

# 沉默 LncRNA DLGAP1-AS2 对人视网膜母细胞瘤增殖和迁移及侵袭的影响

李 晖,汪明红,廖风玲,刘国立

引用:李晖,汪明红,廖风玲,等. 沉默 LncRNA DLGAP1-AS2 对人视网膜母细胞瘤增殖和迁移及侵袭的影响. 国际眼科杂志 2022;22(6):904-910

基金项目:荆门市卫生计生委科研项目(No.202101021)

作者单位:(448000)中国湖北省荆门市第一人民医院眼科

作者简介:李晖,男,本科,副主任医师,研究方向:视光学、青光眼。

通讯作者:刘国立,男,本科,主任医师,研究方向:白内障、眼底外科. liuguolijmy@163.com

收稿日期:2021-07-01 修回日期:2022-04-25

## 摘要

**目的:**探讨沉默 LncRNA DLGAP1-AS2 对人视网膜母细胞瘤 HXO-Rb44 增殖、迁移和侵袭的影响及其可能作用机制。

**方法:**收集病理确诊且临床资料完整的视网膜母细胞瘤组织标本 25 例,同时选取因外伤摘除眼球的正常视网膜组织 9 例为对照;qRT-PCR 法检测正常视网膜组织、视网膜母细胞瘤组织、人正常视网膜血管内皮细胞 ACBRI-181、视网膜母细胞瘤细胞 HXO-Rb44 中 DLGAP1-AS2、miR-1193 的表达量;将 si-NC、si-DLGAP1-AS2、miR-NC、miR-1193 mimic、si-DLGAP1-AS2 与 miR-1193 inhibitor (共转染)分别转染至 HXO-Rb44 细胞;双荧光素酶报告实验检测 DLGAP1-AS2 与 miR-1193 的靶向关系;CCK-8 法、平板克隆形成实验与 Transwell 实验分别检测细胞增殖、集落形成数、迁移及侵袭;Western blot 法检测 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达量。

**结果:**视网膜母细胞瘤组织中 DLGAP1-AS2 的表达量高于正常视网膜组织( $P<0.05$ ),而 miR-1193 的表达量低于正常视网膜组织( $P<0.05$ );HXO-Rb44 细胞中 DLGAP1-AS2 的表达量高于 ACBRI-181 细胞( $P<0.05$ ),miR-1193 的表达量低于 ACBRI-181 细胞( $P<0.05$ );DLGAP1-AS2 可靶向调控 miR-1193 的表达;转染 si-DLGAP1-AS2 或转染 miR-1193 mimic 可抑制 HXO-Rb44 细胞增殖、迁移及侵袭;共转染 si-DLGAP1-AS2 与 miR-1193 inhibitor 可降低转染 si-DLGAP1-AS2 对 HXO-Rb44 细胞增殖、迁移及侵袭的作用。

**结论:**沉默 DLGAP1-AS2 可通过靶向调控 miR-1193 表达而抑制视网膜母细胞瘤细胞增殖、迁移及侵袭。

**关键词:**人视网膜母细胞瘤;LncRNA DLGAP1-AS2;miR-1193;细胞增殖;迁移;侵袭

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.6.04

## Effect of silencing LncRNA DLGAP1-AS2 on the proliferation, migration and invasion of human retinoblastoma

Hui Li, Ming-Hong Wang, Feng-Ling Liao, Guo-Li Liu

**Foundation item:** Scientific Research Project of Jingmen Health and Family Planning Commission (No.202101021)

Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Jingmen City, Jingmen 448000, Hubei Province, China

**Correspondence to:** Guo-Li Liu. Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Jingmen City, Jingmen 448000, Hubei Province, China. liuguolijmy@163.com

Received: 2021-07-01 Accepted: 2022-04-25

## Abstract

• **AIM:** To explore the effect of silencing LncRNA DLGAP1-AS2 on the proliferation, migration and invasion of human retinoblastoma HXO-Rb44 and its possible mechanism.

• **METHODS:** Twenty-five cases of retinoblastoma tissue specimens with complete clinical data and pathologically diagnosed were collected. At the same time, 9 cases of normal retinal tissue from which the eyeball was removed due to trauma were selected as controls. The qRT-PCR method was used to detect the expression of DLGAP1-AS2 and miR-1193 in normal retinal tissue, retinoblastoma tissue, human normal retinal vascular endothelial cell ACBRI-181, and retinoblastoma cell HXO-Rb44. The si-NC, si-DLGAP1-AS2, miR-NC, miR-1193 mimic, si-DLGAP1-AS2 and miR-1193 inhibitor (co-transfected) were transfected into HXO-Rb44 cells. The dual luciferase reporter experiment was used to detect the targeting relationship between DLGAP1-AS2 and miR-1193. The CCK-8 method, plate clone formation experiment and Transwell experiment were used to detect cell proliferation, colony formation, migration and invasion. Western blot method was used to detect the expression of E-cadherin and N-cadherin protein.

• **RESULTS:** The expression of DLGAP1-AS2 in retinoblastoma tissue was higher than that of normal retinal tissue ( $P<0.05$ ), while the expression of miR-1193 was lower than that of normal retinal tissue ( $P<0.05$ ). The

expression of DLGAP1-AS2 in HXO-Rb44 cells was higher than that of ACBRI-181 cells ( $P < 0.05$ ), and the expression of miR-1193 was lower than that of ACBRI-181 cells ( $P < 0.05$ ). DLGAP1-AS2 could target the expression of miR-1193. Transfection of si-DLGAP1-AS2 or miR-1193 mimic could inhibit the proliferation, migration and invasion of HXO-Rb44 cells. Co-transfection of si-DLGAP1-AS2 and miR-1193 inhibitor could reduce the effect of transfection of si-DLGAP1-AS2 on the proliferation, migration and invasion of HXO-Rb44 cells.

• **CONCLUSION:** Silencing DLGAP1-AS2 could inhibit the proliferation, migration and invasion of retinoblastoma cells through targeted regulation of miR-1193 expression.

• **KEYWORDS:** human retinoblastoma; LncRNA DLGAP1-AS2; miR-1193; cell proliferation; migration; invasion

**Citation:** Li H, Wang MH, Liao FL, et al. Effect of silencing LncRNA DLGAP1-AS2 on the proliferation, migration and invasion of human retinoblastoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022; 22(6):904-910

## 0 引言

视网膜母细胞瘤是临床常见的一种恶性肿瘤且已严重威胁患者生命安全,目前视网膜母细胞瘤的发病机制尚未阐明,研究表明长链非编码 RNA (LncRNA) 表达异常与视网膜母细胞瘤发生及发展密切相关,并可能作为视网膜母细胞瘤诊断及治疗的潜在靶点<sup>[1-4]</sup>。LncRNA DLGAP1-AS2 在胆管癌中呈高表达,并可促进胆管癌细胞增殖、迁移及侵袭<sup>[5]</sup>。但 DLGAP1-AS2 与视网膜母细胞瘤相关研究报道相对较少。Starbase 预测显示 DLGAP1-AS2 与 miR-1193 存在结合位点,研究表明 miR-1193 上调表达可抑制宫颈癌细胞增殖及转移<sup>[6]</sup>。但 DLGAP1-AS2 与 miR-1193 在视网膜母细胞瘤发生及发展过程中的作用机制尚未可知。因此,本研究主要探讨 DLGAP1-AS2 是否可通过靶向调控 miR-1193 表达而调节人视网膜母细胞瘤 HXO-Rb44 增殖、迁移和侵袭。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集病理确诊且临床资料完整的视网膜母细胞瘤组织标本 25 例,其中男 15 例,女 10 例,年龄 8 月龄~10 岁(平均  $5.68 \pm 1.25$  岁)。同时选取因外伤摘除眼球的正常视网膜组织 9 例为对照,其中男 5 例,女 4 例,年龄 9 月龄~10 岁(平均  $5.22 \pm 1.16$  岁)。两组研究对象年龄、性别比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),具有可比性。本研究通过医院伦理委员会审核。

人正常视网膜血管内皮细胞 ACBRI-181、视网膜母细胞瘤 HXO-Rb44 购自美国 ATCC;DMEM 培养液与胎牛血清购自美国 Gibco;Trizol 试剂购自美国 Thermo Fisher; cDNA 合成及 qRT-PCR 试剂及引物购自大连宝生物; Lipofectamine 2000、Transwell 小室、Matrigel 基质胶购自北京索莱宝; CCK-8 试剂购自上海碧云天生物; DLGAP1-AS2 小分子干扰 RNA (si-DLGAP1-AS2) 及其阴性对照 (si-NC)、miR-1193 寡核苷酸模拟物 (miR-1193 mimic)

及阴性对照 mimic NC 序列 (miR-NC)、miR-1193 寡核苷酸抑制物 (miR-1193 inhibitor) 购自广州锐博生物;兔抗人 E-cadherin、N-cadherin 抗体与二抗购自美国 CST。

## 1.2 方法

**1.2.1 石蜡切片 HE 染色** 将烤好的组织切片置于新鲜二甲苯中脱蜡 10min×3 次;依次放入体积分数 100%、95%、85%、70% 乙醇中各 3~5min 后蒸馏水冲洗;Harry 苏木素染液染色 8min,蒸馏水冲洗;体积分数 1% 盐酸酒精分化,蒸馏水冲洗,自来水冲洗 20min 返蓝;伊红染液染色 1min,蒸馏水冲洗;依次经体积分数 95%、100% 乙醇浸泡脱水各 2 次,每次 20s,干燥后依次置于酒精二甲苯溶液、两缸二甲苯中各 5min;迅速滴加适量中性树脂,盖玻片封固;显微镜下观察、照相。

**1.2.2 实验分组** ACBRI-181 细胞、HXO-Rb44 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素与 100μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 体积分数培养箱内培养,待细胞生长至 80% 融合度时进行传代培养。取对数生长期 HXO-Rb44 细胞接种于 96 孔板 (3×10<sup>3</sup> 个/孔),按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行操作。将 si-DLGAP1-AS2 A、si-DLGAP1-AS2 B、si-DLGAP1-AS2 C 分别转染至 HXO-Rb44 细胞,分别记为 si-DLGAP1-AS2 A 组、si-DLGAP1-AS2 B 组、si-DLGAP1-AS2 C 组,采用 qRT-PCR 法检测细胞中 DLGAP1-AS2 表达量,选取干扰效果较好的进行后续实验。将 si-NC、si-DLGAP1-AS2、miR-NC、miR-1193 mimic、si-DLGAP1-AS2 与 miR-1193 inhibitor (共转染) 分别转染至 HXO-Rb44 细胞,分别记为 si-NC 组、si-DLGAP1-AS2 组、miR-NC 组、miR-1193 mimic 组、si-DLGAP1-AS2+miR-1193 inhibitor 组。同时将正常培养的 HXO-Rb44 细胞记为 control 组。

**1.2.3 qRT-PCR 检测 DLGAP1-AS2 和 miR-1193 的表达水平** 用 Trizol 试剂分别提取正常视网膜组织、视网膜母细胞瘤组织、ACBRI-181 细胞、HXO-Rb44 细胞与转染后各组 HXO-Rb44 细胞总 RNA,应用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增,反应条件:95℃ 预变性 5min 循环 1 次,95℃ 变性 15s,60℃ 退火 60s,72℃ 延伸 30s,共循环 40 次。应用 ABI StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪检测 DLGAP1-AS2、miR-1193 相对表达量。

**1.2.4 双荧光素酶报告实验检测 DLGAP1-AS2 与 miR-1193 的靶向关系** 由美国 Promega 公司构建含有 DLGAP1-AS2 与 miR-1193 互补序列的野生型报告基因载体 WT-DLGAP1-AS2 和含有突变序列的突变型报告基因载体 MUT-DLGAP1-AS2,用脂质体转染法将 miR-NC/WT-DLGAP1-AS2、miR-NC/MUT-DLGAP1-AS2、miR-1193 mimic/WT-DLGAP1-AS2、miR-1193 mimic/MUT-DLGAP1-AS2 分别共转染至 HXO-Rb44 细胞,加入 20μL 1×Passive Lysis Buffer,加入 100μL Luciferase Assay Reagent II,于荧光发光仪检测 Firefly Luciferase 活性值,加入 100μL Stop&Glo Reagent 于荧光发光仪检测 Renilla Luciferase 活性值,以海肾荧光素酶报告基因活性值为内参,计算各组细胞荧光素酶活性值。

**1.2.5 CCK-8 实验检测细胞增殖** 取各组 HXO-Rb44 细胞接种于 96 孔板 ( $4 \times 10^3$  个/孔), 每孔加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 于  $37^\circ\text{C}$  培养箱培养 2h, 用酶标仪检测各孔光密度值 (OD 450nm) 并计算细胞增殖抑制率 [(对照组 OD-实验组 OD)/(对照组 OD-空白组 OD)  $\times 100\%$ ]。

**1.2.6 平板克隆形成实验** 取各组 HXO-Rb44 细胞接种于 6 孔板 (500 个/孔), 于  $37^\circ\text{C}$  培养箱培养 14d, 每隔 2d 更换一次培养液, 4% 多聚甲醛固定 20min ( $-20^\circ\text{C}$ ), 1% 结晶紫染色 15min, PBS 洗涤后晾干, 观察集落形成数。

**1.2.7 Transwell 实验检测细胞迁移与侵袭** 迁移实验: 取各组 HXO-Rb44 细胞 ( $1 \times 10^5$  cell/mL) 按照每孔  $200 \mu\text{L}$  的密度加入小室的上室, 按照每孔  $600 \mu\text{L}$  的密度将含有 10% 胎牛血清的培养液加入下室,  $37^\circ\text{C}$  培养箱内培养 24h, 多聚甲醛固定 20min, 用 0.1% 结晶紫染液染色 20min, 显微镜下观察迁移细胞数。侵袭实验: Matrigel 基质胶稀释液按照每孔  $40 \mu\text{L}$  的密度加入小室的上室,  $37^\circ\text{C}$  培养箱内固定 5h, 后续实验步骤同迁移实验。

**1.2.8 Western blot 检测 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达量** 各组 HXO-Rb44 细胞加入  $500 \mu\text{L}$  RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳、电转膜至 PVDF 膜, 密封 2h, 加入 E-cadherin (1:500)、N-cadherin (1:500)、GAPDH 抗体 (1:1000) 稀释液  $4^\circ\text{C}$  孵育 24h, TBST 洗膜 40min, 加入二抗稀释液 (1:3000)  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h, TBST 洗膜 40min, ECL 试剂与 DNR BioImaging System 观察 PVDF 膜上蛋白条带, 用凝胶图像处理系统软件分析蛋白条带灰度值。

统计学分析: 采用统计学软件 SPSS21.0 进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示且均符合正态分布, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 病理形态特征检测** 与正常视网膜组织细胞相比, 视网膜母细胞瘤组织中肿瘤细胞核大, 染色较深, 细胞呈椭圆或梭形, 可见核分裂, 排列不规则, 见图 1。

**2.2 DLGAP1-AS2 和 miR-1193 表达的检测** 与正常视网膜组织比较, 视网膜母细胞瘤组织中 DLGAP1-AS2 的表达量升高 ( $P < 0.05$ ), miR-1193 的表达量降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。与 ACBRI-181 细胞比较, HXO-Rb44 细胞中 DLGAP1-AS2 的表达量升高 ( $P < 0.05$ ), miR-1193 的表达量降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 2、图 2。

**2.3 沉默 DLGAP1-AS2 处理后 DLGAP1-AS2 表达的检测** 与 control 组、si-NC 组比较, si-DLGAP1-AS2 A 组、si-DLGAP1-AS2 B 组、si-DLGAP1-AS2 C 组 DLGAP1-AS2 的表达量降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 3、图 3。其中 si-DLGAP1-AS2 A 组 DLGAP1-AS2 的表达量相对较低, 因而选用 si-DLGAP1-AS2 A 进行后续实验。

**2.4 DLGAP1-AS2 和 miR-1193 靶向关系** Starbase 预测显示 DLGAP1-AS2 与 miR-1193 存在结合位点, 见图 4A。miR-1193 过表达可抑制野生型载体 WT-DLGAP1-AS2 的荧光素酶活性 ( $P < 0.05$ ), 而未能抑制突变型载体 MUT-DLGAP1-AS2 的荧光素酶活性, 见表 4、图 4B。

表 1 视网膜母细胞瘤组织中 DLGAP1-AS2 和 miR-1193 表达的检测

分组	<i>n</i>	DLGAP1-AS2	miR-1193
正常视网膜组织	9	0.48 $\pm$ 0.06	1.08 $\pm$ 0.09
视网膜母细胞瘤组织	25	1.38 $\pm$ 0.10	0.30 $\pm$ 0.05
<i>t</i>		25.261	32.130
<i>P</i>		<0.01	<0.01

表 2 视网膜母细胞瘤细胞 HXO-Rb44 中 DLGAP1-AS2 和 miR-1193 表达的检测 ( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

分组	DLGAP1-AS2	miR-1193
ACBRI-181	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
HXO-Rb44	3.64 $\pm$ 0.18	0.36 $\pm$ 0.03
<i>t</i>	44.000	64.000
<i>P</i>	<0.01	<0.01

表 3 沉默 DLGAP1-AS2 后 DLGAP1-AS2 表达的检测 ( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

分组	DLGAP1-AS2
control 组	1.00 $\pm$ 0.00
si-NC 组	1.00 $\pm$ 0.02
si-DLGAP1-AS2 A 组	0.23 $\pm$ 0.02 <sup>a,c</sup>
si-DLGAP1-AS2 B 组	0.35 $\pm$ 0.03 <sup>a,c</sup>
si-DLGAP1-AS2 C 组	0.39 $\pm$ 0.04 <sup>a,c</sup>
<i>F</i>	1920.409
<i>P</i>	<0.01

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs control 组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs si-NC 组。

表 4 双荧光素酶报告实验 ( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

分组	WT	MUT
miR-NC 组	1.01 $\pm$ 0.07	1.02 $\pm$ 0.09
miR-1193 mimic 组	0.25 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.08
<i>t</i>	29.938	0.747
<i>P</i>	<0.01	0.466

**2.5 各个处理组对 HXO-Rb44 中 miR-1193 及增殖的影响** 与 control 组、si-NC 组比较, si-DLGAP1-AS2 组 miR-1193 的表达量升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞增殖抑制率升高 ( $P < 0.05$ ), 集落形成数减少 ( $P < 0.05$ ); 与 miR-NC 组比较, miR-1193 mimic 组 miR-1193 的表达量升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞增殖抑制率升高 ( $P < 0.05$ ), 集落形成数减少 ( $P < 0.05$ ); 与 si-DLGAP1-AS2 组比较, si-DLGAP1-AS2+miR-1193 inhibitor 组 miR-1193 的表达量降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞增殖抑制率降低 ( $P < 0.05$ ), 集落形成数增多 ( $P < 0.05$ ), 见表 5、图 5。

**2.6 各个处理组对 HXO-Rb44 迁移和侵袭的影响** 与 control 组、si-NC 组比较, si-DLGAP1-AS2 组迁移及侵袭细胞数减少 ( $P < 0.05$ ); 与 miR-NC 组比较, miR-1193 mimic 组迁移及侵袭细胞数减少 ( $P < 0.05$ ); 与 si-DLGAP1-AS2 组比较, si-DLGAP1-AS2+miR-1193 inhibitor 组迁移及侵袭细胞数增多 ( $P < 0.05$ ), 见图 6、表 6。



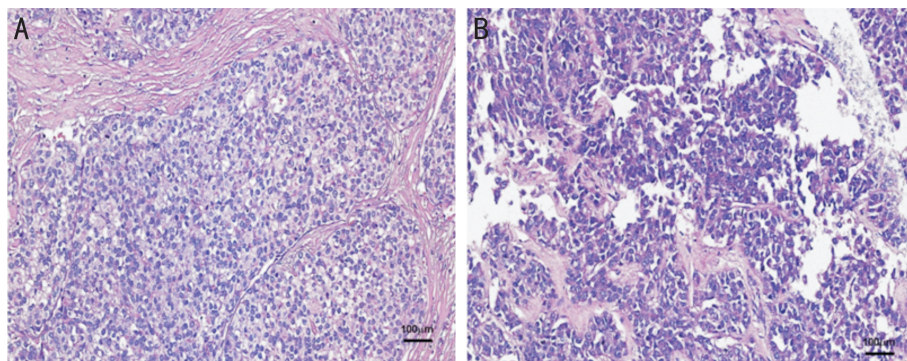


图1 视网膜组织的 HE 染色检测 A:正常视网膜;B:视网膜母细胞瘤。

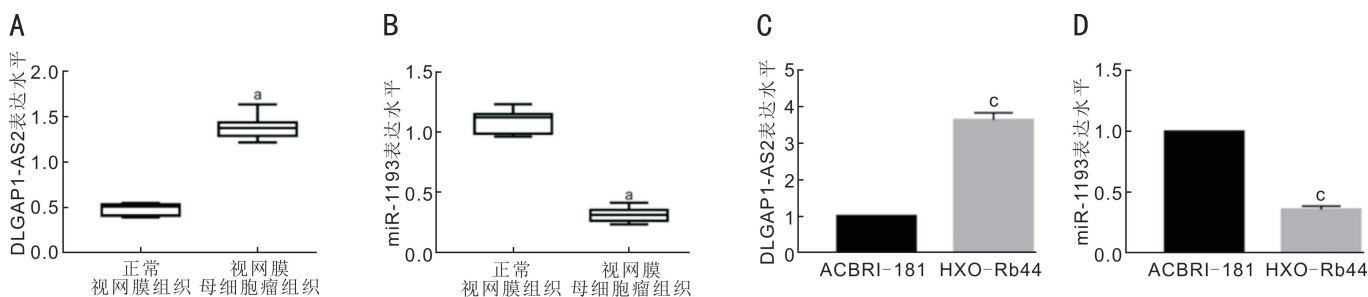


图2 视网膜母细胞瘤组织和细胞中 DLGAP1-AS2 和 miR-1193 表达的检测 A:与正常视网膜组织相比,DLGAP1-AS2 在视网膜母细胞瘤组织中高表达;B:与正常视网膜组织相比,miR-1193 在视网膜母细胞瘤组织中低表达;C:与 ACBRI-181 细胞相比,DLGAP1-AS2 在 HXO-Rb44 细胞中高表达;D:与 ACBRI-181 细胞相比,miR-1193 在 HXO-Rb44 细胞中低表达。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常视网膜组织组;<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs ACBRI-181 组。

表5 HXO-Rb44 细胞中 miR-1193、抑制率和集落形成数的检测

( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

分组	miR-1193	抑制率(%)	集落形成数(个)
control 组	1.00±0.00	0.00±0.00	115.78±2.94
si-NC 组	0.99±0.03	0.01±0.01	114.56±5.08
si-DLGAP1-AS2 组	3.54±0.16 <sup>a,c</sup>	60.79±1.86 <sup>a,c</sup>	53.33±1.41 <sup>a,c</sup>
miR-NC 组	0.99±0.04	0.01±0.02	113.67±5.42
miR-1193 mimic 组	3.20±0.10 <sup>a,c</sup>	54.01±1.50 <sup>a,c</sup>	65.22±2.10 <sup>a,c</sup>
si-DLGAP1-AS2+miR-1193 inhibitor 组	1.26±0.07 <sup>e</sup>	14.89±0.53 <sup>e</sup>	106.78±2.39 <sup>e</sup>
<i>F</i>	1814.902	7265.081	558.215
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs control 组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs si-NC 组;<sup>e</sup> $P < 0.05$  vs miR-NC 组;<sup>e</sup> $P < 0.05$  vs si-DLGAP1-AS2 组。

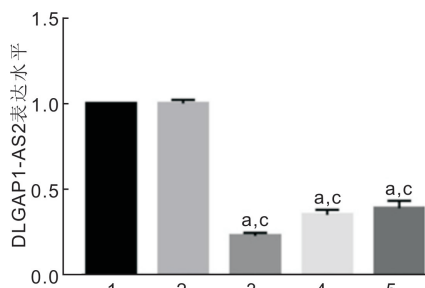


图3 沉默 DLGAP1-AS2 后 DLGAP1-AS2 表达的检测 1:control 组;2:si-NC 组;3:si-DLGAP1-AS2 A 组;4:si-DLGAP1-AS2 B 组;5: si-DLGAP1-AS2 C 组。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs control 组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs si-NC 组。

2.7 各个处理组对 HXO-Rb44 中 E-cadherin 和 N-cadherin 表达的影响 与 control 组、si-NC 组比较, si-DLGAP1-AS2 组 E-cadherin 蛋白水平升高( $P < 0.05$ ), N-cadherin 蛋白水平降低( $P < 0.05$ );与 miR-NC 组比较,

miR-1193 mimic 组 E-cadherin 蛋白水平升高( $P < 0.05$ ), N-cadherin 蛋白水平降低( $P < 0.05$ );与 si-DLGAP1-AS2 组比较, si-DLGAP1-AS2+miR-1193 inhibitor 组 E-cadherin 蛋白水平降低( $P < 0.05$ ), N-cadherin 蛋白水平升高( $P < 0.05$ ), 见图 7、表 7。

### 3 讨论

LncRNA 在视网膜母细胞瘤发生发展过程中可发挥重要调控作用,例如,沉默 LncRNA ANRIL 可通过调节 miR-99a 和 c-Myc 而抑制视网膜母细胞瘤细胞生长并促进其凋亡<sup>[7]</sup>。LncRNA XIST 通过竞争性结合 miR-101 而促进视网膜母细胞瘤细胞转移<sup>[8]</sup>。敲低 LncRNA PVT1 可抑制视网膜母细胞瘤的进展<sup>[9]</sup>。LncRNA CANT1 可抑制视网膜母细胞瘤细胞增殖<sup>[10]</sup>。

DLGAP1-AS2 在视网膜母细胞瘤中的表达尚未可知。研究表明抑制 DLGAP1-AS2 表达可抑制肝癌细胞转移及侵袭<sup>[11]</sup>。DLGAP1-AS2 通过上调 YAP1 表达而促进神经

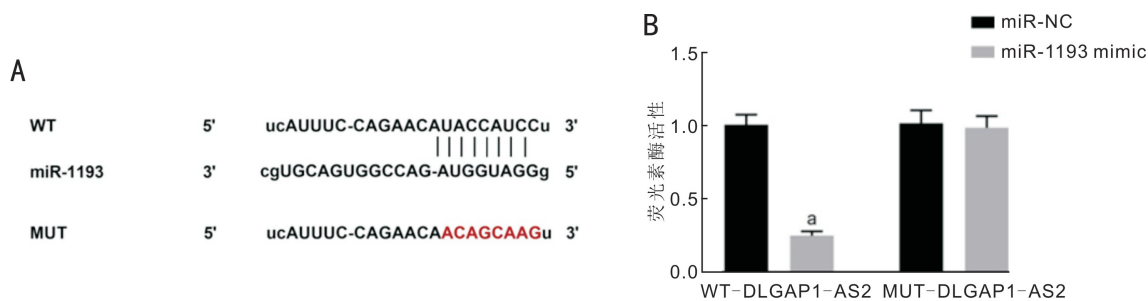


图4 DLGAP1-AS2和miR-1193的互补序列及荧光素酶活性检测 A:DLGAP1-AS2和miR-1193的互补序列;B:双荧光素酶报告实验检测荧光素酶活性。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs miR-NC组。

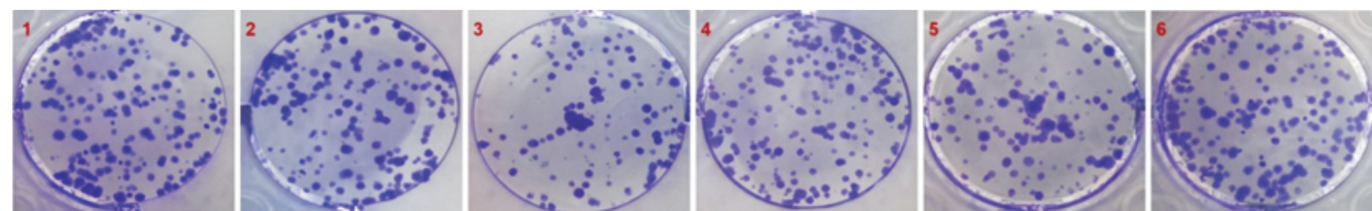
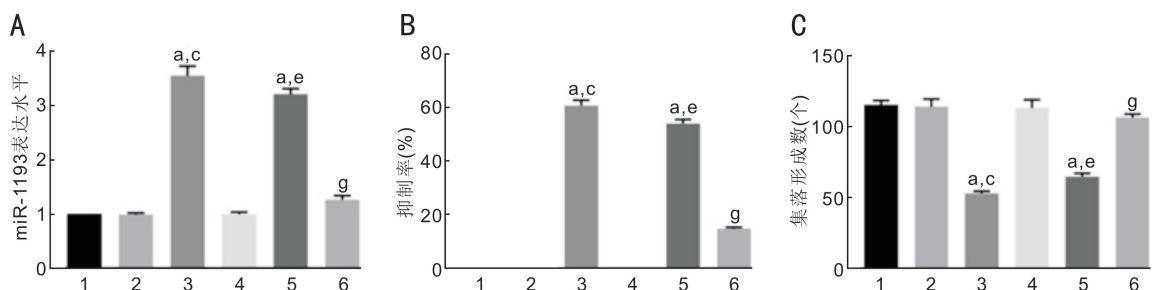


图5 HXO-Rb44细胞中miR-1193、抑制率和集落形成数的检测 A:miR-1193表达的检测;B:HXO-Rb44细胞抑制率的检测;C: HXO-Rb44细胞集落形成数的检测。1:control组;2:si-NC组;3:si-DLGAP1-AS2组;4:miR-NC组;5:miR-1193 mimic组;6:si-DLGAP1-AS2+miR-1193 inhibitor组。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs control组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs si-NC组;<sup>e</sup> $P < 0.05$  vs miR-NC组;<sup>g</sup> $P < 0.05$  vs si-DLGAP1-AS2组。

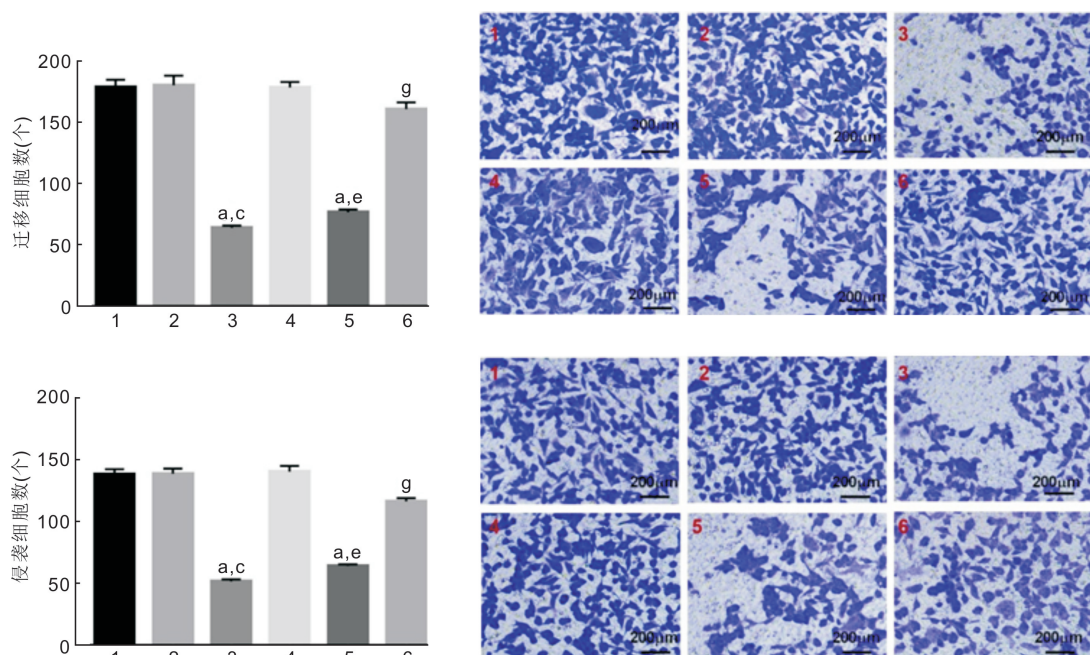


图6 HXO-Rb44细胞迁移、侵袭的检测 1:control组;2:si-NC组;3:si-DLGAP1-AS2组;4:miR-NC组;5:miR-1193 mimic组;6:si-DLGAP1-AS2+miR-1193 inhibitor组。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs control组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs si-NC组;<sup>e</sup> $P < 0.05$  vs miR-NC组;<sup>g</sup> $P < 0.05$  vs si-DLGAP1-AS2组。

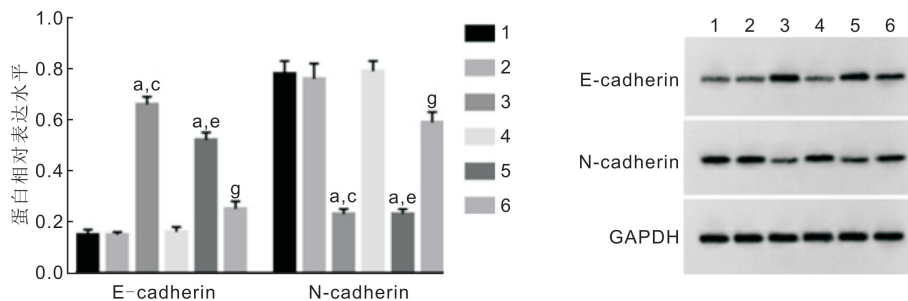


图7 E-cadherin和N-cadherin蛋白表达的检测 1:control组;2:si-NC组;3:si-DLGAP1-AS2组;4:miR-NC组;5:miR-1193 mimic组;6:si-DLGAP1-AS2+miR-1193 inhibitor组。<sup>a</sup> $P<0.05$  vs control组;<sup>c</sup> $P<0.05$  vs si-NC组;<sup>e</sup> $P<0.05$  vs miR-NC组;<sup>g</sup> $P<0.05$  vs si-DLGAP1-AS2组。

表6 HXO-Rb44细胞迁移和侵袭的检测

( $n=9, \bar{x} \pm s$ , 个)

分组	迁移	侵袭
control组	179.00±5.72	138.22±3.88
si-NC组	180.56±7.41	138.78±3.94
si-DLGAP1-AS2组	64.11±1.73 <sup>a,c</sup>	51.56±1.57 <sup>a,c</sup>
miR-NC组	178.67±4.32	140.33±4.52
miR-1193 mimic组	76.78±2.15 <sup>a,e</sup>	64.11±1.20 <sup>a,e</sup>
si-DLGAP1-AS2+miR-1193 inhibitor组	161.11±5.22 <sup>g</sup>	116.33±2.67 <sup>g</sup>
<i>F</i>	1137.224	1407.708
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup> $P<0.05$  vs control组;<sup>c</sup> $P<0.05$  vs si-NC组;<sup>e</sup> $P<0.05$  vs miR-NC组;<sup>g</sup> $P<0.05$  vs si-DLGAP1-AS2组。

表7 HXO-Rb44中E-cadherin和N-cadherin蛋白表达的检测

( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

分组	E-cadherin	N-cadherin
control组	0.15±0.02	0.78±0.05
si-NC组	0.16±0.01	0.76±0.06
si-DLGAP1-AS2组	0.66±0.03 <sup>a,c</sup>	0.23±0.02 <sup>a,c</sup>
miR-NC组	0.16±0.02	0.79±0.04
miR-1193 mimic组	0.52±0.03 <sup>a,e</sup>	0.33±0.02 <sup>a,e</sup>
si-DLGAP1-AS2+miR-1193 inhibitor组	0.25±0.03 <sup>g</sup>	0.59±0.04 <sup>g</sup>
<i>F</i>	721.600	322.503
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup> $P<0.05$  vs control组;<sup>c</sup> $P<0.05$  vs si-NC组;<sup>e</sup> $P<0.05$  vs miR-NC组;<sup>g</sup> $P<0.05$  vs si-DLGAP1-AS2组。

胶质瘤的发生<sup>[12]</sup>。DLGAP1-AS2在Wilms肿瘤中表达上调,并可能作为Wilms肿瘤诊断的潜在生物学标记物<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,视网膜母细胞瘤组织与细胞系中DLGAP1-AS2的表达量升高,沉默DLGAP1-AS2可增高视网膜母细胞瘤细胞增殖抑制率,集落形成数减少,提示沉默DLGAP1-AS2可抑制视网膜母细胞瘤细胞增殖及克隆形成。表明DLGAP1-AS2高表达可促进视网膜母细胞瘤细胞增殖及增强细胞克隆形成能力从而促进视网膜母细胞瘤的发生及发展。E-cadherin与N-cadherin表达失调可调节上皮-间质转化(EMT)进而调控细胞转移<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,沉默DLGAP1-AS2后视网膜母细胞瘤迁移及侵袭细胞数减少,E-cadherin蛋白水平升高,N-cadherin蛋白水平降低,提示沉默DLGAP1-AS2可抑制视网膜母细胞瘤细胞迁移及侵袭。表明DLGAP1-AS2高表达可促进视网膜母细胞瘤细胞迁移及侵袭从而发挥癌基因作用。

本研究证实DLGAP1-AS2可靶向结合miR-1193,并可负向调控miR-1193的表达。提示DLGAP1-AS2可能通过靶向miR-1193而促进视网膜母细胞瘤发展。研究表明miR-1193表达下调可促进皮肤鳞状细胞癌的发展<sup>[15]</sup>。miR-1193通过直接靶向跨膜9超家族3(TM9SF3)抑制人T细胞白血病细胞增殖和侵袭<sup>[16]</sup>。抑制miR-1193表达可促进成胶质细胞瘤的发生<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,视网膜母细胞瘤组织与细胞系中miR-1193的表达量降低,上调miR-1193表达可抑制视网膜母细胞瘤细胞增殖、克隆形成、迁移及侵袭,而抑制其表达可恢复沉默DLGAP1-AS2对视网膜母细胞瘤细胞增殖、克隆形成、迁移及侵袭的抑制作用。提示DLGAP1-AS2可能通过靶向miR-1193而促进视网膜母细胞瘤细胞增殖、迁移和侵袭。

综上所述,视网膜母细胞瘤组织与细胞系中DLGAP1-AS2表达上调,而miR-1193表达下调,DLGAP1-AS2与



miR-1193 存在靶向调控作用,沉默 DLGAP1-AS2 可通过促进 miR-1193 表达而抑制视网膜母细胞瘤细胞增殖、克隆形成、迁移及侵袭,DLGAP1-AS2/miR-1193 在视网膜母细胞瘤发生发展过程中可发挥重要调控作用,并可能作为视网膜母细胞瘤治疗的潜在靶点,还可能为进一步揭示视网膜母细胞瘤的发病机制奠定实验基础。但 DLGAP1-AS2 基因序列上富含多个 miRNA 的结合位点,其是否可通过靶向调控其他 miRNA 而参与视网膜母细胞瘤发生及发展过程仍需进一步探究。

#### 参考文献

- 1 Wang Y, Xin DL, Zhou L. LncRNA LINC00152 increases the aggressiveness of human retinoblastoma and enhances carboplatin and adriamycin resistance by regulating miR-613/yes-associated protein1 (YAP1) axis. *Med Sci Monit* 2020;26(1):e920886
- 2 Xu CL, Hu CM, Wang YX, et al. Long noncoding RNA SNHG16 promotes human retinoblastoma progression via sponging miR-140-5p. *Biomed Pharmacother* 2019;117(1):109153-109163
- 3 Xu C, Tian LH. LncRNA XIST promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition of retinoblastoma cells through sponge action of miR-142-5p. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24(18):9256-9264
- 4 Wang LM, Zhang YW, Xin XY. Long non-coding RNA MALAT1 aggravates human retinoblastoma by sponging miR-20b-5p to upregulate STAT3. *Pathol Res Pract* 2020;216(6):152977-152987
- 5 Liu Z, Pan LL, Yan XF, et al. The long noncoding RNA DLGAP1-AS2 facilitates cholangiocarcinoma progression via miR-505 and GALNT10. *FEBS Open Bio* 2021;11(2):413-422
- 6 Zhang B, Lin Y, Bao QF, et al. miR-1193 inhibits the malignancy of cervical cancer cells by targeting claudin 7 (CLDN7). *Oncol Targets Ther* 2020;13(1):4349-4358
- 7 Wang XM, Zhang XX, Han YT, et al. Silence of lncRNA ANRIL represses cell growth and promotes apoptosis in retinoblastoma cells through regulating miR-99a and c-Myc. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*

2019;47(1):2265-2273

- 8 Cheng Y, Chang Q, Zheng B, et al. LncRNA XIST promotes the epithelial to mesenchymal transition of retinoblastoma via sponging miR-101. *Eur J Pharmacol* 2019;843(1):210-216
- 9 Wu XZ, Cui HP, Lv HJ, et al. Knockdown of lncRNA PVT1 inhibits retinoblastoma progression by sponging miR-488-3p. *Biomed Pharmacother* 2019;112(1):108627-108637
- 10 Ni HY, Chai PW, Yu J, et al. LncRNA CANT1 suppresses retinoblastoma progression by repelling histone methyltransferase in PI3K promoter. *Cell Death Dis* 2020;11(5):306-316
- 11 Chen K, Zhang ZQ, Yu AJ, et al. LncRNA DLGAP1-AS2 knockdown inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion by regulating miR-154-5p methylation. *Biomed Res Int* 2020;2020:6575724
- 12 Miao W, Li N, Gu B, et al. LncRNA DLGAP1-AS2 modulates glioma development by up-regulating YAP1 expression. *J Biochem* 2020;167(4):411-418
- 13 Ren P, Hu ML. A three long non-coding RNA signature to improve survival prediction in patients with Wilms' tumor. *Oncol Lett* 2019;18(6):6164-6170
- 14 Zhao H, Wan JJ, Zhu Y. Carboplatin inhibits the progression of retinoblastoma through lncRNA XIST/miR-200a-3p/NRP1 axis. *Drug Des Devel Ther* 2020;14(1):3417-3427
- 15 Lu XY, Gan Q, Gan CB. Circular RNA circSEC24A promotes cutaneous squamous cell carcinoma progression by regulating miR-1193/MAP3K9 axis. *Oncol Targets Ther* 2021;14(1):653-666
- 16 Shen LY, du XJ, Ma HY, et al. miR-1193 suppresses the proliferation and invasion of human T-cell leukemia cells through directly targeting the transmembrane 9 superfamily 3 (TM9SF3). *Oncol Res* 2017;25(9):1643-1651
- 17 Zhang J, Jing L, Tan S, et al. Inhibition of miR-1193 leads to synthetic lethality in glioblastoma multiforme cells deficient of DNA-PKcs. *Cell Death Dis* 2020;11(7):602-612