

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.004

LINC00519 通过 miR-876-3p/HMGA1 轴调控胃癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭

张丽柯, 汪建光, 景东帅, 雷亮亮, 刘德纯(河南科技大学临床医学院暨河南科技大学第一附属医院 胃肠外科, 河南 洛阳 471003)

[摘要] **目的:**探讨长基因间非编码RNA 00519(long intergene non-coding RNA 00519, LINC00519)调控 miR-876-3p/高迁移率家族蛋白 A1(high mobility group protein A1, HMGA1)轴在胃癌 HGC-27 细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭中的作用。**方法:**采用 qPCR 检测胃癌细胞 HGC-27 和胃黏膜上皮细胞 GES-1 中 LINC00519 的表达水平。将 HGC-27 细胞按转染处理分为 si-NC、si-LINC00519、si-LINC00519+anti-miR-NC 和 si-LINC00519+anti-miR-876-3p 组,采用集落形成实验检测细胞克隆形成能力,流式细胞术检测细胞凋亡和周期分布,Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭。双荧光素酶报告实验和 qPCR 验证 LINC00519 与 miR-876-3p、miR-876-3p 与 HMGA1 之间的相互作用。**结果:**HGC-27 细胞中 LINC00519 表达较 GES-1 细胞显著升高($P<0.05$),转染 siRNA 后 si-LINC00519 组 HGC-27 细胞中 LINC00519 的表达水平较 si-NC 组显著降低($t=47.294, P<0.01$)。与 si-NC 组比较,si-LINC00519 组 HGC-27 细胞克隆数、迁移侵袭数、S 期细胞比例均显著降低(均 $P<0.01$),凋亡率、G0/G1 期细胞比例均显著升高(均 $P<0.01$)。与 si-LINC00519+anti-miR-NC 组比较,si-LINC00519+anti-miR-876-3p 组 HGC-27 细胞克隆数、迁移侵袭数、S 期细胞比例升高(均 $P<0.01$),凋亡率、G0/G1 期细胞比例显著降低(均 $P<0.01$)。LINC00519 能够靶向负调控 miR-876-3p 的表达,miR-876-3p 靶向负调控 HMGA1 的表达。**结论:**敲降 LINC00519 能够通过调控 miR-876-3p/HMGA1 轴抑制胃癌 HGC-27 细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡。

[关键词] LINC00519; miR-876-3p; 高迁移率蛋白 A1; 胃癌; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R730.54; R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)06-0574-08

LINC00519 regulates the proliferation, apoptosis, migration and invasion of gastric cancer cells through the miR-876-3p/HMGA1 axis

ZHANG Like, WANG Jianguang, JING Dongshuai, LEI Liangliang, LIU Dechun (Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology; School of Clinical Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of long intergene non-coding RNA 00519 (LINC00519) on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of gastric cancer HGC-27 cells by regulating the miR-876-3p / high mobility group protein A1 (HMGA1) axis. **Methods:** The expression levels of LINC00519 in gastric cancer HGC-27 cells and gastric mucosal epithelial GES-1 cells were detected by qPCR. HGC-27 cells were divided into si-NC, si-LINC00519, si-LINC00519+anti-miR-NC, and si-LINC00519 + anti-miR-876-3p groups according to transfection treatment. Colony formation test was applied to detect cell cloning ability; Flow cytometry was used to detect apoptosis and cell cycle distribution; Transwell assay was selected to measure cell migration and invasion. Dual luciferase reporter gene assay and qPCR were applied to confirm the interaction between LINC00519 and miR-876-3p as well as between miR-876-3p and HMGA1. **Results:** The expression of LINC00519 in HGC-27 cells was significantly higher than that in GES-1 cells ($P<0.05$). After siRNA transfection, the expression level of LINC00519 in HGC-27 cells of the si-LINC00519 group was significantly lower than that of the si-NC group ($t=47.294, P<0.01$). Compared with the si-NC group, the number of HGC-27 cell clones, the number of migrated and invaded cells, and proportion of S-phase cells in the si-LINC00519 group were significantly decreased (all $P<0.01$), while the apoptosis rate and the proportion of G0/G1 phase cells were significantly increased (all $P<0.01$). Compared with the si-LINC00519+anti-miR-NC group, the number of HGC-27 cell clones, the number of migrated and invaded cells, proportion of S-phase cells were significantly increased (all $P<0.01$), while the apoptosis rate and the proportion of G0/G1 phase

[作者简介] 张丽柯(1985—),男,硕士,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤的早期诊断与外科手术为基础的综合治疗相关研究, E-mail: mrdllc@163.com

[通信作者] 刘德纯(LIU Dechun, corresponding author), 博士,主任医师,主要从事胃肠道肿瘤的微创治疗及腹部疑难疾病的诊治相关研究, E-mail: 373929323@qq.com

cells in the si-LINC00519 + anti-miR-876-3p group were significantly decreased (all $P < 0.01$). LINC00519 could target and negatively regulate miR-876-3p expression. miR-876-3p could target and negatively regulate HMGA1 expression. **Conclusion:** Knocking down LINC00519 could inhibit the proliferation, migration and invasion of gastric cancer HGC-27 cells and induce apoptosis by regulating the miR-876-3p/HMGA1 axis.

[Key words] LINC00519; miR-876-3p; high mobility group protein A1(HMGA1); gastric cancer (GC); proliferation; apoptosis; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(6): 574-581. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.004]

近年来,胃癌已成为一种严重的公共卫生负担,每年导致超过70万人死亡^[1]。胃癌发病率地域差异较大,中国、韩国等亚洲国家发病率明显高于世界上的其他地区。虽然胃癌的治疗取得了迅速进展,但进展期胃癌患者的预后仍然很差,5年生存率低于25%^[2]。肿瘤细胞的侵袭和转移是导致癌症患者预后差的关键因素,但其潜在机制并不十分清楚。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度超过200个核苷酸、蛋白编码能力缺失的RNA转录本。据报道多种lncRNA在胃癌中表达失调,参与包括细胞生长、凋亡和迁移等细胞过程的调控^[3-4]。作为基因间型lncRNA,长基因间非编码RNA 00519(long intergene non-coding RNA 00519, LINC00519)位于染色体14q21.3位点,其在胃癌中表达上调,可能与胃癌发生和远端转移有关^[5]。然而,LINC00519在胃癌中作用和潜在机制仍有待阐明。生物信息学分析发现,LINC00519与miR-876-3p、miR-876-3p与高迁移率家族蛋白A1(high mobility group protein A1, HMGA1)之间存在结合位点,而miR-876-3p和HMGA1已被证实与胃癌肿瘤形成有关^[6-7]。因此,本研究以miR-876-3p/HMGA1轴为切入点,探讨LINC00519在胃癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭中的作用,以期胃癌治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

胃癌细胞HGC-27、胃黏膜上皮细胞GES-1购于中国科学院典型培养物保藏中心,;RPMI 1640培养基、胎牛血清、青链霉素双抗溶液均购于美国Hyclone公司;Lipofectamine 2000、Opti-MEM培养基购于美国Invitrogen公司;LINC00519小干扰RNA(si-LINC00519)及其阴性对照(si-NC)、miR-876-3p模拟物(mimic)及其阴性对照(miR-NC)、miR-876-3p抑制物(anti-miR-876-3p)及其阴性对照(anti-miR-NC)、荧光素酶报告质粒由上海吉玛制药公司提供;TRIzol试剂、PrimeScript RT试剂盒、SYBR Premix Ex Taq II试剂盒购于大连TaKaRa生物技术公司;膜联蛋白-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒、兔抗人

磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、兔抗人Ki67抗体、兔抗人半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)抗体、兔抗人神经钙黏素(N-cadherin)抗体、鼠抗人上皮细胞钙粘蛋白(E-cadherin)抗体、山羊抗兔IgG、山羊抗鼠IgG购于上海碧云天生物技术研究所;Transwell小室、基质胶购于美国BD公司。

1.2 细胞培养

GES-1细胞、HGC-27细胞采用含有10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI-1640培养基在37℃、5% CO₂的湿润培养箱中培养。培养基每2天更换一次。显微镜下观察细胞生长状态,当细胞汇合达到80%~90%时,进行细胞传代培养。取对数期细胞进行后续实验。

1.3 细胞转染与实验分组

按照每孔 2×10^5 个HGC-27细胞的密度接种到6孔板,当细胞汇合度达到60%时按照Lipofectamine 2000试剂盒说明书进行转染。转染48 h时,按照qPCR步骤检测转染效果,合格后进行后续实验。根据转染载体不同将HGC-27细胞分为以下几组。si-NC组(转染si-NC)、si-LINC00519组(转染si-LINC00519)、miR-NC组(转染miR-NC)、miR-876-3p组(转染miR-876-3p mimic)、anti-miR-NC组(转染anti-miR-NC)、anti-miR-876-3p组(转染anti-miR-876-3p)、si-LINC00519+anti-miR-NC组(转染si-LINC00519和anti-miR-NC)、si-LINC00519+anti-miR-876-3p组(转染si-LINC00519和anti-miR-876-3p)。

1.4 qPCR检测LINC00519的表达

采用TRIzol试剂提取GES-1细胞和各组HGC-27细胞总RNA。采用PrimeScript RT试剂盒进行逆转录,以cDNA为模板,参照SYBR Premix Ex Taq II试剂盒说明书进行qPCR反应。引物序列如下:LINC00519上游引物GACACAACCACAGTTGGCAG,下游引物ACCGTTTTCTCAGTGAGCTG;GAPDH上游引物5'-TGTTTCGTCATGGGTGTGAAC-3',下游引物5'-ATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'。miR-876-3p上游引物5'-CTGTGGTGGTTTACAAAGTAAT-3',下游引物5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';HMGA1上游引物5'-AAGGGGCAGACCCAAAAA-3',下游引物

5'-TCCAGTCCCAGAAGGAAGC3'; U6 上游引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; 目的基因相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法表示。

1.5 克隆形成实验检测细胞增殖

按照每皿 200 个细胞的浓度分别接种 5 ml 细胞悬液到直径为 60 mm 的培养皿中, 使细胞分散均匀。细胞培养箱孵育 2~3 周, 当培养皿出现肉眼可见克隆时终止培养, 弃去培养液。磷酸盐缓冲液洗涤, 干燥后进行甲醇固定和吉姆萨染色, 显微镜下计数克隆数(大于 50 个细胞)。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡和周期分布

细胞周期检测:用 0.25% 胰蛋白酶消化转染 48 h 后的细胞, 并调整至 1×10^6 个/ml。取 1 ml 细胞悬液经 1 500 rpm 离心 10 min 获得细胞沉淀。加入预冷 70% 乙醇 4 °C 固定过夜。磷酸盐缓冲液洗涤后, 加入 500 μ l 含核糖核酸酶 A (RNase A) 的 PI 溶液中, 4 °C 避光孵育 30 min。流式细胞仪分析细胞周期分布情况。

细胞凋亡:结合缓冲液调整转染 48 h 后细胞密度为 1×10^6 个/ml 的单细胞悬液。分别取 5 μ l 的 Annexin FITC 和 5 μ l 的 PI 加入 100 μ l 细胞悬液中, 避光孵育 15 min, 补充 400 μ l 结合缓冲液后上机检测细胞凋亡率。Annexin V 阳性-PI 阴性为早期凋亡细胞, Annexin V 阳性-PI 阳性为晚期凋亡细胞。细胞凋亡率为早期凋亡率和晚期凋亡之和。

1.7 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭

迁移实验:转染 48 h 细胞悬浮在无胎牛血清的培养基中制备细胞悬液。将 200 μ l 细胞悬浮液加入 Transwell 上室, 将 500 μ l 含 20% 无胎牛血清的培养基添加到 24 孔板下腔室, 培养箱孵育 24 h, 用棉签擦拭上室中的细胞, 磷酸盐缓冲液冲洗 2~3 次。甲醇固定下室膜 20 min, 0.1% 结晶紫染色 30 min。倒置显微镜下观察细胞穿膜情况。侵袭实验时采用预先涂有基质凝胶的 Transwell 小室, 其余步骤与迁移实验一致。

1.8 双荧光素酶报告基因实验

将含有 miR-876-3p 预测野生型(wild type, WT) 结合位点或突变型(mutant type, MUT) 结合的位点的 LINC00519 或 HMGA1-3'-UTR 克隆到 pmirGLO 荧光素酶报告基因载体, 获得 WT-LINC00519、MUT-LINC00519、WT-HMGA1、MUT-HMGA1 报告质粒。将 miR-NC、miR-876-3p mimic 分别与报告质粒共转染至 HGC-27 细胞, 48 h 后, 使用双荧光素酶报告基因测定系统评估各组细胞荧光素酶活性。

1.9 WB 法检测 Ki67、caspase-3、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白的表达水平

提取各组细胞总蛋白。将适量蛋白与上样缓冲

液混合, 煮沸 5 min, 冷却至室温后按照每泳道 30 μ g 蛋白样品上样, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上后, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。将膜与 Ki67 抗体(1:1 000)、Caspase-3 抗体(1:1 000)、E-cadherin 抗体(1:500)和 N-cadherin 抗体(1:500)在 4 °C 条件下孵育过夜, 加入二抗, 室温孵育 1 h。添加增强型化学发光试剂在暗室进行显色。以目的基因灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值表示目的基因的相对表达水平。

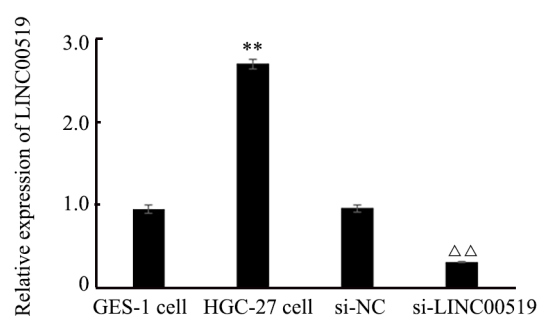
1.10 统计学处理

使用 SPSS20.0 软件进行统计分析, 本研究中每组设置 3 个平行实验并独立重复 3 次, 符合正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异分析采用 *t* 检验, 多组间差异分析采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LINC00519 在胃癌细胞中呈高表达

qPCR 检测结果显示, 胃癌细胞 HGC-27 中 LINC00519 的表达水平高于正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 ($t=67.988$, $P < 0.01$); 向 HGC-27 细胞转染 siRNA 后, 与 si-NC 组比较, si-LINC00519 组 HGC-27 细胞 LINC00519 表达水平显著降低 ($t=47.294$, $P < 0.01$), 证明成功构建了敲降 LINC00519 表达的 HGC-27 细胞(图 1)。



** $P < 0.01$ vs GES-1 cells; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs si-NC group

图 1 qPCR 检测 LINC00519 的表达

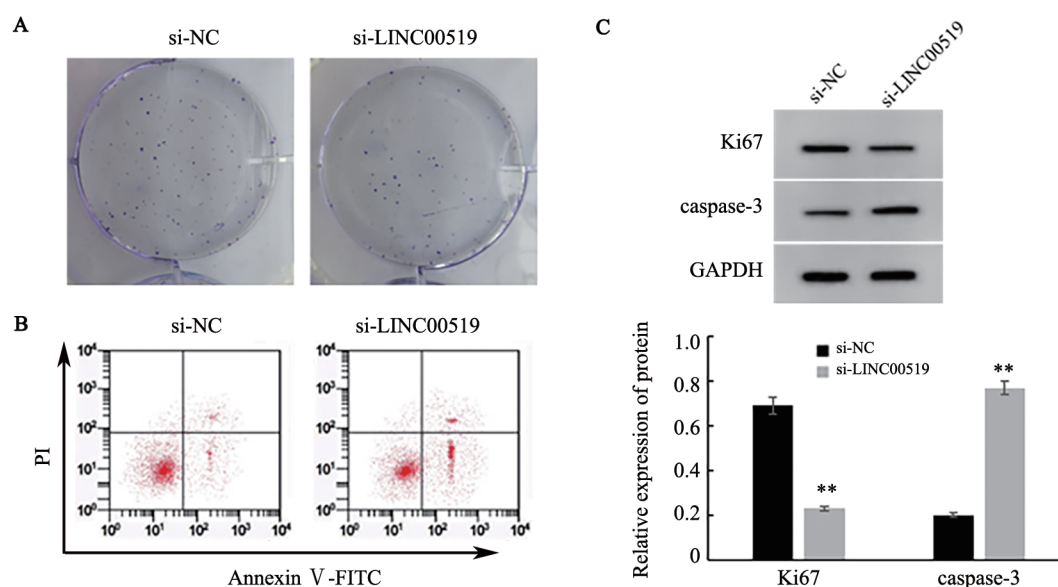
Fig.1 Expression of LINC00519 detected by qPCR

2.2 敲降 LINC00519 对 HGC-27 增殖凋亡的影响

克隆形成实验结果(图 2A)显示, 与 si-NC 组比较, si-LINC00519 组 HGC-27 细胞克隆数显著降低 [(42.85 \pm 3.10) vs (95.37 \pm 8.14) 个, $t=18.089$, $P < 0.01$]。流式细胞术检测结果(图 2B)显示, 与 si-NC 组比较, si-LINC00519 组 HGC-27 细胞的凋亡率显著升高 [(21.88 \pm 2.10)% vs (7.92 \pm 1.11)%, $t=17.631$, $P < 0.01$],

而 G0/G1 期细胞比例显著升高[(46.62±3.89)% vs (33.04±2.58)%], $t=8.728$, $P<0.01$]、S 期细胞比例显著降低[(21.06±4.31)% vs (34.35±3.12)%], $t=7.493$, $P<0.01$]。WB 法检测结果(图 2C)显示,与 si-NC 组比

较,si-LINC00519 组 HGC-27 细胞 Ki67 蛋白表达水平显著降低, caspase-3 蛋白表达水平显著升高(均 $P<0.01$)。



** $P<0.01$ vs si-NC group

图2 敲降LINC00519对HGC-27细胞克隆形成数(A)、凋亡(B)及Ki67、caspase-3蛋白表达(C)的影响

Fig.2 The effects of knocking down LINC00519 on clone formation (A), apoptosis (B) and protein expressions of Ki67 and caspase-3 (C) of HGC-27 cells

2.3 抑制LINC00519对HGC-27细胞迁移、侵袭的影响

Transwell 实验检测结果(图 3A)显示,与 si-NC 组比较,si-LINC00519 组 HGC-27 细胞迁移和侵袭数量显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。WB 检测结果(图 3B)显示,与 si-NC 组比较,si-LINC00519 组 HGC-27 细胞 N-cadherin 蛋白表达显著降低, E-cadherin 蛋白表达水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 LINC00519 靶向调控 miR-876-3p 表达

DIANA Tools 预测到 LINC00519 与 miR-876-3p 之间存在部分连续结合位点,见图 4。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与 miR-NC+WT-LINC00519 共转染组比较,miR-876-3p+WT-LINC00519 共转染组 HGC-27 细胞的荧光素酶活性显著下降($0.22±0.01$ vs $0.96±0.04$, $t=53.843$, $P<0.05$)；而 miR-NC+MUT-LINC00519 共转染组与 miR-876-3p+MUT-LINC00519 共转染组 HGC-27 细胞的荧光素酶活性差异无统计学意义($0.98±0.04$ vs $0.94±0.03$, $t=2.400$, $P>0.05$)。qPCR 检测结果显示,si-LINC00519 组 HGC-27 细胞 miR-876-3p 的表达水平显著高于 si-NC 组($2.82±0.06$ vs $0.95±0.03$, $t=83.629$, $P<0.05$)；而 si-LINC00519+anti-miR-876-3p 共转染组细胞中

miR-876-3p 的表达较 si-LINC00519+anti-miR-NC 组显著降低($1.49±0.03$ vs $2.82±0.07$, $t=52.391$, $P<0.01$)。

2.5 下调 miR-876-3p 表达逆转敲降 LINC00519 对 HGC-27 细胞增殖和凋亡的影响

克隆形成实验结果(图 5A)显示,与 si-LINC00519+anti-miR-NC 组比较,si-LINC00519+anti-miR-876-3p 组 HGC-27 细胞克隆数显著增加[(42.87±3.19) vs (78.31±5.41)个], $t=16.929$, $P<0.01$]。流式细胞术检测结果显示,与 si-LINC00519+anti-miR-NC 组比较,si-LINC00519+anti-miR-876-3p 组 HGC-27 细胞凋亡率显著降低[(11.15±1.74)% vs (21.87±2.24)%], $t=11.338$, $P<0.01$] (图 5B),同时 G0-G1 期细胞比例显著降低[(37.31±3.58)% vs (46.59±4.15)%], $t=5.080$, $P<0.01$]、S 期细胞比例显著升高[(21.04±4.55)% vs (30.07±3.06)%], $t=4.940$, $P<0.01$]。WB 检测结果(图 5C)显示,与 si-LINC00519+anti-miR-NC 组比较,si-LINC00519+anti-miR-876-3p 组 HGC-27 细胞 Ki67 蛋白表达水平显著升高, caspase-3 蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。

2.6 下调 miR-876-3p 表达逆转抑制 LINC00519 对 HGC-27 细胞迁移和侵袭的影响

Transwell 实验结果(图 6A)显示,与 si-LINC00519+

anti-miR-NC 组比较, si-LINC00519+ anti-miR-876-3p 组 HGC-27 细胞迁移 $[(122.25 \pm 9.87) \text{ vs } (74.07 \pm 5.41)]$ 个, $t=12.842, P<0.01$ 和侵袭 $[(108.35 \pm 10.02) \text{ vs } (56.72 \pm 5.90)]$ 个, $t=13.320, P<0.01$ 数量均显著增加。WB 检测结果(图 6B)显示, 与 si-LINC00519+anti-

miR-NC 组比较, si-LINC00519+ anti-miR-876-3p 组 HGC-27 细胞 N-cadherin 蛋白表达显著升高 $(0.51 \pm 0.03 \text{ vs } 0.21 \pm 0.01, t=28.460, P<0.01)$, E-cadherin 蛋白表达显著降低 $(P<0.01)$ 。

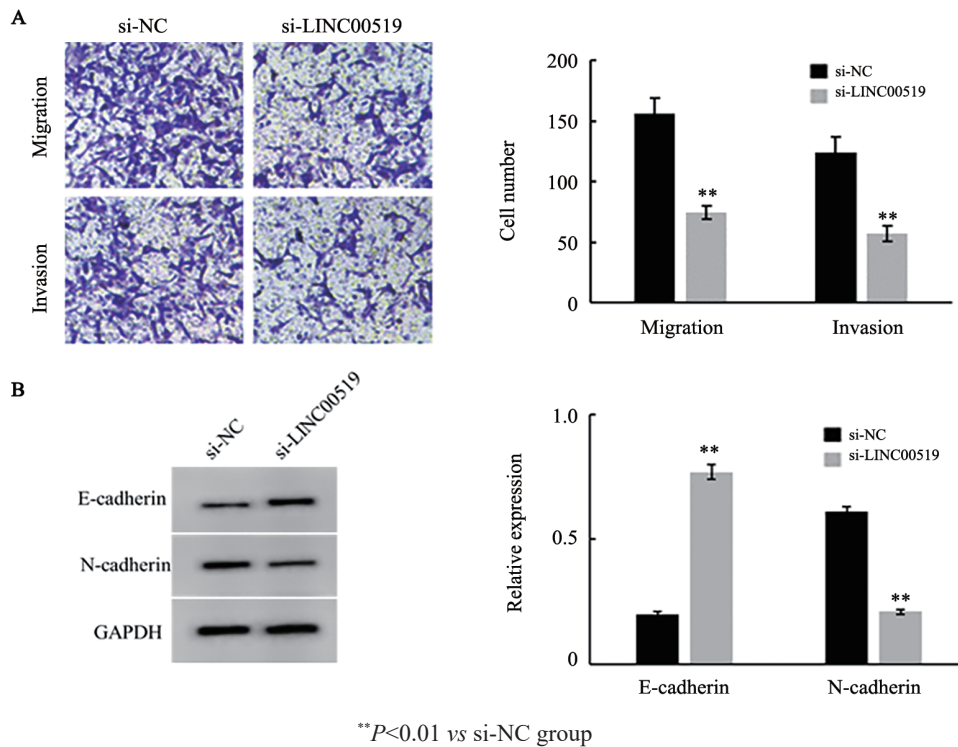


图3 敲降 LINC00519 表达对 HGC-27 细胞的迁移、侵袭(A)及 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达(B)的影响($\times 100$)
 Fig.3 The effect of LINC00519 knockdown on the migration, invasion (A) and the protein expressions of E-cadherin and N-cadherin (B) of HGC-27 cells($\times 100$)

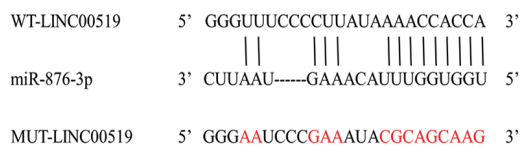


图4 LINC00519 与 miR-876-3p 的靶向结合位点
 Fig.4 The targeted binding sites between LINC00519 and miR-876-3p

2.7 miR-876-3p 靶向调控 HMGA1 表达

TargetsCan 预测到 HMGA1-3'-UTR 与 miR-876-3p 之间存在结合位点, 见图 7。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 与 miR-NC+WT-HMGA1 共转染组比较, miR-876-3p+WT-HMGA1 共转染组 HGC-27 细胞的荧光素酶活性显著下降 $(0.29 \pm 0.02 \text{ vs } 1.01 \pm 0.05, t=40.11, P<0.05)$; 与 miR-NC+MUT-HMGA1 共转染组比较, miR-876-3p+MUT-HMGA1 共转染组 HGC-27 细胞的荧光素酶活性无显著差异 $(P>0.05)$ 。qPCR 检测结果显示, miR-876-3p 组 HGC-27 细胞 HMGA1 mRNA 的表达水平显著低于 miR-NC 组, anti-miR-876-3p 组

HGC-27 细胞 HMGA1 mRNA 的表达水平显著高于 anti-miR-NC 组(均 $P<0.05$)。

3 讨论

胃癌是人类消化系统中最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率、病死率分别在全球恶性肿瘤中高居第四和第二位^[8]。由于早期缺乏特异性临床症状和生物标志物, 导致大量胃癌患者确诊时已处于晚期, 甚至发生远端转移。因此, 深入了解胃癌发生、转移的病理机制对制定有效的胃癌治疗策略至关重要。

lncRNA 作为遗传、表观遗传、转录、转录后基因调控的重要参与者, 近年来有大量文献报道了其在胃癌发生、转移和干细胞特性中的作用^[9]。研究显示, lncRNA MALAT1 通过靶向下调 miR-141-3p 对 ZEB1 的抑制作用, 进而促进 SGC7901 细胞侵袭、迁移及 EMT^[10]; lncRNA 核仁小分子宿主基因 12 (small nucleolar RNA host gene 12, SNHG12) 高表达与胃癌肿瘤大小、肿瘤细胞增殖能力呈正相关, 与患者总生存时间呈负相关^[11]; LOXL1 反义 RNA1 (LOXL1

antisense 1, LOXL1-AS1)在胃癌中表达上调,其高表达可诱导胃癌细胞增殖、迁移、上皮间质转化和干细胞特性,加速胃癌恶化^[12]。LINC00519作为一种新发现的lncRNA,目前其在肿瘤中的研究较少。本研究首次探讨LINC00519在胃癌中的生物学作用,结果显示,胃癌细胞HGC-27中LINC00519表达显著升高,这与杜娟等^[5]报道的胃癌中LINC00519表达上调的结论一致。功能实验表明,抑制LINC00519表达能够降低HGC-27细胞的克隆形成能力、迁移侵袭能力,减少S期细胞比例,增加G0/G1期细胞比例和细

胞凋亡率。Ki67是反应肿瘤细胞增殖活跃程度的重要指标,其表达水平与胃癌临床病理分期、淋巴结转移密切相关^[13]。E-cadherin是维持上皮细胞极性以及细胞间紧密连接的重要分子,E-cadherin表达缺失、N-cadherin表达增加可使细胞获得间质细胞表型,加速肿瘤的浸润和转移^[14-15]。抑制LINC00519表达后HGC-27细胞Ki67、E-cadherin表达显著降低,N-cadherin和凋亡执行蛋白caspase-3表达增加,与功能分析结果一致。以上研究说明LINC00519参与了胃癌的发生和转移。

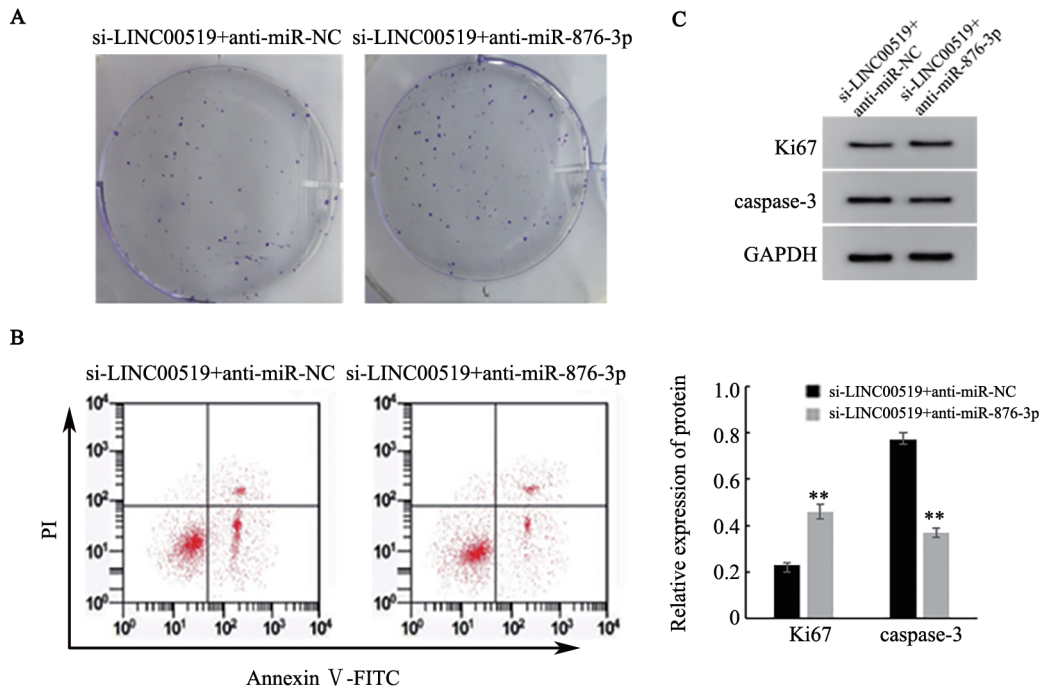


图5 下调miR-876-3p和LINC00519对HGC-27细胞克隆形成数(A)凋亡(B)及Ki67、caspase-3蛋白表达(C)的影响
 Fig.5 The effect of downregulation of miR-876-3p and LINC00519 on clone formation (A), apoptosis (B) and protein expressions of Ki67 and caspase-3 (C) of HGC-27 cell

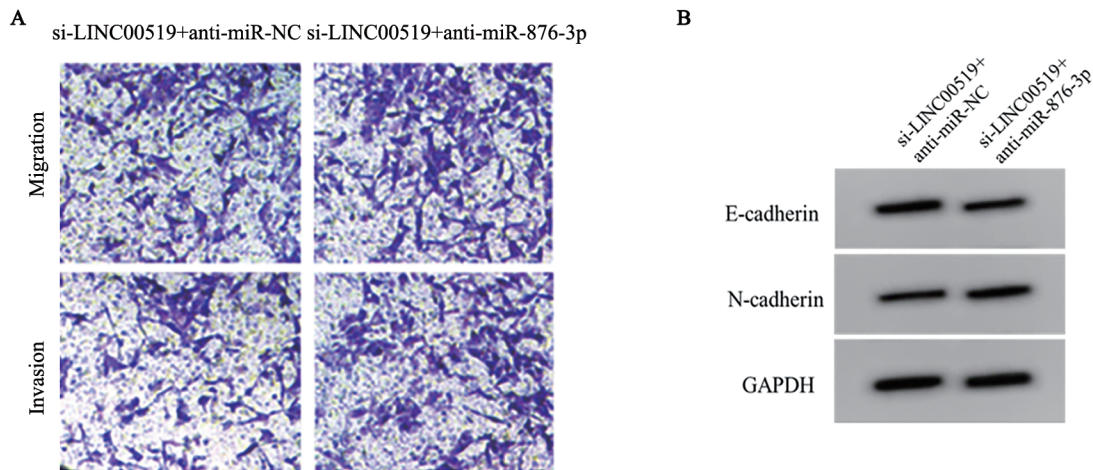
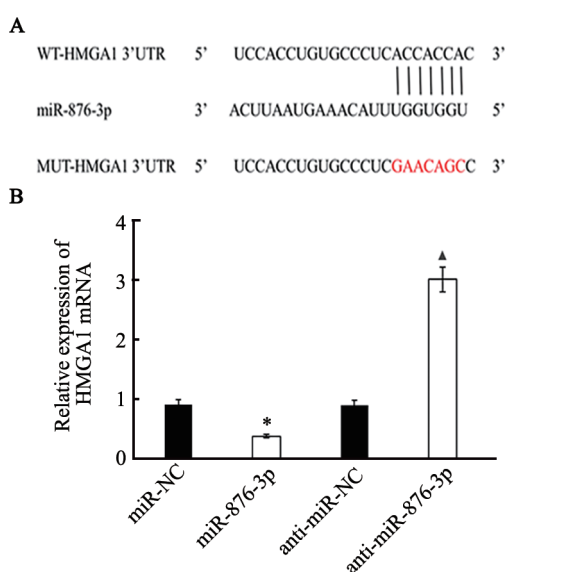


图6 抑制miR-876-3p能逆转抑制LINC00519对HGC-27迁移、侵袭(A)及蛋白表达(B)的影响(×100)
 Fig.6 Downregulation of miR-876-3p could reverse the effect of LINC00519 on clone formation (A) and protein expressions of E-cadherin and N-cadherin (C) of HGC-27 cells (×100)



* $P < 0.05$ vs miR-NC group; ^ $P < 0.05$ vs anti-miR-NC group

A: The binding site of miR-876-3p and HMGA1 gene;

B: Relative mRNA expression of HMGA1 detected by qPCR

图7 miR-876-3p 靶向调控 HMGA1 基因的表达

Fig.7 miR-876-3p targetedly regulated the expression of HMGA1 gene

研究^[6]显示, miR-876-3p 表达水平降低与胃癌患者顺铂耐药呈负相关, 与胃癌患者预后不良呈正相关, 过表达 miR-876-3p 可提高顺铂耐药的胃癌细胞的顺铂敏感性, 降低其干细胞特性。过表达 miR-876-3p 还可抑制胰腺癌细胞的生长, 并显著增加细胞凋亡^[16]。然而, miR-876-3p 在膀胱尿路上皮癌中呈高表达, 这可能与 miRNA 的组织特异性有关^[17]。本研究通过双荧光素酶报告实验证实, miR-876-3p 是 LINC00519 的靶基因, 且抑制 LINC00519 表达可上调 miR-876-3p 表达水平, 提示 LINC00519 可能靶向调控 miR-876-3p, 参与胃癌的发生和转移。恢复实验表明, 抑制 miR-876-3p 表达能够部分逆转抑制 LINC00519 对 HGC-27 细胞克隆、周期分布、凋亡以及迁移侵袭的影响, 这表明 LINC00519 在胃癌进展中的作用可能部分是通过调控 miR-876-3p 表达实现的。

HMGA1 作为一种细胞转录因子已被报道参与多种恶性肿瘤的发生发展。在胃癌中 HMGA1 表达上调与胃癌患者预后较差相关, 敲减 HMGA1 可抑制胃癌细胞增殖、侵袭和糖酵解^[18-20]。进一步研究发现, miR-876-3p 对 HMGA1 具有靶向负调控作用。基于以上结果, 推测 LINC00519 在胃癌中的致癌作用可能与调控 miR-876-3p/HMGA1 轴有关。

综上, 胃癌细胞中 LINC00519 呈高表达, 抑制 LINC00519 能够抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与调控 miR-876-3p/

HMGA1 轴有关, 这为胃癌发生提供了新的见解, 为胃癌治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] RUSSO A, LI P, STRONG V E. Differences in the multimodal treatment of gastric cancer: East versus west[J]. J Surg Oncol, 2017, 115(5): 603-614. DOI:10.1002/jso.24517.
- [3] ZHANG J J, HAN X, JIANG L, et al. LncRNA CERN2 is an independent predictor for clinical prognosis and is related to tumor development in gastric cancer[J/OL]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(12): 5783-5791[2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6963070/>.
- [4] 郭浩, 杨堃, 姜志荣, 等. lncRNA CASC2c 通过 ERK1/2 和 Wnt/ β -catenin 信号通路对胃癌细胞 SGC-7901 增殖及迁移的影响[J]. 精准医学杂志, 2018, 33(2): 155-158. DOI:10.13362/j.jpmed.201802016.
- [5] 杜娟, 陈亚妮, 史海燕, 等. 长链非编码 RNA LINC00519 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(4): 484-488. DOI:10.13753/j.issn.1007-6611.2019.04.020.
- [6] PENG C, HUANG K, LIU G, et al. MiR-876-3p regulates cisplatin resistance and stem cell-like properties of gastric cancer cells by targeting TMED3[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2019, 34(10): 1711-1719. DOI:10.1111/jgh.14649.
- [7] 朱海涛, 郑志超, 张剑军, 等. HMGA1 通过 Wnt/ β -Catenin 通路被诱导并维持胃癌细胞增殖[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(5): 511-513, 525. DOI:10.13381/j.cnki.cjm.201405004.
- [8] ZULUETA A, CARETTI A, SIGNORELLI P, et al. Resveratrol: a potential challenger against gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(37): 10636-10643. DOI: 10.3748/wjg.v21.i37.10636.
- [9] CAO Y, XIONG J B, ZHANG G Y, et al. Long noncoding RNA UCA1 regulates PRL-3 expression by sponging microRNA-495 to promote the progression of gastric cancer[J/OL]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19: 853-864[2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6992896/>. DOI:10.1016/j.omtn.2019.10.020.
- [10] 王辉, 郑晓, 张蕾, 等. lncRNA MALAT1/miR-141-3p/ZEB1 分子轴调控胃癌 SGC7901 细胞的侵袭、迁移及上皮间质转化[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(8): 888-895.
- [11] YANG B F, CAI W, CHEN B. LncRNA SNHG12 regulated the proliferation of gastric carcinoma cell BGC-823 by targeting microRNA-199a/b-5p[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(5): 1297-1306. DOI:10.26355/eurrev_201803_14471.
- [12] 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/OL]. Cell Prolif, 2019, 52(6): e12687 [2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6869681/>. DOI:10.1111/cpr.12687.
- [13] 季斌斌, 封凯, 董昊晨, 等. Ki67 基因的表达水平与胃癌淋巴结转移相关性的 Meta 分析[J]. 内蒙古医学杂志, 2019, 51(12): 1428-1431. DOI:10.16096/J.cnki.nmgxyzz.2019.51.12.008.
- [14] 董海峰, 郑英斌, 庞志刚, 等. E-钙黏蛋白与波形蛋白在胃癌中的

- 表达及意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(6): 580-582. DOI:10.13507/j.issn.1674-3474.2018.06.018.
- [15] CAO Z Q, WANG Z, LENG P. Aberrant N-cadherin expression in cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109320. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109320.
- [16] YANG F, ZHAO W J, JIA C L, et al. MicroRNA-876-3p functions as a tumor suppressor gene and correlates with cell metastasis in pancreatic adenocarcinoma via targeting JAG2[J/OL]. Am J Cancer Res, 2018, 8(4): 636-649[2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5934554/>.
- [17] 程文, 高建平, 张征宇, 等. II级膀胱尿路上皮癌microRNA差异表达及意义[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(1): 48-52. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2010.01.018.
- [18] JIN G H, SHI Y, TIAN Y, et al. HMGA1 accelerates the malignant progression of gastric cancer through stimulating EMT[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(7): 3642-3647.
- [19] CAO X P, CAO Y, ZHAO H, et al. HMGA1 promoting gastric cancer oncogenic and glycolytic phenotypes by regulating c-myc expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 516(2): 457-465. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.06.071.
- [20] WANG J Y, LV B J, SU Y H, et al. Exosome-mediated transfer of lncRNA HOTTIP promotes cisplatin resistance in gastric cancer cells by regulating HMGA1/miR-218 axis [J/OL]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 11325-11338[2021-06-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31908497/>. DOI: 10.2147/OTT.S231846.
- [收稿日期] 2021-01-24 [修回日期] 2021-03-22
[本文编辑] 黄静怡