

田莉, 胡月明, 崔海军, 等. OSTN-AS1/miR-330 调控前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 88-95.

Tian L, Hu YM, Cui HJ, et al. Mechanism of OSTN-AS1/miR-330 in regulating the proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 88-95.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.11.013

## OSTN-AS1/miR-330 调控前列腺癌细胞增殖、 迁移和侵袭的分子机制

田莉<sup>1\*</sup>, 胡月明<sup>1</sup>, 崔海军<sup>2</sup>, 赵济华<sup>3</sup>

(1.河北省唐山中心医院病理科,河北唐山 063000;2.河北省唐山市工人医院泌尿外科,河北唐山 063000;  
3.华北理工大学临床医学院,河北唐山 063210)

**【摘要】** 目的 探讨 OSTN 的反义 RNA 1(OSTN-AS1)对前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及作用机制。方法 收集 25 例前列腺癌患者的癌组织和对应癌旁组织 RT-qPCR 检测组织中 OSTN-AS1 和 miR-330 的表达。体外培养前列腺癌 PC-3M 细胞,分别转染 OSTN-AS1 小干扰 RNA、miR-330 抑制剂或共转染 OSTN-AS1 小干扰 RNA 与 miR-330 抑制剂。流式细胞仪检测细胞周期,克隆形成实验检测细胞克隆形成数,Transwell 检测细胞迁移和侵袭,RT-qPCR 检测 miR-330 和 MMP-2 的 mRNA 表达。双荧光素酶报告基因实验验证 OSTN-AS1 与 miR-330 及 miR-330 与 MMP-2 调控关系。将转染后的 PC-3M 细胞接种至裸鼠皮下,饲养 4 周后,剥离肿瘤并称重。结果 前列腺癌组织中 OSTN-AS1 表达升高( $P<0.05$ ),而 miR-330 表达降低( $P<0.05$ )。下调 OSTN-AS1 可阻滞体外 PC-3M 细胞的细胞周期进程,抑制细胞增殖、迁移和侵袭,同时抑制体内肿瘤生长。下调 miR-330 促进体外 PC-3M 细胞的细胞周期进程及增殖、迁移和侵袭能力,同时促进体内肿瘤生长。OSTN-AS1 负调控 miR-330 表达,miR-330 负调控 MMP-2 表达。下调 OSTN-AS1 对体外 PC-3M 细胞的细胞周期、增殖、迁移和侵袭的抑制作用及体内肿瘤生长抑制作用可被下调 miR-330 逆转。结论 OSTN-AS1 可能通过调控 miR-330/MMP-2 轴促进前列腺癌发展进程,其可能成为前列腺癌治疗的分子靶点。

**【关键词】** 前列腺癌;OSTN-AS1;miR-330;细胞增殖;迁移;侵袭;RT-qPCR

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 11-0088-08

### Mechanism of OSTN-AS1/miR-330 in regulating the proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells

TIAN Li<sup>1\*</sup>, HU Yueming<sup>1</sup>, CUI Haijun<sup>2</sup>, ZHAO Jihua<sup>3</sup>

(1. Department of Pathology, Tangshan Central Hospital, Tangshan 063000, China. 2. Department of Urology, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063000. 3. School of Clinical Medicine, North China University of Technology, Tangshan 063210)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect and mechanism of OSTN-AS1 on the proliferation, migration, and invasion of prostate cancer cell PC-3M. **Methods** The cancerous tissues and corresponding adjacent tissues of 25 prostate cancer patients were collected, and then RT-qPCR was used to measure the expression of OSTN-AS1 in the tissues. PC-3M cells were transfected with OSTN-AS1 small interfering RNA and/or miR-330 inhibitor. Flow cytometry was used to analyze the cell cycle. A colony formation assay was used to analyze the number of cell clones. Transwell assays were used to

analyze the migration and invasion. RT-qPCR was used to measure the expression of miR-330 and MMP-2 mRNA. Dual luciferase reporter gene assays were used to verify the regulatory relationships between OSTN-AS1 and miR-330 as well as miR-330 and MMP-2. Transfected PC-3M cells were injected into nude mice subcutaneously. After 4 weeks, the tumors were harvested and weighed. **Results** Expression of OSTN-AS1 was increased in prostate cancer tissue ( $P < 0.05$ ), but expression of miR-330 was decreased ( $P < 0.05$ ). Down-regulating OSTN-AS1 blocked cell cycle progression of PC-3M cells and inhibited cell proliferation, migration, and invasion *in vitro*. At the same time, down-regulating OSTN-AS1 inhibited tumor growth *in vivo*. Down-regulating miR-330 promoted cell cycle progression, proliferation, migration and invasion of PC-3M cells *in vitro*. At the same time, down-regulating miR-330 promoted tumor growth *in vivo*. OSTN-AS1 negatively regulated miR-330 expression and miR-330 negatively regulated MMP-2 expression. The inhibitory effects of down-regulating OSTN-AS1 on the cell cycle, proliferation, migration and invasion of PC-3M cells *in vitro* and tumor growth *in vivo* could be reversed by down-regulating miR-330. **Conclusion** OSTN-AS1 may promote the development of prostate cancer by regulating the miR-330/MMP-2 axis, which may be a molecular target for prostate cancer treatment.

**【Keywords】** prostate cancer; OSTN-AS1; miR-330; cell proliferation; migration; invasion; RT-qPCR

OSTN 的反义 RNA 1 (OSTN antisense RNA 1, OSTN-AS1) 属于长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA), 有报道称, 其在前列腺癌中表达升高, 且其高表达的患者预后较差<sup>[1]</sup>。然而, OSTN-AS1 对前列腺癌细胞恶性表型的影响和机制还未知。生物信息学软件预测显示, OSTN-AS1 可能靶向结合 miR-330。有报道称, 前列腺癌细胞中 miR-330 表达下调, 上调 miR-330 对前列腺癌细胞迁移和侵袭具有明显的抑制作用, miR-330 是前列腺癌的潜在治疗靶点<sup>[2]</sup>。但是, OSTN-AS1 能否通过调控 miR-330 表达影响前列腺癌细胞的恶性表型也还未知。本研究以前列腺癌 PC-3M 细胞为研究对象, miR-330 为切入点, 主要探讨 OSTN-AS1 对 PC-3M 细胞增殖、迁移和侵袭的影响和可能机制, 旨在了解 OSTN-AS1 对前列腺癌发生发展的影响和机制, 以期为前列腺癌的治疗提供新靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

36 只清洁级 BALB/c-nu/nu 无胸腺雄性裸鼠, 3 周龄, 体重 (18.5 ± 2.4) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2019-0009], 饲养在华北理工大学实验动物中心 [SYXK(冀)2020-012]。饲养条件: 白昼、黑夜交替, 各 12 h, 温度 23℃ ~ 27℃, 自由进食和喝水。本实验严格按照 3R 原则进行, 并通过了唐山中心医院伦理会批准 (20200034)。

#### 1.1.2 细胞

前列腺癌细胞系 PC-3M 来自中国科学院上海细胞库。

#### 1.1.3 临床资料

选取 25 例于 2017 年 5 月至 2018 年 12 月在本院行手术治疗的前列腺癌患者为研究对象, 前列腺癌的诊断符合原发性前列腺癌的诊断标准, 且经 HE 染色病理确诊 (图 1A)。患者年龄 46~78 岁, 平均年龄 (65.24 ± 5.87) 岁。临床分期 I 期、II 期和 III 期患者分别为 3、8 和 14 例; 淋巴结转移、未转移患者分别为 18、7 例。排除标准: (1) 同时患有其他恶性肿瘤的患者; (2) 重要脏器如心脏、肾、肝等脏器功能障碍者; (3) 合并自身免疫系统疾病、心血管疾病等患者。所有患者术前未接受任何治疗。本研究符合《赫尔辛基宣言》原则。采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 法检测前列腺癌组织及癌旁组织中 OSTN-AS1 和 miR-330 表达水平。

### 1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; RPMI 1640 培养基、细胞周期检测试剂盒和双荧光素酶活性检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; TRIzol 试剂和 Lipofectamine™2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; OSTN-AS1 小干扰 RNA (si-OSTN-AS1)、乱序无意义阴性序列 (si-NC)、miR-330 抑制剂 (anti-miR-330) 和模拟物 (mimcs)、抑制剂阴性序列 (anti-miR-NC)、模拟对照序列 (miR-NC)、引物序列、荧光素酶报告载体购自上海吉玛制药技术有限公司; 逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; QP-50 CO<sub>2</sub> 培养箱, 山东济南鑫贝西生物技术有限公司; GeneAmp970 型 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; FACSCalibur 型流式细胞仪, 美国 BD 公司; CKX41 型倒置显微镜, 日本 Olympus 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养和转染

用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(完全培养基)培养 PC-3M 细胞。于 6 孔板中培养 PC-3M 细胞( $2.5 \times 10^4$  个/孔),培养 24 h 后,弃培养基。将 Lipofectamine™ 2000 试剂分别与 si-OSTN-AS1 (si-OSTN-AS1 组)、si-NC (si-NC 组)、anti-miR-330 (anti-miR-330 组)、anti-miR-NC (anti-miR-NC 组)、si-OSTN-AS1 和 anti-miR-330 (si-OSTN-AS1 + anti-miR-330 组)、si-OSTN-AS1 和 anti-miR-NC (si-OSTN-AS1 + anti-miR-NC 组)混合均匀,加入 6 孔板中,孵育细胞 6 h。然后更换培养基,再培养 24 h,RT-qPCR 法检测 OSTN-AS1 或 miR-330 表达验证转染效果。

#### 1.3.2 RT-qPCR 法检测 OSTN-AS1、miR-330 和基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2) mRNA 表达

TRIzol 试剂提取组织或细胞中总 RNA,然后将其逆转录为 cDNA 后,行 PCR 扩增。引物序列: OSTN-AS1 上游 5'-AGCTGAGAGTCTGTCAAGGG-3',下游 5'-CTTACAAGGCAGCAGGAAG-3'; miR-330 上游 5'-GTGCTGCGATGTTGCCAAACCCG-3',下游 5'-CGCGGCCTAGATTCGATCGTAG-3'; MMP-2 上游 5'-CCACAAGCCACGAGTTTTCa-3',下游 5'-TTGGGCTTTAGAGGGGATGG-3'; GAPDH 上游 5'-TGTTTCGTCATGGGTGTGAAC-3',下游 5'-ATGGC ATGGACTGTGGTCAT-3'; U6 上游 5'-GCTTCGGC AGCACATATACTAAAAT-3',下游 5'-CGCTTAC GAATTTGCGTGTTCAT-3'。2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算 OSTN-AS1 和 MMP-2 mRNA 相对 GAPDH、miR-330 相对 U6 的表达量。

#### 1.3.3 流式细胞仪检测细胞周期

于 24 孔板中培养各组细胞( $2.5 \times 10^4$  个/孔),每组设 3 个复孔。培养 24 h 后,收集细胞。加 70%冰乙醇固定,4℃过夜。4℃、800 r/min 离心,弃上清。加入 PBS 清洗细胞 2 次。加入 400 μL 结合缓冲液,重悬细胞。加入 50 μL RNA 酶,37℃孵育 30 min。在避光环境下加入 50 μL 碘化丙啶,并孵育 30 min,最后用流式细胞仪检测细胞周期。

#### 1.3.4 克隆形成实验

于 24 孔板中培养各组细胞( $2.5 \times 10^4$  个/孔),每组设 3 个复孔。培养 14 d,弃培养基。将细胞放置于多聚甲醛进行固定,时间 30 min。然后再置于结晶紫染色液中进行染色,时间 20 min。用 PBS 清洗细胞后,显微镜观察,计数。

#### 1.3.5 Transwell 检测细胞迁移和侵袭

迁移实验:于 Transwell 小室上室加 100 μL 各组细胞悬液(每 mL  $5 \times 10^4$  个),下室加 500 μL 完全培养基。培养 24 h 后,弃培养基。将细胞放置于多聚甲醛溶液中进行固定,时间 30 min。然后再置于结晶紫染色液中进行染色,时间 20 min。用 PBS 清洗细胞后,显微镜观察,计数。侵袭实验:预先于 Transwell 小室上室铺 Matrigel 基质胶铺,自然晾干后,再加 100 μL 细胞悬液,剩余操作同迁移实验。

#### 1.3.6 双荧光素酶报告基因实验验证 OSTN-AS1 与 miR-330 及 miR-330 与 MMP-2 靶向关系

OSTN-AS1、MMP-2 的野生型(WT)和突变型(MUT)由上海吉玛制药技术公司设计并制备,并克隆到 pMIR-Report 质粒中,分别命名为 WT-OSTN-AS1、MUT-OSTN-AS1、WT-MMP-2、MUT-MMP-2。将 PC-3M 细胞接种于 24 孔板中( $2.5 \times 10^4$  个/孔),培养 24 h 后,弃培养基。将 Lipofectamine™ 2000 试剂分别与 WT-OSTN-AS1 (或 MUT-OSTN-AS1)和 miR-330 mimics (或 miR-NC)、WT-MMP-2 (或 MUT-MMP-2)和 miR-330 mimics (或 miR-NC)混合均匀,加入 6 孔板中,孵育细胞 6 h。更换培养基,再培养 24 h,弃培养基,将细胞进行裂解处理。用离心机(半径 10 cm)将细胞裂解液离心(3500 r/min, 10 min)后,20 μL 取上清液,分别加 100 μL 1×萤火虫或海肾荧光素酶反应工作液,振荡混匀,用 GENios Pro 多功能酶标仪检测萤火虫或海肾的荧光强度。细胞荧光素酶活性以萤火虫荧光强度与海肾荧光强度的比值表示。

#### 1.3.7 裸鼠移植瘤实验

将 si-NC 组、si-OSTN-AS1 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-330 组、si-OSTN-AS1 + anti-miR-NC 组、si-OSTN-AS1 + anti-miR-330 组 PC-3M 细胞密度调整为每 mL  $2.0 \times 10^7$  个,均以 0.1 mL 接种至裸鼠皮下,每组 6 只。自观察到肉眼可见的肿瘤时,常规饲养 4 周。处死裸鼠后剥离肿瘤,称重。

### 1.4 统计学分析

SPSS 22.0 软件分析实验数据。计量资料以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。前列腺癌组织和癌旁组织中 OSTN-AS1 与 miR-330 表达的比较及细胞荧光素活性的比较均采用独立样本 *t* 检验; si-NC 组、si-OSTN-AS1 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-330 组、si-OSTN-AS1 + anti-miR-NC 组和 si-OSTN-AS1 + anti-miR-33 组各检测指标均首先采用单因素方差分析,进一步组间两两比较用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OSTN-AS1 和 miR-330 在前列腺癌组织中的表达

HE 染色显示前列腺癌旁组织由导管和腺泡组成,其上皮排列有两层细胞,内层为表面的分泌细胞,外层为位于基底膜和内层上皮之间的底层细胞;各分区的导管、腺泡的结构和上皮形状差别不大。前列腺癌组织分泌细胞具有明显异型性,且形态多样;基底部基底细胞局限性缺失,腺体局部细胞向间质浸润(图 1A);RT-qPCR 法检测前列腺癌组织及癌旁组织中 OSTN-AS1 和 miR-330 表达,结果显示,前列腺癌组织中 OSTN-AS1 表达高于癌旁组织( $P < 0.05$ ),而 miR-330 表达低于癌旁组织( $P < 0.05$ )。结果说明,OSTN-AS1 在前列腺癌组织中呈高表达,而 miR-330 呈低表达(图 1B、1C)。

### 2.2 PCR 检测 PC-3M 细胞中 OSTN-AS1、miR-330 和 MMP-2 mRNA 的表达水平

RT-qPCR 法检测 si-OSTN-AS1 或 anti-miR-330 转染效率,结果显示,si-OSTN-AS1 组 PC-3M 细胞中 OSTN-AS1 表达明显低于 si-NC 组( $P < 0.05$ ),anti-miR-330 组 PC-3M 细胞中 miR-330 表达明显低于 anti-miR-NC 组( $P < 0.05$ ),说明下调 OSTN-AS1 或下调 miR-330 表达的 PC-3M 细胞构建成功。RT-qPCR 法检测下调 OSTN-AS1、下调 miR-330 或同时下调 OSTN-AS1 与 miR-330 后 PC-3M 细胞中 miR-330 或 MMP-2 mRNA 表达,结果显示,下调 OSTN-AS1 的 PC-3M 细胞中 miR-330 表达升高,而 MMP-2 mRNA 表达降低,说明下调 OSTN-AS1 可促进 PC-3M 细胞中 miR-330 表达,而抑制 MMP-2 mRNA 表达;而下调 miR-330 的 PC-3M 细胞中 MMP-2 mRNA 表达升高,说明下调 miR-330 可促进 PC-3M 细胞中 MMP-2 mRNA 表达;同时下调 OSTN-AS1 和 miR-330 的 PC-3M 细胞中 MMP-2 mRNA 表达与仅下调 OSTN-AS1 的细胞比较升高( $P < 0.05$ ),说明下调 miR-330 逆转下调 OSTN-AS1 对 PC-3M 细胞中 MMP-2 mRNA 表达的抑制作用(图 2)。

### 2.3 克隆形成实验检测 PC-3M 细胞克隆形成数和流式细胞仪检测 PC-3M 细胞周期

流式细胞仪、克隆形成实验分别检测下调 OSTN-AS1、下调 miR-330 或同时下调 OSTN-AS1 与 miR-330 对 PC-3M 细胞的细胞周期及克隆形成的影响,结果显示,下调 OSTN-AS1 后,PC-3M 细胞的细胞周期阻

滞,克隆形成数降低,说明下调 OSTN-AS1 可阻碍 PC-3M 细胞的细胞周期进程,抑制细胞增殖;下调 miR-330 后,PC-3M 细胞的细胞周期进程加快,克隆形成数升高,说明下调 miR-330 促进 PC-3M 细胞的细胞周期进程,并促进细胞增殖。与仅下调 OSTN-AS1 的 PC-3M 细胞比较,同时下调 OSTN-AS1 与 miR-330 的 PC-3M 细胞的细胞周期进程加快,克隆形成数升高,说明下调 miR-330 逆转下调 OSTN-AS1 对 PC-3M 细胞周期及克隆形成的影响(图 3、表 1)。

### 2.4 Transwell 实验检测 PC-3M 细胞迁移和侵袭

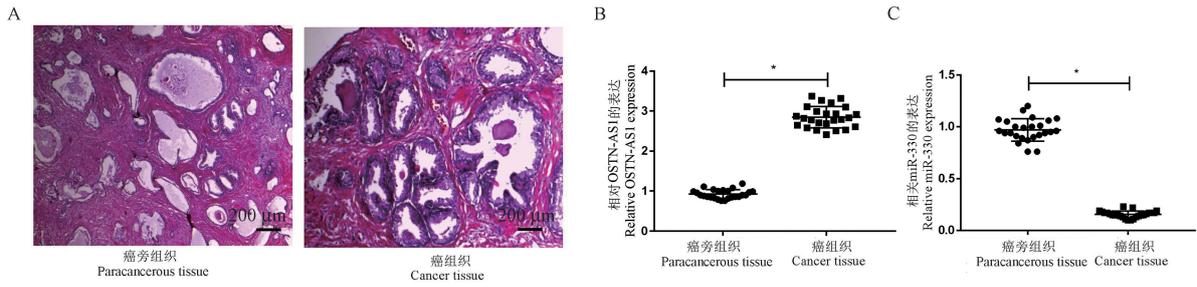
Transwell 分别检测下调 OSTN-AS1、下调 miR-330 或同时下调 OSTN-AS1 与 miR-330 对 PC-3M 细胞迁移和侵袭的影响,结果显示,下调 OSTN-AS1 后,PC-3M 细胞的迁移和侵袭数均降低,说明下调 OSTN-AS1 可抑制 PC-3M 细胞迁移和侵袭;下调 miR-330 后,PC-3M 细胞的迁移和侵袭数均升高,说明下调 miR-330 促进 PC-3M 细胞迁移和侵袭。与仅下调 OSTN-AS1 的 PC-3M 细胞比较,同时下调 OSTN-AS1 与 miR-330 的 PC-3M 细胞迁移和侵袭数升高,说明下调 miR-330 逆转下调 OSTN-AS1 对 PC-3M 细胞迁移和侵袭的抑制作用(图 4、表 2)。

### 2.5 双荧光素酶报告实验验证 OSTN-AS1、miR-330、MMP-2 的靶向关系

生物信息学软件预测显示,OSTN-AS1 与 miR-330、MMP-2 3' UTR 与 miR-330 的核苷酸序列具有连续结合位点(图 5)。双荧光素酶报告基因实验检测 OSTN-AS1 与 miR-330 及 miR-330 与 MMP-2 的靶向关系,结果显示,共转染 miR-330 mimics 与 WT-OSTN-AS1 或 WT-MMP-2 的 PC-3M 细胞荧光素酶活性明显降低( $P < 0.05$ ),而共转染 miR-330 mimics 与 MUT-OSTN-AS1 或 MUT-MMP-2 的 PC-3M 细胞荧光素酶活性无显著变化( $P > 0.05$ ),说明 OSTN-AS1 可靶向结合 miR-330,MMP-2 是 miR-330 的靶基因(表 3)。

### 2.6 裸鼠移植瘤实验检测不同处理对裸鼠成瘤的影响

各组裸鼠饲养 21 d 后,剥离肿瘤,并对其称重。结果显示,下调 OSTN-AS1 后,裸鼠肿瘤重量降低,说明下调 OSTN-AS1 可抑制体内肿瘤生长;下调 miR-330 后,裸鼠肿瘤重量增加,说明下调 miR-330 促进体内肿瘤生长;而同时下调 OSTN-AS1 与 miR-330 后,裸鼠肿瘤重量增加,说明下调 miR-330 逆转下调 OSTN-AS1 对裸鼠肿瘤生长的抑制作用(图 6、表 4)。

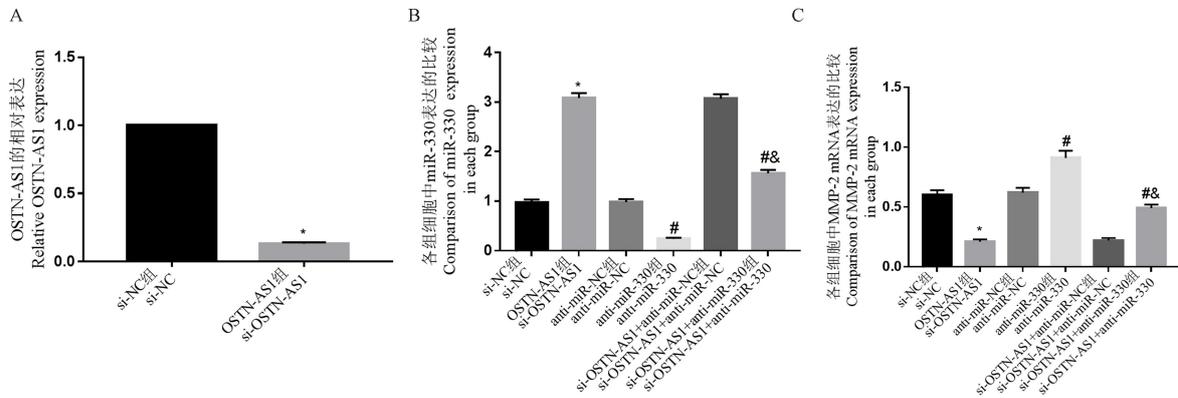


注:A:前列腺癌组织基底部基底细胞局限性缺失,腺体局部细胞向间质浸润;B:前列腺癌组织中 OSTN-AS1 表达升高;C:前列腺癌组织中 miR-330 表达降低。与癌旁组织相比, \* $P < 0.05$ 。

图 1 癌旁组织和癌组织的 HE 染色结果及 OSTN-AS1 和 miR-330 在前列腺癌组织中的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 25$ )

Note. A, Localized loss of basal cells at the base of prostate cancer tissue, and local cells infiltrating into the interstitium of the glands. B, Expression of OSTN-AS1 in prostate cancer tissue increased. C, Expression of miR-330 in prostate cancer tissue decreased. Compared with the adjacent tissues, \* $P < 0.05$ .

Figure 1 Results of HE staining of adjacent tissues and cancerous tissues and the expression of OSTN-AS1 and miR-330 in prostate cancer tissue



注:A:si-OSTN-AS1 组 PC-3M 细胞中 OSTN-AS1 表达降低;B:下调 OSTN-AS1 促进 PC-3M 细胞中 miR-330 表达;C:下调 OSTN-AS1 抑制 PC-3M 细胞中 MMP-2 mRNA 表达,而下调 miR-330 促进 MMP-2 mRNA 表达。与 si-NC 组相比, \* $P < 0.05$ ;与 anti-miR-NC 组相比, # $P < 0.05$ ;与 si-OSTN-AS1+anti-miR-NC 组相比, & $P < 0.05$ 。

图 2 各组 PC-3M 细胞中 miR-330 和 MMP-2 mRNA 的表达水平比较

Note. A, Expression of OSTN-AS1 decreased in PC-3M cells of the si-OSTN-AS1 group. B, Down-regulating OSTN-AS1 promoted the expression of miR-330 in PC-3M cells. C, Down-regulating OSTN-AS1 inhibited the expression of MMP-2 mRNA in PC-3M cells, while down-regulating miR-330 promoted the expression of MMP-2 mRNA in PC-3M cells. Compared with si-NC group, \* $P < 0.05$ . Compared with anti-miR-NC group, # $P < 0.05$ . Compared with si-OSTN-AS1+anti-miR-NC group, & $P < 0.05$ .

Figure 2 Comparison of the expression levels of miR-330 and MMP-2 mRNA in PC-3M cells in each group

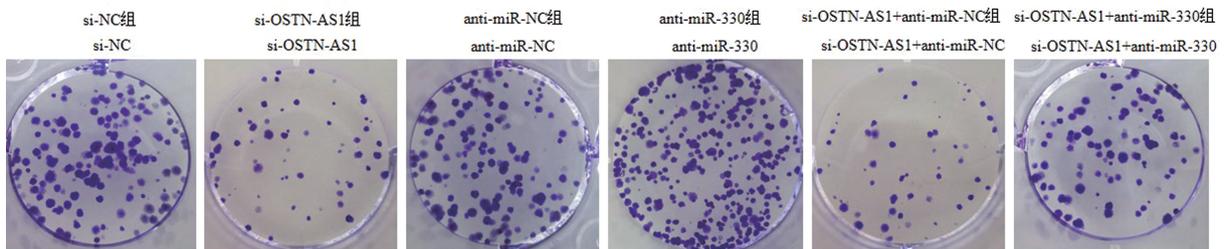


图 3 各组 PC-3M 细胞克隆形成数

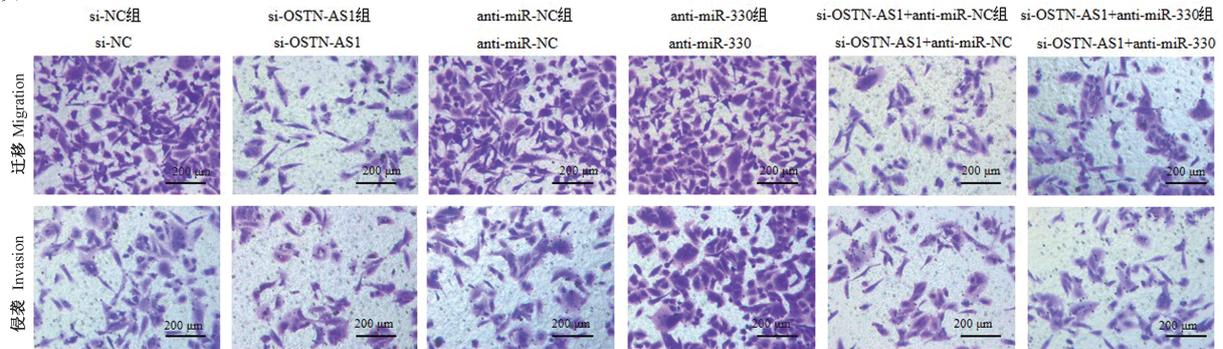
Figure 3 Colony formation number of PC-3M cells in each group

**表 1** 各组 PC-3M 细胞的细胞周期及克隆形成数 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
**Table 1** Cell cycle changes and clone formation number of PC-3M cells in each group

| 分组<br>Groups   | G0-G1                        | S                            | G2-M       | 克隆形成数<br>Clone formation number |
|--|------------------------------|------------------------------|------------|---------------------------------|
| si-NC 组<br>si-NC                                       | 33.72±0.68                   | 33.63±0.78                   | 32.65±0.77 | 155.33±4.03                     |
| si-OSTN-AS1 组<br>si-OSTN-AS1                           | 43.13±1.03*                  | 24.32±0.64*                  | 32.55±0.71 | 82.00±2.94*                     |
| anti-miR-NC 组<br>anti-miR-NC                           | 33.81±0.71                   | 33.36±0.98                   | 32.83±0.74 | 156.67±4.64                     |
| anti-miR-330 组<br>anti-miR-330                         | 27.40±0.69 <sup>#</sup>      | 40.41±0.70 <sup>#</sup>      | 32.19±0.72 | 195.33±4.78 <sup>#</sup>        |
| si-OSTN-AS1+anti-miR-NC 组<br>si-OSTN-AS1+anti-miR-NC   | 43.21±0.87                   | 24.44±0.66                   | 32.35±0.66 | 82.33±2.62                      |
| si-OSTN-AS1+anti-miR-330 组<br>si-OSTN-AS1+anti-miR-330 | 36.58±0.51 <sup>#&amp;</sup> | 30.42±0.62 <sup>#&amp;</sup> | 33.00±0.60 | 129.33±3.40 <sup>#&amp;</sup>   |
| <i>F</i>   | 190.754                      | 206.877                      | 0.546      | 415.657                         |
| <i>P</i>   | 0.000                        | 0.000                        | 0.739      | 0.000                           |

注:与 si-NC 组相比, \* $P<0.05$ ;与 anti-miR-NC 组相比, <sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 si-OSTN-AS1+anti-miR-NC 组相比, <sup>&</sup> $P<0.05$ 。

Note. Compared with the si-NC group, \* $P<0.05$ . Compared with the anti-miR-NC group, <sup>#</sup> $P<0.05$ . Compared with the si-OSTN-AS1+anti-miR-NC group, <sup>&</sup> $P<0.05$ .



**图 4** Transwell 检测各组 PC-3M 细胞迁移和侵袭 (结晶紫染色)

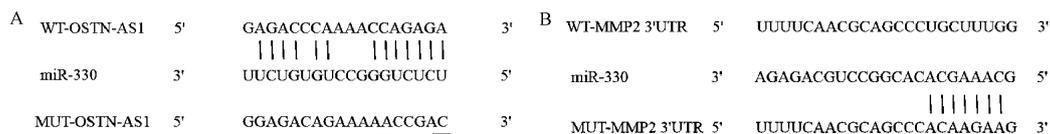
**Figure 4** Transwell detects the migration and invasion of PC-3M cells in each group (crystal violet staining)

**表 2** 各组 PC-3M 细胞迁移和侵袭数比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
**Table 2** Comparison of migration and invasion numbers of PC-3M cells in each group

| 分组<br>Groups   | 迁移细胞数<br>Number of migration cells | 侵袭细胞数<br>Number of invasive cells |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|
| si-NC 组<br>si-NC                                       | 137.33±4.11                        | 94.67±2.87                        |
| si-OSTN-AS1 组<br>si-OSTN-AS1                           | 72.00±2.94*                        | 50.33±2.05*                       |
| anti-miR-NC 组<br>anti-miR-NC                           | 138.33±4.19                        | 95.00±3.27                        |
| anti-miR-330 组<br>anti-miR-330                         | 181.00±5.10 <sup>#</sup>           | 156.33±4.19 <sup>#</sup>          |
| si-OSTN-AS1+anti-miR-NC 组<br>si-OSTN-AS1+anti-miR-NC   | 72.67±2.62                         | 51.00±3.56                        |
| si-OSTN-AS1+anti-miR-330 组<br>si-OSTN-AS1+anti-miR-330 | 114.67±2.87 <sup>#&amp;</sup>      | 76.67±2.62 <sup>#&amp;</sup>      |
| <i>F</i>   | 381.671                            | 458.841                           |
| <i>P</i>   | 0.000                              | 0.000                             |

注:与 si-NC 组相比, \* $P<0.05$ ;与 anti-miR-NC 组相比, <sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 si-OSTN-AS1+anti-miR-NC 组相比, <sup>&</sup> $P<0.05$ 。

Note. Compared with the si-NC group, \* $P<0.05$ . Compared with the anti-miR-NC group, <sup>#</sup> $P<0.05$ . Compared with the si-OSTN-AS1+anti-miR-NC group, <sup>&</sup> $P<0.05$ .



注:A:OSTN-AS1 和 miR-330 互补序列;B:miR-330 和 MMP-2 的互补序列。

图 5 OSTN-AS1 与 miR-330 及 miR-330 与 MMP-2 的互补序列

Note. A, Complementary sequence of OSTN-AS1 and miR-330. B, Complementary sequence of miR-330 and MMP-2.

Figure 5 Complementary sequence of OSTN-AS1 and miR-330 or miR-330 and MMP-2

表 3 荧光素酶活性检测结果( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Test results of luciferase activity

| 分组 Groups         | WT-OSTN-AS1 | MUT-OSTN-AS1 | WT-MMP-2   | MUT-MMP-2 |
|-------------------|-------------|--------------|------------|-----------|
| miR-NC 组 miR-NC   | 1.00±0.04   | 1.00±0.04    | 0.99±0.04  | 0.98±0.04 |
| miR-330 组 miR-330 | 0.27±0.02*  | 1.01±0.03    | 0.34±0.01* | 0.99±0.04 |
| <i>t</i>          | 28.273      | 0.346        | 27.305     | 0.306     |
| <i>P</i>          | 0.000       | 0.746        | 0.000      | 0.775     |

注:与 miR-NC 组相比, \* $P<0.05$ 。

Note. Compared with the miR-NC group, \* $P<0.05$ .

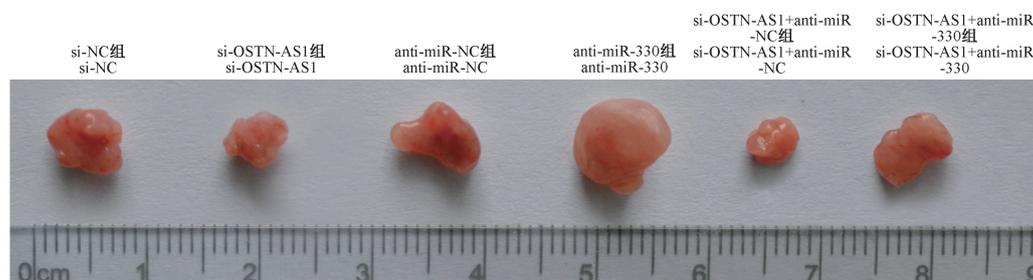


图 6 各个处理组瘤重

Figure 6 Tumor weight of each treatment group

表 4 各个处理组小鼠中瘤重的检测( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Detection of tumor weight in each treatment group

| 分组 Groups  | 瘤重(g) Tumor weight          |
|--|-----------------------------|
| si-NC 组<br>si-NC                                       | 1.36±0.14                   |
| si-OSTN-AS1 组<br>si-OSTN-AS1                           | 0.61±0.11*                  |
| anti-miR-NC 组<br>anti-miR-NC                           | 1.33±0.15                   |
| anti-miR-330 组<br>anti-miR-330                         | 2.89±0.27 <sup>#</sup>      |
| si-OSTN-AS1+anti-miR-NC 组<br>si-OSTN-AS1+anti-miR-NC   | 0.63±0.09                   |
| si-OSTN-AS1+anti-miR-330 组<br>si-OSTN-AS1+anti-miR-330 | 1.18±0.12 <sup>#&amp;</sup> |
| <i>F</i>   | 83.390                      |
| <i>P</i>   | 0.000                       |

注:与 si-NC 组相比, \* $P<0.05$ ;与 anti-miR-NC 组相比, <sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 si-OSTN-AS1+anti-miR-NC 组相比, <sup>&</sup> $P<0.05$ 。

Note. Compared with the si-NC group, \* $P<0.05$ . Compared with the anti-miR-NC group, <sup>#</sup> $P<0.05$ . Compared with the si-OSTN-AS1+anti-miR-NC group, <sup>&</sup> $P<0.05$ .

### 3 讨论

lncRNA 是一类长度超过 200 bp 的小分子非编码 RNA,其竞争性吸附 miRNA,调控 miRNA 靶基因的表达,进而发挥生物学作用。研究已表明,多种 lncRNA 参与调控前列腺癌细胞的恶性表型,与该肿瘤的发生发展密切相关。lncRNA PROX1-AS1<sup>[3]</sup>、lncRNA HCP5<sup>[4]</sup> 等 lncRNA 在前列腺癌中表达升高,可分别通过竞争性吸附 miR-647、miR-4656 促进前列腺癌的发展进程。此外, lncRNA Erbb4-IR<sup>[5]</sup>、lncRNA MIR22HG 等<sup>[6]</sup> lncRNA 在前列腺癌中表达下调,对前列腺癌的发展起抑制作用。OSTN-AS1 是近年来新发现的一种 lncRNA,目前对其在肿瘤中的研究较为少见。

Jiang 等<sup>[1]</sup> 报道称,OSTN-AS1 在前列腺癌组织中呈高表达,这与本研究结果一致,但 Jiang 并未探究 OSTN-AS1 对前列腺癌细胞恶性表型的影响。本研究通过转染 OSTN-AS1 小干扰 RNA 下调前列腺癌细胞中表达,首次探究了 OSTN-AS1 对前列腺癌

细胞恶性表型的影响,结果显示,下调 OSTN-AS1 可明显削弱体外前列腺癌细胞的克隆形成、迁移和侵袭能力,并使细胞周期阻滞,且下调 OSTN-AS1 抑制了裸鼠体内肿瘤生长,这提示下调 OSTN-AS1 可抑制前列腺癌的发展进程,OSTN-AS1 有可能是前列腺癌治疗的分子靶点。

此外,本研究证实了 OSTN-AS1 可竞争性吸附并负调控 miR-330 表达,这在其他文献中也尚未见报道。研究显示,结直肠癌<sup>[7]</sup>、黑色素瘤<sup>[8]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[9]</sup>等肿瘤中 miR-330 的表达降低,上调 miR-330 对这些肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭具有明显抑制作用,miR-330 作为抑癌基因参与这些肿瘤的发展进程。然而,Zhang 等<sup>[10]</sup>研究显示,miR-330 在乳腺癌患者癌组织和血清中表达升高,可促进腋窝淋巴结转移,是影响乳腺癌患者预后的重要因素,其在乳腺癌中发挥促癌基因作用。这说明 miR-330 可能在不同的肿瘤中发挥的作用不同。本研究结果显示,下调 miR-330 促进体外前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,与相关报道结果一致<sup>[11]</sup>,且下调 miR-330 促进体内肿瘤生长,说明 miR-330 作为抑癌基因参与前列腺癌的发展进程。本研究结果还显示,下调 miR-330 逆转了下调 OSTN-AS1 对体外 PC-3M 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用及体内肿瘤生长的抑制作用,提示 OSTN-AS1 可能通过负调控 miR-330 来促进前列腺癌的发展进程。

MMP-2 是一种基质金属蛋白酶,可降解细胞外基质,促进细胞迁移和侵袭<sup>[12]</sup>。Yang 等<sup>[13]</sup>研究显示,miR-200a 在人乳腺癌组织中明显过表达,miR-200a 的过表达通过促进 MMP-2 的转录促进了乳腺癌细胞侵袭。邱承俊等<sup>[14]</sup>研究显示,MMP-2 在前列腺癌 PC3 细胞表达升高,下调其表达可能通过下调血管内皮生长因子和上调活化的半胱天冬酶-8 的蛋白表达降低了 PC3 细胞的增殖、侵袭和迁移。本研究首先利用双荧光素酶报告基因实验证实了 MMP-2 是 miR-330 的靶基因,且下调 OSTN-AS1 抑制前列腺癌细胞中 MMP-2 的表达,且下调 miR-330 降低可下调 OSTN-AS1 对前列腺癌细胞中 MMP-2 表达的抑制作用,进一步提示提示 OSTN-AS1 通过调控 miR-330/MMP-2 轴来抑制 PC-3M 细胞增殖、迁移和侵袭。

综上所述,前列腺癌组织中 OSTN-AS1 呈高表达,而 miR-330 呈低表达;下调 OSTN-AS1 显著降低体外前列腺癌 PC-3M 细胞的增殖、迁移和侵袭性及体内肿瘤生长,其作用机制可能与调控 miR-330/MMP-2 轴有关,

有可能成为前列腺癌治疗的分子靶点。

#### 参考文献:

- [1] Jiang T, Guo JJ, Hu ZC, et al. Identification of potential prostate cancer-related pseudogenes based on competitive endogenous RNA network hypothesis [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(5): 4213-4239.
- [2] Mao YQ, Chen H, Lin YW, et al. microRNA-330 inhibits cell motility by downregulating Sp1 in prostate cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1): 327-333.
- [3] Qian C, Liao CH, Tan BF, et al. LncRNA PROX1-AS1 promotes proliferation, invasion, and migration in prostate cancer via targeting miR-647 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(6): 2938-2944.
- [4] Hu RG, Lu ZJ. Long non-coding RNA HCP5 promotes prostate cancer cell proliferation by acting as the sponge of miR-4656 to modulate CEMIP expression [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(1): 328-336.
- [5] Zhou JY, Song QB, Liu XJ, et al. lncRNA Erbb4-IR is downregulated in prostate carcinoma and predicts prognosis [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(5): 3425-3430.
- [6] Shen H, Weng XD, Yang D, et al. Long noncoding RNA MIR22HG is down-regulated in prostate cancer [J]. *Math Biosci Eng*, 2019, 17(2): 1776-1786.
- [7] Yoo HI, Kim BK, Yoon SK. MicroRNA-330-5p negatively regulates ITGA5 expression in human colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6): 3023-3029.
- [8] Sehati N, Sadeghie N, Mansoori B, et al. MicroRNA-330 inhibits growth and migration of melanoma A375 cells; *In vitro* study [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1): 458-467.
- [9] Cui LH, Xu HR, Yang W, et al. lncRNA PCAT6 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion through regulating miR-330-5p [J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11(4): 7715-7724.
- [10] Zhang HL, Wang XX, Zhang F. Correlations of the MiR-330 expression with the pathogenesis and prognosis of breast cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(4): 1584-1590.
- [11] Liu DC, Song LL, Liang Q, et al. Long noncoding RNA LEF1-AS1 silencing suppresses the initiation and development of prostate cancer by acting as a molecular sponge of miR-330-5p via LEF1 repression [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12727-12744.
- [12] 雷赞涛,刘镭,左彦珍,等.二氢杨梅素对绒毛膜癌细胞增殖和迁移能力的影响[J].*解剖学报*,2019,50(3):317-323.
- [13] Yang R, Xu JH, Hua XH, et al. Overexpressed miR-200a promotes bladder cancer invasion through direct regulating Dicer/miR-16/JNK2/MMP-2 axis [J]. *Oncogene*, 2020, 39(9): 1983-1996.
- [14] 邱承俊,程帆. MMP-2 基因对前列腺癌细胞恶性表型的影响及其机制研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(4): 365-370.

[收稿日期]2020-11-16