

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.09.002

LINC01503 通过 miR-342-3p/IGF2R 轴促进上皮性卵巢癌的进展

吕微^{1a}, 王佳丽^{1a}, 刘天旭^{1a}, 段玉青^{1a}, 王俊², 刘丽华^{1a,1b,1c} (1. 河北医科大学第四医院 a. 肿瘤免疫治疗科; b. 河北省肿瘤研究所; c. 国际合作研究干细胞实验室, 河北 石家庄 050011; 2. 山东第一医科大学第一附属医院 肿瘤内科, 山东 济南 250014)

[摘要] **目的:** 探讨 LINC01503 在上皮性卵巢癌(EOC)中的表达水平和生物学功能及其可能的作用机制。**方法:** 收集 2015 年 5 月至 2016 年 5 月间在河北医科大学第四医院妇科手术切除并经病理学确诊的 85 例 EOC 患者的肿瘤组织和输卵管组织。常规培养人 EOC 细胞 A2780、SKOV3、OVCAR3 和 OV90 及正常人卵巢上皮细胞 IOSE80, 将 si-LINC01503、si-NC 及 miR-342-3p mimic、miR mimic NC 分别转染至 SKOV3 和 A2780 细胞, 分别作为 si-LINC01503 组、si-NC 组、miR-342-3p mimic 组和 miR mimic NC 组。qPCR 法检测 EOC 组织和细胞中 LINC01503 的表达水平, Kaplan-Meier 法分析 LINC01503 表达水平与患者生存的关系。双荧光素酶报告基因实验验证 LINC01503/miR-342-3p/IGF2R 轴相关分子间的靶向关系。平板克隆、划痕愈合和 Transwell 实验分别检测敲低 LINC01503 及转染 miR-342-3p mimic 对 A2780 和 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。WB 法检测 EOC 细胞中 LINC01503/miR-342-3p 通路对 IGF2R 蛋白表达的影响。构建 A2780 细胞裸鼠移植瘤模型, 观察敲低 LINC01503 对移植瘤生长的影响。**结果:** EOC 组织和细胞中 LINC01503 表达水平分别显著高于输卵管组织和 IOSE80 细胞(均 $P < 0.01$), LINC01503 高表达组患者术后 PFS 和 OS 均显著短于 LINC01503 低表达组患者(均 $P < 0.01$)。敲低 LINC01503、转染 miR-342-3p mimic 均可抑制 EOC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力(均 $P < 0.01$)。敲低 LINC01503 可下调 IGF2R 的表达($P < 0.01$), 这一现象可通过转染 miR-342-3p inhibitor 挽救。敲低 LINC01503 可抑制 A2780 细胞裸鼠移植瘤的生长($P < 0.01$)。**结论:** 在 EOC 组织和细胞中呈高表达的 LINC01503 与患者的不良预后密切相关, LINC01503 可能通过吸附 miR-342-3p 影响 IGF2R 表达进而促进 EOC 的进展。

[关键词] 上皮性卵巢癌; LINC01503; miR-342-3p; 胰岛素样生长因子 2 受体; A2780 细胞; SKOV3 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R737.31; R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)09-0754-08

LINC01503 promotes progression of epithelial ovarian cancer through the miR-342-3p/IGF2R axis

LYU Wei^{1a}, WANG Jiali^{1a}, LIU Tianxu^{1a}, DUAN Yuqing^{1a}, WANG Jun², LIU Lihua^{1a,1b,1c} (1.a. Department of Tumor Immunotherapy, b. Hebei Cancer Institute; c. International Cooperation Laboratory of Stem Cell Research, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250014, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression level, biological function and possible mechanism of LINC01503 in epithelial ovarian cancer (EOC). **Methods:** A total of 85 pairs of tumor tissues and fallopian tube tissues from EOC patients who underwent ovarian tumor reduction surgery in the Department of Gynecology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University from May 2015 to May 2016 were collected. Human EOC cells A2780, SKOV3, OVCAR3 and OV90 and normal human ovarian epithelial cells IOSE80 were routinely cultured, and si-LINC01503, si-NC, and miR-342-3p mimic, miR mimic NC were transfected into SKOV3 and A2780 cells, respectively, and recorded as si-LINC01503 group, si-NC group, miR-342-3p mimic group and miR mimic NC group. qPCR was used to detect the expression level of LINC01503 in EOC tissues and cells, and Kaplan-Meier method was used to analyze the correlation between the expression of LINC01503 and the survival of EOC patients. Dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship among molecules associated with LINC01503/miR-342-3p/IGF2R axis. The effects of LINC01503 knockdown and miR-342-3p over-expression on proliferation, migration and invasion of EOC A2780 and SKOV3 cells were detected by plate cloning assay, scratch wound healing assay and Transwell assay, respectively. The effect of LINC01503/miR-342-3p pathway on IGF2R protein expression was detected by WB method in SKOV3 and A2780 cells. A nude mouse model of A2780 cell

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81871894)

[作者简介] 吕微(1986—), 女, 博士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤的临床治疗和肿瘤分子生物学研究, E-mail: lvwei0326@foxmail.com

[通信作者] 刘丽华, E-mail: cdlihua@aliyun.com

transplanted tumor was established to observe the effect of LINC01503 on the growth of transplanted tumor. **Results:** The expression levels of LINC01503 in EOC tissues and cells were significantly higher than that in fallopian tube tissues and IOSE80 cells (all $P < 0.01$). Kaplan-Meier survival analysis showed that compared with the low LINC01503 expression group, patients in the high LINC01503 expression group had significantly shorter PFS and OS after surgery (all $P < 0.01$). Knockdown of LINC01503 and over-expression of miR-342-3p could inhibit proliferation, migration, and invasion of EOC cells (all $P < 0.01$). WB results showed that knockdown of LINC01503 down-regulated the expression of IGF2R ($P < 0.01$), which could be saved by transfection of miR-342-3p inhibitor ($P < 0.01$). LINC01503 knockdown could inhibit the growth of A2780 cell transplanted tumors *in vivo* ($P < 0.01$). **Conclusion:** LINC01503 is highly expressed in EOC tissues and cells, and it is significantly related to the poor prognosis of EOC patients. LINC01503 promotes the development of EOC possibly by upregulating IGF2R *via* sponging miR-342-3p.

[Key words] epithelial ovarian cancer (EOC); LINC01503; miR-342-3p; insulin like growth factor 2 receptor (IGF2R); A2780 cell; SKOV3 cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(9): 754-761. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.09.002]

卵巢癌是病死率最高的妇科恶性肿瘤, 上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)是卵巢癌中最常见的病理类型^[1-2]。虽然治疗手段不断丰富, 但其早期诊断困难、复发转移率高、易产生铂耐药、5年生存率低仍是 EOC 目前诊断和治疗中难以突破的瓶颈^[3]。基因的异常表达通常会对肿瘤细胞的恶性生物学行为产生影响, 因此, 阐明 EOC 发生发展中的分子机制有可能为 EOC 的诊断和治疗提供新的思路。lncRNA 作为肿瘤领域研究的热点, 已经被证实参与多种恶性肿瘤的发生发展^[4-6]。LINC01503 作为一种 lncRNA, 其可促进胰腺癌^[7]、胶质母细胞瘤^[8]、非小细胞肺癌^[9]、鳞状细胞癌^[10]等多种类型肿瘤的发生发展, 但其在 EOC 发生发展中的作用及其机制尚鲜有研究报道。本研究探讨 LINC01503 在 EOC 组织中的表达水平及临床意义, 并初步探索其对 EOC 细胞增殖、迁移与侵袭和荷瘤小鼠移植瘤生长的影响及其可能的作用机制, 旨在为筛选 EOC 诊断的生物标志物和治疗靶标提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2015 年 5 月至 2016 年 5 月间河北医科大学第四医院手术的 85 例 EOC 患者的肿瘤组织和输卵管组织, 组织标本离体后迅速置于液氮中, 后转于 -80°C 冰箱存放待用。患者年龄为 26~74 岁, 中位年龄为 59 岁。按照国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)的癌症分期标准: I+II 期 34 例, III+IV A 期 51 例。所有组织标本在切取前均告知患者或家属并签署知情同意书, 研究方案经过河北医科大学第四医院医学伦理委员会批准(伦理批准号: 2015KY317)。

1.2 细胞及主要试剂

人 EOC 细胞 A2780、SKOV3、OVCAR3、OV90 和正常人卵巢上皮细胞 IOSE80 均购于普赛尔生命科技有限公司。DMEM 培养基、胰蛋白酶购自武汉普诺

赛生物公司, 胎牛血清购自新西兰 Ausbian 公司, RNA 提取试剂、逆转录试剂和 SYBR Green 荧光定量试剂均购自上海翌圣生物科技股份有限公司, 转染试剂 Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, 干扰序列 LINC01503-siRNA 由苏州吉玛基因股份有限公司合成, 引物由上海生物工程有限公司合成。兔抗人胰岛素样生长因子 2 受体(insulin like growth factor 2 receptor, IGF2R)、GAPDH 一抗均购自美国 Abcam 公司, HRP 标记的山羊抗兔二抗购自中杉金桥公司。

1.3 细胞培养、转染及分组

A2780、SKOV3、OVCAR3、OV90 和 IOSE80 细胞均用含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基进行培养, 并将其放置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中。

取对数生长期细胞, 按照 siRNA 转染试剂盒说明书的步骤, 将 si-LINC01503、si-NC 及 miR-342-3p mimic、miR mimic NC 分别转染至 SKOV3 和 A2780 细胞, 培养 48 h 后进行后续实验。

1.4 qPCR 法检测 EOC 组织和细胞中 LINC01503、miR-342-3p 的表达

用 TRIzol 试剂提取组织和细胞的总 RNA, 用逆转录试剂盒进行逆转录, 获得的 cDNA 作为模板进行扩增。引物序列: LINC01503 上游引物为 5'-GGGACGGAGACAAATGACGG-3', 下游引物为 5'-GCAAATTCGTGAAGCGTCCATA-3'; miR-342-3p 上游引物为 5'-GTGCTATCTGTGATTGAGGGA-3', 下游引物为 5'-CGGGTGCGATTTCTGTG-3'。PCR 反应条件: 95°C 5 min; 95°C 15 s, 59°C 30 s, 72°C 30 s, 共 38 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.5 克隆形成实验检测敲低 LINC01503 表达对 EOC 细胞增殖能力的影响

将各组细胞按照每孔 1×10^3 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 置于培养箱中培养, 约每 3 d 换液一次,

待单个克隆集落细胞数目超过 50 个时即可终止培养,用 PBS 洗涤,然后每孔中加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤后使用 0.1% 结晶紫染色 15 min, PBS 洗涤并晾干,最后拍照并进行结果分析。

1.6 划痕愈合实验检测敲低 LINC01503 对 EOC 细胞迁移能力的影响

将各组细胞以每孔 5×10^5 个接种到 6 孔板中,当细胞汇合度达 80% 时,用无菌微量移液吸头在每孔底壁的细胞上垂直划痕来制备划痕伤口,用无菌 PBS 冲洗细胞 3 次,将培养基更换为不含血清的培养基,分别于 0 h 和 48 h 在倒置显微镜下观察并拍照。

1.7 Transwell 实验检测敲低 LINC01503 对 EOC 细胞侵袭能力的影响

将各组细胞密度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液 200 μ L 加入预先铺好基质胶的 Transwell 小室上室,在下室中加入 600 μ L DMEM 培养基,培养 24 h。PBS 冲洗 3 次,加入 1 mL 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min, PBS 清洗后,加入 0.1% 结晶紫染液 1 mL 染色 15 min,用清水轻轻冲洗,晾干后在显微镜下观察,并随机选取 5 个视野进行拍照,统计穿膜侵袭细胞数。

1.8 双荧光素酶报告基因实验验证 LINC01503 与 miR-342-3p、miR-342-3p 与 IGF2R 的靶向关系

构建 LINC01503 突变型(MUT)和野生型(WT)3'非翻译区(3'-UTR)的报告基因质粒,通过体外转染,将 SKOV3 和 A2780 细胞分为 4 组:miR-342-3p mimic+LINC01503-WT、miRNA mimic NC+LINC01503-WT、miR-342-3p mimic+LINC01503-MUT 和 miRNA mimic NC+LINC01503-MUT,每组 3 个复孔。同时,构建 IGF2R 突变型(MUT)和野生型(WT)报告基因质粒,将 A2780 和 SKOV3 细胞分为 4 组:miR-342-3p mimic+IGF2R-WT、miR mimic NC+IGF2R-WT、miR-342-3p mimic+IGF2R-MUT 和 miR mimic NC+IGF2R-MUT,每组设置 3 个复孔。培养 48 h 后按照双荧光素酶试剂盒说明书检测细胞的荧光素酶活性。

1.9 WB 法检测 LINC01503/miR-342-3p 通路对 IGF2R 蛋白表达的影响

通过体外转染,将 SKOV3 和 A2780 细胞分为空载体(EV)组、si-LINC01503 组、si-LINC01503+miR-342-3p inhibitor 组,分别加入细胞裂解液及蛋白酶抑制剂,提取细胞总蛋白。采用 10%SDS-PAGE 分离蛋白质,将蛋白质转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶中在 37 $^{\circ}$ C 温箱封闭 60 min。加入 IGF2R (稀释比例为 1:2 000)、GAPDH (稀释比例为 1:2 500)一抗,4 $^{\circ}$ C 处理过夜。TBST 洗膜 3 次(10 min/次),加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(稀释比例为 1:20 000),摇床室温下处理 60 min。TBST 洗膜 3 次后,ECL 试剂曝光、显影,用 Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.10 A2780 细胞裸鼠移植瘤模型的构建及观察

将 10 只 4 周龄的 BALB/c 雌性裸鼠按随机数字表法分成 2 组,每组 5 只。取对数生长期的 2 组 A2780 细胞,分为空载体(EV)组、si-LINC01503 组。将密度为 5×10^5 个/mL 的细胞悬液 100 μ L 注射于裸鼠腹股沟区皮下。每 3 d 称 1 次裸鼠体质量,每 1 周用游标卡尺测量 1 次移植瘤的大小,依据公式“ $V(\text{体积}) = (\text{长径} \times \text{短径}^2) / 2$ ”计算移植瘤体积,绘制移植瘤生长曲线。35 d 后对各组裸鼠实施安乐死,取出移植瘤拍照并称瘤质量。

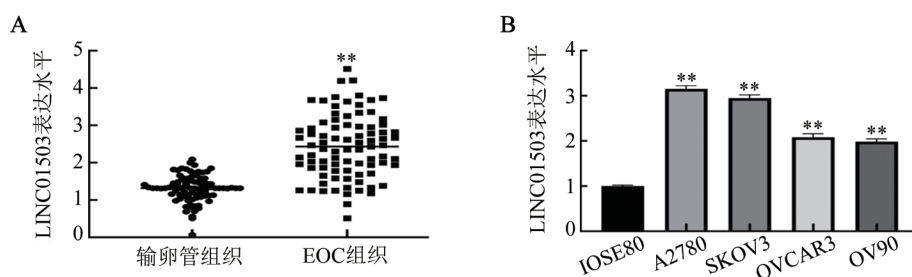
1.11 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采取两独立样本 t 检验;采用 Kaplan-Meier 法分析 LINC01503 表达水平与患者生存期的相关性。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LINC01503 在 EOC 组织和细胞中均呈高表达

qPCR 法检测结果(图 1)显示,EOC 组织中 LINC01503 的表达水平显著高于输卵管组织(图 1A, $P < 0.01$),EOC 细胞中 LINC01503 的表达水平显著高于 IOSE80 细胞(图 1B, 均 $P < 0.01$)。结果表明,LINC01503 在 EOC 组织和细胞中均呈高表达。



与输卵管组织或 IOSE80 细胞比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 qPCR 法检测 LINC01503 在 EOC 组织(A)和细胞(B)中的表达

2.2 LINC01503 表达与 EOC 患者预后的关系

以 LINC01503 表达的均值作为分界线将患者分成高、低表达两组, 小于等于均值的为低表达, 大于均值的为高表达。本组患者随访时间为 60 个月, 采用 Kaplan-Meier 法分析, 结果(图 2)显示, 与 LINC01503 低表达组相比, LINC01503 高表达组患者的 PFS 和 OS 均明显缩短(均 $P < 0.01$)。

2.3 敲低 LINC01503 可抑制 EOC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

qPCR 法检测结果(图 3A)显示, 与 si-NC 组相

比, si-LINC01503 组 SKOV3 和 A2780 细胞中 LINC01503 的表达水平均显著下降($P < 0.01$), 表明在 EOC 细胞中成功敲低 LINC01503 表达, 可以进行后续功能实验。

平板克隆、划痕愈合和 Transwell 实验结果(图 3B、3C、3D)显示, 与 si-NC 组比较, 敲低 si-LINC01503 组 SKOV3 和 A2780 细胞的增殖、迁移及侵袭能力均显著降低(均 $P < 0.01$)。结果表明, 敲低 LINC01503 表达可显著抑制 EOC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

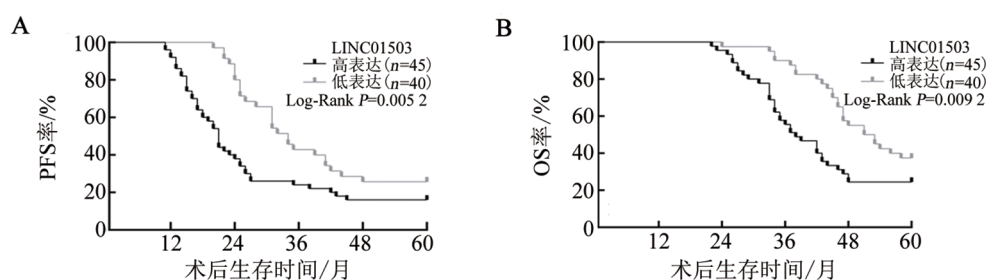
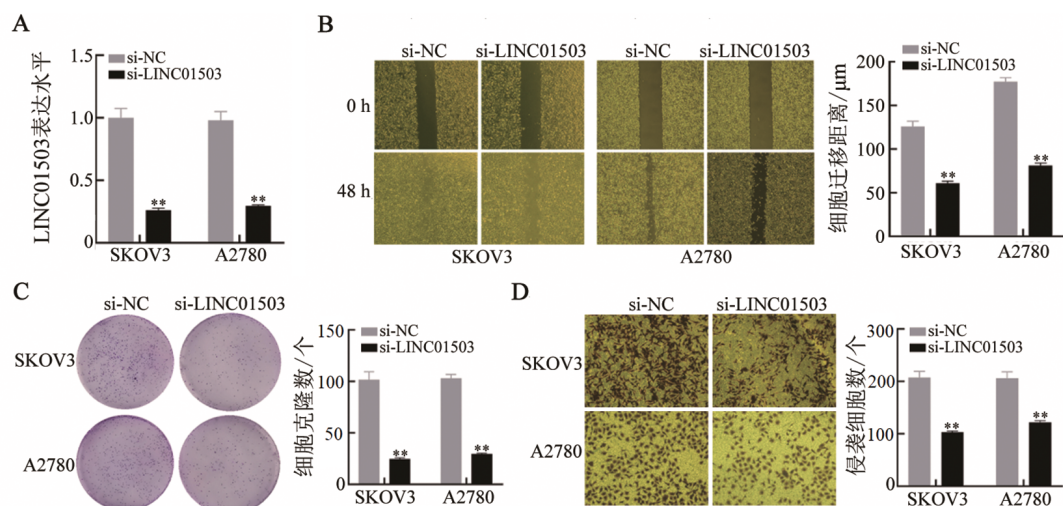


图2 Kaplan-Meier 法分析 LINC01503 表达水平对 EOC 患者术后 PFS(A)和 OS(B)的影响



A: qPCR 法检测 SKOV3、A2780 细胞中敲低 LINC01503 后的转染效率; B: 划痕愈合实验检测 SKOV3、A2780 细胞的迁移($\times 40$); C: 平板克隆形成实验检测 SKOV3、A2780 细胞的增殖能力; D: Transwell 实验检测 SKOV3、A2780 细胞的侵袭能力(结晶紫染色, $\times 200$)。与 si-NC 组比较, $**P < 0.01$ 。

图3 敲低 LINC01503 对 EOC 细胞迁移、增殖、侵袭的影响

2.4 在 EOC 细胞中 LINC01503 可靶向结合 miR-342-3p

用 DIANA LncBase v.2 数据库预测可能与 LINC01503 结合的 miRNA, 结果如图 4A 所示, LINC01503 转录本上存在与 miR-342-3p 相互作用的结合位点。

双荧光素酶报告基因实验结果(图 4B)显示, 共转染 miR-342-3p mimic 显著降低转染 LINC01503-WT 细胞的荧光素酶活性($P < 0.01$), 但 LINC01503-MUT 组细胞的荧光素酶活性未降低。

结果表明, LINC01503 可作为 miR-342-3p 的内源竞争 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 与之结合。

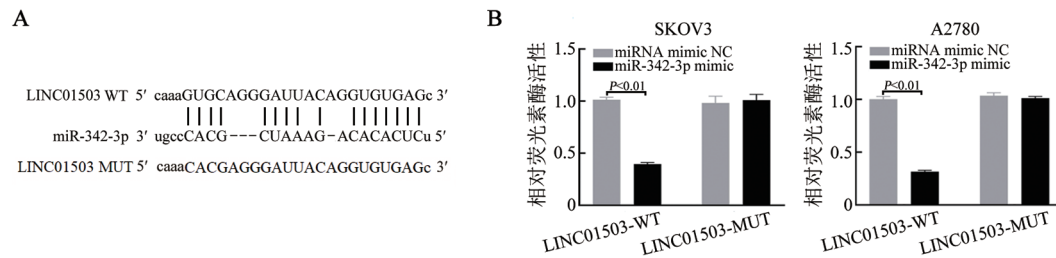
2.5 miR-342-3p 过表达可抑制 EOC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

qPCR 法检测结果(图 5A、B)显示, miR-342-3p 在 EOC 细胞中呈低表达状态(均 $P < 0.01$); 与 miRNA mimic NC 组相比, miR-342-3p mimic 组细胞中 miR-342-3p 的含量明显升高(均 $P < 0.01$), 说明转染

成功,建立稳定过表达 miR-342-3p 的细胞模型。

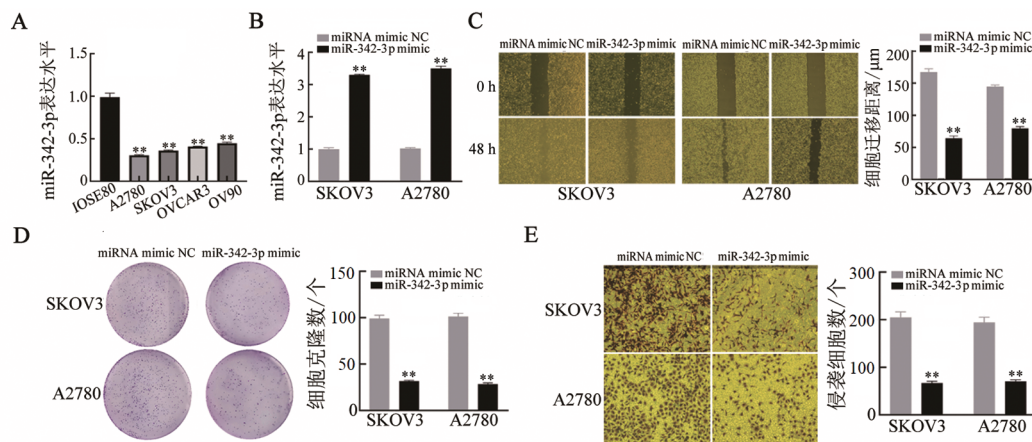
平板克隆形成、划痕愈合和 Transwell 侵袭实验结果发现,与 miRNA mimic NC 组相比,miR-342-3p mimic 组 A2780 和 SKOV3 细胞的迁移(图 5C)、增殖

(图 5D)和侵袭(图 5E)能力均显著降低(均 $P < 0.01$)。结果表明,过表达 miR-342-3p 可显著抑制 A2780 和 SKOV3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,提示 miR-342-3p 在 EOC 中可能充当了抑癌基因的角色。



A: DIANA LncBase v.2 预测 miR-342-3p 和 LINC01503 结合的位点; B: 双荧光素酶报告基因实验检测荧光素酶活性。

图 4 LINC01503 能够靶向结合 miR-342-3p



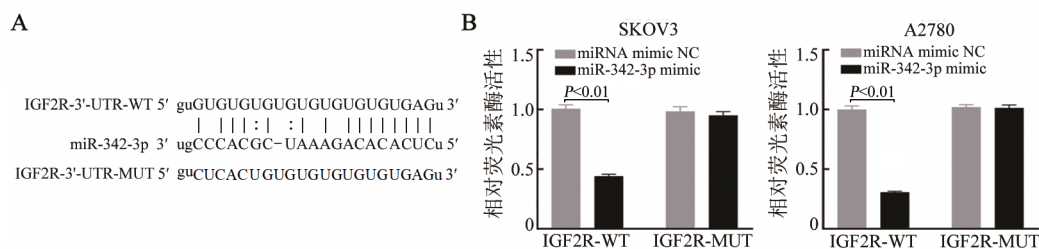
A: qPCR 法检测 IOSE80 和 EOC 细胞中 miR-342-3p 的表达; B: qPCR 法检测转染效率; C: 划痕愈合实验检测 SKOV3、A2780 细胞的迁移能力($\times 40$); D: 平板克隆形成实验检测细胞增殖能力; E: Transwell 实验检测 SKOV3、A2780 细胞的侵袭能力(结晶紫染色, $\times 200$)。与 miRNA mimic NC 组比较,** $P < 0.01$ 。

图 5 过表达 miR-342-3p 对 EOC 细胞迁移、增殖、侵袭的影响

2.6 在 EOC 细胞中 IGF2R 是 miR-342-3p 的直接靶点

利用数据库预测 miR-342-3p 下游的潜在结合基因,结果发现,IGF2R 的 3'-UTR 上有一个潜在的与 miR-342-3p 相互作用的结合位点(图 6A)。双荧光素酶报告基因实验结果(图 6B)发现,转染 miR-342-3p

mimic 后显著降低了转染 IGF2R-3'-UTR-WT 的 EOC 细胞荧光素酶活性($P < 0.01$),而 IGF2R-3'-UTR-MUT 组细胞的荧光素酶活性没有下降。实验表明,miR-342-3p 可以靶向结合 IGF2R。



A: 数据库预测 miR-342-3p 和 IGF2R 潜在结合位点; B: 双荧光素酶报告基因实验检测荧光素酶活性。

图 6 miR-342-3p 靶向结合 IGF2R

2.7 LINC01503/miR-342-3p 轴对 IGF2R 蛋白表达的影响

WB 法检测结果(图7)显示,与EV组相比,si-LINC01503组 IGF2R 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$), si-LINC01503+miR-342-3p inhibitor 组 IGF2R 蛋白表达无明显变化,说明抑制 miR-342-3p 可以部分逆转由敲低 LINC01503 引起的 IGF2R 的下调。结果表明,LINC01503 可能通过吸附 miR-342-3p

上调 IGF2R 的表达,参与了 EOC 的发生发展。

2.8 敲低 LINC01503 可显著抑制裸鼠移植瘤的生长

成功建立 A2780 细胞小鼠移植瘤模型。分析移植瘤生长曲线发现,与EV组相比,si-LINC01503 组小鼠移植瘤体积明显减小(图8A, $P<0.01$)、移植瘤质量显著降低(图8B, $P<0.01$)。结果表明,敲低 LINC01503 明显抑制裸鼠 EOC 细胞移植瘤的生长。

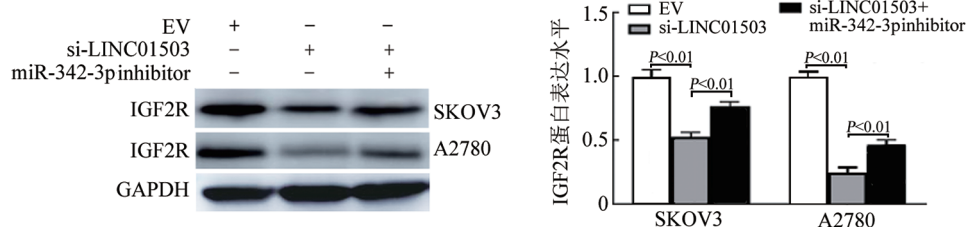
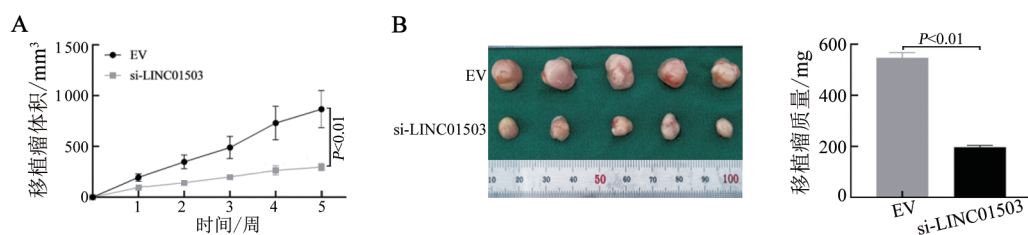


图7 IGF2R 在不同处理组 SKOV3、A2780 细胞的表达



A: 肿瘤生长曲线; B: 不同处理组移植瘤大小及质量分析。

图8 LINC01503 对裸鼠移植瘤生长的影响

3 讨论

EOC 作为一种恶性程度极高的妇科肿瘤,其发病原因不明、治疗方法有限、预后欠佳,是国内外学者的重点研究领域。多项研究^[11-14]表明, lncRNA 在 EOC 的发生发展中起重要作用,有望成为肿瘤进展过程中的新型治疗靶标。LINC01503 作为一种新型 lncRNA,参与和影响多种人类肿瘤细胞的恶性生物学行为。例如,在胃癌中 LINC01503 可以通过 miR-133a-5p/VIM 轴促进上皮间质转化^[15];在鼻咽癌中可以通过 SFPQ-FOSL1 轴促进肿瘤细胞增殖和转移^[16];在结直肠癌中通过调控 miR-4492/FOXK1 信号通路促进结直肠癌细胞的增殖和侵袭^[17];在肝细胞癌中通过激活 MAPK/ERK 通路促进肿瘤的进展^[18];在宫颈癌中通过靶向 miR-615-3p/CCND1 轴发挥促癌作用^[19]。目前,LINC01503 在 EOC 发生发展中的作用及相关机制尚未见报道。

为明确 LINC01503 在 EOC 组织中的表达情况,通过 qPCR 法检测了 EOC 组织和输卵管组织中

LINC01503 表达水平,结果发现 EOC 组织中 LINC01503 的表达水平显著高于输卵管组织,提示 LINC01503 可能在 EOC 发生与发展过程中发挥了促癌作用。为了明确 LINC01503 在 EOC 患者中的临床意义,本研究通过 Kaplan-Meier 法分析了 LINC01503 的表达水平与 EOC 患者预后的关系,结果表明,LINC01503 高表达 EOC 患者的 PFS 和 OS 均显著短于 LINC01503 低表达的患者,提示 LINC01503 可能与 EOC 的预后不良密切相关。无限增殖是恶性肿瘤细胞的重要标志,侵袭和转移的能力也是影响癌症患者预后的关键因素。本研究通过体外细胞功能实验探讨 LINC01503 对 EOC 生物学功能的影响,结果表明,LINC01503 可促进 EOC 细胞增殖、迁移和侵袭能力。以上结果表明 LINC01503 在 EOC 的恶性进展过程中发挥了促癌作用。

lncRNA 存在多种调控机制,其中作为 ceRNA 间接调控靶基因的表达是其最常见的功能机制^[20]。为了验证 LINC01503 是否通过 ceRNA 的机制发挥促癌作用,本研究首先使用 DIANA LncBase v.2 数据库预测可能被 LINC01503 海绵吸附的下游靶 miR-342-3p。

通过双荧光素酶报告基因实验验证了 LINC01503 和 miR-342-3p 的潜在结合性, 同时探索了 miR-342-3p 在 EOC 发生发展过程中的作用。在本研究中, 观察到 miR-342-3p 在 EOC 细胞中低表达, 转染 miR-342-3p mimic 后可以抑制 EOC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。本研究结果为 miR-342-3p 在 EOC 中发挥抑癌作用提供了证据。miRNA 能够与 argonaute 家族蛋白组成沉默复合体, 进而阻断靶 mRNA 的翻译或降解, 最终在转录后水平调控基因的表达^[21]。为此, 本研究通过数据库分析筛选出 miR-342-3p 下游的靶基因, IGF2R 引起了课题组的注意, 因为 IGF2R 在多种类型肿瘤中发挥了促癌作用^[22-24]。为了验证 LINC01503 是否通过吸附 miR-342-3p 影响 IGF2R 的表达水平, 从而在 EOC 中发挥促癌作用, 本研究进行了挽救实验。结果表明, 敲低 LINC01503 导致 IGF2R 表达水平下调, 而共转染 miR-342-3p inhibitor 可逆转这一现象。以上结果表明, LINC01503 可作为 ceRNA 与 miR-342-3p 相结合, 通过上调 IGF2R 的表达水平在 EOC 中发挥促癌作用。

为探讨 LINC01503 的体内致癌作用, 本研究在裸鼠腹股沟区皮下注射敲低 LINC01503 的人 EOC 细胞 A2780, 同时设置阴性对照 EV 组, 构建 A2780 细胞裸鼠皮下移植瘤模型。结果发现, 敲低 LINC01503 可以显著减慢裸鼠皮下移植瘤的生长速度, 小鼠移植瘤的体积和质量均显著下降。以上结果表明, LINC01503 可以促进 A2780 细胞裸鼠移植瘤的生长。

综上所述, LINC01503 在 EOC 组织和细胞中高表达, 与 EOC 患者预后不良密切相关; LINC01503 可促进 EOC 细胞增殖、迁移和侵袭能力, 可能是通过吸附 miR-342-3p 上调 IGF2R 表达水平在 EOC 中发挥了促癌作用。本研究为筛选 EOC 诊断和治疗的生物标志物奠定了一定的实验基础, 但其中具体的作用机制有待更深入的研究去验证。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21669.
- [2] LHEUREUX S, GOURLEY C, VERGOTE I, *et al.* Epithelial ovarian cancer[J]. *Lancet*, 2019, 393(10177): 1240-1253. DOI: 10.1016/s0140-6736(18)32552-2.
- [3] KUROKI L, GUNTUPALLI S R. Treatment of epithelial ovarian cancer [J/OL]. *BMJ*, 2020, 371: m3773[2023-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33168565/>. DOI: 10.1136/bmj.m3773.
- [4] STATELLO L, GUO C J, CHEN L L, *et al.* Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(2): 96-118. DOI: 10.1038/s41580-020-00315-9.
- [5] GOODALL G J, WICKRAMASINGHE V O. RNA in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(1): 22-36. DOI: 10.1038/s41568-020-00306-0.
- [6] ULITSKY I, BARTEL D P. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms[J]. *Cell*, 2013, 154(1): 26-46. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.020.
- [7] AN B P, CAI Y, ZHU J, *et al.* Long noncoding RNA LINC01503 silencing suppresses KLK4 expression to impede pancreatic cancer development as miR-1321 sponge[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2023, 2023: 5403344[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9922183/>. DOI: 10.1155/2023/5403344.
- [8] CHEN F, PENG X, TENG Z P, *et al.* Identification of prognostic lincRNAs subtypes predicts prognosis and immune microenvironment for glioma[J/OL]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 3709823[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9568296/>. DOI: 10.1155/2022/3709823.
- [9] ZHANG M L, ZHAO T T, DU W W, *et al.* C-MYC-induced upregulation of LINC01503 promotes progression of non-small cell lung cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(21): 11120-11127. DOI: 10.26355/eurrev_202011_23599.
- [10] XIE J J, JIANG Y Y, JIANG Y, *et al.* Super-enhancer-driven long non-coding RNA LINC01503, regulated by TP63, is over-expressed and oncogenic in squamous cell carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(8): 2137-2151.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.02.018.
- [11] ZHOU L, JIANG H Y, LIN L, *et al.* lncRNA GAS5 suppression of the malignant phenotype of ovarian cancer via the miR-23a-WT1 axis[J/OL]. *Ann Transl Med*, 2023, 11(2): 119[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9929739/>. DOI: 10.21037/atm-22-6394.
- [12] EOH K J, LEE D W, NAM E J, *et al.* HOXA-AS3 induces tumor progression through the epithelial-mesenchymal transition pathway in epithelial ovarian cancer[J/OL]. *Oncol Rep*, 2023, 49(3): 64[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9944947/>. DOI: 10.3892/or.2023.8501.
- [13] LI S H, SHEN S Z, GE W Z, *et al.* Long non-coding RNA SLC25A21-AS1 inhibits the development of epithelial ovarian cancer by specifically inducing PTBP3 degradation[J/OL]. *Biomark Res*, 2023, 11(1): 12[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9885650/>. DOI: 10.1186/s40364-022-00432-x.
- [14] 吕微, 王佳丽, 贾云泷, 等. lncRNA TOB1-AS1 在上皮性卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(11): 1061-1067[2023-05-18]. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.11.002.
- [15] GUO Y L, SUN P P, GUO W, *et al.* Long non-coding RNA LINC01503 promotes gastric cardia adenocarcinoma progression via miR-133a-5p/VIM axis and EMT process[J/OL]. *Dig Dis Sci*, 2021, 66(10): 3391-3403[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/3535292/>. DOI: 10.1007/s10620-020-06690-9.
- [16] HE S W, XU C, LI Y Q, *et al.* Correction: AR-induced long non-coding RNA LINC01503 facilitates proliferation and metastasis via the SFPQ-FOSL1 axis in nasopharyngeal carcinoma[J/OL]. *Oncogene*, 2021, 40(49): 6703-6704[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8660634/>. DOI: 10.1038/s41388-021-02050-7.
- [17] LU S R, LI Q, LU J L, *et al.* Long non-coding RNA LINC01503 promotes colorectal cancer cell proliferation and invasion by regulating miR-4492/FOXK1 signaling[J/OL]. *Exp Ther Med*,

- 2018, 16(6): 4879-4885[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6257603/>. DOI: 10.3892/etm.2018.6775.
- [18] WANG M R, FANG D, DI M P, *et al.* Long non-coding RNA LINC01503 promotes the progression of hepatocellular carcinoma via activating MAPK/ERK pathway[J/OL]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(9): 1224-1234[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7294912/>. DOI: 10.7150/ijms.45256.
- [19] FENG J, GAO F Y, LI Y Y, *et al.* Upregulation of LINC01503 promotes cervical cancer progression by targeting the miR-615-3p/CCND1 axis[J/OL]. *J Cancer*, 2021, 12(15): 4552-4560[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8210569/>. DOI: 10.7150/jca.54148.
- [20] NOJIMA T, PROUDFOOT N J. Mechanisms of lncRNA biogenesis as revealed by nascent transcriptomics[J/OL]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(6): 389-406[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/5095917/>. DOI: 10.1038/s41580-021-00447-6.
- [21] TREIBER T, TREIBER N, MEISTER G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways[J/OL]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1): 5-20[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/2675692/>. DOI: 10.1038/s41580-018-0059-1.
- [22] ZHONG Y, REN X Y, CAO X, *et al.* Insulin-like growth factor 2 receptor is a key immune-related gene that is correlated with a poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer: a bioinformatics analysis[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 871786[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9624382/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.871786.
- [23] LIU B, HU Y Q, WAN L X, *et al.* Proteomics analysis of cancer tissues identifies IGF2R as a potential therapeutic target in laryngeal carcinoma[J/OL]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1031210[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9592118/>. DOI: 10.3389/fendo.2022.1031210.
- [24] BOISCLAIR C, DICKINSON R, GIRI S, *et al.* Characterization of IGF2R molecular expression in canine osteosarcoma as part of a novel comparative oncology approach[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 1867[2023-05-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9916217/>. DOI: 10.3390/ijms24031867.

[收稿日期] 2023-05-19

[修回日期] 2023-08-09

[本文编辑] 党瑞山