

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.05.005

· 基础研究 ·

## lncRNA HOXA-AS2 靶向 miR-520a-3p 调控卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭

谢德玲<sup>1</sup>, 凌烈峰<sup>2</sup>, 金洵<sup>3</sup> (1. 芜湖市第二人民医院 妇科, 安徽 芜湖 241001; 2. 皖南医学院 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 芜湖 241002; 3. 南京中医药大学附属医院 中医外科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:** 探究长链非编码 RNA HOXA-AS2 (lncRNA HOXA-AS2) 与微小 RNA-520a-3p (miR-520a-3p) 之间的靶向关系及其对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法:** qPCR 检测 lncRNA HOXA-AS2 与 miR-520a-3p 在多种卵巢癌细胞 (SKOV3、HO8910、OVCAR3 细胞) 及正常卵巢上皮细胞 HOSE 中的表达水平。生物信息学手段预测 HOXA-AS2 与 miR-520a-3p 之间的靶向关系并用双荧光素酶报告基因实验验证。将 si-HOXA-AS2、miR-520a-3p mimic、anti-miR-520a-3p 和相应对照片段分别或共转染 SKOV3 细胞, MTT、Transwell 和 Western blotting 法分别检测各组 SKOV3 细胞增殖、迁移、侵袭及相关蛋白 (CyclinD1、p21、p27、MMP-2、MMP-9、MMP-14) 表达情况。**结果:** 与 HOSE 细胞相比, 多种卵巢癌细胞中 HOXA-AS2 均呈高表达 (均  $P < 0.05$ )、miR-520a-3p 均呈低表达 (均  $P < 0.05$ ); HOXA-AS2 可靶向下调 miR-520a-3p 的表达。si-HOXA-AS2 和 miR-520a-3p mimics 组 SKOV3 细胞的增殖、迁移及侵袭能力均较对照组均显著降低 (均  $P < 0.01$ ), 且 p21、p27 蛋白表达显著升高, 而 CyclinD1、MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达显著减少 (均  $P < 0.01$ ); si-HOXA-AS2+anti-miR-520a-3p 组 SKOV3 细胞增殖、迁移及侵袭能力较 si-HOXA-AS2 和 si-HOXA-AS2+anti-miR-NC 组显著增强 (均  $P < 0.05$ )。**结论:** lncRNA HOXA-AS2 通过靶向抑制 miR-520a-3p 表达进而增强卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

**[关键词]** lncRNA HOXA-AS2; miR-520a-3p; 卵巢癌; SKOV3 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

**[中图分类号]** R737.31; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)05-0501-07

## lncRNA HOXA-AS2 regulates proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells via targeting miR-520a-3p

XIE Deling<sup>1</sup>, LING Liefeng<sup>2</sup>, JIN Xun<sup>3</sup> (1. Department of Gynecology, The Second People's Hospital of Wuhu City, Wuhu 241001, Anhui, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China; 3. Department of Chinese Medicine Surgery, Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the targeting relationship between long-chain noncoding RNA HOXA-AS2 (lncRNA HOXA-AS2) and microRNA-520a-3p (miR-520a-3p) and their effects on the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells. **Methods:** qPCR was used to detect the expression levels of lncRNA HOXA-AS2 and miR-520a-3p in various ovarian cancer cell lines (SKOV3, HO8910, OVCAR3 cells) and normal ovarian epithelial cell line HOSE. Bioinformatics methods were used to predict the targeting relationship between HOXA-AS2 and miR-520a-3p, which was then verified by Dual luciferase reporter gene assay. si-HOXA-AS2, miR-520a-3p mimic, anti-miR-520a-3p and corresponding control fragments were transfected into SKOV3 cells separately or in combination. MTT, Transwell and Western blotting were used to detect the proliferation, migration, invasion and expressions of related proteins (CyclinD1, p21, p27, MMP-2, MMP-9, MMP-14) of SKOV3 cells in each group. **Results:** Compared with HOSE cells, HOXA-AS2 was over-expressed while miR-520a-3p was under-expressed in ovarian cancer cell lines (all  $P < 0.05$ ). HOXA-AS2 could targetedly down-regulate the expression of miR-520a-3p. Compared with the NC group, the proliferation, migration and invasion of SKOV3 cells in the si-HOXA-AS2 and miR-520a-3p mimics groups were significantly reduced (all  $P < 0.01$ ), and the protein expressions of p21 and p27 were significantly increased, while protein expressions of CyclinD1, MMP-2, MMP-9, MMP-14 were significantly reduced (all  $P < 0.01$ ). The proliferation, migration and invasion of SKOV3 cells in the si-HOXA-AS2+anti-miR-520a-3p group were significantly enhanced compared with those in si-HOXA-AS2 and si-HOXA-AS2+anti-miR-NC groups (all

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (No. 81603674)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81603674)

**[作者简介]** 谢德玲 (1972-), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤相关的基础与临床研究, E-mail: p0vt6cf@163.com

**[通信作者]** 凌烈峰 (LING Liefeng, corresponding author), 男, 硕士, 副教授, 主要从事肿瘤的生物治疗相关研究, E-mail: nc7og5jf@163.com

$P < 0.05$ ). **Conclusion:** lncRNA HOXA-AS2 enhances the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells by targetedly inhibiting the expression of miR-520a-3p.

**[Key words]** lncRNA HOXA-AS2; miR-520a-3p; ovarian cancer; SKOV3 cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(5): 501-507. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.05.005]

卵巢癌是威胁女性健康的恶性肿瘤,随着现代生活节奏的加快,卵巢癌患者发病率与病死率均逐年增加<sup>[1]</sup>。目前临床主要采用手术及放化疗治疗卵巢癌,但由于卵巢癌早期诊断困难,中晚期患者治疗效果较差,患者生活质量严重降低<sup>[2-3]</sup>。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)异常表达可参与卵巢癌发生及发展过程,并可对肿瘤细胞恶性生物学行为产生一定影响<sup>[4]</sup>。lncRNA HOXA-AS2在胃癌、胰腺癌、乳腺癌组织中表达显著上调,下调其表达能明显抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[5-7]</sup>。通过生物信息学网站预测lncRNA HOXA-AS2与微小RNA-520a-3p(microRNA-520a-3p, miR-520a-3p)存在结合位点,而miR-520a-3p在非小细胞肺癌、乳腺癌组织中的表达水平降低,并可影响肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力<sup>[8-9]</sup>。因此,本研究主要探讨lncRNA HOXA-AS2与miR-520a-3p在卵巢癌细胞中的表达变化,进一步分析其对卵巢癌细胞生物学行为的影响,明确lncRNA HOXA-AS2与miR-520a-3p在卵巢癌中的可能作用机制,为卵巢癌诊断及治疗提供潜在靶点。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料与试剂

卵巢癌细胞株 SKOV3、HO8910、OVCAR3 与正常卵巢上皮细胞 HOSE 均购自中科院上海生科院细胞库。DMEM 培养基与胎牛血清(FBS)均购自美国 Gibco 公司,脂质体 Lipofectamine™2000、HOXA-AS2 siRNA (si-HOXA-AS2) 及阴性对照 siRNA (si-NC) 购自 Invitrogen 公司,miR-520a-3p mimic、miR-NC 均购自上海吉玛制药技术有限公司,Transwell 小室购自美国 Milliporegongis 公司,Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒及荧光素酶报告载体均购自美国 Promega 公司,TRIzol、反转录及 qPCR 试剂盒均购自美国 Sigma 公司,MTT 检测试剂盒购自北京白奥莱博科技有限公司,RIPA 裂解液购自江苏凯基生物技术股份有限公司,WT-HOXA-AS2、MUT-HOXA-AS2 购自美国 Abcam 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自上海博彩生物科技有限公司,Western blotting(WB)实验所用一抗(MMP-2、MMP-9、MMP-14、CyclinD1、p21、p27 抗体)、酶标二抗均购自美国 CST 公司,引物均由上海生物工程股份有限公司合成。

### 1.2 细胞转染及分组

用含有 10% FBS 和双抗的 DMEM 培养基培养卵巢癌细胞株 SKOV3、HO8910、OVCAR3 及正常卵巢上皮细胞 HOSE,置于温度为 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中,每隔 1 d 更换一次培养液,细胞生长至 80% 左右汇合时进行传代培养。转染前 24 h 收集 SKOV3 细胞接种于 6 孔细胞培养板(2 ml/孔),待细胞汇合至 30%~40% 时取 si-HOXA-AS2、si-NC、miR-520a-3p mimic、miR-NC 质粒载体,用无血清 DMEM 培养液稀释至 100 nmol/L,以 2 ml/孔分别加入 Lipofectamine2000 脂质体进行转染,严格按照试剂盒说明书进行操作,转染 6 h 后更换为完全 DMEM 培养基培养基,继续培养 48 h 后收集对数生长期细胞进行后续检测。

### 1.3 qPCR 检测卵巢癌细胞中 HOXA-AS2 和 miR-520a-3p 的表达水平

用 TRIzol 试剂盒提取不同卵巢癌细胞、正常卵巢上皮细胞及转染后各组 SKOV3 细胞总 RNA,利用核酸浓度检测仪测定 RNA 浓度,稀释 RNA 至 40 μg/ml。参照反转录试剂盒合成 cDNA,HOXA-AS2 正向引物:5'-CCCGTAGGAAGAACCGATGA-3',反向引物:5'-TTTAGGCCTTCGCAGACAGC-3';miR-520a-3p 正向引物:5'-ACACTCCAGCTGGGAAAGTGCTTCCC-3',反向引物:5'-CTCAACTGGTGTCGTGA-3'。根据 qPCR 试剂盒说明书配置反应体系,反应条件设置为 95 °C 变性 5 min 后,95 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s,循环 40 次。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 算法计算 HOXA-AS2、miR-520a-3p 相对表达量。

### 1.4 WB 检测 HOXA-AS2 和 miR-520a-3p 对 SKOV3 细胞中 CyclinD1、p21、p27、MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达的影响

收集各组转染 48 h 后 SKOV3 细胞,加入 RIPA 裂解液,1 200×g 转速离心 15 min 提取总蛋白,采用 BCA 法定量蛋白,蛋白样品以 4:1 的比例加入蛋白上样缓冲液,通过 SDS-PAGE 分离蛋白,采用半干膜转移法将蛋白条带转移至 PVDF 膜,脱脂奶粉封闭,分别加入各蛋白一抗(1:1 000)后置于 4 °C 冰箱内保存,次日分别加入酶标二抗(1:5 000),室温孵育 1 h, TBST 洗膜后曝光,ECL 显影,放入凝胶成像分析系统并利用 Quantity one 软件分析各蛋白条带灰度值,计算目的蛋白的相对表达量。

### 1.5 荧光素酶报告基因实验检测 HOXA-AS2 与 miR-520a-3p 之间的靶向关系

根据生物信息学网站预测 HOXA-AS2 的 3' UTR

与 miR-520a-3p 存在结合位点, 分别将 Wt-HOXA-AS2、Mut-HOXA-AS2 与 miR-520a-3p mimic、miR-NC 共转染到 SKOV3 细胞, 检测 miR-NC 组与 miR-520a-3p 组 SKOV3 细胞中 HOXA-AS2 的相对荧光素酶活性, 严格按照试剂盒说明书进行操作, 应用双荧光素酶报告基因系统进行检测。为进一步明确 miR-520a-3p 与 HOXA-AS2 之间的表达关系, 采用 qPCR 法分别检测 HOXA-AS2 过表达(转染方法同“1.2.1”)及抑制 HOXA-AS2 表达后 SKOV3 细胞中 miR-520a-3p 表达变化情况。

### 1.6 MTT 法检测 HOXA-AS2 和 miR-520a-3p 对 SKOV3 细胞增殖的影响

分别收集各组对数生长期 SKOV3 细胞, 以  $5 \times 10^3$  个/ml 的细胞密度接种于 96 孔板(100  $\mu$ l/孔), 培养 48 h 后弃培养基, 每孔加入 20  $\mu$ l MTT 溶液(5 mg/ml), 混匀后避光孵育 4 h, 弃上清, 每孔加入 150  $\mu$ l 二甲亚砜(DMSO), 混匀后置于酶标仪中检测波长 490 nm 处各孔光密度(D)值, 以  $D_{490}$  值代表细胞增殖水平。

### 1.7 Transwell 实验检测 HOXA-AS2 和 miR-520a-3p 对 SKOV3 细胞迁移和侵袭能力的影响

取 0.5 ml 新鲜 DMEM 完全培养基加入 Transwell 小室的下室, 同时收集各组 SKOV3 细胞, 胰酶消化后制备单细胞悬浮液, 取 200  $\mu$ l 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室, 放入恒温培养箱继续培养 24 h, 除去未穿过细胞, 95% 乙醇固定, 20 min 后置于超净工作台, 晾干后用结晶紫染色, 15 min 后用 PBS 洗涤 3 次, 晾干, 置于显微镜下拍照、计数穿膜细胞。Transwell 侵袭实验中预先在上室表面加入 100  $\mu$ l 无血清 DMEM 培养基稀释过的 Matrigel 基质胶(1:8), 下室加入 600  $\mu$ l 含 FBS 的 DMEM 培养基, 其余操作与迁移实验相同。

### 1.8 统计学处理

应用 SPSS21.0 统计学软件分析数据, 所有实验独立重复 3 次, 符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 卵巢癌细胞中 lncRNA HOXA-AS2 呈高表达、miR-520a-3p 低表达

qPCR 检测结果显示(表 1), 与正常卵巢上皮细胞 HOSE 相比, HOXA-AS2 在卵巢癌细胞株 SKOV3、HO8910、OVCAR3 中呈高表达(均  $P < 0.05$ ), 在 SKOV3 细胞中表达水平最高; miR-520a-3p 在卵巢癌细胞株中呈低表达(均  $P < 0.05$ ), 在 SKOV3 细胞中表

达水平最低, 因此将 SKOV3 细胞作为进一步研究生物学功能实验的细胞。

表 1 HOXA-AS2 和 miR-520a-3p 在卵巢癌细胞和正常卵巢上皮细胞中的表达( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Tab.1 Expressions of HOXA-AS2 and miR-520a-3p in ovarian cancer cells and normal ovarian epithelial cells( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Cell line	HOXA-AS2	miR-520a-3p
HOSE	1.02 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.09
SKOV3	4.12 $\pm$ 0.32*	0.36 $\pm$ 0.03*
HO8910	3.76 $\pm$ 0.31*	0.41 $\pm$ 0.04*
OVCAR3	4.07 $\pm$ 0.39*	0.53 $\pm$ 0.05*
F	298.580	312.794
P	0.000	0.000

\* $P < 0.05$  vs HOSE cell group

### 2.2 敲减 HOXA-AS2 表达抑制 SKOV3 细胞的增殖

qPCR 检测结果显示, 与 si-NC 组相比, si-HOXA-AS2 组 SKOV3 细胞中 HOXA-AS2 的表达水平显著降低(0.42 $\pm$ 0.04 vs 0.99 $\pm$ 0.09,  $P=0.00$ ,  $t=14.18$ ), 说明转染 si-HOXA-AS2 成功敲低了 HOXA-AS2 的表达。MTT 检测结果(表 2)显示, 与 si-NC 组相比, si-HOXA-AS2 组 SKOV3 细胞在转染后 48、72 h 时增殖活力均明显下降( $P < 0.05$ )。WB 检测结果(图 1)显示, 与 si-NC 组相比, si-HOXA-AS2 组 SKOV3 细胞中 Cyclin D1 蛋白表达下调(0.29 $\pm$ 0.03 vs 0.64 $\pm$ 0.06,  $P=0.00$ ,  $t=12.78$ ), p21(0.79 $\pm$ 0.07 vs 0.31 $\pm$ 0.03,  $P=0.00$ ,  $t=15.44$ )、p27(0.68 $\pm$ 0.06 vs 0.27 $\pm$ 0.03,  $P=0.00$ ,  $t=14.97$ )蛋白表达明显上调。

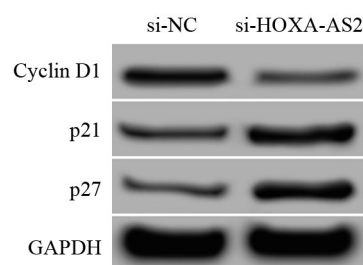


图 1 敲降 HOXA-AS2 影响 SKOV3 细胞增殖相关蛋白表达  
Fig.1 Knockdown of HOXA-AS2 affected the expression of proliferation-related proteins in ovarian cancer SKOV3 cells

### 2.3 敲降 HOXA-AS2 表达抑制 SKOV3 细胞迁移和侵袭

WB 检测结果(表 3)显示, si-HOXA-AS2 组 SKOV3 细胞中 MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达均明显低于 si-NC 组( $P < 0.05$ )。Transwell 实验检测结果(图 2)显示, 与 si-NC 组相比, si-HOXA-AS2 组在转染后 48 h SKOV3 细胞迁移细胞数明显减少

[(42.53±3.87) vs (86.34±7.69) 个,  $P=0.00, t=12.47$ ], 穿过 Matrigel 基质胶的细胞数量明显减少 [(33.96±4.07) vs (73.61±7.52) 个,  $P=0.00, t=11.36$ ].

表2 敲降 HOXA-AS2 表达抑制 SKOV3 细胞的增殖( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

**Tab.2 Knockdown HOXA-AS2 expression inhibited the proliferation of SKOV3 cells( $\bar{x}\pm s, n=6$ )**

Group	24 h	48 h	72 h
si-NC	0.38±0.03	0.69±0.06	1.12±0.09
si-HOXA-AS2	0.36±0.04	0.47±0.05*	0.68±0.07*
<i>t</i>	0.980	6.900	9.453
<i>P</i>	0.350	0.000	0.000

\* $P<0.05$  vs si-NC group

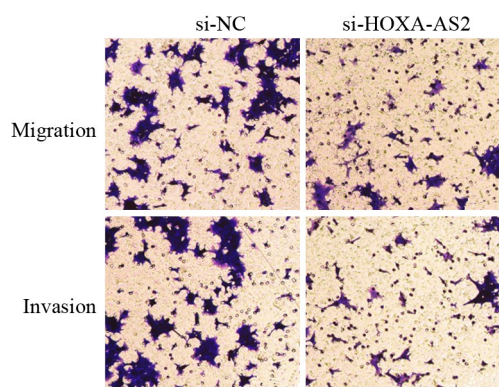


图2 敲降 HOXA-AS2 抑制 SKOV3 细胞的迁移和侵袭( $\times 200$ )

Fig.2 HOXA-AS2 knockdown inhibited migration and invasion of SKOV3 cells( $\times 200$ )

表3 敲降 HOXA-AS2 抑制 SKOV3 细胞中迁移、侵袭相关蛋白的表达( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

**Tab.3 HOXA-AS2 knockdown inhibited the expressions of migration- and invasion-related proteins in SKOV3 cells ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )**

Group	MMP-2	MMP-9	MMP-14
si-NC	0.76±0.07	0.79±0.08	0.86±0.08
si-HOXA-AS2	0.32±0.03*	0.27±0.03*	0.19±0.02*
<i>t</i>	14.152	14.908	19.902
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

\* $P<0.05$  vs si-NC group

#### 2.4 miR-520a-3p 过表达抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移和侵袭

qPCR 检测结果显示, miR-520a-3p 组 SKOV3 细胞中 miR-520a-3p 表达水平较 miR-NC 组显著升高 (6.47±0.62 vs 1.02±0.08,  $P=0.00, t=21.36$ ), 提示 miR-520a-3p 过表达转染效率较高。MTT 检测结果(表4)显示, 相较于 miR-NC 组, 48、72 h 时 miR-520a-3p 组 SKOV3 细胞 D 值明显降低(均  $P<0.01$ ); Transwell 实

验结果显示, miR-520a-3p 组 SKOV3 细胞迁移 [(48.39±4.27) vs (88.43±7.56) 个,  $P=0.00, t=11.30$ ] 及侵袭 [(36.44±4.08) vs (69.73±6.54) 个,  $P=0.00, t=10.58$ ] 细胞数均明显减少。WB 实验结果(图3、表5)显示, miR-520a-3p 组 SKOV3 细胞中 p21 蛋白表达上调 ( $P<0.05$ ), 而 Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显下调( $P<0.05$ )。

表4 miR-520a-3p 过表达抑制 SKOV3 细胞的增殖( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

**Tab.4 miR-520a-3p overexpression inhibited the proliferation of SKOV3 cells( $\bar{x}\pm s, n=6$ )**

Group	24 h	48 h	72 h
miR-NC	0.41±0.04	0.72±0.07	1.13±0.09
miR-520a-3p	0.39±0.03	0.54±0.05	0.76±0.07
<i>t</i>	0.980	5.126	7.949
<i>P</i>	0.350	0.000	0.000

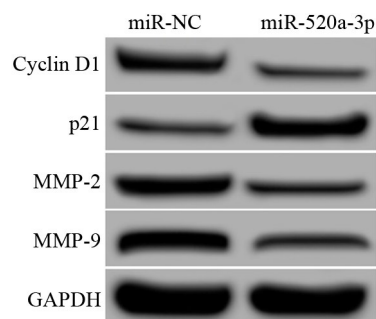


图3 miR-520a-3p 过表达影响 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭相关蛋白表达

Fig.3 miR-520a-3p overexpression affected the expressions of proliferation, migration and invasion-related proteins in SKOV3 cells

表5 miR-520a-3p 过表达对 SKOV3 细胞增殖、迁移、侵袭相关蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

**Tab.5 The effect of miR-520a-3p overexpression on the expressions of proliferation, migration and invasion-related proteins in SKOV3 cells ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )**

Groups	CyclinD1	p21	MMP-2	MMP-9
miR-NC	0.76±0.07	0.26±0.03	0.78±0.07	0.74±0.06
miR-520a-3p	0.25±0.03	0.82±0.07	0.36±0.03	0.33±0.03
<i>t</i>	16.403	18.012	13.509	14.971
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

#### 2.5 lncRNA HOXA-AS2 靶向调控 miR-520a-3p 的表达

用生物信息学网站预测 HOXA-AS2 与 miR-520a-3p 存在相似结合位点, 见图4。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 与 NC 组相比, miR-520a-3p mimic 可明显抑制 Wt-HOXA-AS2 荧光素酶活性 (0.44±0.05 vs 1.02±0.08,  $P=0.00, t=15.06$ ), miR-520a-

3p mimic 对 Mut-HOXA-AS2 荧光素酶活性无明显抑制作用 ( $1.03 \pm 0.09$  vs  $1.01 \pm 0.07$ ,  $P=0.68$ ,  $t=0.43$ )。qPCR 实验结果 (表 6) 显示, si-HOXA-AS2 组细胞内 miR-520a-3p 表达较 NC 组显著上调 ( $P<0.05$ ), 上调 HOXA-AS2 表达可下调 miR-520a-3p 表达 ( $P<0.05$ )。

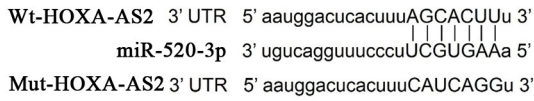


图 4 HOXA-AS2 的序列中含有与 miR-520a-3p 互补的核苷酸序列

Fig.4 The sequence of HOXA-AS2 contains a nucleotide sequence complementary to miR-520a-3p

2.6 转染 anti-miR-520a-3p 逆转敲降 HOXA-AS2 对 SKOV3 细胞增殖、迁移、侵袭的抑制

qPCR 检测结果 (图 5A) 显示, 与 si-HOXA-AS2+anti-miR-NC 共转染组相比, si-HOXA-AS2+anti-miR-520a-3p 共转染组中 miR-520a-3p 表达水平显著降低 ( $P<0.05$ )。MTT 检测结果 (图 5B、C) 显示, 与 si-NC 组相比, si-HOXA-AS2 组和 si-HOXA-AS2+anti-miR-NC 共转染组中 SKOV3 细胞的增殖水平、迁移和侵袭

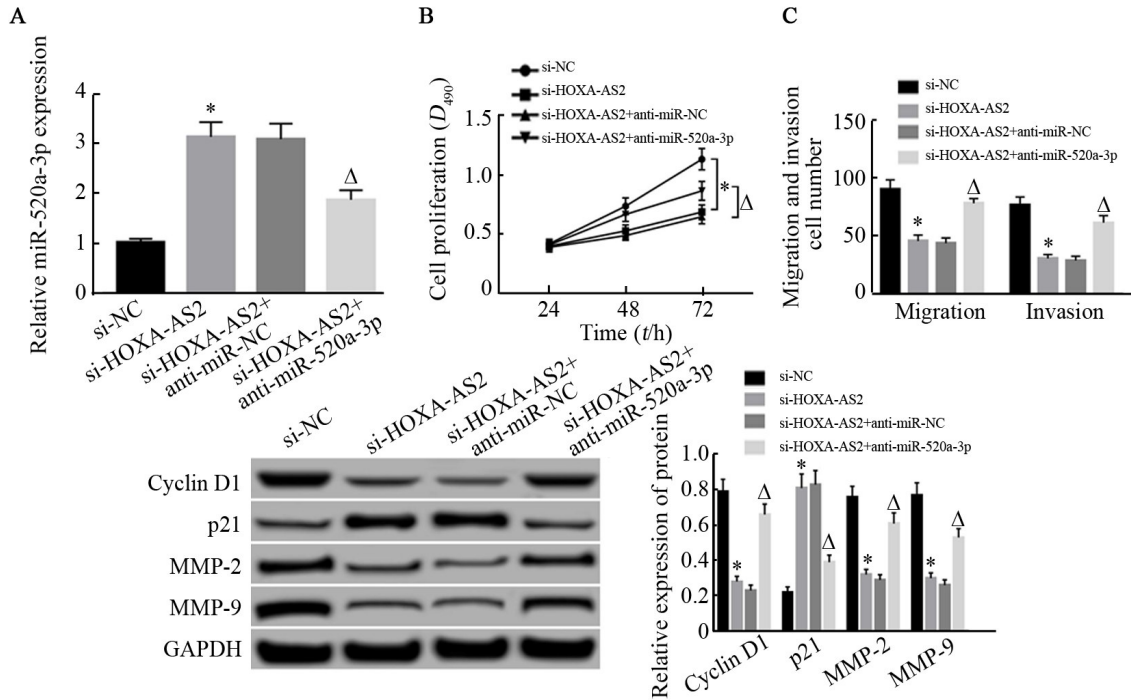
细胞数均显著降低 (均  $P<0.05$ ), 而 si-HOXA-AS2+anti-miR-520a-3p 共转染组 SKOV3 细胞的增殖水平、迁移及侵袭细胞数均较 si-HOXA-AS2 组和 si-HOXA-AS2+anti-miR-NC 共转染组明显增加 (均  $P<0.05$ )。WB 实验检测结果 (图 5D) 显示, si-HOXA-AS2+anti-miR-520a-3p 共转染组 SKOV3 细胞中 p21 蛋白表达水平较 si-HOXA-AS2 和 si-HOXA-AS2+anti-miR-NC 组明显降低 ( $P<0.05$ ), 而 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达均明显升高 (均  $P<0.05$ )。

表 6 lncRNA HOXA-AS2 靶向调控 miR-520a-3p 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Tab.6 lncRNA HOXA-AS2 targetedly regulated the expression of miR-520a-3p ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Group	HOXA-AS2	miR-520a-3p
si-NC	0.98±0.09	1.03±0.11
si-HOXA-AS2	0.27±0.03*	3.05±0.31*
pcDNA	0.99±0.08	0.97±0.09
pcDNA-HOXA-AS2	2.86±0.24 <sup>Δ</sup>	0.38±0.04 <sup>Δ</sup>
F	808.877	553.347
P	0.000	0.000

\* $P<0.05$  vs si-NC group; <sup>Δ</sup> $P<0.05$  vs pcDNA group



\* $P<0.05$  vs si-NC group; <sup>Δ</sup> $P<0.05$  vs si-HOXA-AS2+anti-miR-NC group

A: The relative expression level of miR-520a-3p detected by qPCR; B: Proliferation of SKOV3 cells detected by CCK-8 assay; C: Migration and invasion of SKOV3 cells detected by Transwell assay; D: Expression of proliferation, migration, and invasion-related proteins in SKOV3 cells detected by WB

图 5 抑制 miR-520a-3p 表达逆转了抑制 HOXA-AS2 表达对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移、侵袭的作用  
Fig.5 miR-520a-3p knockdown reversed the inhibitory effect of HOXA-AS2 on the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells

### 3 讨论

在急性髓细胞白血病患者体内 lncRNA HOXA-AS2 呈高表达, 沉默 HOXA-AS2 表达后可通过调控 miR-520c-3p/S100A4 轴进而抑制急性髓细胞白血病进展过程<sup>[10]</sup>。HOXA-AS2 高表达还可通过调节 miR-520c-3p/S100A4 轴促进乳头状甲状腺癌发生及发展<sup>[11]</sup>。WANG 等<sup>[12]</sup>研究表明, HOXA-AS2 可通过竞争性吸附 miR-520c-3p 并抑制其表达进而促进骨肉瘤细胞迁移及侵袭。HOXA-AS2 还可通过调节 miR-125b / Smad2 轴进而促进膀胱癌的迁移, 侵袭<sup>[13]</sup>。本研究发现, HOXA-AS2 在多种卵巢癌细胞中均呈高表达, 敲降 HOXA-AS2 表达后 SKOV3 细胞增殖、迁移及侵袭能力均显著降低, CyclinD1 蛋白表达明显降低, 而 p21、p27 蛋白表达明显升高, 提示 HOXA-AS2 可在卵巢癌发生过程中发挥癌基因作用。CyclinD1 作为细胞周期调节因子可促进细胞从 G1 期进展到 S 期进而加快细胞增殖, p21、p27 可抑制细胞周期蛋白与 CDK 结合而诱导细胞周期停滞于 G1 期进而抑制肿瘤细胞生长<sup>[14]</sup>。推测敲降 HOXA-AS2 表达可通过提高 p21、p27 表达水平抑制 CDK4-CyclinD1 复合物形成, 进而抑制卵巢癌细胞增殖。同时, 本研究发现, 抑制 HOXA-AS2 表达后 SKOV3 细胞中 MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达均明显降低。MMP-2、MMP-9、MMP-14 表达变化均与肿瘤细胞迁移及侵袭有关<sup>[15-16]</sup>。提示抑制 HOXA-AS2 表达可通过下调 MMP-2、MMP-9、MMP-14 蛋白表达进而抑制卵巢癌 SKOV3 细胞迁移及侵袭。

miR-520a-3p 在结直肠癌细胞中呈低表达, 上调 miR-520a-3p 表达后可通过抑制 EGFR 表达进而抑制结直肠癌细胞增殖并诱导细胞凋亡<sup>[17-18]</sup>。BI 等<sup>[19]</sup>研究表明, miR-520a-3p 可通过调控 JAK / STAT 信号通路进而抑制甲状腺乳头状癌细胞的上皮-间质转化、侵袭及迁移。本研究结果显示, 在多种卵巢癌细胞中 miR-520a-3p 均呈低表达, 上调 miR-520a-3p 表达可降低 SKOV3 细胞增殖、迁移及侵袭能力, 其对 SKOV3 细胞的影响与敲降 HOXA-AS2 相似, 提示 miR-520a-3p 在卵巢癌发生过程中可能发挥抑癌作用。lncRNA 可与 miRNA 相互结合并调控下游靶基因表达进而参与肿瘤发生及发展过程<sup>[20]</sup>。通过生物信息网站预测 HOXA-AS2 可能竞争性吸附 miR-520a-3p, 本研究采用双荧光素酶报告基因实验验证 HOXA-AS2 可通过吸附 miR-520a-3p 进而抑制其表达, 进一步研究显示, 抑制 miR-520a-3p 表达可逆转抑制 HOXA-AS2 表达对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移、侵袭的作用, 提示 HOXA-AS2 可通过抑制 miR-

520a-3p 表达进而促进卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移及侵袭。

综上所述, 本研究发现 HOXA-AS2 可靶向调控 miR-520a-3p 表达进而影响卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖、迁移及侵袭, HOXA-AS2 可作为卵巢癌早期诊断及靶向治疗的潜在标志物, 但关于 HOXA-AS2 与 miR-520a-3p 发挥作用的具体通路仍需进一步研究。

### [参考文献]

- [1] MANCHANDA R, MENON U. Setting the threshold for surgical prevention in women at increased risk of ovarian cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, 28(1): 34-42. DOI: 10.1097/IGC.0000000000001147.
- [2] LA VECCHIA C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2017, 26(1): 55-62. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000217.
- [3] 王帆, 周骞平, 谢小娟, 等. LncRNA UCA1 对卵巢癌细胞侵袭及迁移的影响及机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(1): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2015.01.01.
- [4] 余心华, 张华, 张波, 等. LncRNA ANRIL 靶向 miR-214 的表达调控卵巢癌细胞增殖与侵袭行为[J]. *解剖学杂志*, 2018, 41(5): 519-524.
- [5] 郑寿招. 长链非编码 RNA HOXA-AS2 在胃癌组织中的表达及对胃癌癌细胞增殖和迁移作用影响的初步研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2016: 1-96.
- [6] LIAN Y F, LI Z H, FAN Y Y, et al. The lncRNA-HOXA-AS2/EZH2/LSD1 oncogene complex promotes cell proliferation in pancreatic cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12): 5496-5506.
- [7] FANG Y, WANG J X, WU F, et al. Long non-coding RNA HOXA-AS2 promotes proliferation and invasion of breast cancer by acting as a miR-520c-3p sponge[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 46090-46103. DOI:10.18632/oncotarget.17552.
- [8] 于杰. MicroRNA-520a-3p 对非小细胞肺癌增殖、淋巴转移影响的机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015: 1-109.
- [9] LI J, WEI J, MEI Z, et al. Suppressing role of miR-520a-3p in breast cancer through CCND1 and CD44[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(1): 146-154.
- [10] DONG X Y, FANG Z G, YU M X, et al. Knockdown of long non-coding RNA HOXA-AS2 suppresses chemoresistance of acute myeloid leukemia via the miR-520c-3p/S100A4 Axis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(2): 886-896. DOI:10.1159/000495387.
- [11] XIA F D, CHEN Y, JIANG B, et al. Long noncoding RNA HOXA-AS2 promotes papillary thyroid cancer progression by regulating miR-520c-3p/S100A4 pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5): 1659-1672. DOI:10.1159/000494786.
- [12] WANG Y H, ZHANG R, CHENG G Q, et al. Long non-coding RNA HOXA-AS2 promotes migration and invasion by acting as a Cerna of miR-520c-3p in osteosarcoma cells[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(13): 1637-1648. DOI:10.1080/15384101.2018.1489174.
- [13] WANG F, WU D L, CHEN J X, et al. Long non-coding RNA HOXA-AS2 promotes the migration, invasion and stemness of bladder cancer via regulating miR-125b/Smad2 Axis[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 375(1): 1-10. DOI:10.1016/j.yexcr.2018.11.005.

- [14] 艾晓兰, 姚芳, 王晓晴, 等. 同种异体移植炎症因子-1 在结肠癌细胞增殖、迁移及凋亡中的作用[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(5): 511-519. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2018.05.02.
- [15] 王庆生, 陆航, 陈汉蕊, 等. IL-17A 通过 NF- $\kappa$ B 通路介导 MMP-2/9 表达促进结肠癌 SW480 细胞迁移和侵袭[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(5): 516-520. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.010.
- [16] 刘晶晶, 顾振鹏, 姚丽娟, 等. RECK 和 MMP-9 在子宫内膜癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(3): 298-302. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2012.3.014.
- [17] ZHANG R, LIU R, LIU C, et al. A novel role for MiR-520a-3p in regulating EGFR expression in colorectal cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(4): 1559-1574. DOI:10.1159/000479397.
- [18] QU X F, YANG L, SHI Q Q, et al. Lidocaine inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells by upregulating miR-520a-3p and targeting EGFR[J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(12): 1974-1979. DOI:10.1016/j.prp.2018.09.012.
- [19] BI C L, ZHANG Y Q, LI B, et al. MicroRNA-520a-3p suppresses epithelial-mesenchymal transition, invasion, and migration of papillary thyroid carcinoma cells via the JAK1-mediated JAK/STAT signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 4054-4067. DOI: 10.1002/jcp.27199.
- [20] 赵雪卉, 刘宗印, 毛红妮. 长链非编码 RNA H19 靶向 miR-141 调控卵巢癌细胞的迁移和侵袭行为[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(9): 1349-1353, 1359. doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2018.09.014.

[收稿日期] 2019-10-30

[修回日期] 2020-04-21

[本文编辑] 黄静怡