

LncRNA LINC00342 通过靶向 miR-596 促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭

辛宝山, 刘刚, 张成雄, 汪兵, 史良会

皖南医学院第一附属医院弋矶山医院胃肠外科, 安徽 芜湖 241001

摘要:目的 研究 LINC00342 在胃癌组织、细胞中的表达水平及影响胃癌细胞生物学功能的具体通路。方法 运用生物信息技术, 通过 GEO 数据库及相关预测软件, 进行相关筛选及文献查询后, 确定所研究的 LncRNA 及其下游所调控的 miRNA; 采用 qRT-PCR 检测 LINC00342、miR-596 在胃癌细胞系及人胃黏膜细胞中、胃癌组织及相应癌旁组织中的表达差异; 细胞生物学功能上, 过表达胃癌 BGC-823 细胞系中的 LINC00342, 将其分为 pcDNA-LINC00342 组和 pcDNA 组; 过表达胃癌 MGC-803 细胞系中的 miR-596, 将其分为 miR-596-mimic 组及 mimic-NC 组; 敲低胃癌 MGC-803 细胞系中 LINC00342 的表达, 将其分为 si-LINC00342 组及 si-NC 组; 敲低胃癌 BGC-823 细胞系中 miR-596 的表达, 将其分为 miR-596-inhibitor 组及 inhibitor-NC 组; 分别进行 CCK-8、Edu 细胞增殖实验、划痕实验、Transwell 细胞侵袭实验、细胞周期实验以验证 LINC00342 及 miR-596 对胃癌细胞功能的影响; 双荧光素酶标记实验验证 LINC00342 与 miR-596 的靶向调控关系。结果 通过生物信息学技术及相关软件预测分析, 确定所研究 LncRNA 为 LINC00342, 预测其下游调控的 miRNA 为 miR-596; LINC00342 在胃癌组织中表达高于癌旁组织 ($P < 0.05$); 在人胃癌细胞系中表达高于人胃黏膜细胞系 ($P < 0.05$), miR-596 则相反 ($P < 0.05$); 在胃癌细胞中, LINC00342 的过表达能促进胃癌细胞的增殖 ($P < 0.05$)、迁移 ($P < 0.01$) 和侵袭 ($P < 0.001$), 且减少处于 G0/G1 期的细胞比率 ($P < 0.01$); LINC00342 敲低后, 胃癌细胞的增殖 ($P < 0.05$)、迁移 ($P < 0.01$) 和侵袭 ($P < 0.001$) 则受抑制, 增加处于 G0/G1 期的细胞比率 ($P < 0.01$); miR-596 则发挥着相反的作用。LINC00342 和 miR-596 能特异性结合 ($P = 0.0067$)。结论 在胃癌细胞中, LINC00342 通过调控 miR-596, 促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词: 生物信息技术; MGC-803 和 BGC-823 细胞系; 长链非编码核糖核酸; LINC00342; miR-596

LncRNA LINC00342 regulates gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting miR-596

XIN Baoshan, LIU Gang, ZHANG Chengxiong, WANG Bing, SHI Lianghui

Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

Abstract: Objective To investigate the expression levels of LINC00342 in gastric cancer (GC) tissues and cells and the pathways mediating its effects on biological behaviors of GC cells. **Methods** Bioinformatic analysis was performed to identify the lncRNAs and their downstream miRNAs involved in regulation of biological behaviors of GC cells. qRT-PCR was used to analyze the differential expression of LINC00342 and miR-596 in GC cell lines, human gastric mucosal cells, and GC and adjacent tissues. In human GC MGC-803 and MGC-823 cells, the effects of LINC00342 overexpression, miR-596 overexpression, LINC00342 knockdown, or miR-596 knockdown on cell proliferation, migration, invasion and cell cycle changes were examined using Edu assay, CCK-8 assay, wound healing assay, Transwell assay, and flow cytometry. The regulatory interaction between LINC00342 and miR-596 was investigated using a dual-luciferase reporter assay. **Results** Informatic analysis identified LINC00342 as the candidate lncRNA regulating biological behaviors of GC cells, with miR-596 as its downstream miRNA. LINC00342 expression levels were significantly higher while miR-596 expression levels were lower in GC tissues and cell lines than in the paired adjacent tissues and human gastric mucosal cell lines (all $P < 0.05$). In MGC-803 and MGC-823 cells, overexpression of LINC00342 significantly enhanced cell proliferation ($P < 0.05$), migration ($P < 0.01$), and invasion ($P < 0.001$) and reduced the percentage of G0/G1 phase cells ($P < 0.01$), while knocking down LINC00342 significantly suppressed cell proliferation ($P < 0.05$), migration ($P < 0.01$), and invasion ($P < 0.001$) and increased G0/G1 phase cell percentage ($P < 0.01$). Modulation of miR-596 expression levels produced the opposite effects. Dual-luciferase reporter assay confirmed the specific binding between LINC00342 and miR-596 ($P = 0.0067$). **Conclusion** In GC cells, LINC00342 regulates cell proliferation, migration, and invasion by targeting miR-596.

Keywords: bioinformatics; MGC-803 and BGC-823 cell lines; long-stranded non-coding ribonucleic acid; LINC00342; miR-596

胃癌是五大常见恶性肿瘤之一, 全世界发病率高达

5.7%, 死亡率约为 8.2%^[1-3], 我国胃癌发病率、死亡率分别位于全国恶性肿瘤的第 2 位、第 3 位^[4]。生物信息学分析主要应用于寻找各大基因数据库中与某种疾病的发生发展相关的基因, 或通过表达、生存分析等手段验证这些基因的价值。由美国国立生物技术信息中心 NCBI 创建并维护的基因表达数据库 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 收录

收稿日期: 2023-02-01

基金项目: 2022 安徽省教育厅自然科学基金重点项目 (2022AH051241); 2021 安徽省卫生健康委科研项目 (AHWJ2021b109); 皖南医学院中青年科研基金 (WK2021F07)

作者简介: 辛宝山, 硕士, E-mail: 1939748972@qq.com

通信作者: 史良会, 博士, 教授, 主任医师, E-mail: shilianghui@163.com

了各大研究机构提交的高通量基因表达的数据,包括基因表达数据,微阵列和芯片^[5]。LncRNA及miRNA在遗传调控、细胞周期、细胞分化以及凋亡调控等众多生命活动中发挥重要作用^[6,7]。相关研究更表明,LncRNA能用于肿瘤的诊断^[8],其与常规的肿瘤标志物联合,可提高胃癌诊断的准确度^[9]。LncRNA在对肿瘤病人化疗方案的选择^[10,11]及提高肿瘤患者的预后也极为重要^[12-14]。

LINC00342是一种新发现的LncRNA,既往研究表明,LINC00342在多种肿瘤的发展中发挥着重要作用。报道称,相较于正常结肠组织,结肠癌组织中LINC00342表达较高,过表达LINC00342具有促进细胞增殖、迁移和侵袭,抑制细胞凋亡的作用^[15]。也有研究发现,LINC00342在大肠癌中高表达,LINC00342的下调抑制了CRC细胞的增殖和转移,敲低LINC00342抑制体内肿瘤生长^[16]。另一项研究则发现,过表达LINC00342可加速血管瘤源性内皮细胞的增殖,减少细胞凋亡^[17]。另有报道称,LINC00342在非小细胞肺癌中发挥致癌基因的作用^[18,19]。然而,对于LINC00342在GC中的潜在功能研究很少,仅有1项研究发现LncRNA LINC00342可通过靶向miR-545-5p/CNPy2轴促进胃癌进展^[20];此外,通过在Kaplan-Meier Plotter数据库中进行查找,我们发现胃癌组织中LINC00342高表达的患者较低表达者生存率低。因此,研究LINC00342在胃癌中是否同样发挥着致癌基因的作用具有重要意义。报道称miR-596通过抑制MAPK信号通路影响口腔癌细胞的增殖^[21],而其在胃癌中的功能和作用尚缺乏研究。本研究旨在利用生物信息学技术及相关细胞功能学实验,研究LINC00342在胃癌组织、细胞中的表达水平及影响胃癌细胞生物学功能的具体通路,为LINC00342将来是否能作为胃癌筛查、预防、治疗中新的靶点提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

胃癌组织和相应癌旁组织(距离肿瘤组织>5 cm)均为本课题组收集来自皖南医学院第一附属医院弋矶山医院胃肠外科进行手术治疗后切除下来的标本,标本离体后,立即将其放入已加有RNA保护液的冻存管中,并快速存放于实验室-80℃冰箱中,直至提取RNA。标本选择严格遵守纳入、排除标准。纳入标准:患者临床资料、病理资料完整,术后病理证实为胃癌;患者知情同意本研究,能按期完成随访。排除标准:除胃癌外,曾合并其他部位恶性肿瘤的患者;存在自身免疫系统疾病、精神类疾病、妊娠、哺乳等可能影响本研究结果的患者。人胃黏膜细胞(GES-1)及5种人胃癌细胞系(AGS、

MGC-803、BGC-823、SGC-7901、HGC-27)均购自中国科学院上海生命科学院。LINC00342引物由生工合成,引物序列F:5'-CGTTCCAATGTGTTGGGT-3';R:5'-TGGGAGGAGGTTGAGATG-3';小干扰RNA Si-LINC00342、LINC00342过表达质粒pcDNA-LINC00342及其阴性对照由GenePharma合成;miR-596引物、模拟物、抑制物及其阴性对照由RIBOBIO(中国广州);GAPDH购自Biorworld公司。其余常规设备及试剂均由皖南医学院第一附属医院弋矶山医院中心实验室提供,所有细胞功能实验均重复3次,以减少误差,本研究通过皖南医学院第一附属医院伦理委员会批准(编号:2022伦审研第20号)。

1.2 方法

1.2.1 生信技术确定研究对象 首先课题组在GEO数据库当中检索出比较胃癌组织与正常胃组织之间基因的两个数据集:GSE13911(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE13911>)与GSE54129(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE54129>),通GEO2R(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>)在线分析,在相同条件下比较两组样本,用于筛选差异表达LncRNAs,默认情况下,使用Benjamini和Hochberg错误发现率方法应用调整后的P值来纠正假阳性结果的发生。差异表达的倍数变化(FC)通过对数转换进行评估,即筛选条件为 $|\log FC| < 1$ 和调整后的 $P < 0.05$ 。通过Venny 2.1.0(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)得到两组数据集中的差异性表达LncRNAs,两组结果取交集共得到8个LncRNA。通过Kaplan-Meier Plotter(<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service>)数据库,共查询出7个LncRNA的生存曲线(LINC00849的生存曲线未查询出),以 $P \leq 0.01$ 为筛选条件,最终筛选出LINC00342、LINC00675以及LINC00982这3个LncRNA。通过查阅其他肿瘤数据库以及在Pubmed进行文献查询,最终确定LINC00342为研究对象。通过mircode及Diana生物信息学预测软件预测LncRNA下游调控miRNA,以及在Pubmed进行文献查询,课题组最终发现miR-596与LINC00342可能存在潜在的靶向作用关系。

1.2.2 PCR测定LINC00342及miR-596的表达量 用Trizol试剂(Invitrogen)提取胃癌组织和相应癌旁组织、人胃癌细胞和人胃黏膜细胞中的RNA;溶解于DEPC水中,取总含量为2 μg的RNA进行逆转录,按照SYBR Green实时荧光定量PCR kit(Takara)说明书要求进行PCR;逆转录及PCR步骤应在冰上完成。LINC00342和miR-596的相对表达水平分别通过GAPDH和U6标准化,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法量化相对表达水平。

1.2.3 胃癌细胞的培养 细胞培养环境为 37 °C、5% CO₂、饱和湿度,所用培养基为含有 10%FBS(Gibco)的 RPMI 1640(Gibco),每日观察细胞,保证传代时,细胞处于对数生长期,即细胞密度为 70%~80%。

1.2.4 胃癌细胞系内转染 LINC00342、miR-596 取处在对数生长期的细胞,2 mL 培养基重悬后转移至 6 孔板培养,每孔加入重悬细胞 300 μL。将 LINC00342 过表达质粒和其阴性对照、干扰 RNA 及其阴性对照、miR-596 的 mimic 及其阴性对照、miR-596 的 inhibitor 及其阴性对照各自加入 125 μL 无双抗无血清培养基混匀,脂质体 LIPO-3000 及 P3000(Invitrogen)各取适量加入至相同培养基,室温放置 5 min。然后将 LINC00342 的过表达质粒及其阴性对照、LINC00342 的 siRNA 及其阴性对照、miR-596 的 mimic 及其阴性对照、miR-596 的 inhibitor 及其阴性对照分别与脂质体混匀,室温静置 15 min。分别将上述混合物加入 6 孔板细胞中,混匀,置于培养箱中培养,4~6 h 后使用含血清的培养基换液,继续培养 24 h 后收集细胞进行下一步实验。各组细胞分别命名为 pcDNA-LINC00342 组和其阴性对照 pcDNA 组、si-LINC00342 组及其阴性对照 si-NC 组、miR-596-mimic 组及其阴性对照 mimic-NC 组、miR-596-inhibitor 组及其阴性对照 inhibitor-NC 组。

1.2.5 CCK-8 细胞增殖实验 将上述 4 组细胞在转染完成后 24 h 用胰蛋白酶(Gibco)消化,以 8000 细胞/孔的密度接种于 96 孔板,体积 100 μL。每个实验组设置 3 个复孔。按照试剂盒(Dojindo Laboratories)提供的说明书步骤处理细胞后,分别在 0、24、48、72 h 用酶标仪测定 450 nm 波长时各孔的吸光值 $A_{450\text{nm}}$,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞增殖曲线。

1.2.6 Edu 细胞增殖实验 如上所述,每组分别取对数生长期细胞,以 6×10^3 孔细胞接种于 96 孔板中,培养至正常生长阶段。依次经过 Edu 培养基孵育、PBS 清洗、细胞固定液固定后,依次加入甘氨酸溶液、含 0.5% TritonX-100 的 PBS,脱色摇床孵育后 PBS 清洗;再加入 Apollo 染色反应液进行染色,最后每孔加入 $1 \times$ Hoechst33342 反应液避光孵育,用 PBS 清洗后,用荧光显微镜观测结果并拍照。

1.2.7 细胞横向迁移(划痕实验) 用 marker 笔于 6 孔板的背面平行于长边画线,两条线间隔约 1 cm。每孔至少 5 条线。每孔加入约 5×10^5 各组细胞,24 h 后用 200 μL 枪头在每孔内垂直于背后横线划痕。PBS 冲洗干净划下的细胞,加入无血清培养基。置于 37 °C、5% CO₂ 培养。分别于 0、24、48、72 h 在倒置显微镜下观察结果并拍照,用 ImageJ 软件分析结果。

1.2.8 细胞纵向迁移(Transwell 侵袭实验) 转染 24 h 后的各组细胞,胰酶消化,无血清 RPMI 1640 培养基洗涤

3 次后用无血清培养基重悬,调整密度为 3×10^4 /mL。Transwell 小室下室加 600 μL 含 20% 血清的培养基,上室加 200 μL 细胞悬液,37 °C 孵育 24 h。取出小室,PBS 洗 2 遍,加 4% 多聚甲醛固定 15 min。加 0.1% 结晶紫溶液,室温染色 20 min。自来水轻柔漂洗后,用棉签轻轻擦除上室表面非侵袭性细胞,室温干燥,至观察颜色适宜,在倒置显微镜下观察结果并拍照、计数,用 ImageJ 软件分析结果。

1.2.9 细胞周期实验 收集各组样本细胞,用冷 PBS 洗涤细胞并重悬,冷乙醇 4 °C 固定过夜;收集细胞,冷 PBS 洗重悬细胞后,加入 RnaseA 溶液,37 °C 水浴后离心、弃上清,加入 PI 染液重悬细胞,轻轻混匀后 4 °C 避光孵育 1 h;用流式细胞仪检测,激发波长为 488 nm。采用 FlowJo-V10 软件进行分析,收集各组细胞 S 期、G0/G1 期比率。

1.2.10 双荧光素酶报告基因检测实验 将原代或变异全长型 LINC00342 克隆到 H306 pMIR-REPORT Luciferase 质粒受体中,以上所有原代与变异的受体携带体和模拟生物体内源化,miR-596 模拟物均被导入 293T 细胞中。待 48 h 后,利用 Promega 试剂盒通过双荧光素酶受体分析系统 Dual-Luciferase Reporter Assay System(E1960, Promega),测量荧光素活性。

1.2.11 统计学分析 统计分析选用 GraphPad Prism8.0。正态分布的计量资料采用均数±标准差描述,组间差异使用 *t* 检验和单因素方差分析比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义(双侧)。

2 结果

2.1 确定 LncRNA 及其下游 miRNA

通过生物信息学技术及相关预测软件,最终确定所研究 LncRNA 为 LINC00342(图 1),预测其下游调控的 miRNA 为 miR-596。

2.2 qRT-PCR

LINC00342 在胃癌组织中表达高于癌旁组织 ($P < 0.05$,图 2A);在人胃癌细胞中表达高于人胃黏膜细胞 (P 均 < 0.05 ,图 2B);miR-596 则相反,即 miR-596 在胃癌组织中表达低于癌旁组织(图 2C);在人胃癌细胞中表达低于人胃黏膜细胞 (P 均 < 0.05 ,图 2D)。

2.3 LINC00342 转染效率的验证

转染 LINC00342 过表达质粒和 siRNA 敲低 LINC00342 后,PCR 结果显示,pcDNA-LINC00342 组表达量高于 pcDNA 组 ($P < 0.05$,图 2E),si-LINC00342 组表达量低于 si-NC 组 ($P < 0.05$,图 2F)。

2.4 LINC00342 和 miR-596 对胃癌细胞增殖的影响

CCK-8 细胞增殖实验显示:在 24、48、72 h,pcDNA-LINC00342 组 $A_{450\text{nm}}$ 高于对照组(图 3B),si-LINC00342

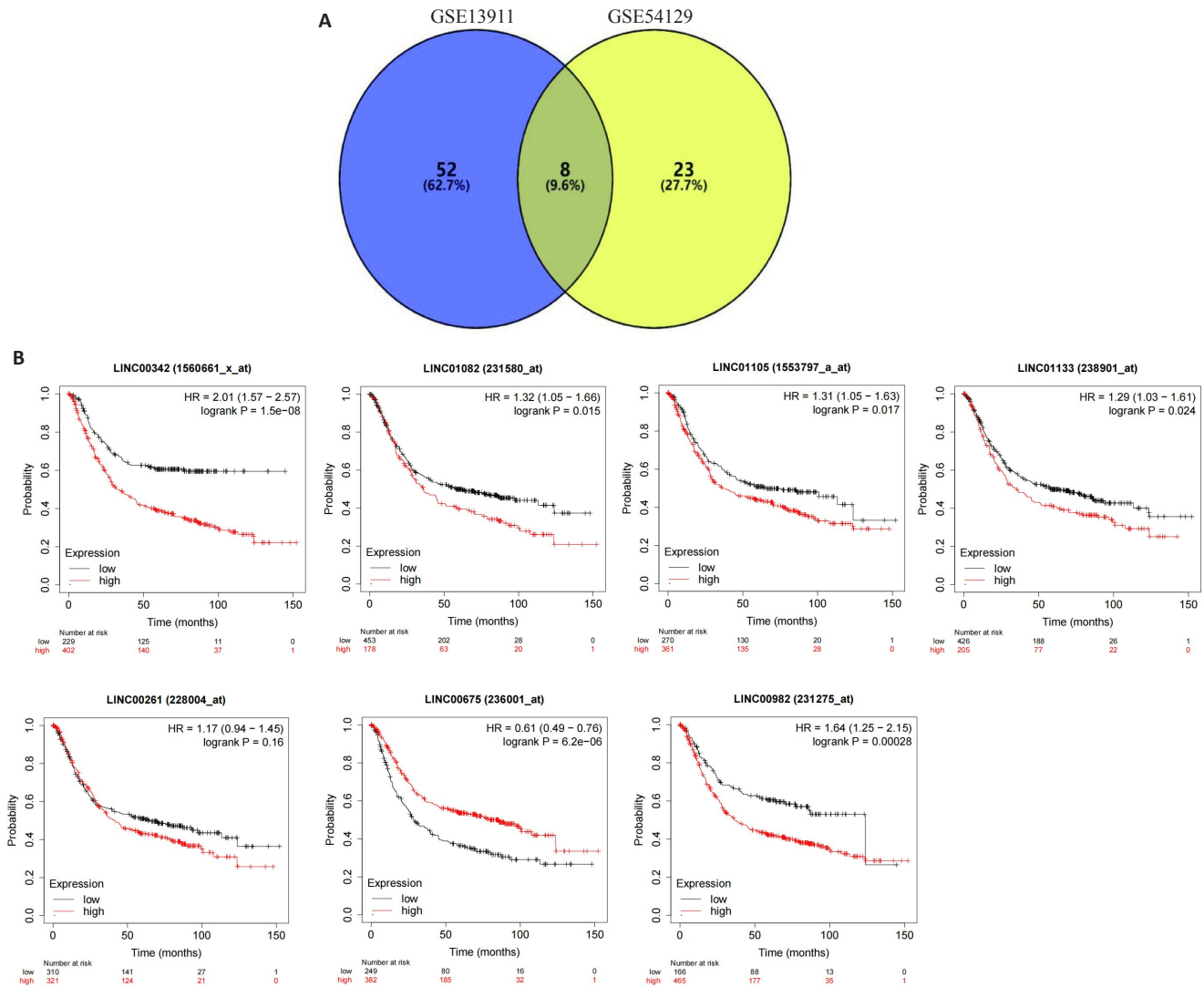


图1 研究对象的选择

Fig.1 Selection of the candidate lncRNAs. A: Venn diagram showing that the intersection of the two datasets yields 8 differentially expressed lncRNAs. B: Using Kaplan-Meier Plotter, 7 lncRNAs were queried (LINC00849 was not queried) with $P < 0.01$ as the screening condition.

组低于对照组(图3A),在48h差异最为明显(P 均 <0.05); miR-596-inhibitor 组高于对照组(图3D), miR-596-mimic 组低于对照组(图3C, P 均 <0.05)。LINC00342 对于胃癌细胞的增殖能力有促进作用, miR-596 则能抑制胃癌细胞的增殖能力。Edu 细胞增殖实验的结果与 CCK-8 实验结果一致(图4,5)。

2.5 LINC00342和miR-596对胃癌细胞迁移的影响

划痕实验的结果显示, pcDNA-LINC00342 组的划痕愈合速度快于对照组 ($P < 0.01$), si-LINC00342 组的愈合速度则慢于对照组 ($P < 0.001$)。说明 LINC00342 对于胃癌细胞的横向迁移能力具有促进作用, miR-596-inhibitor 组的划痕愈合速度比对照组快 ($P < 0.01$), miR-596-mimic 组的愈合速度比对照组慢 ($P < 0.01$), miR-596 能够抑制胃癌细胞的横向迁移能力(图6)。

2.6 LINC00342 和 miR-596 对胃癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验结果显示, pcDNA-LINC00342 组穿过上室的胃癌细胞数量要高于对照组 ($P < 0.001$), si-LINC00342 组则低于对照组 ($P < 0.001$)。此结果说明 LINC00342 具有促进胃癌细胞纵向侵袭能力的功能; 同样的, miR-596-inhibitor 组穿过上室的胃癌细胞数量高于对照组 ($P < 0.01$), miR-596-mimic 组穿膜细胞数量低于对照组 ($P < 0.001$), miR-596 对于胃癌细胞纵向侵袭能力具有抑制作用(图7)。

2.7 细胞周期实验

pcDNA-LINC00342 组及 miR-596-inhibitor 组相较于其阴性对照组, G0/G1 期均显著下降, S 期均明显增加; si-LINC00342 组及 miR-596-mimic 组相较于其

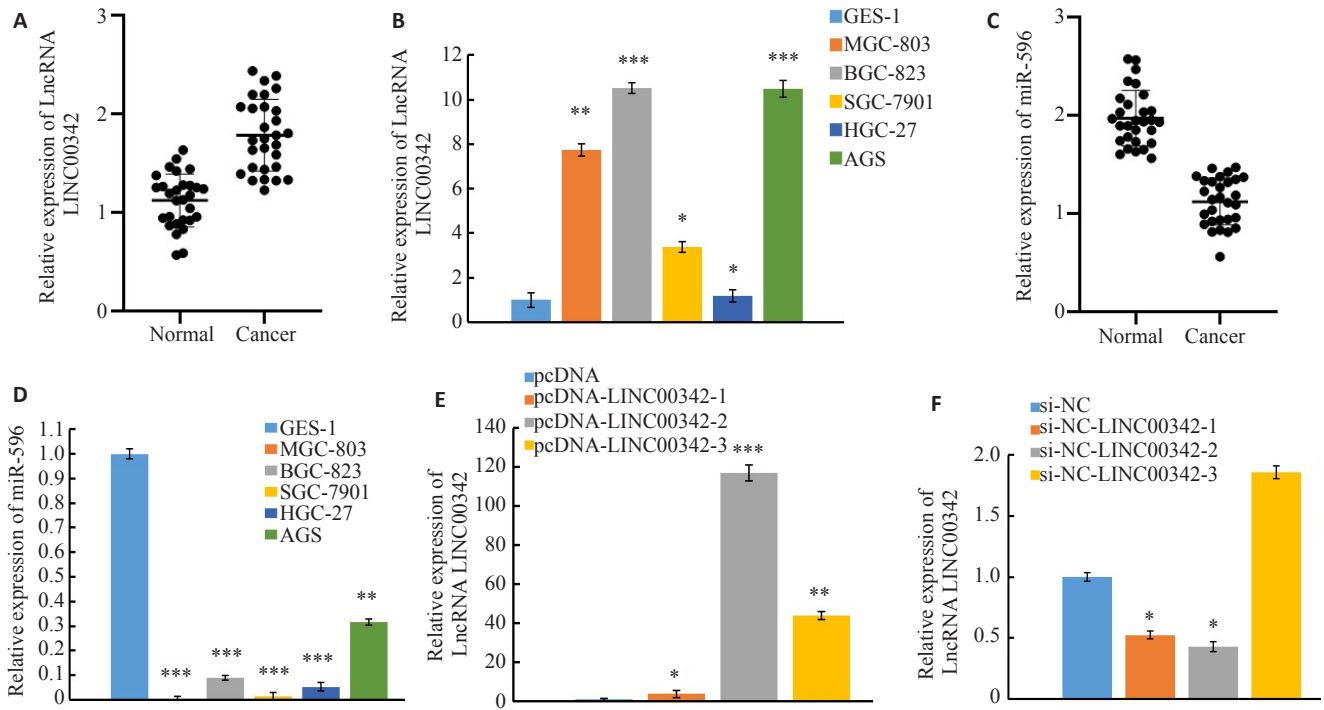


图2 LINC00342及miR-596在胃癌组织及胃癌细胞中的表达情况

Fig.2 Expression of LINC00342 and miR-596 in gastric cancer tissues and cells. **A, C:** Expression of LINC00342 and miR-596 in GC tissues and normal tissues ($n=29, P<0.05$ vs Normal). **B, D:** Expression of LINC00342 in human gastric cancer cell lines AGS, MGC-803, BGC-823, SGC-7901 and HGC-27 and human gastric mucosal GES-1 cells ($*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$ vs GES-1). **E, F:** Efficiency of LINC00342 overexpression and knockdown detected by qRT-PCR in BGC-823 and MGC-803 cells ($*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$ vs Normal).

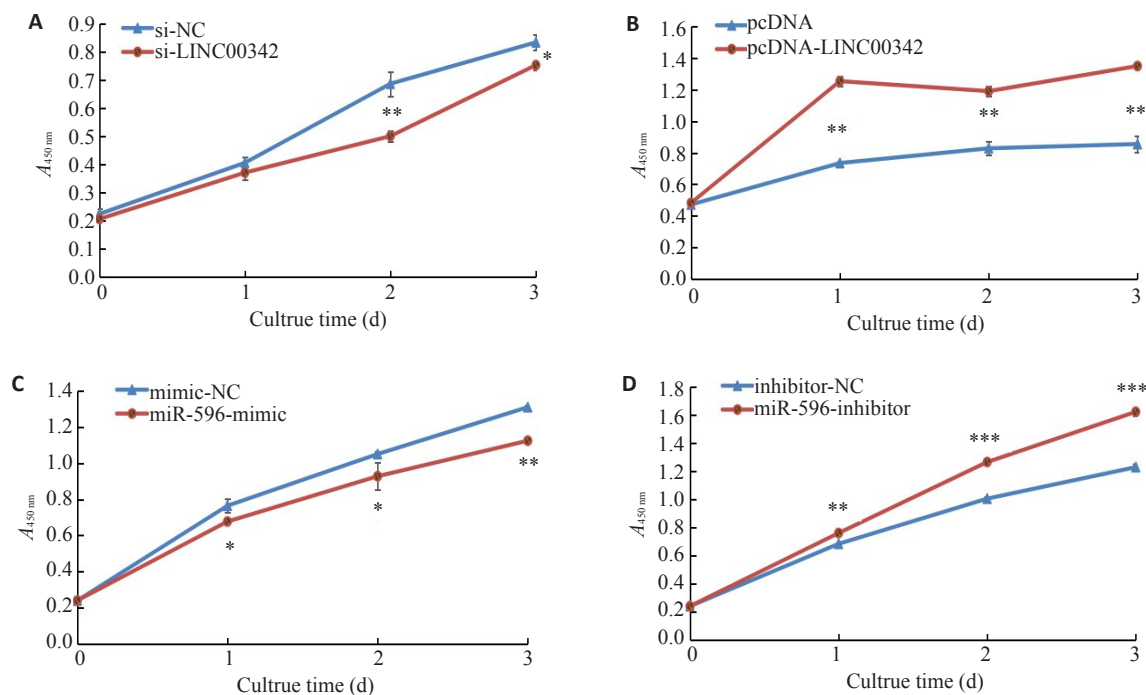


图3 LINC00342和miR-596对胃癌细胞增殖的影响

Fig.3 Effects of LINC00342 and miR-596 overexpression or knockdown on proliferation of gastric cancer cells. **A, B:** CCK-8 assay for assessing proliferation ability of MGC-803 and BGC-823 cells after knockdown and overexpression of LINC00342 ($*P<0.05, **P<0.01$ vs NC or pcDNA). **C, D:** CCK-8 assay for assessing proliferation ability of MGC-803 and BGC-823 cells after overexpression and knockdown of miR-596 ($*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$ vs NC).

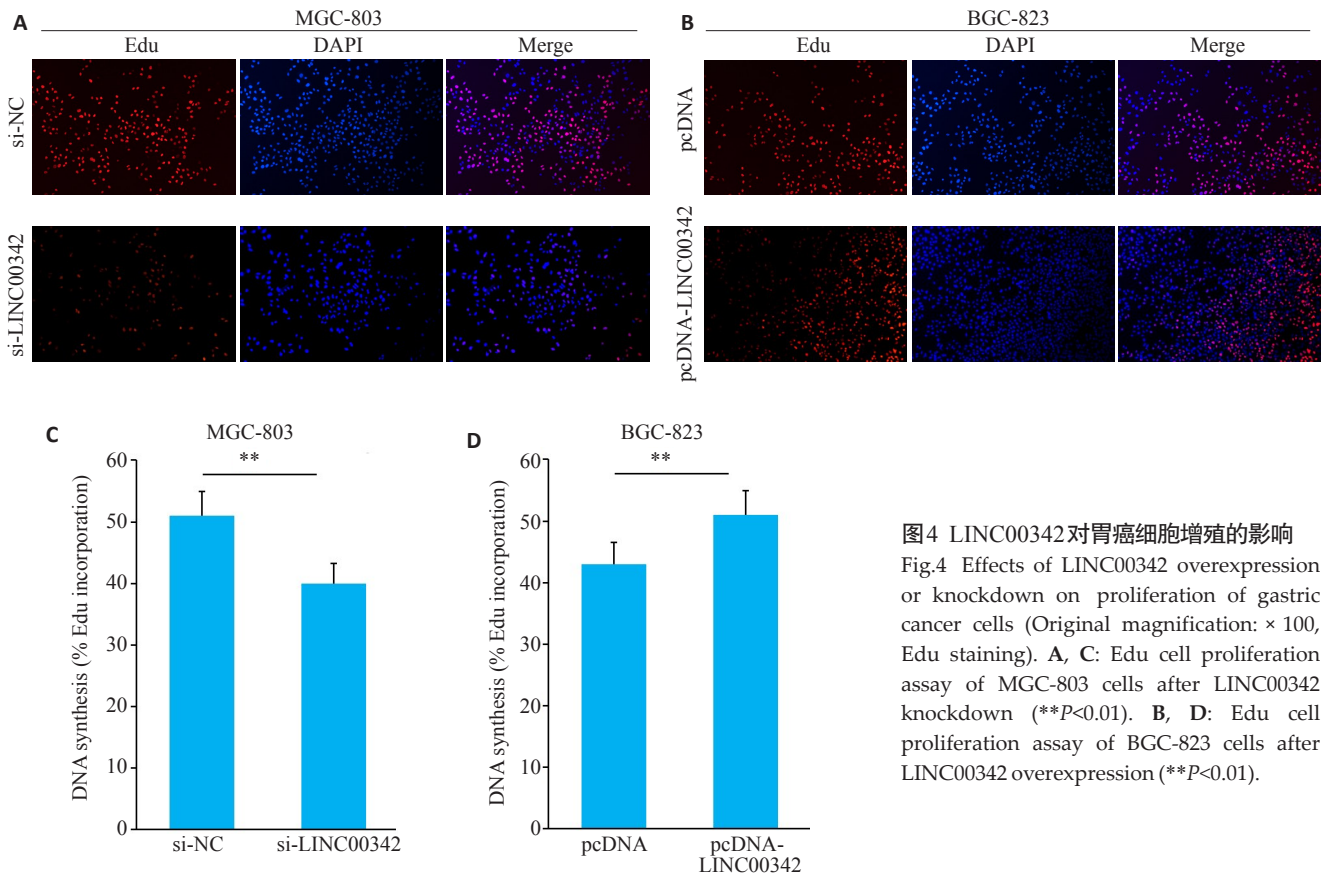


图4 LINC00342对胃癌细胞增殖的影响
Fig.4 Effects of LINC00342 overexpression or knockdown on proliferation of gastric cancer cells (Original magnification: $\times 100$, Edu staining). **A, C**: Edu cell proliferation assay of MGC-803 cells after LINC00342 knockdown (** $P<0.01$). **B, D**: Edu cell proliferation assay of BGC-823 cells after LINC00342 overexpression (** $P<0.01$).

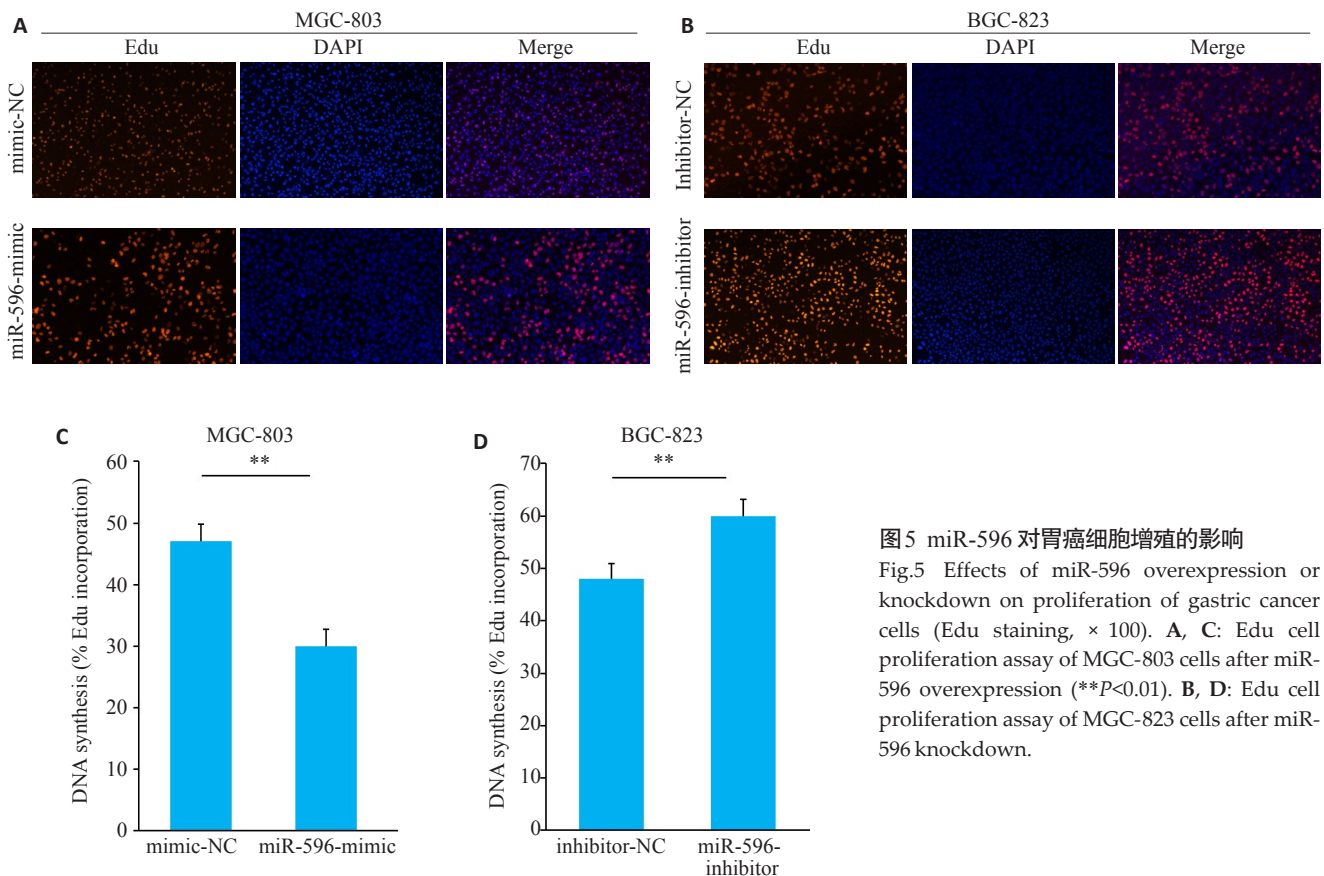


图5 miR-596对胃癌细胞增殖的影响
Fig.5 Effects of miR-596 overexpression or knockdown on proliferation of gastric cancer cells (Edu staining, $\times 100$). **A, C**: Edu cell proliferation assay of MGC-803 cells after miR-596 overexpression (** $P<0.01$). **B, D**: Edu cell proliferation assay of MGC-823 cells after miR-596 knockdown.

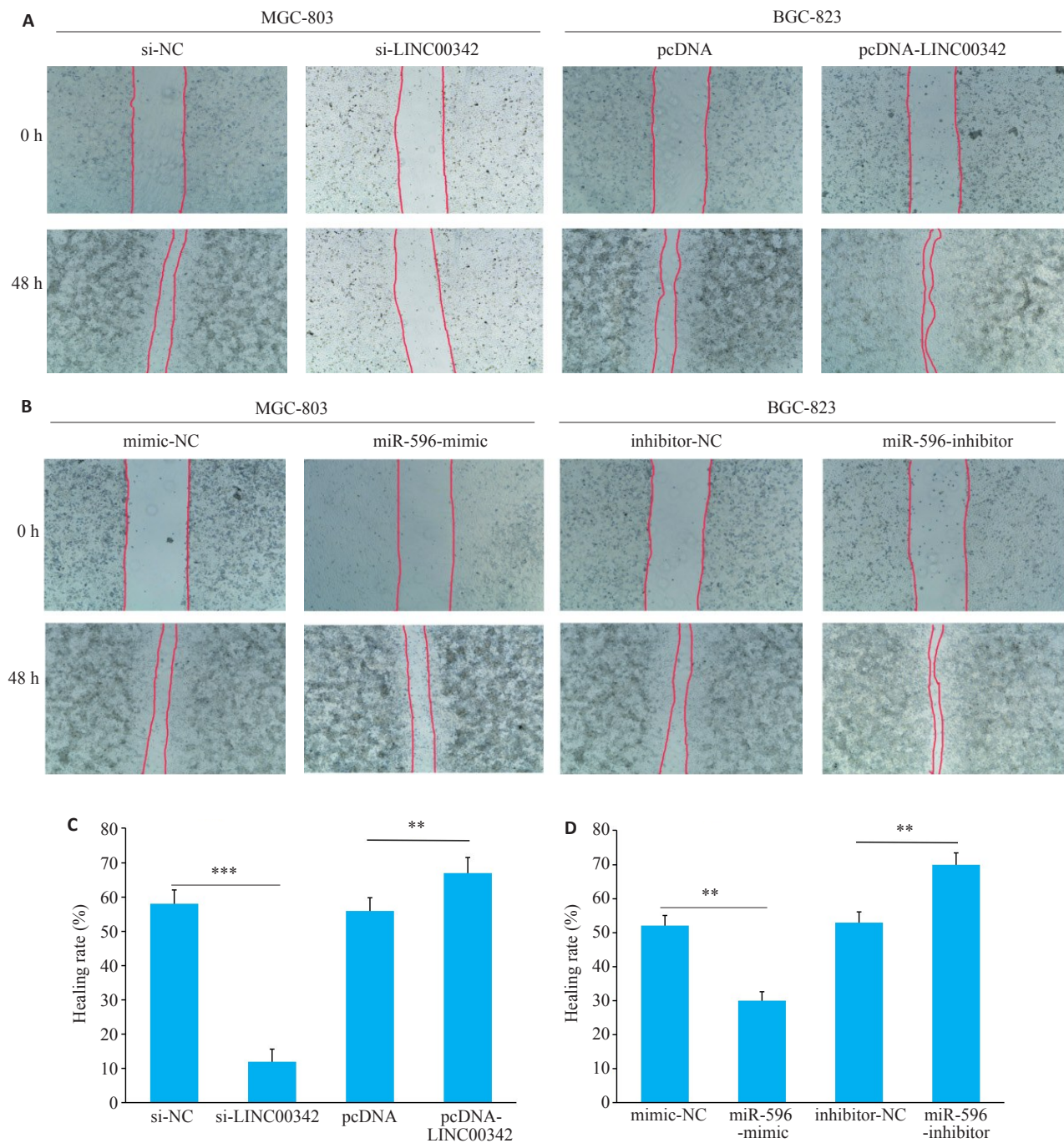


图.6 LINC00342和miR-596对胃癌细胞迁移的影响

Fig.6 Effects of LINC00342 and miR-596 overexpression or knockdown on migration of gastric cancer cells (Original magnification: $\times 40$). **A, C**: Wound healing assay of MGC-803 and BGC-823 cells after LINC00342 knockdown and overexpression (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). **B, D**: Wound healing assay of BGC-823 and MGC-803 cells after miR-596 knockdown and overexpression (** $P < 0.01$).

阴性对照组, G0/G1期均显著增加, S期均明显下降, 说明 LINC00342 能促进胃癌细胞周期向 S 期分裂的进程, miR-596 则阻止胃癌细胞周期抑制向 S 期进展 ($P < 0.01$, 图 8)。

2.8 LINC00342 与 miR-596 能够特异性结合

miR-596 mimic 可以显著降低 LINC00342 WT 质粒的相对荧光素酶活性 ($P = 0.0067$), 但对于突变体的双荧光素酶活性没有显著影响 (图 9)。

3 讨论

随着人类基因组计划的完成以及众多肿瘤数据库被建立, 利用生物信息学技术筛查肿瘤潜在的诊疗靶点已成为当代医学重要的分支。早期胃癌患者多无特异的临床症状, 多数患者确诊时已处于中晚期^[22, 23], 胃癌诊断时的临床病理分期往往决定着胃癌患者的预后情况^[24, 25]。目前临床上广泛使用血清胃蛋白酶原 (PG)、癌胚抗原 (CEA) 和碳水化合物抗原 19-9 (CA19-9) 等相关

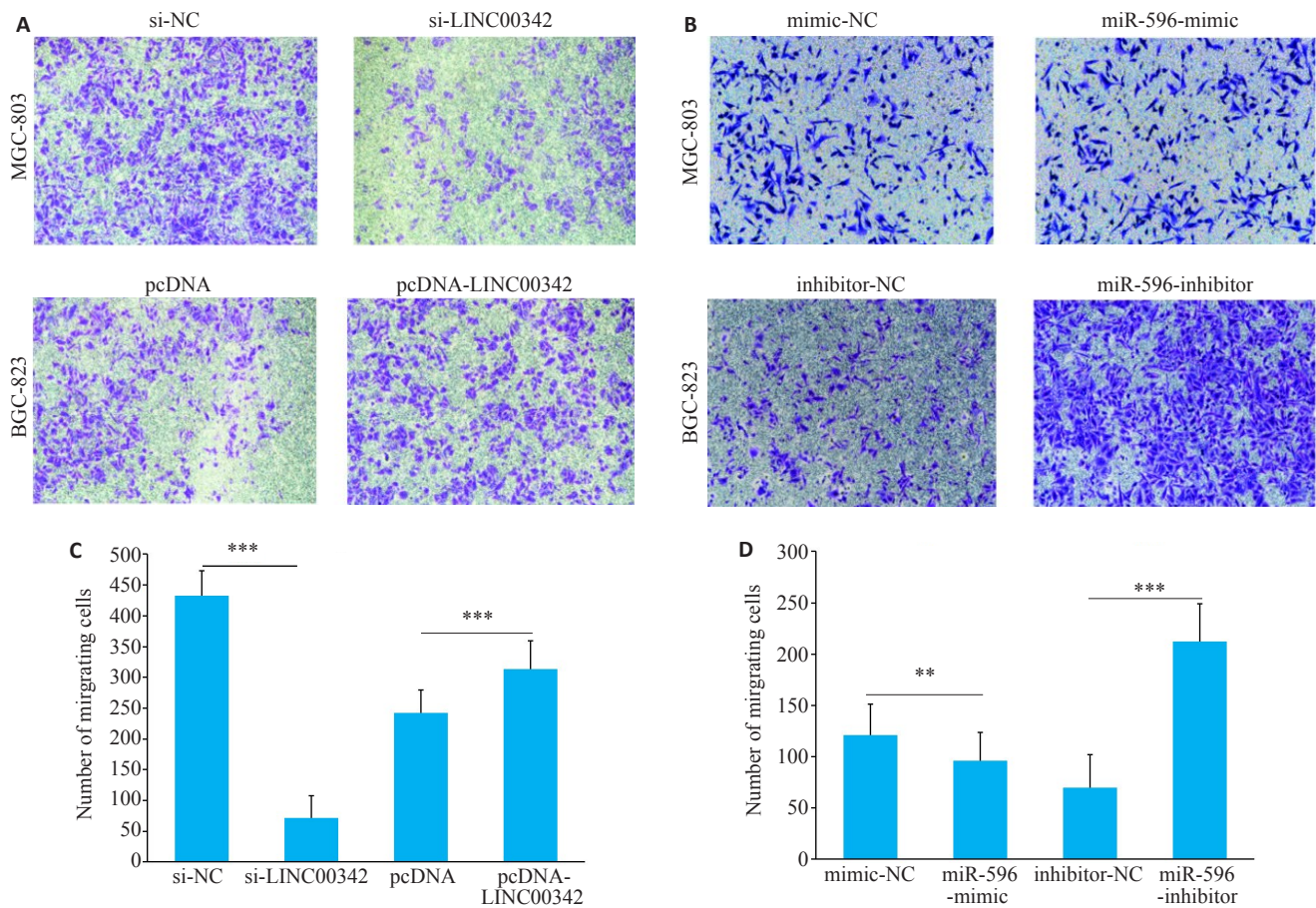


图7 LINC00342 和 miR-596 对胃癌细胞侵袭能力的影响

Fig.7 Effects of LINC00342 and miR-596 knockdown and overexpression on invasiveness of gastric cancer cells (Crystal violet staining, $\times 200$). A, C: Transwell invasion assay of MGC-803 and BGC-823 cells after LINC00342 knockdown and overexpression ($***P<0.001$). B, D: Transwell invasion assay of the cells after miR-596 knockdown and overexpression ($**P<0.01$, $***P<0.001$).

肿瘤标志物来进行胃癌的筛查,这种方法虽然无创,但其敏感性和特异度较差^[26]。因此,如何找到一种无创、高灵敏度、成本低的生物标志物来提高早期胃癌的诊断率,正是现在多数临床研究者所关注的课题。

如前所述,LINC00342 是一种新发现的 lncRNA,在非小细胞肺癌、婴儿血管瘤、结肠腺癌中发挥致癌作用^[11-16],通过查询其它肿瘤数据库后,我们有理由相信其在胃癌中也发挥着致癌的作用,因此,本课题组最终选择 LINC00342 作为研究对象。为了验证数据库的预测,课题组通过 qRT-PCR 证明了 LINC00342 在胃癌组织的表达较癌旁组织增高,此外,与正常胃黏膜细胞株相比,在胃癌细胞中,LINC00342 的表达也升高,此结果与数据库预测一致,这意味着 LINC00342 对胃癌的发生发展可能也起到调控的作用。

分别在两个胃癌细胞系进行一系列细胞功能试验后,我们发现,过表达 LINC00342 能促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,能促进细胞周期向着 S 期发展;敲低 LINC00342 会抑制这些能力,miR-596 在胃癌细胞中

则发挥着相反的作用。然而,不同于传统的中心法则,lncRNA 不编码或很少编码蛋白质,其发挥作用的分子基础往往是作为 miRNA 海绵在转录后水平影响靶标表达^[14,27,28],即与其他分子竞争性结合 miRNA 上的某些位点来调节相应分子的表达水平来发挥作用^[29,30]。

为明确 LINC00342 与 miR-596 二者之间是否具有调控关系,本课题组通过完成两者之间的双荧光素酶结合实验,证明了 LINC00342 和 miR-596 之间存在特异性结合关系,此项发现尚属首次。结合其它实验结果,我们认为 LINC00342 可以通过调控 miR-596 促进胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭。

本研究也存在不足之处:(1)在胃癌中,LINC00342 及 miR-596 的上下游是否存在其他的调控机制尚需进一步研究;(2)未来是否能找到有效的作用靶点、能否真正在胃癌的诊断及治疗中产生作用,这还需要我们进一步的探索。

综上所述,本研究结果显示 LINC00342 在胃癌组织及细胞中表达高于癌旁组织及正常胃黏膜细胞,

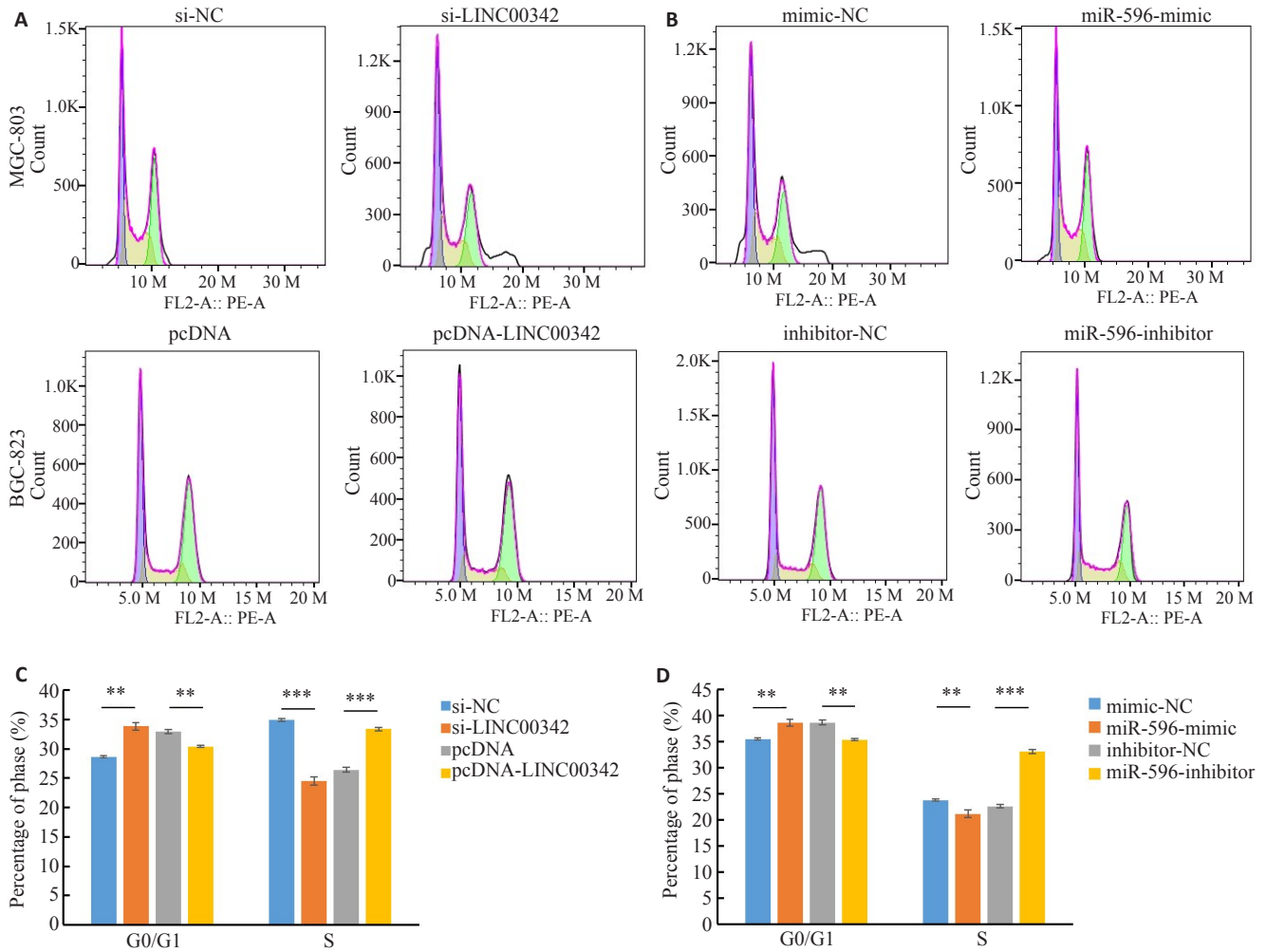


图8 LINC00342 和miR-596 对胃癌细胞周期的影响。

Fig.8 Effects of LINC00342 and miR-596 knockdown and overexpression on gastric cancer cell cycle. **A, C:** Flow cytometry of MGC-803 and BGC-823 cells after LINC00342 knockdown and overexpression (** $P<0.01$, *** $P<0.001$). **B, D:** Flow cytometry of the cells after miR-596 knockdown and overexpression (** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

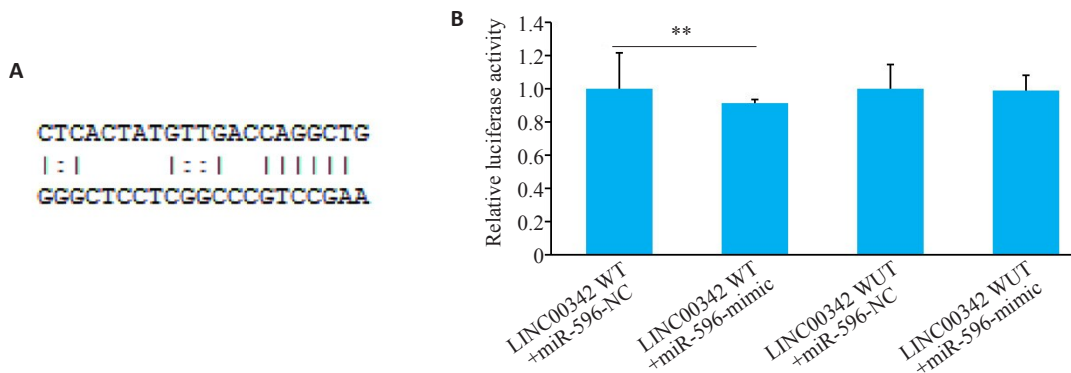


图9 LINC00342与miR-596能够特异性结合

Fig.9 Specific binding between LINC00342 and miR-596. **A:** Binding sites of LINC00342 and miR-596 predicted by online software DIANA. **B:** Luciferase reporter assay for confirming the binding between LINC00342 and miR-596 ($P=0.0067$). ** $P<0.001$.

miR-596则相反;LINC00342 能促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,且减少处于G0/G1期的细胞比率,miR-596则发挥着相反的作用;最后,LINC00342和miR-596能

特异性结合。因此,课题组认为本研究为LINC00342将来是否能作为胃癌筛查、预防、治疗中新的靶点提供了依据。

参考文献:

- [1] Arnold M, Abnet CC, Neale RE, et al. Global burden of 5 major types of gastrointestinal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(1): 335-49.e15.
- [2] Ree R, Kind L, Kaziales A, et al. PFN2 and NAA80 cooperate to efficiently acetylate the N-terminus of actin[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(49): 16713-31.
- [3] Tariq N, Basharat Z, Butt S, et al. Distribution analysis of profilin isoforms at transcript resolution with mRNA-seq and secondary structure in various organs of *Rattus norvegicus*[J]. *Gene*, 2016, 589(1): 49-55.
- [4] Rung J, Brazma A. Reuse of public genome-wide gene expression data[J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(2): 89-99.
- [5] Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets: 10 years on[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(Database issue): D1005-10.
- [6] Yang L, Kirby JE, Sunwoo H, et al. Female mice lacking Xist RNA show partial dosage compensation and survive to term[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(15): 1747-60.
- [7] Yang XZ, Cheng TT, He QJ, et al. LINC01133 as ceRNA inhibits gastric cancer progression by sponging miR-106a-3p to regulate APC expression and the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 126.
- [8] Zhang GH, Xu Y, Wang SJ, et al. LncRNA SNHG17 promotes gastric cancer progression by epigenetically silencing of p15 and p57[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 5163-74.
- [9] Wang JJ, Liu YY, Sun WW, et al. Plasma exosomes as novel biomarker for the early diagnosis of gastric cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 21(4): 805-12.
- [10] Cheng CY, Qin YG, Zhi QJ, et al. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits cisplatin resistance of gastric cancer cells through inhibiting the PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signaling pathways by up-regulating miR-34a[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107(Pt B): 2620-9.
- [11] Fang Q, Chen XY, Zhi XT. Long non-coding RNA (LncRNA) urothelial carcinoma associated 1 (UCA1) increases multi-drug resistance of gastric cancer *via* downregulating miR-27b[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 3506-13.
- [12] Temraz S, Mukherji D, Alameddine R, et al. Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer[J]. *Crit Rev Oncol*, 2014, 89(2): 217-30.
- [13] Zhang MH, Yang Y, Zhao Y, et al. LncRNA DQ786243 expression as a biomarker for assessing prognosis in patients with gastric cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(8):2304-9.
- [14] Zhang Q, Chen BY, Liu P, et al. XIST promotes gastric cancer (GC) progression through TGF- β 1 *via* targeting miR-185[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(3): 2787-96.
- [15] Miao ZH, Liu SY, Xiao XW, et al. LINC00342 regulates cell proliferation, apoptosis, migration and invasion in colon adenocarcinoma *via* miR-545-5p/MDM2 axis[J]. *Gene*, 2020, 743: 144604.
- [16] Shen P, Qu LL, Wang JJ, et al. LncRNA LINC00342 contributes to the growth and metastasis of colorectal cancer via targeting miR-19a-3p/NPEPL1 axis[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 105.
- [17] Liu Z, Kang ZM, Dai YJ, et al. Long noncoding RNA LINC00342 promotes growth of infantile hemangioma by sponging miR-3619-5p from HDGF[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 317(4): H830-9.
- [18] Chen QF, Kong JL, Zou SC, et al. LncRNA LINC00342 regulated cell growth and metastasis in non-small cell lung cancer *via* targeting miR-203a-3p[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(17): 7408-18.
- [19] Su H, Yu SC, Sun FS, et al. LINC00342 induces metastasis of lung adenocarcinoma by targeting miR-15b/TPBG[J]. *Acta Biochim Pol*, 2022, 69(2): 291-7.
- [20] Liu R, Yang XW. LncRNA LINC00342 promotes gastric cancer progression by targeting the miR-545-5p/CNPY2 axis[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1163.
- [21] Endo H, Muramatsu T, Furuta M, et al. Potential of tumor-suppressive miR-596 targeting LGALS3BP as a therapeutic agent in oral cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(3): 560-9.
- [22] Song ZY, Wu YY, Yang JB, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317714626.
- [23] Fattahi S, Kosari-Monfared M, Golpour M, et al. LncRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in gastric cancer: a novel approach to personalized medicine[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3189-206.
- [24] Yuan L, Xu ZY, Ruan SM, et al. Long non-coding RNAs towards precision medicine in gastric cancer: early diagnosis, treatment, and drug resistance[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 96.
- [25] C, la Fouchardiere D. Advanced oesophago-gastric adenocarcinoma in older patients in the era of immunotherapy. A review of the literature[J]. *Cancer Treat Rev*, 2021, 100: 102289.
- [26] Feng W, Zong W, Li Y, et al. Abnormally expressed long noncoding RNA B3GALT5-AS1 may serve as a biomarker for the diagnostic and prognostic of gastric cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1): 557-65.
- [27] Jiang DT, Li H, Xiang HP, et al. Retracted: long chain non-coding RNA (lncRNA) HOTAIR knockdown increases miR-454-3p to suppress gastric cancer growth by targeting STAT3/cyclin D1[J]. *Med Sci Monit*, 2023, 29: e939464.
- [28] Sun Q, Li J, Li F, et al. LncRNA LOXL1-AS1 facilitates the tumorigenesis and stemness of gastric carcinoma via regulation of miR-708-5p/USF1 pathway[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(6): e12687.
- [29] Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393-407.
- [30] Zhao J, Du PZ, Cui P, et al. LncRNA PVT1 promotes angiogenesis *via* activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2018, 37(30): 4094-109.

(编辑:余诗诗)