·论著·

# lncRNA SNAI3-AS1调节miR-367-3p/SOX4轴对前列腺癌细胞恶性生物学行为的影响

王小虎,李亚灵
(甘肃省武威凉州医院泌尿外科,甘肃 武威 733000)

**摘要 目的** 探讨长链非编码RNA(lncRNA)SNAI3-AS1调节微RNA(miR)-367-3p/高迁移率族盒蛋白4(SOX4)轴对前列腺癌(PC)细胞恶性生物学行为的影响。**方法** 实时PCR检测人PCa细胞系DU145、LNCap、PC-3、正常前列腺上皮细胞系RWPE-1以及PC组织、癌旁组织中SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4* mRNA表达。选取对数生长期的LNCap,设置空白组、阴性对照(vector)组、SNAI3-AS1过表达(vector SNAI3-AS1)组、小干扰RNA(siRNA)阴性对照(si-NC)组、si-SNAI3-AS1组、si-SNAI3-AS1+抑制剂阴性对照(NC inhibitor)组和si-SNAI3-AS1+miR-367-3p inhibitor组。用克隆形成实验、Transwell实验、Hoechst33258染色分别检测细胞克隆形成能力、迁移、侵袭及凋亡;实时PCR检测LNCap中SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4* mRNA表达;Western blotting检测LNCap中SOX4蛋白表达;报告基因实验验证miR-367-3p与SNAI3-AS1、*SOX4*的靶向关系。**结果** SNAI3-AS1、*SOX4* mRNA表达在DU145、LNCap、PC-3及PC组织中显著增加,miR-367-3p表达显著降低($P<0.05$)。与空白组、vector组相比,vector SNAI3-AS1组SNAI3-AS1、*SOX4* mRNA及蛋白表达、克隆数、侵袭与迁移显著增加,miR-367-3p表达、凋亡显著降低($P<0.05$);与空白组、si-NC组相比,si-SNAI3-AS1组SNAI3-AS1、*SOX4* mRNA及蛋白表达、克隆数、侵袭与迁移显著降低,miR-367-3p表达、凋亡显著增加($P<0.05$);与si-SNAI3-AS1+NC inhibitor组相比,si-SNAI3-AS1+miR-367-3p inhibitor组*SOX4* mRNA及蛋白表达、克隆数、侵袭与迁移显著增加,miR-367-3p表达、凋亡显著降低($P<0.05$),SNAI3-AS1表达无统计学差异($P>0.05$)。miR-367-3p与SNAI3-AS1、*SOX4*存在靶向关系。**结论** lncRNA SNAI3-AS1通过上调miR-367-3p/SOX4轴抑制PC细胞恶性生物学行为的发展。

**关键词** lncRNA SNAI3-AS1;miR-367-3p/SOX4轴;前列腺癌细胞;恶性生物学行为
**中图分类号** R737.25 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2024)10-0914-09
**网络出版地址** https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20241009.1601.018
**DOI:**10.12007/j.issn.0258-4646.2024.10.008

## Effects of lncRNA SNAI3-AS1 on the malignant biological behavior of prostate cancer cells by regulating the miR-367-3p/SOX4 axis

WANG Xiaohu, LI Yaling
(Department of Urology, Gansu Wuwei Liangzhou Hospital, Wuwei 733000, China)

**Abstract Objective** To investigate the effect of the long non-coding RNA (lncRNA) SNAI3-AS1 on the malignant biological behavior of prostate cancer (PC) cells by regulating the microRNA (miR)-367-3p/high-mobility group box protein 4 (SOX4) axis. **Methods** Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to detect SNAI3-AS1, miR-367-3p, and *SOX4* mRNA expressions in human PCa cell lines DU145, LNCap, and PC-3, normal prostate epithelial cell line RWPE-1, PC tissue, and adjacent cancer tissues. LNCap in the logarithmic growth phase were collected and assigned to the blank, negative control (vector), SNAI3-AS1 overexpression (vector SNAI3-AS1), small interfering RNA negative control (siRNA) (si-NC), si-SNAI3-AS1 group, si-SNAI3-AS1+inhibitor negative control (NC inhibitor), and si-SNAI3-AS1+miR-367-3p inhibitor groups. Clone formation, transwell, and Hoechst33258 staining were used to detect cell clone formation ability, migration, invasion, and apoptosis, respectively. Real-time PCR was used to detect SNAI3-AS1, miR-367-3p, and *SOX4* mRNA expressions in LNCap. Western blotting was used to detect SOX4 protein expression in LNCap, and double luciferase was used to verify the targeting relationship between miR-367-3p and SNAI3-AS1 and SOX4. **Results** SNAI3-AS1 and *SOX4* mRNA expressions increased in DU145, LNCap, PC-3, and PC tissues, whereas miR-367-3p expression significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the blank and vector groups, the SNAI3-AS1 and *SOX4* mRNA and protein expression, clone number, invasion, and migration in the vector SNAI3-AS1 group increased, whereas miR-367-3p expression and apoptosis decreased ($P<0.05$). Compared with the blank and si-NC groups, the SNAI3-AS1 and *SOX4* mRNA and protein expression, clone number, invasion, and migration in si-SNAI3-AS1 group

**基金项目:**甘肃省科技计划(21JR8RA658)
**作者简介:**王小虎(1972-),男,副主任医师,本科.
**通信作者:**王小虎,E-mail:664195519@qq.com
**收稿日期:**2023-11-23
**网络出版时间:**2024-10-10 14:51:37

decreased, whereas miR-367-3p expression and apoptosis increased ($P < 0.05$). Compared with the si-SNAI3-AS1+NC inhibitor group, the *SOX4* mRNA and protein expression, clone number, invasion, and migration in si-SNAI3-AS1+miR-367-3p inhibitor group increased, whereas miR-367-3p expression and apoptosis decreased ($P < 0.05$); however, SNAI3-AS1 expression had no statistically significant difference ($P > 0.05$). miR-367-3p had a targets SNAI3-AS1 and SOX4. **Conclusion**　SNAI3-AS1 inhibits the development of malignant behavior in PC cells by upregulating the miR-367-3p/SOX4 axis.

**Keywords**　lncRNA SNAI3-AS1; miR-367-3p/SOX4 axis; prostate cancer cell; malignant biological behavior

前列腺癌(prostate cancer, PC)是男性泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,发病率及死亡率均较高[1]。由于PC早期症状的非特异性以及复杂的发病机制,目前缺乏早期的临床诊断和治疗手段[2],因此迫切需要探索新的有效分子靶点。长链非编码RNA(long chain non-coding RNA, lncRNA)是长度超过200个核苷酸且不具有蛋白质编码能力的转录物,因其在调控肿瘤发生和转移方面的潜力而受到广泛关注[3]。lncRNA SNAI3-AS1已被鉴定为位于扩增的16q24基因的lncRNA,被认为是一种癌基因,在肝癌细胞中表达增加[4],但其在PC中的表达尚未见报道。lncRNA可以作为内源性RNA充当微RNA(microRNA, miRNA)海绵,抑制miRNA对其靶基因RNA的降解作用[5]。生物信息学显示,miR-367-3p与SNAI3-AS1、高迁移率族盒蛋白4(high-mobility group box protein 4, SOX4)存在结合位点,且miR-367-3p在PC组织中表达下调,过表达miR-367-3p可抑制PC细胞的增殖、侵袭和转移[6]。SOX4在PC组织和细胞中高表达,其水平下调显著抑制了PC细胞的增殖[7]。本研究探讨SNAI3-AS1在PC进展中可能发挥的作用,旨在为PC治疗提供潜在靶点。

## 1　材料与方法

### 1.1　细胞及组织来源

人PCa细胞系DU145、LNCap、PC-3及正常前列腺上皮细胞系RWPE-1由BeNa培养物保藏中心提供;细胞在含10%胎牛血清DMEM培养基中培养,并在37 ℃,5% $CO_2$培养箱中孵育,每隔3 d更换1次培养基。

35例PC组织和癌旁组织取自我院手术切除的PC患者。所有PC患者由病理检查确诊,且未接受术前放疗或化疗。本研究经我院伦理委员会批准(审批号:2020-140)。PC组织和癌旁组织均保存在-80 ℃的液氮中,用于进一步研究。

### 1.2　主要材料

PrimeScript RT试剂盒购自日本TaKaRa公司,Hoechst33258染色液购自北京索莱宝科技有限公司,SNAI3-AS1小干扰RNA(si-RNAI3-AS1)和阴性对照(si-NC)、SNAI3-AS1过表达质粒(vector SNAI3-AS1)和阴性对照(vector)购自上海吉玛制药技术有限公司,miR-367-3p抑制剂(miR-367-3p inhibitor)、miR-367-3p模拟物(miR-367-3p mimics)及阴性对照(NC inhibitor、NC mimics)购自广州锐博生物技术有限公司,TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,SOX4抗体购自英国abcam公司。

### 1.3　细胞分组及处理

取对数生长期的LNCap进行实验,分为空白组、vector组、vector SNAI3-AS1组、si-NC组、si-SNAI3-AS1组、si-SNAI3-AS1+NC inhibitor组、si-SNAI3-AS1+miR-367-3p inhibitor组。除空白组不做处理外,其余各组均通过Lipofectamine™2000转染试剂将上述质粒转染或共转染至细胞中,48 h后通过实时PCR检测转染效率。

### 1.4　实时PCR检测细胞及组织中SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4* mRNA表达水平

采用TRIzol试剂从细胞和组织样品中分离总RNA,随后通过PrimeScript RT试剂盒逆转录成第一链cDNA,根据SYBR Premix EX Tap试剂盒进行实时PCR反应。引物序列见表1。PCR反应条件:95 ℃预变性30 s,95 ℃变性5 s,60 ℃退火30 s,共40个循环。以*β-actin*、*U6*为参照,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4* mRNA相对表达量。

### 1.5　克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

将转染后的细胞接种到6孔板中,用含有10%胎牛血清的培养基中,在37 ℃、5% $CO_2$培养箱中培养14 d,每2~3 d更新一次培养基,随后用4%多聚甲醛固定细胞,0.1%结晶紫染色,洗去多余染色液,在倒置显微镜下计数染色的细胞克隆。

### 1.6　Transwell实验检测细胞迁移和侵袭

在Transwell下室中加入含10% 胎牛血清的培养基作为化学引诱剂，在上室中加入不含胎牛血清的细胞悬浮液。孵育24 h后，从上室中取出未能迁移或侵入的细胞，迁移或侵入的细胞用4%多聚甲醛固定10 min，然后用0.5%结晶紫染色。在随机视野中于倒置显微镜下计数细胞。

表1　实时PCR引物序列

Tab.1　Sequence of real-time PCR primers

| Primer name | Direction | Primer sequence (5'－3') |
|---|---|---|
| SNAI3-AS1 | Forward | GCGTTATGTCGTTTGGTTGATG |
| | Reversed | TGGCAGGAATGAGGTGAGC |
| miR-367-3p | Forward | TTCTCCGAACTTTGCACGTTT |
| | Reversed | ACGTGACACGTTCGGAGAATT |
| *SOX4* | Forward | GGCCTCGAGCTGGGAATCGC |
| | Reversed | GGCCTCGAGCTGGGAATCGC |
| *β-actin* | Forward | CACCATTGGCAATGAGCGGTTC |
| | Reversed | AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT |
| *U6* | Forward | CACTGTTCCACCCCTCAGAGC |
| | Reversed | GCCACTTGTCGGCGATAAGG |

1.7　Hoechst33258染色检测细胞凋亡

收集1.6中细胞，经醋酸乙醇固定后，加入Hoechst33258染色液染色，随后清洗细胞，加入抗荧光猝灭剂进行封片处理，随机选取视野于荧光显微镜下观察细胞凋亡变化。

1.8　miR-367-3p与SNAI3-AS1、*SOX4*的靶向关系验证

PCR扩增含有miR-367-3p预测结合位点的SNAI3-AS1和*SOX4*片段，随后将扩增的SNAI3-AS1、SOX4克隆至双荧光素酶表达载体以构建野生型SNAI3-AS1、*SOX4*（SNAI3-AS1-WT、*SOX4*-WT），突变型SNAI3-AS1、*SOX4*（SNAI3-AS1-MUT、*SOX4*-MUT）通过相同的方法构建。随后将WT和MUT质粒与miR-367-3p模拟物、阴性对照一起共转染入LNCap，转染48 h后，裂解细胞，并使用双荧光素酶测定系统评估相对荧光素酶活性。

1.9　Western blotting检测SOX4蛋白表达水平

用含有放射免疫沉淀法裂解缓冲液溶解细胞，高速离心后，收集上清液，在100 ℃水浴中加热10 min使蛋白质变性。然后通过电泳分离蛋白质样品，并转移到PVDF膜上。用5%脱脂牛奶封闭，然后将膜分别与抗SOX4抗体共同孵育。用TBST洗涤膜3次，然后与二抗在室温下孵育。将化学增强发光试剂加入膜中，使用成像系统检测信号，ImageJ软件用于蛋白质定量。

1.10　统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行统计分析，数据以$\bar{x} \pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，进一步行SNK-$q$检验，2组比较采用$t$检验。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

## 2　结果

2.1　细胞及组织中SNAI3-AS1、miR-367-3p和*SOX4* mRNA表达水平

与RWPE-1相比，DU145、LNCap、PC-3中SNAI3-AS1、*SOX4* mRNA表达显著增加，miR-367-3p表达显著降低（$P < 0.05$），见表2。鉴于LNCaP中以上3个基因的表达差异较RWPE-1最大，故选择其作为后续的研究对象。与癌旁组织相比，PC组织中SNAI3-AS1、*SOX4* mRNA表达显著增加，但miR-367-3p表达显著降低（$P < 0.05$）。见表3。

2.2　过表达SNAI3-AS1对LNCap中SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4*表达及生物学行为的影响

与空白组和vector组相比，vector SNAI3-AS1组SNAI3-AS1、*SOX4* mRNA及蛋白表达、克隆数、侵袭与迁移显著增加，miR-367-3p表达、凋亡显著降低（$P < 0.05$），见图1、2，表4。

2.3　干扰SNAI3-AS1对LNCap SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4*表达及生物学行为的影响

表2　各组细胞中SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4* mRNA的表达（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab.2　Comparison of mRNA expression of SNAI3-AS1，miR-367-3p，and *SOX4* in cells of each group（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

| Cell | SNAI3-AS1 | miR-367-3p | *SOX4* mRNA |
|---|---|---|---|
| RWPE-1 | 0.97 ± 0.10 | 0.96 ± 0.10 | 0.93 ± 0.10 |
| PC-3 | 1.42 ± 0.16[1)] | 0.62 ± 0.08[1)] | 1.38 ± 0.15[1)] |
| DU145 | 1.48 ± 0.16[1)] | 0.59 ± 0.07[1)] | 1.44 ± 0.16[1)] |
| LNCap | 2.01 ± 0.23[1)] | 0.42 ± 0.05[1)] | 1.94 ± 0.21[1)] |

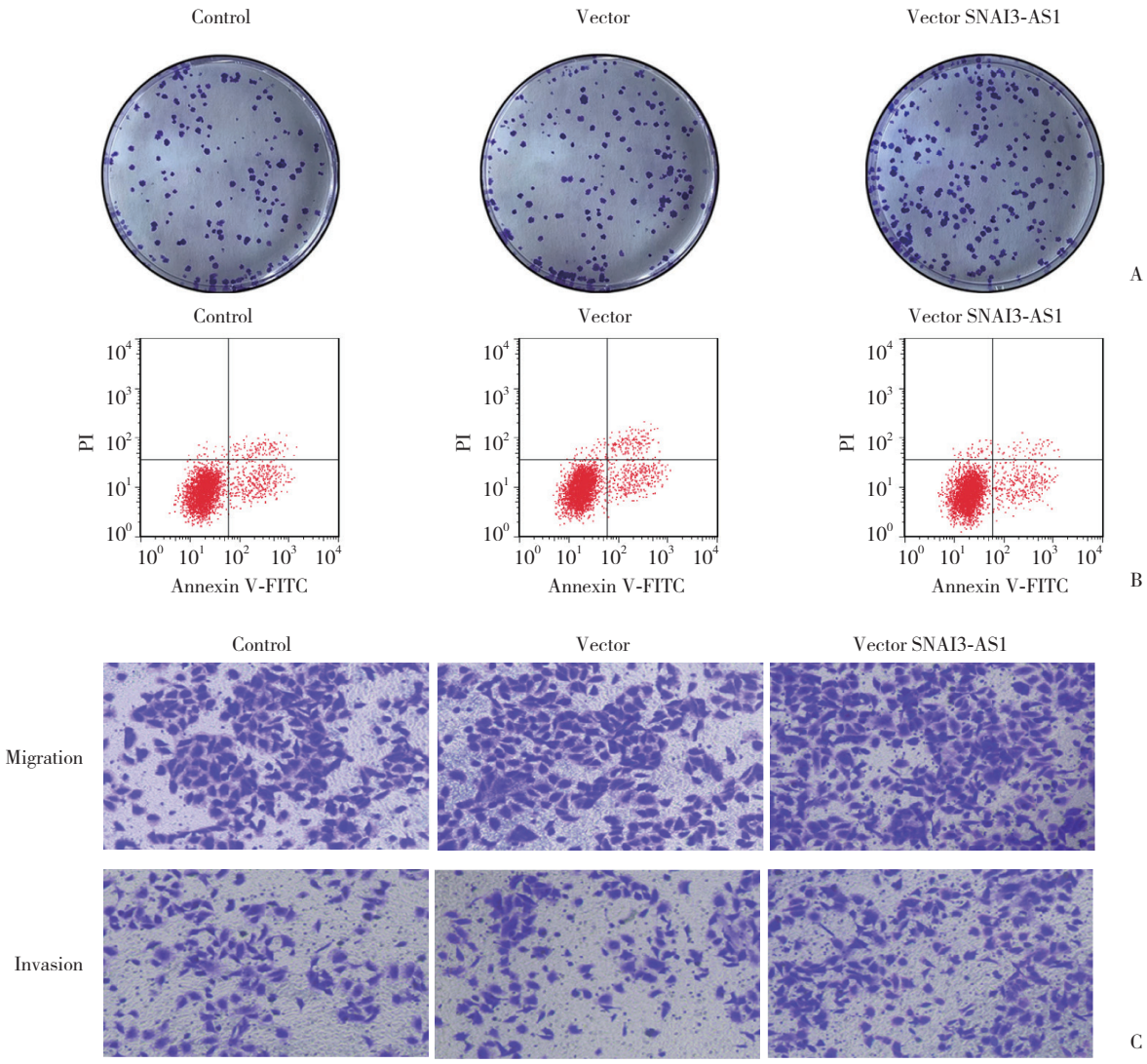
1）$P<0.05$ vs. RWPE-1.

表3　比较组织中SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4* mRNA表达（$\bar{x}\pm s$，$n=35$）

Tab.3　Comparison of mRNA expression of SNAI3-AS1，miR-367-3p，and *SOX4* in tissues（$\bar{x}\pm s$，$n=35$）

| Group | SNAI3-AS1 | miR-367-3p | *SOX4* mRNA |
|---|---|---|---|
| Paracancer tissue | 0.94 ± 0.10 | 0.93 ± 0.10 | 0.97 ± 0.10 |
| PC tissue | 1.96 ± 0.21[1)] | 0.43 ± 0.06[1)] | 2.07 ± 0.22[1)] |

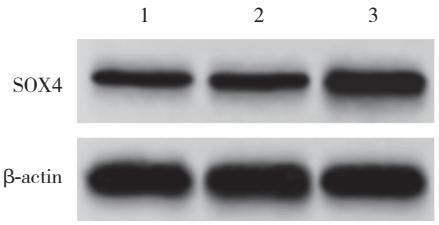
1）$P<0.05$ vs. paracancer tissue.




A，clonal；B，apoptosis；C，migration and invasion（×200）.

图1　LNCap克隆能力、凋亡、侵袭与迁移变化

Fig.1　Changes of clonal ability，apoptosis，invasion，and migration of LNCap




1, control group; 2, vector group; 3, vector SNAI3-A group.

图2　细胞中SOX4蛋白表达

Fig.2　Expression of SOX4 protein in cells

与空白组和si-NC组相比，si-SNAI3-AS1组SNAI3-AS1、*SOX4* mRNA及蛋白表达、克隆数、侵袭与迁移显著降低，miR-367-3p表达、凋亡显著增加（$P<0.05$），见图3、4，表5。

2.4　miR-367-3p与SNAI3-AS1、*SOX4*的靶向关系验证

如图5、6所示，miR-367-3p与SNAI3-AS1、*SOX4*存在结合位点。

miR-367-3p mimics+SNAI3-AS1-WT组荧光素酶活性（0.42 ± 0.06）较mimics NC+SNAI3-AS1-WT组（1.03 ± 0.11）显著降低（$P<0.05$），mimics NC+SNAI3-AS1-MUT组（1.06 ± 0.11）与miR-367-3p mimics+SNAI3-AS1-MUT组（1.04 ± 0.11）荧光素酶活性比较无统计学差异（$P>0.05$）。

表4　过表达SNAI3-AS1诱导的LNCap中SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4*表达及克隆能力、凋亡、侵袭与迁移变化的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab.4　Comparison of the changes in SNAI3-AS1, miR-367-3p, *SOX4* expression and the cloning ability, apoptosis, invasion and migration of LNCap induced by overexpression of SNAI3-AS1 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

| Item | Control | Vector | Vector SNAI3-AS1 |
|---|---|---|---|
| SNAI3-AS1 | 0.92 ± 0.10 | 1.02 ± 0.11 | 1.64 ± 0.18[1),2)] |
| miR-367-3p | 0.95 ± 0.10 | 1.06 ± 0.11 | 0.42 ± 0.06[1),2)] |
| *SOX4* mRNA | 0.98 ± 0.10 | 1.05 ± 0.11 | 1.65 ± 0.18[1),2)] |
| SOX4/β-actin | 0.46 ± 0.06 | 0.51 ± 0.07 | 0.88 ± 0.10[1),2)] |
| Clone number | 125.34 ± 15.34 | 126.11 ± 15.76 | 186.52 ± 20.01[1),2)] |
| Apoptosis rate (%) | 8.63 ± 0.89 | 8.55 ± 0.88 | 4.22 ± 0.45[1),2)] |
| Migration number | 211.03 ± 23.52 | 223.13 ± 24.31 | 300.51 ± 32.05[1),2)] |
| Invasion number | 141.55 ± 15.44 | 142.31 ± 15.67 | 216.34 ± 22.37[1),2)] |

1) $P<0.05$ vs. control group; 2) $P<0.05$ vs.vector group.

miR-367-3p mimics+*SOX4*-WT组荧光素酶活性（0.48 ± 0.06）较mimics NC+*SOX4*-WT组（1.08 ± 0.11）显著降低（$P<0.05$），mimics NC+*SOX4*-MUT组（1.04 ± 0.11）与miR-367-3p mimics+*SOX4*-MUT组（1.04 ± 0.11）荧光素酶活性差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.5　抑制miR-367-3p逆转干扰SNAI3-AS1对LNCap SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4*表达及生物学行为的影响

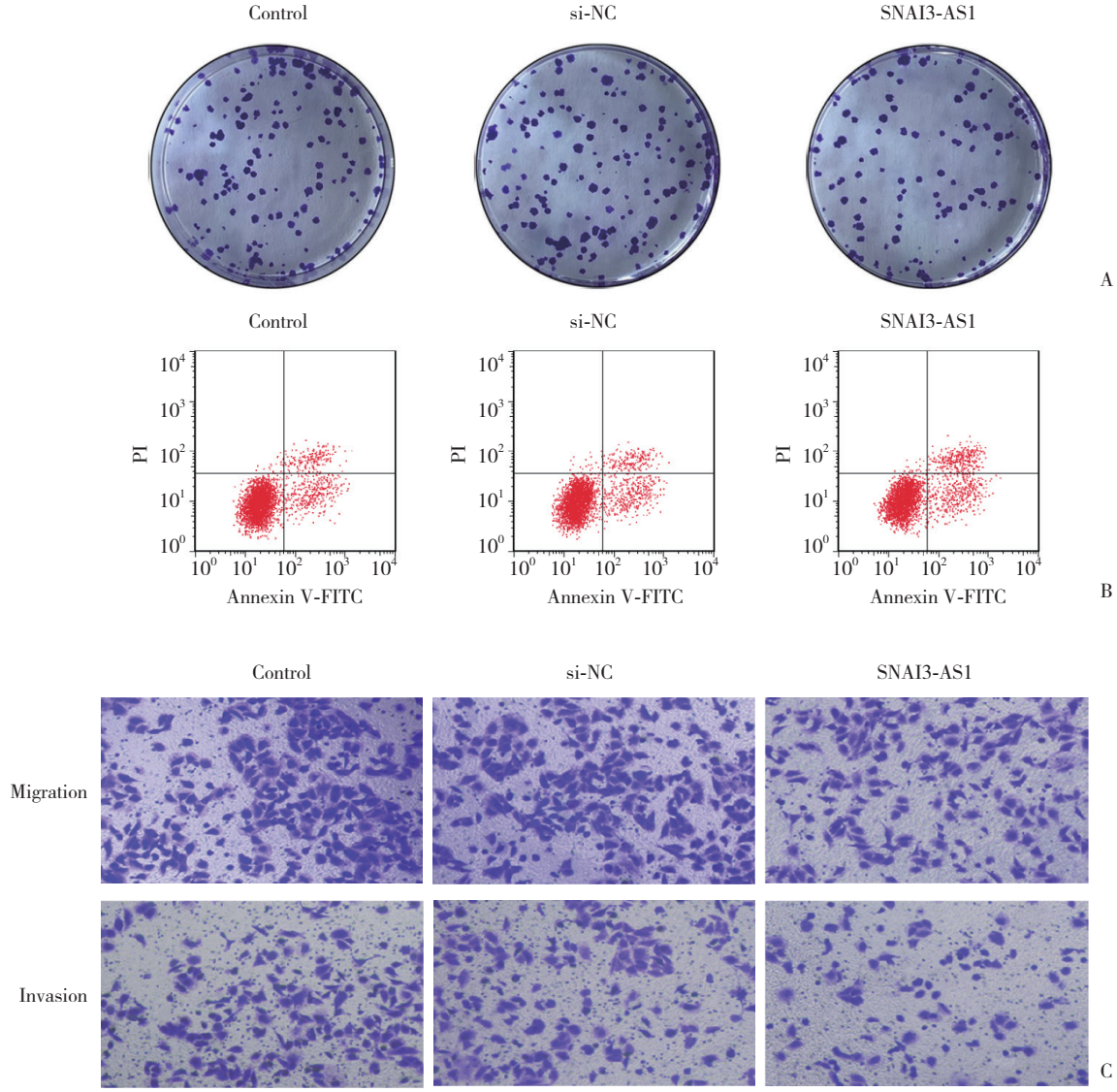
与si-SNAI3-AS1+NC inhibitor组相比，si-SNAI3-AS1+miR-367-3p inhibitor组*SOX4* mRNA及蛋白表达、克隆数、侵袭与迁移显著增加，miR-367-3p表达、凋亡显著降低（$P<0.05$），SNAI3-AS1表达无统计学差异（$P>0.05$）。见图7、表6、图8。

## 3　讨论

PC是男性泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤之一，由于早期PC缺乏特异性症状，确诊时往往已经发展到中晚期，错过了最佳治疗时间[8]。因此，迫切需要寻找PC新的生物标志物以制定相应的治疗方案，延长患者的生存时间，提高患者的生活质量。

lncRNA是>200个核苷酸的RNA转录物，虽然不能编码蛋白质，但在转录后可调节基因表达[9]。研究[10]发现lncRNA在人类多种疾病中异常表达。失调的lncRNA可导致PC进展，如lncRNA CCAT1表达在PC组织中异常上调，lncRNA BLACAT1的抑制可阻止癌细胞增殖、迁移、侵袭，促进细胞凋亡[11]。SNAI3-AS1位于Xp11.23，是新发现的一种lncRNA，研究[12]证明SNAI3-AS1在肝细胞癌中高表达，并与肝细胞癌患者肿瘤大小和TNM分期显著相关，可能作为癌基因发挥作用。本研究发现SNAI3-AS1在DU145、LNCap、PC-3及PC组织中显著上调，提示SNAI3-AS1异常表达可能与PC的发生发展有关。上

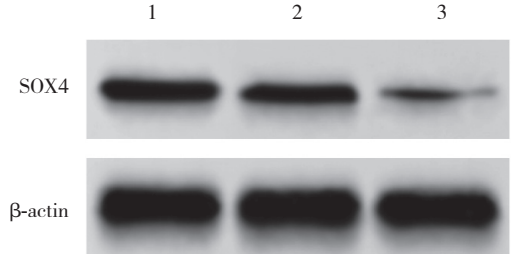
调SNAI3-AS1表达能够显著促进LNCap克隆数、侵袭与迁移，其凋亡显著被抑制；干扰SNAI3-AS1表达能够显著抑制LNCap克隆数、侵袭与迁移，促进LNCap凋亡，提示SNAI3-AS1在PC中作为癌基因发挥抑制肿瘤增殖、侵袭与迁移，促进其凋亡的作用。




A，clonal；B，apoptosis；C，migration and invasion（×200）.

图3　LNCap克隆能力、凋亡、侵袭与迁移的变化

Fig.3　Changes of clonal ability，apoptosis，invasion，and migration of LNCap




1，control group；2，si-NC group；3，si-SNAI3-A group.

图4　LNCap中SOX4蛋白表达

Fig.4　Expression of SOX4 protein in LNCap

miRNA是一种长度约为22个核苷酸的非编码RNA，其异常表达与包括PC在内的肿瘤的发生和发展密切相关[13]。miR-367-3p是许多miRNA家族的成员之一，但miR-367-3p与PC的关系鲜有报道。先前过表达的miR-367-3p通过下调SPAG5介导的Wnt/β–连环蛋白信号抑制宫颈癌细胞的侵袭和增殖[14]。miR-367-3p在PC细胞及组织中显著下调，提示miR-367-3p异常表达可能参与PC的发生。

表5　干扰SNAI3-AS1诱导的LNCap中SNAI3-AS1、miR-367-3p、*SOX4*表达及克隆能力、凋亡、侵袭与迁移变化的比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Tab.5　Comparison of the changes in the cloning ability，apoptosis，invasion，and migration of LNCap and SNAI3-AS1，miR-367-3p，*SOX4* expression induced by knockdown of SNAI3-AS1（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

| Item | Control | si-NC | si-SNAI3-AS1 |
|---|---|---|---|
| SNAI3-AS1 | 0.93 ± 0.11 | 1.05 ± 0.11 | 0.44 ± 0.06[1),2)] |
| miR-367-3p | 0.96 ± 0.10 | 1.03 ± 0.11 | 1.88 ± 0.20[1),2)] |
| *SOX4* mRNA | 0.91 ± 0.09 | 0.99 ± 0.10 | 0.41 ± 0.06[1),2)] |
| SOX4/β-actin | 0.49 ± 0.06 | 0.46 ± 0.06 | 0.13 ± 0.02[1),2)] |
| Clone number | 126.08 ± 15.46 | 126.24 ± 15.68 | 84.55 ± 10.21[1),2)] |
| Apoptosis rate (%) | 8.77 ± 0.89 | 8.62 ± 0.89 | 15.34 ± 1.66[1),2)] |
| Migration number | 219.11 ± 22.95 | 213.66 ± 22.78 | 143.52 ± 15.11[1),2)] |
| Invasion number | 141.77 ± 15.52 | 141.53 ± 15.42 | 82.24 ± 9.02[1),2)] |

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. si-NC group.

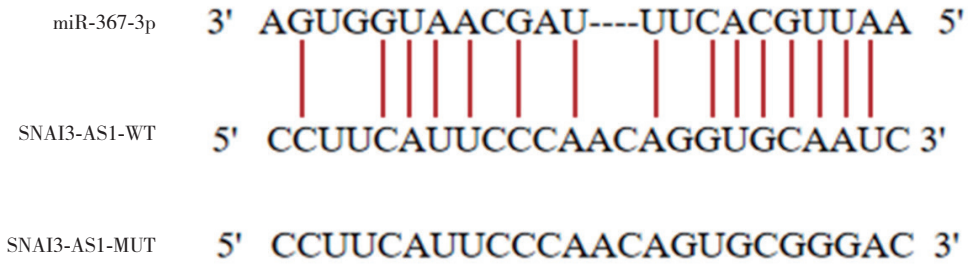



图5　miR-367-3p与SNAI3-AS1的预测结合位点

Fig.5　Predicted binding sites of miR-367-3p and SNAI3-AS1

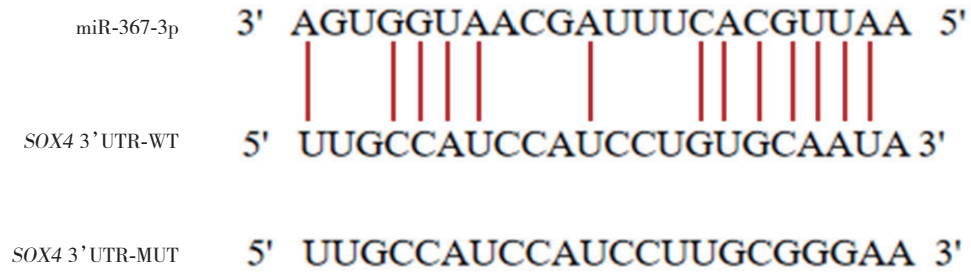
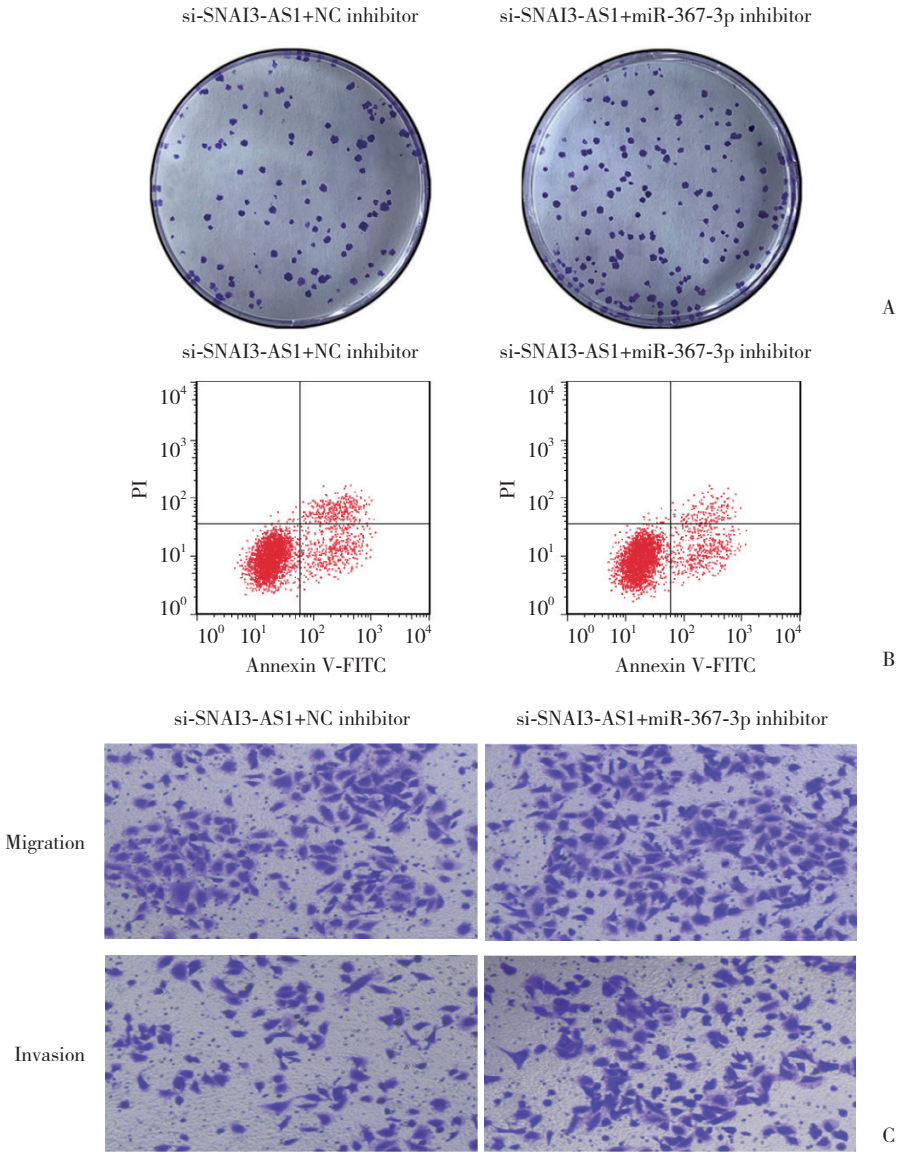



图6　miR-367-3p与*SOX4*的预测结合位点

Fig.6　Predicted binding sites of miR-367-3p and *SOX4*

lncRNA可以作为内源竞争RNA发挥miRNA海绵的作用，抑制miRNA对其靶基因RNA的降解作用[15]。如lncRNA SNHG14通过靶向miR-5590-3p调节YY1表达，从而促进PC肿瘤的发生[16]。敲除lncRNA LOXL1-AS1可以通过miR-541-3p/CCND1轴抑制PC的发生和发展[17]。生物信息学分析结果显示，SNAI3-AS1与miR-367-3p之间存在结合位点，且双荧光素酶报告基因实验及实时PCR检测SNAI3-AS1直接与miR-367-3p结合，充当PC细胞中SNAI3-AS1的海绵，靶向负调节miR-367-3p的表达。SOX4是一种重要转录因子，在人类多种恶性肿瘤中过度表达并与不良临床结局相关[18]。多项研究[19-20]表明，SOX4在调节肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭中发挥关键作用。本研究通过双荧光素酶实验及实时PCR检测miR-367-3p可以直接与SOX4的3' 非翻译区相互作用，并抑制SOX4在PC细胞中的表达，提示SNAI3-AS1在PC中的抗肿瘤作用是通过上调miR-367-3p/SOX4轴实现的。




A, clonal; B, apoptosis; C, migration and invasion ( × 200).

图7　LNCap克隆能力、凋亡、侵袭与迁移变化

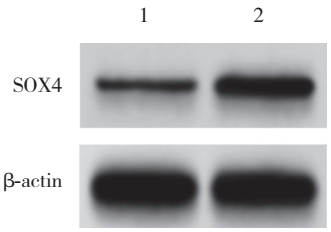
Fig.7　Changes of clonal ability, apoptosis, invasion, and migration of LNCap

表6　抑制miR-367-3p逆转干扰SNAI3-AS1对LNCap基因表达及恶性行为变化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab.6　Inhibition of miR-367-3p reversed the effect of SNAI3-AS1 on LNCap gene expression and malignant behavioral changes ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

| Group | si-SNAI3-AS1+NC inhibitor | si-SNAI3-AS1+miR-367-3p inhibitor |
|---|---|---|
| SNAI3-AS1 | 0.46 ± 0.06 | 0.45 ± 0.06 |
| miR-367-3p | 1.82 ± 0.20 | 1.24 ± 0.13[1)] |
| *SOX4* mRNA | 0.44 ± 0.06 | 0.99 ± 0.10[1)] |
| SOX4/β-actin | 0.15 ± 0.02 | 0.42 ± 0.06[1)] |
| Clone number | 84.88 ± 10.19 | 119.97 ± 12.35[1)] |
| Apoptosis rate (%) | 15.28 ± 1.59 | 10.42 ± 1.11[1)] |
| Migration number | 142.94 ± 14.89 | 200.84 ± 20.96[1)] |
| Invasion number | 82.62 ± 8.89 | 131.77 ± 14.06[1)] |

1) $P < 0.05$ vs. si-SNAI3-AS1+NC inhibitor group.




1,si-SNAI3-AS1+NC inhibitor group;2,si-SNAI3-AS1+miR-367-3p inhibitor group.

图8　LNCap中SOX4蛋白表达

Fig.8　Expression of SOX4 protein in LNCap

为进一步验证实验结论,实验以miR-367-3p抑制剂进行回复验证,结果发现miR-367-3p抑制剂逆转了干扰SNAI3-AS1对LNCap恶性行为的抑制作用,表明干扰SNAI3-AS1可以抑制LNCap克隆、侵袭及迁移,并促进其凋亡,其具体机制可能与上调miR-367-3p/SOX4轴有关。

综上所述,干扰SNAI3-AS1可以通过上调miR-367-3p/SOX4轴抑制LNCap克隆、侵袭及迁移,促进其凋亡,为PC治疗提供潜在生物标志物和治疗靶点,但由于具体机制较为复杂,需要开展相关实验进一步研究探讨。

**参考文献:**

[1] ZHAO WH,ZHU XS,JIN Q,et al. The lncRNAlncRNA NEAT1/miRNA-766-5p/E2F3 regulatory axis promotes prostate cancer progression[J]. J Oncol,2022,2022:1866972. DOI:10.1155/2022/1866972.

[2] PAN JQ,XU XY,WANG GL. lncRNAlncRNA ZFAS1 is involved in the proliferation,invasion and metastasis of prostate cancer cells through competitively binding to miR-135a-5p[J]. Cancer Manag Res,2020,12:1135-1149. DOI:10.2147/CMAR.S237439.

[3] XIAO SW,SONG B. LncRNAlncRNA HOXA-AS2 promotes the progression of prostate cancer via targeting miR-509-3p/PBX3 axis[J]. Biosci Rep,2020,40(8):BSR20193287. DOI:10.1042/BSR20193287.

[4] LI YR,GUO D,LU GF,et al. LncRNA SNAI3lncRNA SNAI3-AS1 promotes PEG10-mediated proliferation and metastasis via decoying of miR-27a-3p and miR-34a-5p in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death Dis,2020,11(8):685. DOI:10.1038/s41419-020-02840-z.

[5] FENG T,SONG CY,WU ZY,et al. Role of lncRNAlncRNA MIAT/miR-361-3p/CCAR2 in prostate cancer cells[J]. Open Med,2022,17(1):1528-1537. DOI:10.1515/med-2021-0380.

[6] DU W,LI D,XIE JH,et al. MiR-367-3p downregulates Rab23 expression and inhibits Hedgehog signaling resulting in the inhibition of the proliferation,migration,and invasion of prostate cancer cells[J]. Oncol Rep,2021,46(3):192. DOI:10.3892/or.2021.8143.

[7] XU GC,MENG Y,WANG LH,et al. miRNA-214-5p inhibits prostate cancer cell proliferation by targeting SOX4[J]. World J Surg Oncol,2021,19(1):338. DOI:10.1186/s12957-021-02449-2.

[8] LI RB,CHEN YC,WU JW,et al. LncRNAlncRNA FGF14-AS2 represses growth of prostate carcinoma cells via modulating miR-96-5p/AJAP1 axis[J]. J Clin Lab Anal,2021,35(11):e24012. DOI:10.1002/jcla.24012.

[9] CHI YJ,WANG D,WANG JP,et al. Long non-coding RNA in the pathogenesis of cancers[J]. Cells,2019,8(9):1015. DOI:10.3390/cells8091015.

[10] HUA JT,CHEN SJ,HE HH. Landscape of noncoding RNA in prostate cancer[J]. Trends Genet,2019,35(11):840-851. DOI:10.1016/j.tig.2019.08.004.

[11] CAI XW,DAI YH,GAO P,et al. LncRNAlncRNA CCAT1 promotes prostate cancer cells proliferation,migration,and invasion through regulation of miR-490-3p/FRAT1 axis[J]. Aging,2021,13(14):18527-18544. DOI:10.18632/aging.203300.

[12] LI YR,GUO D,REN MD,et al. Long non-coding RNA SNAI3-AS1 promotes the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating the UPF1/Smad7 signalling pathway[J]. J Cell Mol Med,2019,23(9):6271-6282. DOI:10.1111/jcmm.14513.

[13] WU XC,XIAO Y,ZHOU Y,et al. LncRNAlncRNA FOXP4-AS1 is activated by PAX5 and promotes the growth of prostate cancer by sequestering miR-3184-5p to upregulate FOXP4[J]. Cell Death Dis,2019,10(7):472. DOI:10.1038/s41419-019-1699-6.

[14] YANG T,TIAN SJ,WANG LL,et al. MicroRNA-367-3p overexpression represses the proliferation and invasion of cervical cancer cells through downregulation of SPAG5-mediated Wnt/β-catenin signaling[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol,2020,47(4):687-695. DOI:10.1111/1440-1681.13222.

[15] YOU PH,TANG LY,ZHU YJ,et al. Brevilin A shows an anti-tumor role in prostate cancer via lncRNA H19/miR-194/E2F3 signaling pathway[J]. Aging,2023,15(10):4411-4428. DOI:10.18632/aging.204744.

[16] LUO ZF,PENG Y,LIU FH,et al. Long noncoding RNA SNHG14 promotes malignancy of prostate cancer by regulating with miR-5590-3p/YY1 axis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2020,24(9):4697-4709. DOI:10.26355/eurrev_202005_21158.

[17] LONG B,LI N,XU XX,et al. Long noncoding RNA LOXL1-AS1 regulates prostate cancer cell proliferation and cell cycle progression through miR-541-3p and CCND1[J]. Biochem Biophys Res Commun,2018,505(2):561-568. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.09.160.

[18] LIU H,WU Z,ZHOU HB,et al. The SOX4/miR-17-92/RB1 axis promotes prostate cancer progression[J]. Neoplasia,2019,21(8):765-776. DOI:10.1016/j.neo.2019.05.007.

[19] QI M,HU J,CUI YY,et al. CUL4B promotes prostate cancer progression by forming positive feedback loop with SOX4[J]. Oncogenesis,2019,8(3):23. DOI:10.1038/s41389-019-0131-5.

[20] PHAN NN,MORENO CS,LAI YH. Overexpression of SOX4 induces up-regulation of miR-126 and miR-195 in LNCaP prostate cancer cell line[J]. Cytotechnology,2020,72(4):527-537. DOI:10.1007/s10616-020-00399-3.

(编辑　于　溪)