

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.09.002

· 基础研究 ·

lncRNA LINC00308 作为 ceRNA 通过调控 miR-361-5p/TRIP13 轴促进前列腺癌 PC3 细胞的增殖和侵袭

拜合提亚·阿扎提, 刘强, 王玉杰(新疆医科大学第一附属医院泌尿中心, 新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的:** 探究长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) LINC00308 对前列腺癌细胞的增殖、侵袭及迁移的影响及其相关作用机制。 **方法:** 利用基因芯片在前列腺癌组织与癌旁对照组织中筛选差异表达的 lncRNA 及 mRNA, 并确定 LINC00308 及甲状腺激素受体因子 13 (thyroid hormone receptor interactor13, TRIP13) 为研究对象。MTT 实验、平板克隆及 Transwell 和划痕实验检测 LINC00308 对前列腺癌细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响, 应用裸鼠移植瘤在体内验证上述影响, 应用 Western blotting 及免疫组化实验在瘤组织和癌细胞中探究 LINC00308 对 TRIP13 表达的影响。生物信息学分析技术与 RNA 免疫共沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 及 qPCR 和双荧光素酶基因报告实验预测并探究 miR-361-5p 与 LINC00308 及 TRIP13 之间的相互作用机制, 并利用平板克隆、Transwell 侵袭实验对癌细胞恶性生物行为进行验证。 **结果:** 芯片结果及 qPCR 共同证实 LINC00308 ($P < 0.01$) 与 TRIP13 ($P < 0.05$) 在前列腺癌组织及 4 种细胞系中均异常高表达; 细胞功能实验结果表明过表达 LINC00308 可以促进前列腺癌细胞 PC3 的增殖、侵袭及迁移能力 (均 $P < 0.05$), 而下调前列腺癌细胞中 LINC00308 表达起相反作用。裸鼠移植瘤实验证实, LINC00308 能够在体内促进前列腺癌 PC3 细胞的成瘤 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且能够在体内体外促进 TRIP13 表达 ($P < 0.05$)。生物信息学分析与 RIP 及 qPCR 和双荧光素酶基因报告实验结果证实 miR-361-5p 能够分别与 LINC00308 与 TRIP13 的 3'-UTR 靶向结合, 且 LINC00308 能够通过吸附 miR-361-5p 而作为内源性竞争 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 调控 TRIP13 的表达, MTT、平板克隆及 Transwell 实验检测癌细胞的增殖、克隆形成和侵袭能力变化证实了三者之间的调控作用。 **结论:** 在前列腺癌组织和细胞中异常高表达的 LINC00308 通过发挥 ceRNA 的功能抑制 miR-361-5p 表达而增强 TRIP13 表达, 从而促进前列腺癌的增殖、侵袭及迁移能力。

[关键词] 前列腺癌; PC3 细胞; 长链非编码 RNA LINC00308; miR-361-5p; 甲状腺激素受体因子 13; 内源性竞争 RNA

[中图分类号] R730.5; R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)09-0968-10

lncRNA LINC00308 acts as a competing endogenous RNA to promote the proliferation and invasion of prostate cancer PC3 cell through regulating the miR-361-5p/TRIP13 axis

BAIHETIYA·Azati, LIU Qiang, WANG Yujie (Urinalysis Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of long non coding RNA (lncRNA) LINC00308 on proliferation, invasion and migration of prostate cancer cells and its related mechanism. **Methods:** lncRNAs and mRNAs differentially expressed in prostate cancer tissues and adjacent control tissues were screened by gene chip, and LINC00308 and TRIP13 (thyroid hormone receptor interactor13) were identified as the research objects. The effects of LINC00308 on the proliferation, invasion and migration of prostate cancer cells were detected by MTT assay, plate cloning, Transwell and scratch test. The above effects were verified in nude mice xenografts. The effect of LINC00308 on expression of TRIP13 in tumor tissues and cancer cells was detected by Western blotting and immunohistochemistry. Bioinformatics analysis, RIP (RNA immunoprecipitation), qPCR and Double luciferase gene reporter experiments were used to predict and explore the interaction mechanism between miR-361-5p and LINC00308 as well as TRIP13, and plate cloning and Transwell invasion test were used to verify the biological behaviors of cancer cells. **Results:** Both the microarray results and qPCR confirmed that the expressions of LINC00308 ($P < 0.01$) and TRIP13 ($P < 0.05$) were abnormally high in prostate cancer tis-

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(No. 2016D01C334)。Project supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2016D01C334)

[作者简介] 拜合提亚·阿扎提(1981-), 男, 博士生, 主治医师, 主要从事泌尿系肿瘤研究, E-mail: xj66home@163.com

[通信作者] 王玉杰(WANG Yujie, corresponding author) 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事泌尿系统肿瘤研究, E-mail: yjking99176@163.com

sues and four cell lines; cell function test results showed that overexpression of LINC00308 could promote the proliferation, invasion and migration of prostate cancer PC3 cells (all $P < 0.05$), while down-regulation of LINC00308 in prostate cancer cells had the opposite effect. In nude mice, LINC00308 could promote the tumorigenesis of prostate cancer cells *in vivo*, and increase the expression of TRIP13 both *in vivo* and *in vitro* ($P < 0.05$). Bioinformatics analysis, RIP, qPCR and Double luciferase gene reporter results confirmed that miR-361-5p could bind to 3'-UTR of LINC00308 and TRIP13 respectively, and LINC00308 could act as a competing endogenous RNA (ceRNA) by sponging miR-361-5p to regulate the expression of TRIP13. In addition, MTT, plate cloning and Transwell assay confirmed the regulatory interaction among LINC00308 miR-361-5p and TRIP13 from the levels of proliferation, colony formation and invasion in cancer cells. **Conclusion:** LINC00308, which is abnormally highly expressed in prostate cancer tissues and cells, can inhibit the expression of miR-361-5p and enhance the expression of TRIP13 by exerting its ceRNA function, thus promoting the proliferation, invasion and migration of prostate cancer.

[Key words] prostate cancer; PC3 cell; long non-coding RNA LINC00308; miR-361-5p; thyroid hormone receptor interactor13 (TRIP13); competing endogenous RNA (ceRNA)

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(9): 968-977. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.09.002]

前列腺癌(prostatic cancer, PCa)是男性人群中最常见的恶性肿瘤之一,全球范围内其发病率位列第二位、病死率居于第六位。中国前列腺癌的发病率及病死率在过去10年的年增长率分别高达12.6%与5.5%,且呈现出不断升高的趋势^[1-2]。因此,针对前列腺癌防治机制的研究意义重大。

长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是转录本长度超过200个碱基的RNA分子,其不编码蛋白质但能够在表观遗传、转录及转录后加工等多个层面调控基因功能^[3]。如lncRNA DILC可通过调控PTEN-AKT通路抑制肾癌进展^[4];在乳腺癌中上调lncRNA SLC4A1-1表达可诱导H3K27的乙酰化,进而促进乳腺癌转移^[5]。JIANG等^[6]发现,lncRNA LINC00308在前列腺癌中的表达显著增高,推测其可能与前列腺癌发生发展密切相关。

MicroRNA(miRNA)是一类由20~25个核苷酸组成的非编码RNA分子,能够与靶基因的3'UTR相结合,从而引起后者的降解或抑制其翻译^[7]。研究^[8]显示,仅占人类基因2%的miRNA可通过调控网络影响机体近1/3基因的表达。miR-361-5p属于miR-361家族,其在肺癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤中的表达显著下调,且可能通过调节肿瘤细胞的生长、转移及代谢等而抑制肿瘤的发展^[9-10]。

内源性竞争RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)是由SALMENA等人^[11]于2011年首次提出的假说,其认为lncRNA、pseudogene、mRNA及环状RNA等内源性RNA含有与某些miRNA相同的结合位点,它们可以通过竞争性结合共同的miRNA以减弱后者对其靶基因的抑制作用,进而参与遗传调控、免疫调控及肿瘤进展等多种生命活动。如在结肠癌中异常高表达的lncRNA LINC00858可通过竞争性结合miR-22-3p上调其靶基因YMHZ的表达,从而促进结肠癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力^[12];lncRNA PTENP1及PTEN在胃癌标本中的表达同时降低,用

梯度法证实lncRNA PTENP1可作为miR-106b及miR-93的ceRNA而抑制胃癌的进展^[13]。

甲状腺激素受体因子13(thyroid hormone receptor interactor13, TRIP13)是一种与甲状腺受体相互作用的蛋白,可通过该家族ATP酶水解底物,从而参与细胞分裂、增殖和转移^[14]。TRIP13在多种恶性肿瘤中异常高表达,如肺腺癌、多发性骨髓瘤、头颈部恶性肿瘤等^[14-16];而在前列腺癌中,TRIP13可作为促癌基因调节肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭功能,并与肿瘤复发及患者不良预后相关^[17]。鉴于以上背景,本课题旨在探究lncRNA LINC00308在前列腺癌中的作用及其涉及的分子生物学机制,为更好地改善前列腺癌患者的疗效和预后提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 临床样本

收集2018年9月至2019年10月于新疆医科大学第一附属医院行手术治疗并经病理学证实的30对前列腺癌组织及对应的癌旁(癌灶边缘 ≥ 3 cm)组织样本。所有患者术前均未接受任何放、化疗及免疫调节剂治疗。所有标本均经病理医师确认。本研究获得本院伦理委员会审批,所有研究对象均签署知情同意书。术中获得标本后立即置于液氮中冻存。

1.2 细胞系及主要试剂

人正常前列腺上皮细胞系P69,前列腺癌细胞系PC3、LNCaP、DU145、22Rv1均购自中国科学院上海细胞库。RPMI 1640、含EDTA的0.25%胰蛋白酶(美国Hyclone公司),MTT试剂、嘌呤霉素(美国Sigma公司),胎牛血清(FBS)、Opti-MEM(英国Gibco公司),TRIzol、逆转录试剂盒(美国Thermo公司),SYBR Green Real-time PCR(上海索莱宝生物公司),转染试剂脂质体Lipofectamine3000(美国Invitrogen公司),沉默lncRNA LINC00308的siRNA(si-LINC00308)、siRNA阴性对照序列(si-NC)(广州锐

博生物公司)。miR-361-5p mimic、mimic 阴性对照序列(NC mimic)、miR-361-5p inhibitor、inhibitor 阴性对照序列(NC inhibitor)和 PCR 引物(上海吉玛生物公司), pcDNA3.1-LINC00308 质粒、pcDNA3.1 空载体(pcDNA3.1-NC, pMS2-GFP 质粒、pcDNA3.1-MS2 (12×)质粒(MS2)、pcDNA3.1-LINC00308-MS2 (12×)野生型质粒(MS2-LINC00308-WT)、与 miR-361-5p 结合位点进行突变的 pcDNA3.1-LINC00308-MUT-MS2 (12×)的质粒(MS2-LINC00308-MUT)(广州瑞博生物公司)。LINC00308 野生型(WT)与突变型(MUT)、TRIP13 WT 及 MUT 的荧光素酶报告基因质粒(上海吉玛生物公司)。荧光酶检测试剂盒(Promega 公司), TRIP13、 β -actin(美国 Abcam 公司), HRP 标记的 IgG 二抗(广州晶彩公司), Matrigel 基质胶(美国 BD 公司), RIP 试剂盒、Transwell 小室(美国 Millipore 公司), 免疫组化 EnVison 二步法试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司), 大鼠抗 Ago2 免疫磁珠、EZ-Magna RIP™-Binding Protein Immunoprecipitation Kit(德国 Millipore 公司), GFP 抗体(瑞士 Roche 公司)。BALB/c 裸鼠[新疆医科大学动物实验中心, 动物合格证号:SYXK(新)2018-0003]。动物实验方案由我院动物实验伦理委员会审查批准。

1.3 细胞培养及其转染

将 P69、PC3、LNCaP、DU145、22Rv1 细胞复苏后用含 10%FBS 的 RPMI 1640 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。取生长汇合至 80% 的 PC3 细胞, 调整细胞密度至 2×10^5 个/孔接种至 6 孔板中过夜; 转染前更换培养基为 Opti-MEM, 参考 Lipofectamine3000 说明书, 将 50 ng 的 si-LINC00308、si-NC、pcDNA3.1-LINC00308、pcDNA3.1-NC 及 100 nmol/L 的 miR-361-5p mimic、NC mimic、miR-361-5p inhibitor、NC inhibitor 分别转染入 PC3 细胞内, 6 h 后将培养基更换为含 10%FBS 的 RPMI 1640 继续培养。48 h 后更换含有 2 μ g/ml 嘌呤霉素与 10%FBS 的 DMEM/HG 培养液, 继续培养 3 d。将细胞转移至新的培养板中, 待 1~2 周细胞出现克隆时, 挑取单克隆至 6 孔板中进行扩大培养, 建立稳定转染细胞系以备用。

1.4 使用芯片分析癌组织中差异表达的 lncRNA 和 mRNA

芯片检测 4 对前列腺癌及癌旁组织中差异表达的 lncRNA 和 mRNA, 利用分层聚类分析筛选表达差异倍数 (fold change, FC) ≥ 2 、 $P < 0.05$ 及 FDR (false discovery rate) < 0.05 的 lncRNA 和 mRNA。

1.5 MTT 法检测细胞增殖能力

取转染后的 PC3 细胞接种至 96 孔板中, 2×10^4 个/孔, 每组设置 5 个复孔。向每孔加入 200 μ l RPMI

1640 继续培养, 分别于 24、36、48、72 h 向每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μ l, 培养 4 h, 弃除原培养液后每孔加入 150 μ l 的 DMSO, 室温下震荡 10 min, 于酶标仪 490 nm 处检测每孔的光密度值 (D_{490})。

1.6 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力

将转染后的 PC3 细胞接种至 6 孔板中, 1×10^3 个/孔, 培养 8 d 后以 3.7% 多聚甲醛固定 5 min, 0.05% 结晶紫中染色 20 min, 轻冲洗 5 次后显微镜下拍照计数克隆形成数量。

1.7 免疫组化法检测癌组织和细胞中 TRIP13 的表达

癌组织及癌旁组织经 10% 甲醛溶液固定, 脱水, 石蜡包埋, 制成约 4 μ m 切片。采用 EnVison 二步法, TRIP13 抗体稀释比例为 1:500, 余操作参考说明书进行。染色结果由 2 名高年资病理医师双盲评估。细胞阳性 $\leq 5\%$ 为 0 分, $5\% < \sim 25\%$ 为 1 分, $25\% < \sim 50\%$ 为 2 分, $50\% < \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分; 细胞染色评分, 1 分为黄色、2 分为棕黄色、3 分为棕褐色。将细胞阳性率评分与染色强度评分相乘, 0 分为阴性, ≥ 1 分为阳性。

1.8 RNA 免疫共沉淀(RIP)实验检测 LINC00308 与 miR-361-5p 结合的水平

将质粒 pcDNA3.1-MS2 (12×)-LINC00308-WT (miR-361-5p) [MS2-LINC00308-WT]、pcDNA3.1-MS2 (12×)-LINC00308-MUT (miR-361-5p) [MS2-LINC00308-MUT] 与空白对照序列 pcDNA3.1-MS2 (12×)[MS2] 分别与 pMS2-GFP 共转染入 PC 细胞中, 48 h 后收集细胞用 RIP 裂解缓冲液裂解, 取 100 μ l 裂解液加入 900 μ l 含抗 GFP 抗体或同型对照抗体 IgG 相偶联磁珠的 RIP Buffer 孵育过夜, 800 \times g 离心 3 min, 下层沉淀即为所需 RNA。应用 qPCR 检测与 LINC00308 结合的 miR-361-5p。同时以 Ago2/IgG 抗体进行 RIP 反向验证实验, 将 miR-362-5p mimic 和 NC mimic 分别转染入 PC3 细胞中, 48 h 后进行 RIP 实验, qPCR 检测与 miR-361-5p 结合的 LINC00308, 步骤同上。

1.9 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

Transwell 预铺 Matrigel 基质胶将细胞接种至含 200 μ l 无血清培养基的 12 孔板的 Transwell 上室, 4×10^4 个/孔, 下室加入 600 μ l RPMI 1640 培养液, 每组 3 个复孔。培养 48 h 后取出上室, PBS 冲洗 2 次, 并用湿棉签轻轻擦拭小室上层未穿出细胞, 无水乙醇固定 15 min, 晾干, 0.1% 结晶紫染色 30 min, PBS 冲洗 2 次后于倒置显微镜下观察穿出小室的细胞数, 每组随机选取 5 个视野计数。

1.10 划痕实验检测细胞迁移能力

在 6 孔板每个孔的底部使用 Marker 笔划 2 条间

隔为5 mm的横线,再将转染后PC3细胞接种,每孔达 2×10^5 个,于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养,待细胞汇合度达80%左右时使用200 μl 移液器枪头在细胞培养面垂直于Marker笔划线,继续培养24 h后,倒置显微镜下拍摄,使用Image J软件测量距离。

1.11 双荧光素酶基因报告实验验证LINC00308及miR-361-5p与TRIP13的靶向结合作用

生物信息学(TargetScan在线数据库)预测显示,LINC00308及miR-361-5p与TRIP13具有结合位点。取PC3细胞, 2×10^4 个/孔接种于96孔板,过夜后利用Lipofectamine3000将野生型(WT)及突变型(MUT)的LINC00308与TRIP13荧光素酶报告基因质粒及miR-361-5p mimic与NC mimic质粒共转染入PC3细胞中,每组设5个复孔继续培养,转染48 h后检测相对荧光素酶活性。

1.12 实时荧光定量PCR(qPCR)检测癌细胞中相关miRNA、lncRNA及TRIP13的表达水平

按照TRIzol法提取P69、PC3、LNCaP、DU145、22Rv1及转染后的PC3细胞中的总RNA,利用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。根据qPCR试剂说明书进行qPCR,引物序列见表1。以U6或GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行定量分析。

表1 qPCR所需引物序列

Tab. 1 Primer sequences for qPCR

Gene	Primer(3'-5')
LINC00308	F:GCCAAGCTGGTAAAATGGAA R:TATGGTTTTGACGACTGTGTGAT
TRIP13	F:ACTGTTGCACTTCACATTTTCCA R:TCGAGGAGATGGGATTTGACG
miR-361-5p	F:CCAGCCATCAGCCATGAGGGT R:GGAGCCCTTTCTGAATCCGCA
GAPDH	F:AGAAGGCTGGGGCTCATTTG R:AGGGGCCATCCACAGTCTTC
U6	F:GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT R:CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT

1.13 Western blotting实验检测癌组织和细胞中TRIP13的表达水平

取前列腺癌及癌旁组织或转染后PC3细胞,加入RIPA裂解液及蛋白酶抑制剂提取组织或细胞中总蛋白。BCA法进行蛋白定量,SDS-PAGE分离蛋白,采用湿转法将分离蛋白转至PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭2 h,分别加入TRIP13(1:500)、GAPDH(1:1 000)一抗, 4°C 过夜,加入辣根酶标记的二抗(1:5 000)室温孵育1 h,以ECL发光液显影。Image J软件测定条带灰度值。

1.14 裸鼠成瘤模型观察LINC00308对PC3细胞移植瘤的影响

将pcDNA3.1-LINC00308及空载体pcDNA3.1-NC转染的PC3细胞,以G418培养基筛选后获得稳定表达PC3细胞株。取稳转pcDNA3.1-NC/LINC00308的PC3细胞与转染2'-OMe修饰的si-NC及si-LINC00308的PC3细胞,制备成 1×10^7 个/ml的细胞悬液。取200 μl 细胞悬液分别接种于4周龄的BALB/c裸鼠的右上肢腋下,并将裸鼠分为si-LINC00308组、si-NC组、pcDNA3.1-LINC00308组及pcDNA3.1-NC组(每组5只),接种30 d后脱颈处死荷瘤小鼠,计算肿瘤体积(肿瘤体积=肿瘤最短径 $^2 \times$ 肿瘤最长径/2)并称其质量。

1.15 统计学处理

采用SPSS 19.0和GraphPad Prism 5.0统计分析。上述各项实验均重复3次。符合正态分布的计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用One-way ANOVA的Dunnett's或Bonferroni's多重比较进行分析;两分类的计数资料间差异比较采用 χ^2 检验进行分析;利用Pearson's法检验LINC00308与TRIP13 mRNA的相关性。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LINC00308与TRIP13在前列腺癌组织及细胞系中均呈高表达

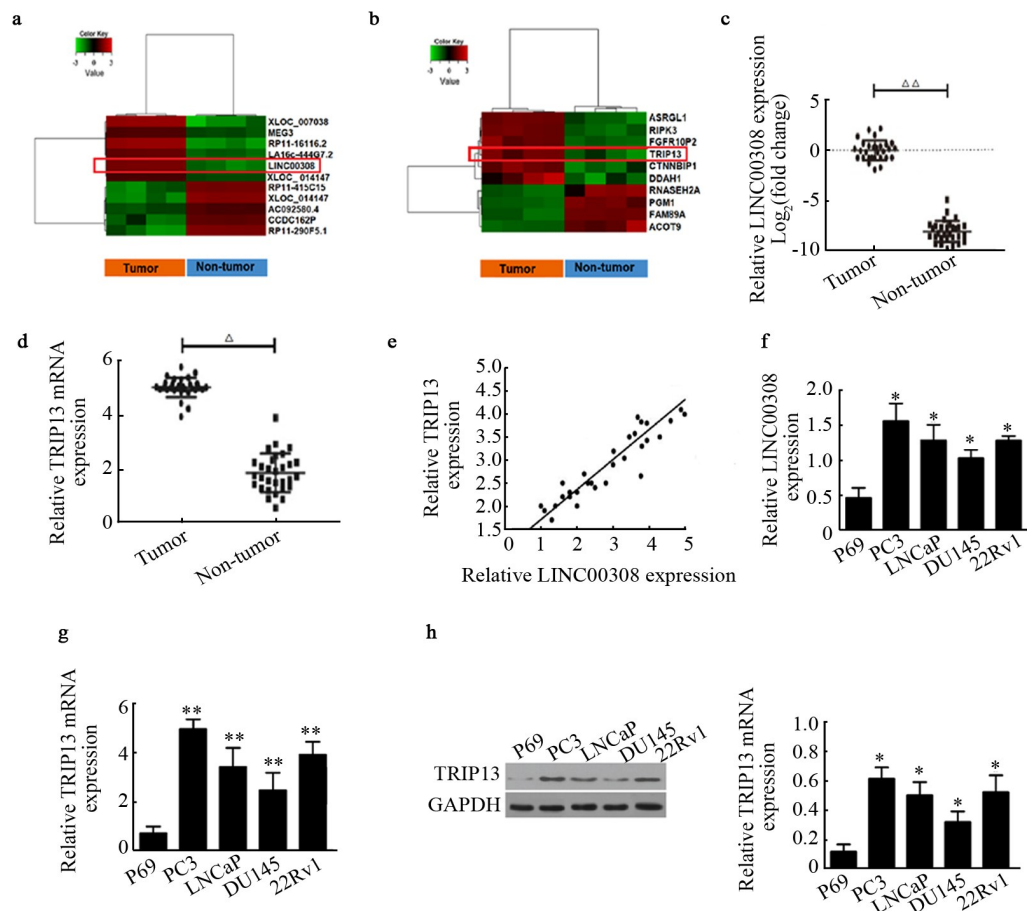
lncRNA和mRNA芯片表达谱的分层聚类分析表明,与癌旁组织相比,4例前列腺癌组织中有11种lncRNA和10种mRNA的表达差异最为显著(图1a、b),其中LINC00308是前列腺癌组织中上调最为明显的lncRNA。qPCR检测LINC00308及TRIP13 mRNA表达结果显示,与前列腺癌旁组织相比,30例前列腺癌组织中两者的表达显著增加,与芯片的结果一致;Pearson相关性分析显示,在30例前列腺癌与癌旁组织中,LINC00308及TRIP13 mRNA表达呈明显正相关($r=0.4712$, $P < 0.05$;图1e)。应用qPCR及Western blotting检测结果显示,与P69细胞相比,前列腺癌细胞系PC3、LNCaP、DU145、22Rv1细胞中LINC00308及TRIP13 mRNA与蛋白表达均显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图1f-h)。

2.2 LINC00308在体外对前列腺癌细胞增殖、迁移及侵袭功能及TRIP13表达影响

选择LINC00308表达最高的PC3细胞进行后续研究。qPCR实验显示,转染pcDNA3.1-LINC00308后细胞中LINC00308表达明显增加($P < 0.01$,图2a),而转染si-LINC00308后细胞中LINC00308表达显著

降低 ($P < 0.01$, 图 2b)。MTT 及平板克隆实验结果显示, 转染 pcDNA3.1-LINC00308 后细胞的增殖能力显著增加 ($P < 0.05$), 而转染 si-LINC00308 后细胞的增殖能力明显减低 ($P < 0.05$, 图 2c-e)。Transwell 迁移及侵袭实验结果表明, 转染 pcDNA3.1-LINC00308 后细胞侵袭、迁移能力显著增加 (均 $P < 0.05$), 而转染

si-LINC00308 后细胞的侵袭、迁移能力明显减低 ($P < 0.05$, 图 2f、g)。结果还表明, 转染 pcDNA3.1-LINC00308 后细胞中 TRIP13 mRNA 及蛋白表达显著增加, 而转染 si-LINC00308 后中 TRIP13 mRNA 及蛋白表达明显减少 (均 $P < 0.05$, 图 2h、i)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs P69 cells; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Non-tumor group

a-b: The results of heatmap for lncRNA and mRNA abnormally expressed in 4 pairs of prostate cancer and adjacent tissues (each column represents a tissue sample, in which the red band represents the increase in expression, and the green band represents the decrease in expression); c-d: The mRNA expressions of LINC00308 and TRIP13 in 30 pairs of prostate cancer and adjacent tissues; e: The spearman correlation analysis of LINC00308 and TRIP13 mRNA expression in 30 cases of prostate cancer; f: The expression level of LINC00308 in prostate cancer cell lines; g-h: The protein expression level of TRIP13 protein and mRNA in prostate cancer cell lines

图 1 LINC00308 与 TRIP13 在前列腺癌组织及细胞系中的表达水平

Fig.1 The expression levels of LINC00308 and TRIP13 in prostate cancer tissues and cell lines

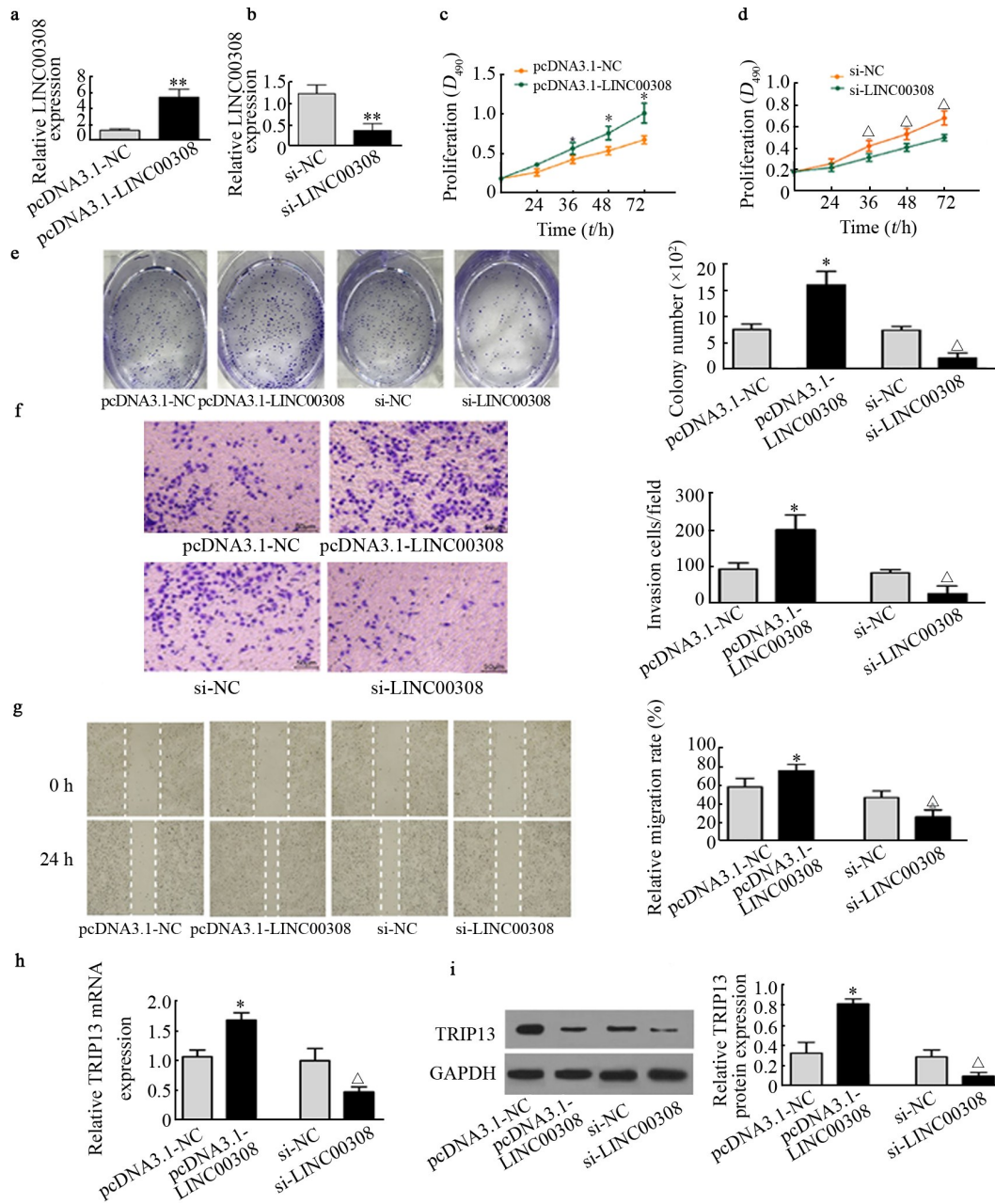
2.3 LINC00308 对前列腺癌 PC3 细胞成瘤能力及其癌组织中 TRIP13 表达的影响

裸鼠体内成瘤实验结果显示, pcDNA3.1 LINC00308 可显著促进 PC3 细胞在裸鼠体内的成瘤能力, 而 si-LINC00308 能够显著抑制 PC3 细胞在裸鼠体内的成瘤能力 (均 $P < 0.05$, 图 3a、b)。Western blotting 检测结果表明, pcDNA3.1 LINC00308 组裸鼠体内 TRIP13 表达显著增加, 而 si-LINC00308 组裸鼠体内 TRIP13 表达显著降低 (均 $P < 0.05$, 图 3c)。免疫组

化结果显示, 在移植瘤组织中 TRIP13 表达显著高于移植瘤旁组织 ($P < 0.05$, 图 3d)。

2.4 miR-361-5p 在前列腺癌细胞内靶向调节 LINC00308/TRIP13 表达

TargetScan 在线数据库预测显示, miR-361-5p 分别与 LINC00308 及 TRIP13 具有潜在结合位点 (图 4a、c)。双荧光素酶报告实验结果表明, 在 PC3 细胞中与转染 NC mimic+LINC00308-WT 相比, 转染 miR-361-5p mimic+LINC00308-WT 时, 细胞的荧光素酶



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pcDNA3.1-NC; ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs si-NC

a-b: The transfection efficiencies of pcDNA3.1-LINC00308 and si-LINC00308 in PC3 cells were confirmed by qPCR; c-e: The effects of overexpression or inhibition of LINC00308 on PC3 cell proliferation; f-g: The effects of overexpression or inhibition of LINC00308 on invasion and migration of PC3 cells($\times 100$); h-i: The effects of overexpression or inhibition of LINC00308 on the expression level of TRIP13 protein and mRNA in PC3 cells

图2 LINC00308通过影响TRIP13表达介导前列腺癌细胞增殖、迁移及侵袭功能

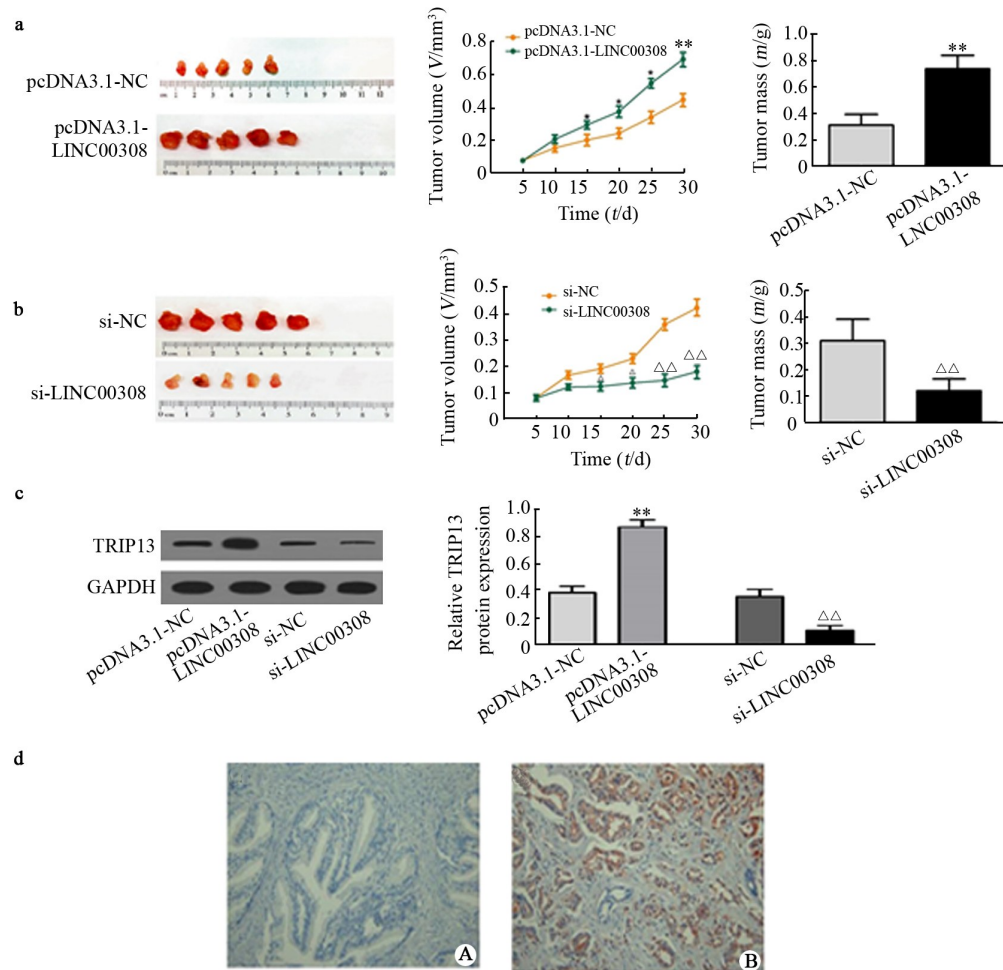
Fig.2 LINC00308 mediated the proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells by affecting TRIP13 expression

活性受到明显抑制, 而转染 miR-361-5p mimic+LINC00308-MUT, 以及转染 NC mimic+LINC00308-WT 或 NC mimic+LINC00308-MUT 时, 细胞荧光素酶活性无明显改变(图4b)。结果还表明, 在PC3细胞中转染 miR-361-5p mimic+TRIP13-WT 的荧光素酶活性显著低于其他共转染组细胞(图4d)。为进一步验证 miR-361-5p 能够在细胞水平上与 LINC00308 相互作用, 又利用 GFP 特异性抗体进行 RIP 实验进行检测, 结果显示与不表达 LINC00308 的 MS2 的 PC3

细胞相比, 转染 MS2-LINC00308-WT 质粒的细胞中 GFP 抗体可富集 miR-361-5p 的趋势显著升高($P < 0.05$), 而突变掉 miR-361-5p 结合位点的 MS2-LINC00308-MUT 富集 miR-361-5p 的趋势无明显变化($P > 0.05$, 图4e、f)。随后, 为进一步证实 LINC00308 与 miR-361-5p 在细胞水平上的内源性结合, 应用 Ago2-RIP 实验进行验证, 结果表明, PC3 细胞转染 miR-361-5p mimic 后可通过 Ago 与 LINC00308 结合(图4g), 提示 LINC00308 可能为 miR-361-5p 的“miRNA 海

绵”。PC3 细胞中共转靶基因的双荧光素酶基因报告实验探究 LINC00308 与 miR-361-5p 及 TRIP13 的相互作用机制,结果表明,与转染 pcDNA3.1 NC+pmir-GLO-TRIP13-WT 的 PC3 细胞相比,转染 pmirGLO-TRIP13-WT+pcDNA3.1-LINC00308 细胞的荧光素酶活性显著增高($P<0.05$),转染 pmirGLO-TRIP13-WT+miR-361-5p mimic 的细胞中荧光素酶活性明显降低

($P<0.05$),其他共转染细胞中的荧光素酶活性无明显改变($P>0.05$)。表明上调 LINC00308 可通过竞争性结合 miR-361-5p 而增加 TRIP13-WT 报告基因的荧光素酶活性,然而这种效应可被 miR-361-5p 的过表达所消除(图 4h)。上述实验结果说明,LINC00308 可作为 miR-361-5p 的 ceRNA 来调控 TRIP13 表达。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs pcDNA3.1-NC; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs si-NC

a-b: The effects of overexpression or knockdown of LINC00308 on tumor-forming ability of PC3 cells in nude mice; c: The effects of overexpression or knockdown of LINC00308 in PC3 cells on TRIP13 expression in nude mice; d: The expression of TRIP13 in tumor tissues and adjacent tissues of nude mice (A indicates the peritumoral tissues, B indicates the transplanted tumor tissues; immunohistochemistry, $\times 200$)

图3 LINC00308 促进裸鼠移植瘤的发生与增殖

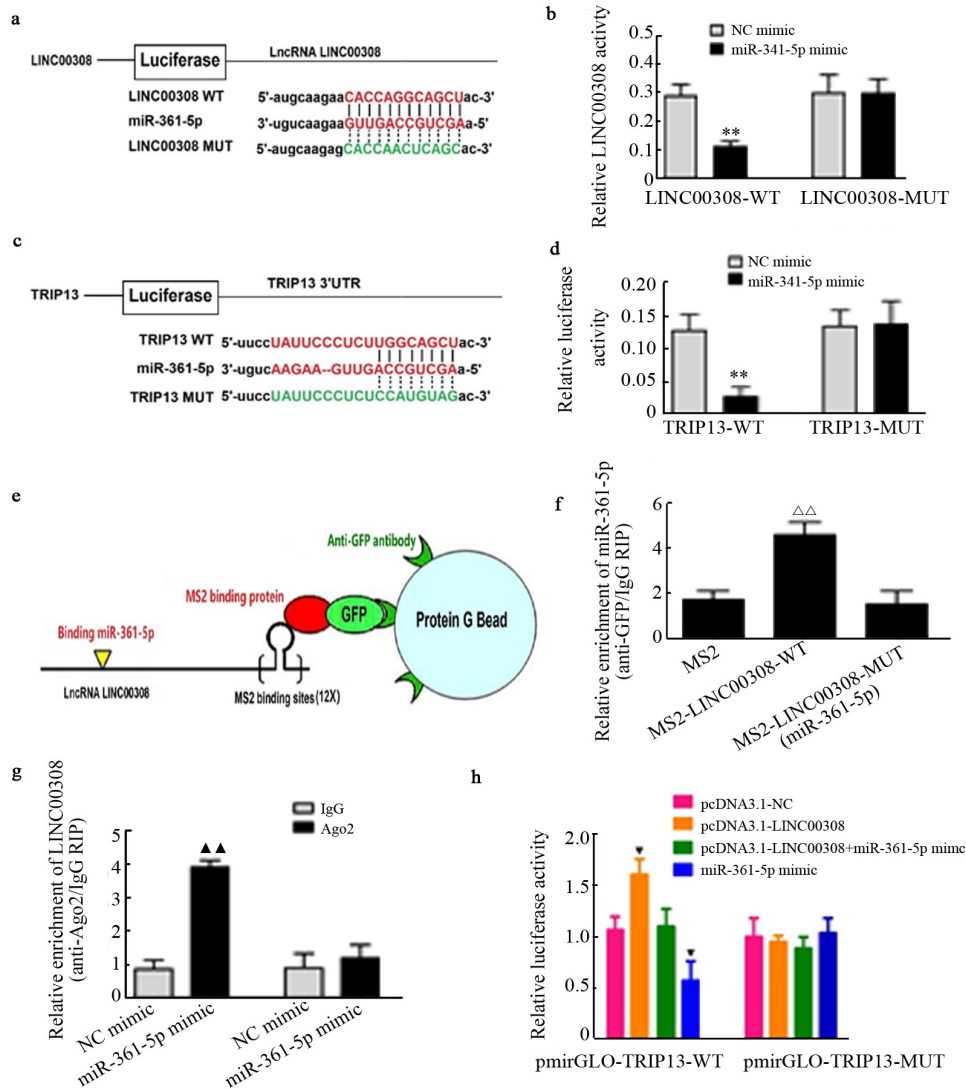
Fig.3 Linc00308 promoted tumorigenesis and proliferation of xenografts in nude mice

2.5 miR-361-5p 通过抑制 TRIP13 表达削弱 LINC00308 对前列腺癌细胞的增殖、侵袭的促进作用
在 PC3 细胞中同时转染 miR-361-5p 与 LINC00308 以验证 miR-361-5p 是否能够通过抑制靶基因 TRIP13 表达直接靶向削弱 LINC00308 对前列腺癌细胞的功能。平板克隆实验及 Transwell 侵袭实验结果表明,过表达 miR-361-5p 可显著抵消 PC3 细

胞中过表达 LINC00308 引起的细胞增殖与侵袭的促进作用($P<0.05$,图 5a、b),而 miR-361-5p inhibitor 减弱了 PC3 细胞中下调 LINC00308 介导的增殖与侵袭的抑制作用($P<0.05$,图 5c、d)。qPCR 与 Western blotting 实验结果表明,PC3 细胞中 miR-361-5p mimic 可显著抑制 TRIP13 的表达,而 miR-361-5p inhibitor 可显著促进 TRIP13 的表达($P<0.05$,图 5e、f)。最后,

与 pcDNA3.1 NC 相比, 在 PC3 细胞中同时过表达 miR-361-5p 与 LINC00308 后, TRIP13 表达显著降低; 且与单独转染过表达的 LINC00308 的 PC3 细胞相比, LINC00308 与 miR-361-5p 的同时过表达可以显

著降低 TRIP13 的表达, 而 si-LINC00308+miR-361-5p inhibitor 的共转染可逆转 si-LINC00308 诱导的 TRIP13 表达下调 ($P < 0.05$, 图 5g-j)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PC3 cells co-transfected with NC mimic+LINC00308-WT, or NC mimic+TRIP13-WT;
 $\Delta\Delta P < 0.01$ vs PC3 transfected with MS2; $\Delta P < 0.01$ vs IgG positive PC3 cells transfected with NC mimic;
 $\nabla P < 0.05$ vs PC3 cells co-transfected with pcDNA3.1-NC+pmirGLO-TRIP13-WT

a: Diagram of predicted binding sites of miR-361-5p and LINC00308; b: Double luciferase assay confirmed that miR-361-5p could inhibit LINC00308 expression in PC3 cells; c: The binding sites of miR-361-5p and TRIP13 were predicted by TargetScan online database; d: Double luciferase assay confirmed that miR-361-5p could inhibit the expression of TRIP 13 in PC3 cells; e: Schematic diagram of GFP-MS2-RIP; f: The endogenous binding of LINC00308 to miR-361-5p was detected by GFP-RIP and qPCR; g: The endogenous binding of miR-361-5p to LINC00308 was detected by Ago2-RIP combined with qPCR; h: Double luciferase reporter assay confirmed that miR-361-5p could bind to 3'-UTR of LINC00308 and TRIP13 respectively

图4 miR-361-5p在前列腺癌细胞内靶向调节LINC00308/TRIP13表达

Fig.4 miR-361-5p regulated the expression of LINC00308/TRIP13 in prostate cancer cells

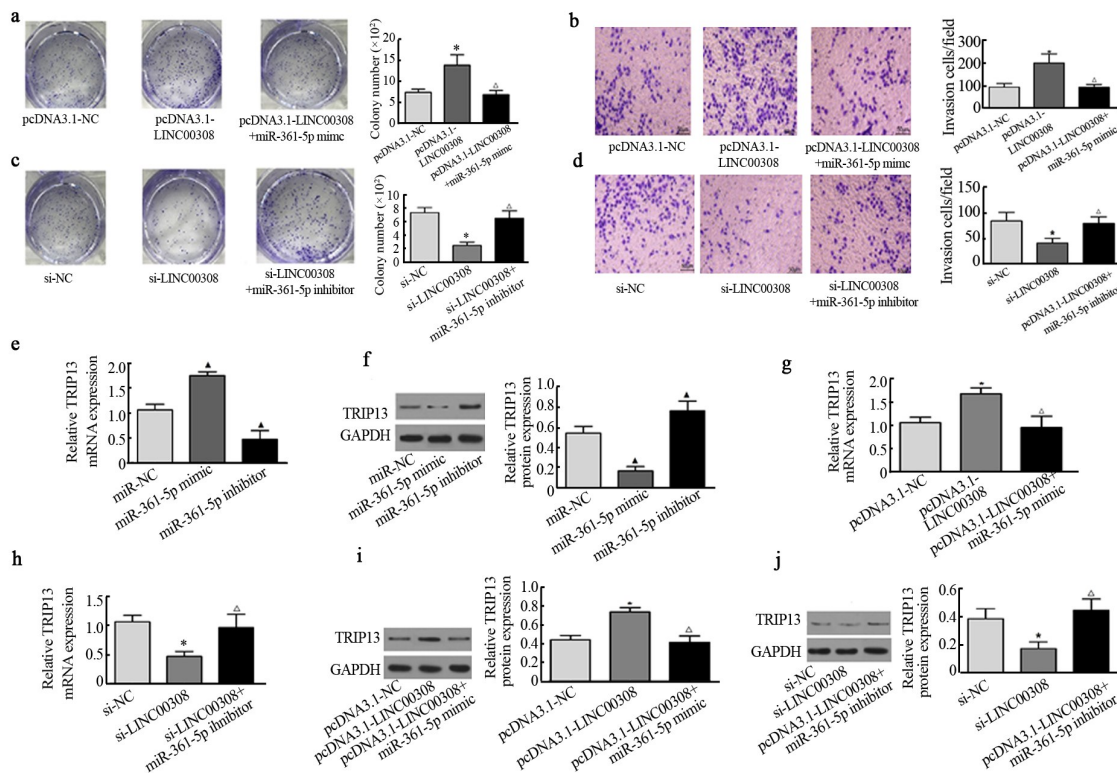
3 讨论

lncRNA 作为近年来肿瘤领域中研究的热点, 其在多种肿瘤组织中表达异常。如 lncRNA HOTAIR

可通过下调 miR-206 促进卵巢癌细胞的增殖、侵袭及转移^[18]; lncRNA AK001058 能够调控 ADAMTS12 甲基化促进结肠癌细胞增殖及转移^[19]。然而在前列腺癌中, lncRNA 研究目前尚少, 故其在前列腺癌的发

生发展中的作用机制值得探究。本课题研究发现 lncRNA LINC00308 在前列腺癌组织中的表达显著高于癌旁对照组织, 与 JIANG 等^[6]的研究结果一致。还发现 TRIP13 mRNA 同时在前列腺癌组织中表达也上调, 与 DONG 等^[17]研究相符。用 Pearson 相关分析显示, LINC00308 与 TRIP13 在前列腺癌组织中的表达呈正相关。又证实 LINC00308 与 TRIP13 在前列腺癌细胞系 PC3、LNCaP、DU145、22Rv1 中的表达均显著升高。本研究还发现, 在前列腺癌细胞 PC3 中过表达 LINC00308 可显著促进细胞的增殖、侵袭及迁移, 而下调 PC3 细胞中 LINC00308 具有相反的作用; 上调或下调 PC3 细胞中的 LINC00308 可引起 TRIP13

表达的相同趋势变化。裸鼠移植瘤实验同样证实, 上调或下调 LINC00308 可促进或抑制 PC3 的成瘤能力, 且在体移植瘤组织中 TRIP13 的表达与 LINC00308 表达趋势一致。以上结果提示 LINC00308 能通过某种作用机制在体内影响前列腺癌中 TRIP13 的表达而促进肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移能力。为探究其可能机制, 利用生物信息学技术分析表明, miR-361-5p 与 LINC00308 及 TRIP13 具有潜在结合位点, 相关实验分别验证了 miR-361-5p 能够直接靶向结合 LINC00308 与 TRIP13 的 3'UTR 区域, 进而抑制两者的表达。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PC3 transfected with pcDNA3.1-NC or si-NC; Δ Δ $P < 0.05$ vs PC3 transfected with pcDNA3.1-LINC00308 or si-LINC00308; $\blacktriangle\blacktriangle$ $P < 0.01$ vs PC3 transfected with miR-NC;

a-b: The effects of overexpression of miR-361-5p and LINC00308 on the proliferation and invasion of PC3 cells($\times 100$); c-d: Knockdown of miR-361-5p and LINC00308 on proliferation and invasion of PC3 cells($\times 100$); e-f: The effects of overexpression or knockdown of miR-361-5p on the expression of TRIP13 protein and mRNA; g-h: The effects of overexpression or knockdown of LINC00308 on the expression of TRIP13 mRNA; i-j: The effects of overexpression or knockdown of miR-361-5p and LINC00308 on the on the expression of TRIP13.

图5 miR-361-5p通过抑制TRIP13表达削弱LINC00308对前列腺癌细胞增殖、侵袭的促进作用
Fig.5 miR-361-5p attenuated the effect of LINC00308 on the proliferation and invasion of prostate cancer cells by inhibiting the expression of TRIP13

研究表明, LncRNA 与 miRNA 之间相互作用机制主要有 3 种: miRNA 结合并降解 lncRNA, lncRNA 截短并生成 miRNA 及 lncRNA 作为 miRNA 海绵 (miRNA sponge) 结合并吸附 miRNA^[20]。为深入探究 miR-361-5p 与 LINC00308 之间的相互作用机制, 本

课题又通过 RIP 实验证实 miR-361-5p 能够与 LINC00308 在细胞水平上进行内源性结合, 且 LINC00308 可能作为 miR-361-5p 的“天然海绵”发挥上述作用。应用共转染靶基因的双荧光素酶基因报告实验进一步证实 PC3 细胞中过表达 LINC00308

可通过竞争性结合内源性 miR-361-5p 而促进 TRIP13 的表达,然而这种效应能够被 miR-361-5p 的过量表达所消除。本研究结果与 lncRNA ZFS1 可作为 miR-150 的“天然海绵”调控其下游靶基因 ZEB1、MMP4、MMP16 的表达,进而促进肝癌的转移^[21]相类似。细胞增殖及侵袭实验实验结果表明,在 PC3 细胞中同时过表达或抑制 miR-361-5p 与 LINC00308 时,细胞增殖及侵袭能力均无明显改变,这在细胞的生物学行为上证实了上述推测。然而既往研究^[17]表明,前列腺癌中高表达 TRIP13 通过调控 YWHAZ 及 EMT 相关基因的表达促进了肿瘤的进展。那么在 LINC00308/miR-361-RNA/TRIP13 轴中,其是否同样能够通过这种机制影响前列腺癌细胞的增殖、侵袭及迁移功能将在后续课题中进行探究。

综上,本课题发现在前列腺癌中异常高表达的 LINC00308 可以发挥 ceRNA 的功能来抑制 miR-361-5p 导致的 TRIP13 表达的上调,从而促进前列腺癌细胞的增殖、侵袭及迁移能力。研究结果表明, LINC00308 可能在前列腺癌的发生和发展中起潜在的促癌作用,而 LINC00308/miR-361-5p/TRIP13 轴有望作为前列腺癌的新型临床标志物和治疗靶点。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132. DOI:10.3322/caac.21338.
- [2] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1):7-34. DOI:10.3322/caac.21551.
- [3] SHI X, ZHANG W, NIAN X, et al. The previously uncharacterized lncRNA APP promotes prostate cancer progression by acting as a competing endogenous RNA[J]. *Int J Cancer*, 2020, 146(2): 475-486. DOI:10.1002/ijc.32422.
- [4] ZHANG H, WEI P, LV W, et al. Long noncoding RNA lnc-DILC stabilizes PTEN and suppresses clear cell renal cell carcinoma progression [J]. *Cell Biosci*, 2019, 81(9): 1-13. DOI:10.1186/s13578-019-0345-4.
- [5] YI T, ZHOU X, SANG K, et al. Activation of lncRNA lnc-SLC4A1-1 induced by H3K27 acetylation promotes the development of breast cancer via activating CXCL8 and NF-kB pathway[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1):3765-3773. DOI: 10.1080/21691401.2019.1664559.
- [6] JIANG T, GUO J, HU Z, et al. Identification of Potential Prostate Cancer-Related Pseudogenes Based on Competitive Endogenous RNA Network Hypothesis[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:4213-4239. DOI:10.12659/MSM.910886.
- [7] KHAN S, AYUB H, KHAN T, et al. MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer [J]. *Biochimie*, 2019, 167:12-24. DOI:10.1016/j.biochi.2019.09.001.
- [8] SUBRAMANIAM S, JEET V, CLEMENTS JA, et al. Emergence of MicroRNAs as key players in cancer cell metabolism[J]. *Clin Chem*, 2019, 65(9):1090-1101. DOI:10.1373/clinchem.2018.299651.
- [9] QIAN B, ZHANG D, TAO R, et al. MiR-361-5p exerts tumor-suppressing functions in gastric carcinoma by targeting syndecan-binding protein[J]. *Anticancer Drugs*, 2020, 31(2): 131-140. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000846.
- [10] HAN J, YU J, DAI Y, et al. Overexpression of miR-361-5p in triple-negative breast cancer (TNBC) inhibits migration and invasion by targeting RQCD1 and inhibiting the EGFR/PI3K/Akt pathway[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2019, 19(1):52-59. DOI:10.17305/bjbm.2018.3399.
- [11] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?[J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358. DOI:10.1016/j.cell.2011.07.014.
- [12] SHA Q K, CHEN L, XI J Z, et al. Long non-coding RNA LINC00858 promotes cells proliferation, migration and invasion by acting as a ceRNA of miR-22-3p in colorectal cancer[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1057-1066. DOI: 10.1080/21691401.2018.1544143.
- [13] ZHANG R, GUO Y, MA Z, et al. Long non-coding RNA PTENP1 functions as a ceRNA to modulate PTEN level by decoying miR-106b and miR-93 in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 26079-26089. DOI:10.18632/oncotarget.15317.
- [14] SARANGI P, CLAIRMONT CS, D'ANDREA AD. Disassembly of the shieldin complex by TRIP13[J]. *Cell Cycle*. 2020, 19(13):1565-1575. DOI:10.1080/15384101.2020.1758435.
- [15] BANERJEE R, RUSSO N, LIU M, et al. TRIP13 promotes error-prone nonhomologous end joining and induces chemoresistance in head and neck cancer[J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 1375-1388. DOI:10.1038/ncomms5527.
- [16] WANG Y, HUANG J, LI B, et al. A small-molecule inhibitor targeting TRIP13 suppresses multiple myeloma progression[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(3):536-548. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-18-3987.
- [17] DONG L, DING H, LI Y, et al. TRIP13 is a predictor for poor prognosis and regulates cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 121: 200-206. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.168.
- [18] CHANG L, GUO R, YUAN Z, et al. LncRNA HOTAIR regulates CCND1 and CCND2 expression by sponging miR-206 in ovarian cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(4): 1289-1303. DOI: 10.1159/000493408
- [19] ZHENG S, LIN F, ZHANG M, et al. AK001058 promotes the proliferation and migration of colorectal cancer cells by regulating methylation of ADAMTS12[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9): 5869-5878. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.118
- [20] YOON J H, ABDELMOHSEN K, GOROSPE M. Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 34: 9-14. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.05.015.
- [21] LI T, XIE J, SHEN C, et al. Amplification of long noncoding RNA ZFAS1 promotes metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15): 3181-3191. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3721.

[收稿日期] 2020-04-11

[修回日期] 2020-08-11

[本文编辑] 韩丹