, *et al.* Lycorine Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis in Hepatoblastoma HepG2 Cells Through ROCK1 Activation[J]. *Front Pharmacol*, 2019,10:651.
- [17] LIU H, TOMAN R E, GOPARAJU S K, *et al.* Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2003,278(41):40330-40336.
- [18] SHI W, MA D, CAO Y, *et al.* SphK2/S1P Promotes Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer Through the PAK1/LIMK1/Cofilin1 Signaling Pathway[J]. *Front Mol Biosci*, 2021,8:598218.
- [19] XIE V, TONG D, WALLINGTON-BEDDOE CT, *et al.* Sphingosine kinase 2 supports the development of BCR/ABL-independent acute lymphoblastic leukemia in mice[J]. *Biomark Res*, 2018,6:6.
- [20] HONG S W, LEE J, KWON H, *et al.* Deficiency of Sphingosine-1-Phosphate Reduces the Expression of Prohibitin and Causes β -Cell Impairment via Mitochondrial Dysregulation[J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2018,33(3):403-412.
- [21] DIAZ ESCARCEGA R, MCCULLOUGH L D, TSVETKOV A S. The Functional Role of Sphingosine Kinase 2[J]. *Front Mol Biosci*, 2021,8:683767.
- [22] SHIMIZU K, GI M, SUZUKI S, *et al.* Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability[J]. *Cell Rep*, 2021,37(6):109988.
- [23] JOUNG J, KIRCHGATTERER P C, SINGH A, *et al.* CRISPR activation screen identifies BCL-2 proteins and B3GNT2 as drivers of cancer resistance to T cell-mediated cytotoxicity[J]. *Nat Commun*, 2022,13(1):1606.

(收稿日期:2023-07-23;修回日期:2024-06-18;编辑:王小菊)

(上接第 1418 页)

- [15] LIU W, WANG Z, WANG C, *et al.* Long non-coding RNA MIAT promotes papillary thyroid cancer progression through upregulating LASP1[J]. *Cancer cell int*, 2019,19:1-13.
- [16] XU H, ZHOU J, TANG J, *et al.* Identification of serum exosomal lncRNA MIAT as a novel diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020,34(8):e23323.
- [17] SATTARI A, SIDDIQUI H, MOSHIRI F, *et al.* Upregulation of long noncoding RNA MIAT in aggressive form of chronic lymphocytic leukemias[J]. *Oncotarget*, 2016,7(34):54174.
- [18] ZAAROUR R F, AZAKIR B, HAJAM E Y, *et al.* Role of hypoxia-mediated autophagy in tumor cell death and survival[J]. *Cancers*, 2021,13(3):533.
- [19] YAN W, SHI X, WANG H, *et al.* Aberrant SPOP-CHAF1A ubiquitination axis triggers tumor autophagy that endows a therapeutic vulnerability in diffuse large B cell lymphoma [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2022,20(1):1-16.
- [20] ZHAO C C, JIAO Y, ZHANG Y Y, *et al.* Lnc SMAD5-AS1 as ceRNA inhibit proliferation of diffuse large B cell lymphoma via Wnt/ β -catenin pathway by sponging miR-135b-5p to elevate expression of APC[J]. *Cell Death Disease*, 2019,10(4):252.
- [21] CHEN X, LI G, ZHONG G, *et al.* Long Non-Coding RNA DUXAP8 Acts as an Oncogene in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma Through miR-584-5p/FNDC3B Pathway[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2022,36(6):708-718.
- [22] LIU Z, LU J, FANG H, *et al.* m6A modification-mediated DUXAP8 regulation of malignant phenotype and chemotherapy resistance of hepatocellular carcinoma through miR-584-5p/MAPK1/ERK pathway axis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021,9:783385.
- [23] LAMBERTI M J, MONTICO B, RAVO M, *et al.* Integration of miRNA: mRNA Co-Expression Revealed Crucial Mechanisms Modulated in Immunogenic Cancer Cell Death[J]. *Biomedicines*, 2022,10(8):1896.
- [24] WAN L, XU K, WEI Y, *et al.* Phosphorylation of EZH2 by AMPK suppresses PRC2 methyltransferase activity and oncogenic function[J]. *Molecular cell*, 2018,69(2):279-291. e5.

(收稿日期:2023-06-24;修改日期:2023-10-29;编辑:王小菊)