

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.007

· 临床研究 ·

## LINC00958 通过上调 VEGF-C 表达促进宫颈癌细胞的恶性生物学行为及小鼠模型的淋巴结转移

靖爽, 和晓利, 井佳雨, 王悦(河南省人民医院暨郑州大学人民医院暨河南大学人民医院 妇科, 河南 郑州 450003)

**[摘要]** **目的:**探讨 LINC00958/血管内皮生长因子 C (VEGF-C) 信号通路在宫颈癌的淋巴管生成和淋巴转移中的作用。**方法:**从 2020 年 9 月至 2022 年 9 月期间在河南省人民医院接受手术的患者中收集了 42 例宫颈癌组织标本, 通过 qPCR 检测宫颈癌组织和宫颈癌细胞 (Hela、C33A、SiHa、Caski) 中 LINC00958 的表达情况。将 LINC00958 过表达载体 (LINC00958 组) 或对照载体 (CMV 组) 转染 Caski 细胞, 敲减 LINC00958 (shLINC00958 组)、VEGF-C (shVEGF-C 组) 的 shRNA 序列或阴性对照 shRNA (shNC 组) 转染 SiHa 细胞。分别通过 CCK-8 法、Transwell 实验检测过表达或敲减 LINC00958 对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。观察转染后细胞的培养上清液对人淋巴管内皮细胞 (HLEC) 淋巴管形成能力的影响。建立小鼠腭淋巴结转移模型, 观察过表达 LINC00958 或同时敲减 VEGF-C 对宫颈癌淋巴结转移的影响。**结果:**LINC00958 在宫颈癌组织中呈高表达 ( $P < 0.001$ ), 高水平的 LINC00958 与大肿瘤、晚期肿瘤分级、浸润深度和淋巴转移有关联 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与正常人宫颈上皮细胞 endc1617 相比, 宫颈癌细胞中 LINC00958 水平均显著升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。shLINC00958 组 SiHa 细胞的增殖、迁移、侵袭能力及其培养上清液的促 HLEC 淋巴管形成能力均显著低于 shNC 组 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ), LINC00958 组 Caski 细胞的增殖、迁移、侵袭能力及其培养上清液的促 HLEC 淋巴管形成能力显著高于 CMV 组 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。通过 RNA 下拉、RNA 免疫沉淀实验发现宫颈癌细胞中 LINC00958 能够特异性结合 VEGF-C。LINC00958+shVEGF-C 组 Caski 细胞的增殖、迁移、侵袭能力及其培养上清液的促淋巴管形成能力显著低于 LINC00958 组 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ); 在小鼠腭淋巴结转移模型中, LINC00958+shVEGF-C 组中小鼠腭淋巴结的体积和 VEGF-C 蛋白、N-cadherin 蛋白以及 LYVE-1 的阳性细胞比例均显著低于 LINC00958 组 (均  $P < 0.001$ )。**结论:**LINC00958 通过直接与 VEGF-C 蛋白相互作用增强宫颈癌细胞的增殖、侵袭、淋巴管生成能力, 促进小鼠腭淋巴结转移模型的淋巴结转移。

**[关键词]** LINC00958; 血管内皮生长因子 C; 宫颈癌; Caski 细胞; SiHa 细胞; 淋巴管形成; 淋巴结转移

**[中图分类号]** R737.33; R730.2; R73-37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)02-0161-08

## LINC00958 promotes the malignant biological behaviors of cervical cancer cells and lymph node metastasis in mouse models by upregulating VEGF-C expression

JING Shuang, HE Xiaoli, JING Jiayu, WANG Yue (Department of Gynaecology, Henan Provincial People's Hospital & People's Hospital of Zhengzhou University & People's Hospital of Henan University Zhengzhou 45003, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of LINC00958/vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) signaling pathway in lymphovascular formation and lymphatic metastasis in cervical cancer. **Methods:** 42 samples of cervical cancer tissues and corresponding adjacent tissues were collected from patients who underwent surgery at Henan Provincial People's Hospital between September 2020 and September 2022. The expressions of LINC00958 in cervical cancer specimens and cervical cancer cells (Hela, C33A, SiHa, Caski) were examined by qPCR. Caski cells were transfected with LINC00958 overexpression vector (LINC00958 group) or vehicle control (CMV group), and SiHa cells were transfected with shRNA sequences of knocked-down LINC00958 (shLINC00958 group) and VEGF-C (shVEGF-C group), or negative control shRNA (shNC group). The effects of overexpressed or knocked-down LINC00958 on the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells were detected by CCK-8 method and Transwell assay, respectively. The effect of the culture supernatant of transfected cells on the lymphovascular formation capacity of human lymphatic endothelial cells (HLEC) was observed. A mouse popliteal lymph node metastasis model was established to investigate the effects of overexpressed LINC00958 or simultaneous knockdown of VEGF-C on cervical cancer lymph node metastasis. **Results:** LINC00958 was highly expressed in cervical cancer tissues ( $P < 0.001$ ), and high levels of LINC00958 were associated with large tumors, advanced

**[基金项目]** 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (No. LHGJ20200024)

**[作者简介]** 靖爽 (1986—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤的基础与临床研究。E-mail: jingshuang111@126.com

**[通信作者]** 王悦, E-mail: wangyue0601@163.com

tumor grade, depth of invasion, and lymphatic metastasis ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with that in the normal human cervical epithelial cells end1617, the level of LINC00958 in cervical cancer cells was significantly increased ( $P<0.01$  or  $P<0.001$ ). The proliferation, migration and invasion abilities of SiHa cells in the shLINC00958 group and the HLEC lymph vessel pro-formation ability of the culture supernatant were significantly lower than those in the shNC group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$  or  $P<0.001$ ), and the proliferation, migration and invasion abilities of Caski cells in the LINC00958 group and the HLEC lymph vessel pro-formation ability of the culture supernatant were significantly higher than those in the CMV group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$  or  $P<0.001$ ). RNA pull-down and RNA immunoprecipitation assays showed that LINC00958 in cervical cancer cells could specifically bind to VEGF-C. The proliferation, migration and invasion abilities of Caski cells in the LINC00958+shVEGF-C group and the lymph vessel pro-formation ability of the culture supernatant were significantly lower than those in the LINC00958 group ( $P<0.01$  or  $P<0.001$ ). In the mouse popliteal lymph node metastasis model, the volume of popliteal lymph nodes in the LINC00958+shVEGF-C group and the proportion of VEGF-C protein, N-cadherin protein and LYVE-1 positive cells were significantly lower than those in the LINC00958 group (all  $P<0.001$ ).

**Conclusion:** LINC00958 directly interacts with VEGF-C protein to enhance the proliferation and invasion abilities and lymph vessel formation ability of cervical cancer cells, and promote lymph node metastasis in the mouse popliteal lymph node metastasis model.

**[Key words]** LINC00958; vascular endothelial growth factor C (VEGF-C); cervical cancer; Caski cell; SiHa cell; lymphovascular formation; lymph node metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(2): 161-168. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.007]

宫颈癌是全球最常见的妇科恶性肿瘤之一,是女性癌症相关死亡的主要原因,每年新增约 530 000 例和死亡 270 000 例<sup>[1]</sup>。宫颈癌患者的预后与淋巴结转移密切相关。虽然早期宫颈癌患者的 5 年生存率可达 90%,但发生淋巴结转移患者的 5 年生存率不足 30%<sup>[2]</sup>。从肿瘤内和肿瘤周围已有的淋巴管形成新的淋巴管在人类癌症的淋巴结转移中起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>,但目前对宫颈癌中淋巴管生成的潜在机制仍然知之甚少。淋巴管生成受到淋巴管生成因子的刺激,包括血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 和 VEGF-D<sup>[4]</sup>。VEGF-C 被证实可促进多种癌症中的淋巴管生成和淋巴结转移<sup>[5]</sup>。此外,据报道,VEGF-C 中和抗体可通过抑制淋巴集合管的扩张来减少肿瘤细胞向淋巴结的扩散<sup>[6]</sup>。因此,VEGF-C 可能是恶性肿瘤中淋巴结转移的标志物。长非编码 RNA (lncRNA) 能在转录或翻译水平上调节基本的细胞过程<sup>[7]</sup>,也参与调节癌症的发生和发展<sup>[8]</sup>。本课题组在前期研究<sup>[9]</sup>中已证实 LINC00958 在宫颈癌组织中上调,并且通过诱导 miR-625-5p 上调 LRRC8E 表达促进宫颈癌细胞增殖。值得注意的是,LINC00958 过表达能够诱导膀胱癌的淋巴管生成和淋巴结转移,而抗 VEGF-C 抗体能够逆转上述作用<sup>[10-11]</sup>。然而,LINC00958 是否通过介导 VEGF-C 表达促进宫颈癌淋巴管生成及其机制仍不清楚。因此,本研究通过体内外实验进一步探索 LINC00958 是否通过调控 VEGF-C 表达介导淋巴管生成促进宫颈癌的发生和发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 患者与临床样本

从 2020 年 9 月至 2022 年 9 月期间在河南省人民

医院妇科接受手术的患者中收集了 42 例 RNAlater 保存的宫颈癌标本和癌旁组织(距病灶 2 cm)。患者平均年龄 44.6 岁,(32~65 岁);G1 期 5 例、G1 期 17 例、G3 期 20 例;组织类型:鳞癌 35 例、腺癌 6 例、腺鳞癌 1 例;肿瘤直径 $\geq 4$  cm 者 12 例;子宫肌层浸润 31 例;淋巴结转移 33 例。所有组织切取后立即在液氮中速冻,储存在  $-80^{\circ}\text{C}$  下。两位病理医生通过 H-E 染色对每个样本进行病理学诊断。在采集样本前,每位患者签署书面知情同意书。本研究经河南省人民医院伦理委员会批准同意(No. 202009012)。

### 1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(FBS)、Dulbecco 改良 Eagle 培养基、RPMI-1640 培养基均购自美国 Gibco 公司;TRIzol 试剂、Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司,iScript cDNA 合成试剂盒、SYBR Green Supermixes 购自美国 Bio-Rad 公司,CCK-8 试剂盒购自上海 Beyotime 公司,Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司,二辛可宁酸蛋白质测定购自美国 Pierce 公司,淋巴管标志物淋巴管内皮透明质酸受体-1 (lymphatic vessel endothelial receptor-1, LYVE-1) 抗体、抗 E-cadherin、N-cadherin、VEGF-C、 $\beta$ -actin 一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗均购自英国 Abcam 公司,增强型化学发光试剂购自美国 PerkinElmer 公司,Pierce™ 磁性 RNA-Protein Pulldown 试剂盒、Transcript Aid T7 高产转录试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,EZ-Magna RIP 试剂盒购自美国 MERCK 公司,抗 VEGF-C 抗体结合的磁珠购自美国 Proteintech 公司,Synergy4 自动酶标仪购自美国 BioTek 公司,光学显微镜购自日本 Nikon 公司。

BALB/c 裸鼠(4~5 周龄,18~20 g)购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物生产许可证编

号:SCXK(上海)2019-005。所有实验程序均经河南省人民医院动物保护和利用委员会批准。

### 1.3 细胞培养与分组转染

正常人宫颈上皮细胞ende1617,宫颈癌细胞(Hela、C33A、SiHa、Caski),以及人淋巴管内皮细胞(HLEC)均购自美国典型培养物保藏中心,并在含有10%FBS、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的Dulbecco改良Eagle培养基或RPMI-1640培养基中培养。

SiHa细胞分组:shNC组(用shNC转染细胞)和shLINC00958组(用shLINC00958转染细胞)。Caski细胞分组:CMV组(用CMV载体转染细胞)和LINC00958组(用含LINC00958序列的CMV载体转染细胞)。

将LINC00958序列(正向引物:5'-GTGAACCGTCAGATCGAATTCGTCTTTCAGGATGAATGCCATCC-3'和反向引物:5'-TAATCCAGAGGTTGAGGATCCATTTTTTAAAGCAATTTTTTATTTTATTTTT-3')克隆到慢病毒表达载体pLenti-EF1a-F2A-Puro-CMV-MCS中,并将载体pLenti-EF1a-F2A-Puro-CMV-MCS作为对照(CMV)。

阴性对照shRNA(shNC)和LINC00958、VEGF-C基因的shRNA序列(shLINC00958正向序列:5'-CCGGAAGCGCCTAAGAAATGCCTGTCTCGAGGTATAGCTTAACGTAGGCATTTTTTTG-3',反向序列:5'-AATTCAAAAAAAGCGCCTAAGAAATGCCTGTC TCGAGGTATAGCTTAACGTAGGCATT-3';shVEGF-C正向序列:5'-CCGGAACCTTCCCTCGAGCTGATATCTCGAGATATCAGCTCGAGGGAAGGTTTTTTTTG-3',反向序列:5'-AATTCAAAAAAACCTTCCCTCGAGCTGATATCTCGAGATATCAGCTCGAGGGAAGGTT-3')是从上海GenePharma公司设计和订购,克隆到pLKO.1慢病毒表达载体中。使用Lipofectamine 3000将100 nmol/L的shRNA瞬时转染至SiHa细胞中、将慢病毒表达载体瞬时转染至Caski细胞中。转染48 h后,将细胞用于后续实验。

### 1.4 qPCR法检测LINC00958在宫颈癌组织和细胞中的表达

将细胞直接溶解在TRIzol试剂中,将临床组织称重、匀浆并溶解在TRIzol试剂中。根据制造商的方案收集总RNA。定量后,使用随机引物和iScript cDNA合成试剂盒进行逆转录反应。使用SYBR Green Supermixes进行qPCR检测。 $\beta$ -actin用作标准化的内部对照。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析相对表达水平。引物序列如下:LINC00958:F:5'-GCAGTGAAGCATCAGAAAAGTATAGT-3',R:3'-GACTTGATGTC AAAGCTGGGAG-5'; $\beta$ -Actin:F:5'-AGTGTGACGTGGACATCCGCAAAG-3',R:3'-ATCCACATC TGCTGGAAGGTGGAC-5'。

### 1.5 CCK-8法检测过表达或敲减LINC00958对宫颈癌细胞增殖的影响

根据制造商的说明,用CCK-8法测量不同时间点(0、24、48、72、96 h)的细胞活力。将3 000个细胞接种到96孔板的每个孔中。然后,在4个时间点加入10  $\mu$ L CCK-8溶液,并在37  $^{\circ}$ C下培养1 h。使用Synergy4自动酶标仪测定光密度(D)值。每个实验至少重复3次。

### 1.6 Transwell法分析过表达或敲减LINC00958对宫颈癌细胞侵袭和迁移的影响

使用带有8  $\mu$ m微孔过滤器的Transwell小室评估细胞的侵袭和迁移能力。转染48 h后,将细胞( $2 \times 10^4$ 细胞/100  $\mu$ L)铺在涂有或不涂有50  $\mu$ L Matrigel基基胶的无血清培养基的上室中。将含有10% FBS的DMEM作为化学引诱剂加入下室中。在37  $^{\circ}$ C下反应12 h后,迁移至膜底部的细胞用4%多聚甲醛固定,并用结晶紫溶液染色30 min。在200倍显微镜下对所有细胞进行计数。对五个随机区域中计数的细胞数进行平均。

### 1.7 淋巴管形成实验检测过表达或敲减LINC00958的宫颈癌细胞培养上清液对HLEC淋巴管形成的影响

将HLEC接种到预包被基质胶的96孔板中,并在来自宫颈癌细胞的条件培养基(取VEGF-C敲低的LINC00958过表达Caski细胞的培养上清液)中培养。在显微镜下拍摄淋巴管,并在3个随机区域对管状结构进行计数。

### 1.8 WB法检测过表达或敲减LINC00958对宫颈癌细胞中相关蛋白质表达的影响

使用RIPA裂解缓冲液在冰上从细胞中分离总蛋白。收集上清液,并在4  $^{\circ}$ C离心10 min后,使用二辛可宁酸蛋白质测定检测蛋白质浓度。蛋白质通过10% SDS-PAGE分离,然后转移到PVDF膜上。在室温下用5%脱脂奶粉封闭1 h后,将膜用PBS洗涤两次,随后与E-cadherin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)、VEGF-C(1:800)和 $\beta$ -actin一抗稀释液(1:10 000)在4  $^{\circ}$ C处理过夜。然后与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)在室温下处理1 h。使用增强型化学发光试剂显示信号。

### 1.9 RNA下拉和RNA免疫沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)实验

参照文献<sup>[22]</sup>方法进行实验。根据Pierce™磁性RNA-Protein Pulldown试剂盒的说明,使用RNA下拉实验检测LINC00958结合蛋白。使用Transcript Aid T7高产转录试剂盒合成了生物素化的LINC00958有义和反义序列。细胞裂解物与生物素化的LINC00958反应过夜,然后用链霉菌素磁珠沉淀。从RNA-蛋白质复合物中洗脱出保留的蛋白质,通过库

马西蓝染色或免疫印迹进行分析。

使用EZ-Magna RIP试剂盒进行RIP检测。使用完整的RIP裂解缓冲液获得 $1 \times 10^7$ 个宫颈癌细胞裂解液,用含有抗VEGF-C抗体结合的磁珠的RIP缓冲液进行免疫沉淀。小鼠IgG用作阴性对照。

### 1.10 小鼠腩淋巴结转移模型

采用随机数字表法,将小鼠随机分为3组,每组6只,分别为对照组、LINC00958组和LINC00958+shVEGF-C组。对照组将约 $3 \times 10^6$ 个Caski细胞接种小鼠的足垫。LINC00958组将约 $3 \times 10^6$ 个Caski细胞(转染LINC00958)接种小鼠的足垫。LINC00958+VEGF-C组将约 $3 \times 10^6$ 个Caski细胞(转染LINC00958和shVEGF-C)接种小鼠的足垫。每4 d测量并记录淋巴结体积,接种4周后,处死小鼠并摘取原发肿瘤和腩窝淋巴结,石蜡包埋,制成 $4.0 \mu\text{m}$ 切片,在室温下用1%牛血清白蛋白封闭切片2 h后,加入抗N-cadherin单抗(1:400),抗LYVE-1单抗(1:300)和抗VEGF-C单抗(1:400)在 $4^\circ\text{C}$ 下处理过夜,在光学显微镜下观察、拍照。记录阳性染色肿瘤细胞的百分比。

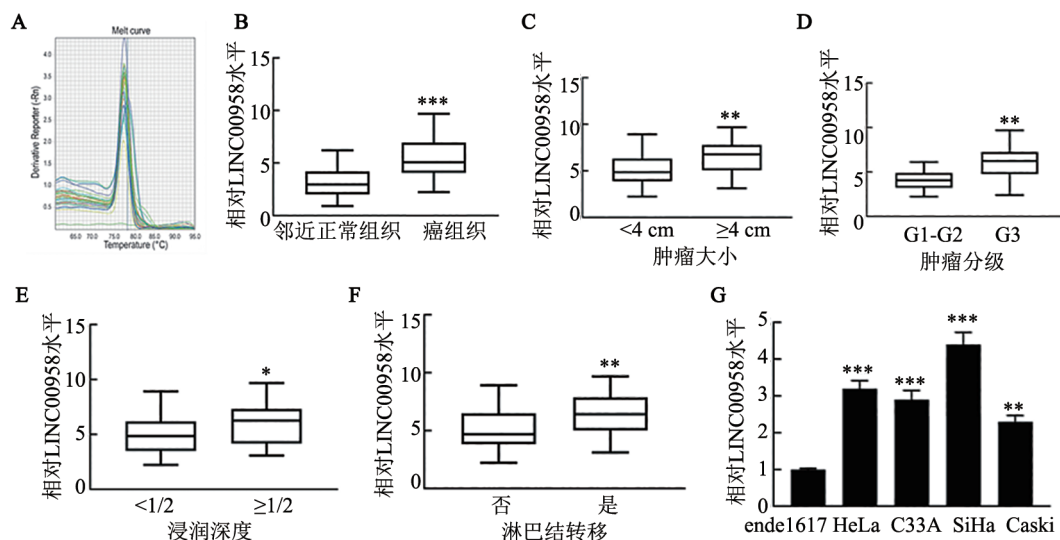
### 1.11 统计学处理

以上实验至少独立重复3次。使用SPSS 16.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对样本或独立样本 $t$ 检验、Fisher's精确检验或单因素方差分析。重复测量资料采用重复测量方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LINC00958在宫颈癌组织和细胞中呈高表达且与淋巴转移有关

在42对宫颈癌和癌旁组织中测定了LINC00958的表达水平(图1A),结果(图1B)显示,在癌性样品中LINC00958的表达较癌旁组织显著上调( $P < 0.001$ )。高水平的LINC00958与大肿瘤(图1C)、晚期肿瘤分级(图1D)、浸润深度(图1E)和淋巴转移(图1F)有关联( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与上述结果一致,与正常人宫颈上皮细胞ende1617相比,Hela、C33A、SiHa和Caski细胞中LINC00958 mRNA水平均显著升高(均 $P < 0.01$ ) (图1G)。这些结果表明,LINC00958可能在宫颈癌淋巴转移中起调节作用,促进宫颈癌进展。



A: qPCR检测LINC00958的熔解曲线; B: 在42对癌组织和配对的邻近正常组织中LINC00958表达的qPCR分析; C~F: 42例宫颈癌患者癌组织中LINC00958的表达与患者肿瘤大小(C)、肿瘤分级(D)、肿瘤浸润深度(E)和淋巴结状态(F)之间的关联; G: qPCR检测正常人宫颈上皮细胞ende1617和宫颈癌细胞中LINC00958的相对mRNA水平。与ende1617细胞相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图1 LINC00958在癌性宫颈组织中表达上调并与宫颈癌进展有关

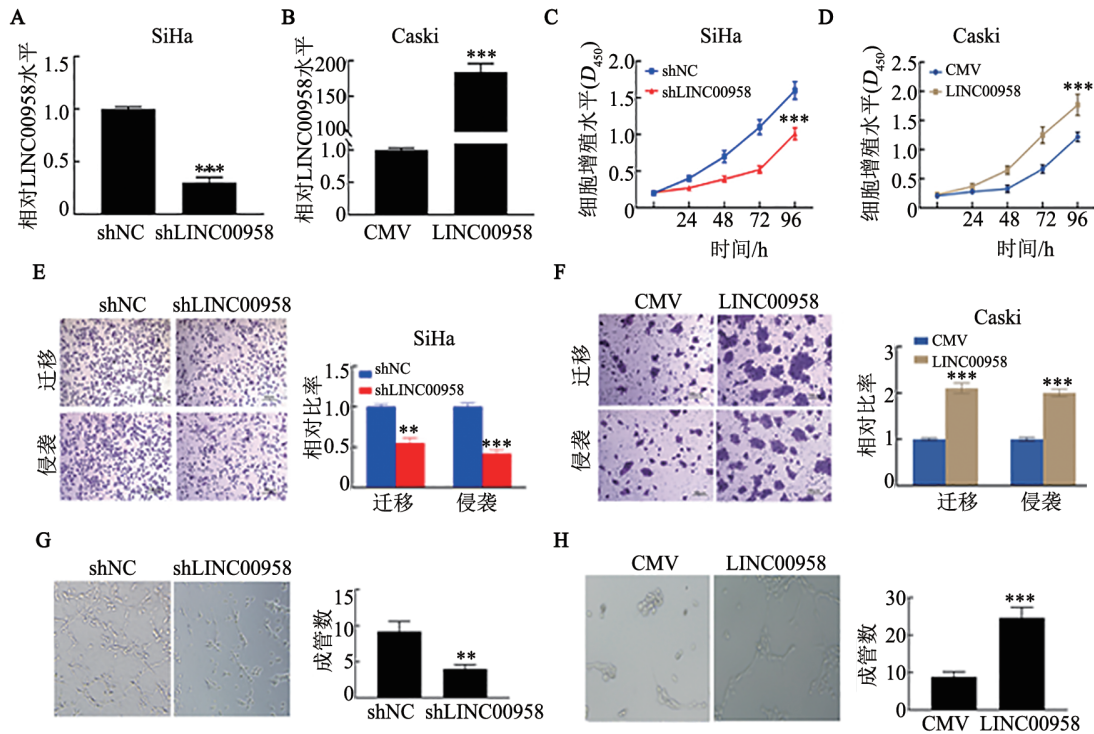
### 2.2 LINC00958促进宫颈癌细胞的转移和淋巴管生成

选择LINC00958水平最高的SiHa细胞进行LINC00958敲减实验,成功构建了敲低LINC00958表达的SiHa细胞(图2A),选择LINC00958的相对mRNA水平最低的Caski细胞用于LINC00958过表达实验,成功构建了LINC00958过表达的Caski细胞(图2B)。CCK-8法检测结果显示,shLINC00958组

SiHa细胞的增殖水平显著低于shNC组( $P < 0.05$ ,图2C),而LINC00958组Caski细胞的增殖水平显著高于CMV组( $P < 0.05$ ,图2D)。Transwell实验检测结果显示,shLINC00958组抑制SiHa细胞的迁移和侵袭能力显著低于shNC组( $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ ,图2E),而LINC00958组Caski细胞的迁移和侵袭能力显著高于CMV组(均 $P < 0.01$ ,图2F)。淋巴管形成实

验检测结果显示,与从shNC组收集的条件培养基相比,从shLINC00958组收集的条件培养基显著抑制HLEC的淋巴管形成( $P<0.01$ ,图2G)。相反,

LINC00958组的上清液显著促进了HLEC的淋巴管形成( $P<0.001$ ,图2H)。



A、B:qPCR法验证SiHa、Caski细胞中LINC00958的敲减和过表达;C、D:CCK-8法检测敲减和过表达LINC00958对宫颈癌细胞增殖的影响;E、F:Transwell实验检测敲减和过表达LINC00958对宫颈癌细胞迁移和侵袭的作用( $\times 200$ );G:与敲减LINC00958表达的SiHa细胞上清液共培养的HLEC的淋巴管形成的代表性图像和定量分析结果( $\times 20$ );H:与过表达LINC00958的Caski细胞的上清液共培养的HLEC的淋巴管形成的代表性图像和定量分析结果( $\times 20$ )。与shNC组或CMV组相比,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

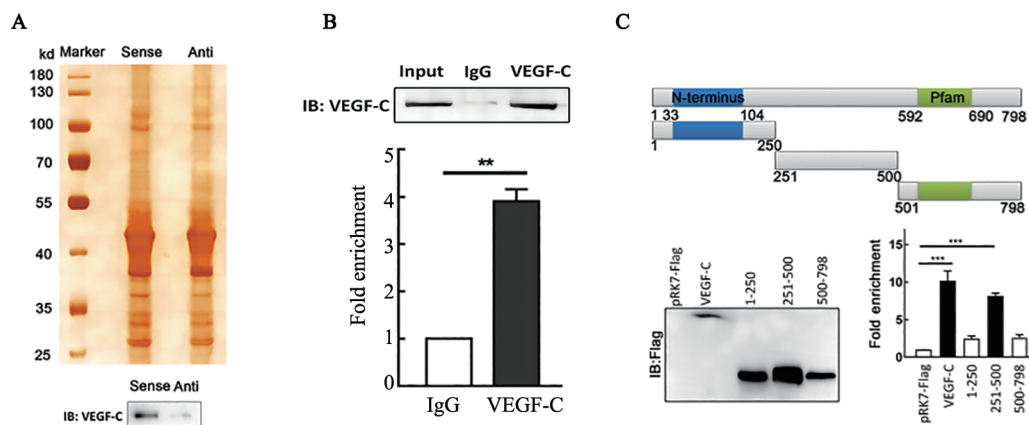
图2 LINC00958抑制宫颈癌细胞转移和淋巴管生成

### 2.3 LINC00958与宫颈癌细胞中的VEGF-C相互作用

为了探索LINC00958在宫颈癌发生中的致癌作用的分子机制,本研究进行了RNA下拉分析,以鉴定宫颈癌细胞中与LINC00958相关的蛋白质,WB法检测RNA下拉实验所获蛋白质,结果显示,VEGF-C是潜在的LINC00958相关蛋白(图3A)。RIP分析进一步证实了VEGF-C与LINC00958之间的关联(图3B)。为了鉴定LINC00958中与VEGF-C结合的区域,本研究根据Incipedia (<http://www.incipedia.org/>)和cat rapid (<http://service.tartaglialab.com/page/catrapidgroup>)预测的二级结构构建了一系列LINC00958突变体。用这些突变体进行的RNA下拉实验结果显示,LINC00958的1~379 nt、621~981 nt或380~981 nt片段分别介导其与VEGF-C的相互作用。然后本研究构建了这几个缺失突变体用于RIP分析。结果显示,VEGF-C的251~500 aa结构域在宫颈癌细胞中与LINC00958物理结合(图3C)。总之,这些数据表明LINC00958特异性结合宫颈癌细胞中的VEGF-C。

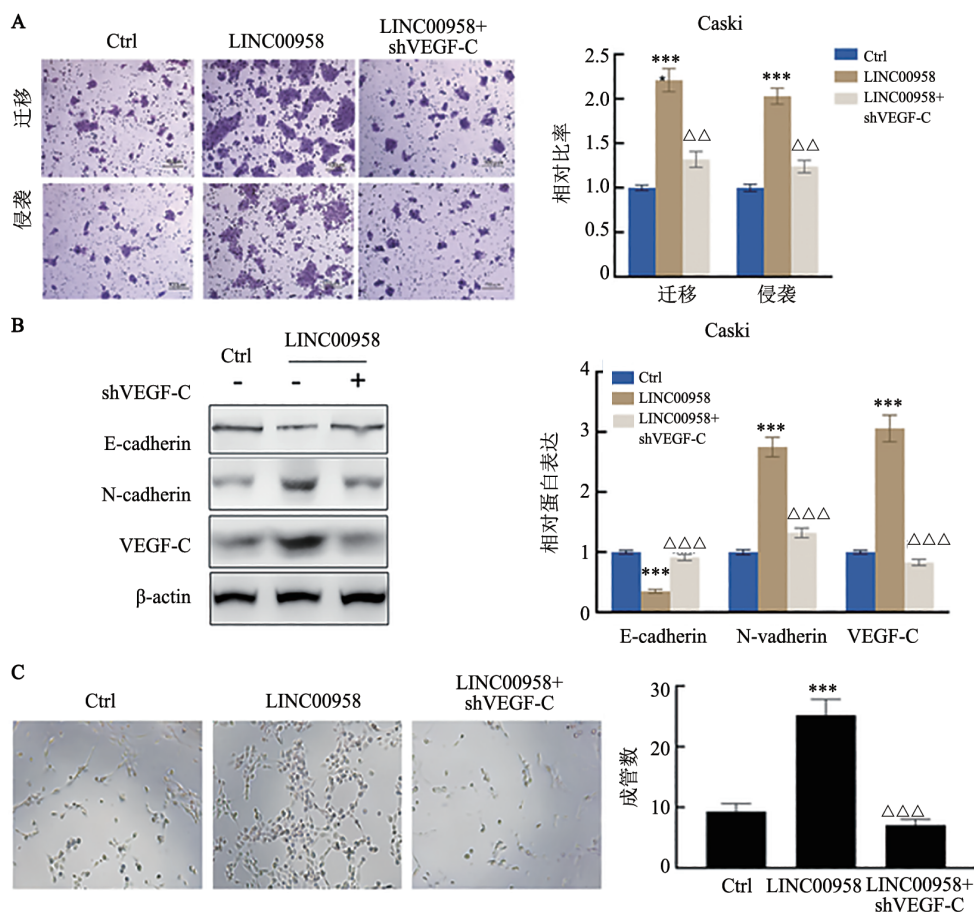
### 2.4 VEGF-C是LINC00958的功能靶点

为了验证VEGF-C是否是LINC00958的功能靶点,进行功能抑制试验。与对照组相比,LINC00958组细胞的增殖水平( $D_{450}$ )较对照组显著升高( $1.68 \pm 0.11$  vs  $1.13 \pm 0.07$ ,  $P<0.001$ ),而与LINC00958组相比,LINC00958+shVEGF-C组细胞的增殖能力显著降低( $1.08 \pm 0.06$  vs  $1.68 \pm 0.11$ ,  $P<0.001$ )。Transwell实验结果(图4A)显示,LINC00958组细胞的迁移和侵袭细胞数较对照组显著升高( $P<0.01$ 或 $P<0.001$ ),而与LINC00958组相比,LINC00958+shVEGF-C组细胞的迁移和侵袭细胞数均显著降低( $P<0.01$ )。WB法检测结果(图4B)显示,与对照组相比,LINC00958组细胞中E-cadherin表达水平显著降低,N-cadherin和VEGF-C表达水平显著升高(均 $P<0.001$ );而与LINC00958组相比,LINC00958+shVEGF-C组细胞中E-cadherin表达显著增加,N-cadherin和VEGF-C表达显著降低(均 $P<0.001$ )。此外,与从LINC00958细胞收集的条件培养基相比,从LINC00958+shVEGF-C细胞收集的条件培养基显著抑制HLEC淋巴管形成( $P<0.05$ )(图4C)。



A:通过 SDS-PAGE 银染对从 LINC00958 RNA 下拉实验中提取的蛋白质进行分析,对回收的蛋白质中的 VEGF-C 进行免疫印迹分析;B:使用指定的抗体进行 RIP 分析以确认 VEGF-C 与 LINC00958 的关联,qPCR 检测 LINC00958 的富集情况;C:进行 RIP 分析以测量全长或截短的 VEGF-C 蛋白对 LINC00958 的富集。 $**P<0.01$ , $***P<0.001$ 。

图3 LINC00958 与宫颈癌细胞中的 VEGF-C 发生物理相互作用



A:Transwell 实验检测敲减 VEGF-C 表达对 LINC00958 过表达 Caski 细胞迁移和侵袭的影响( $\times 20$ );B:WB 法检测敲减 VEGF-C 表达对 LINC00958 过表达 Caski 细胞中 E-cadherin、N-cadherin 和 VEGF-C 表达影响;C:与过表达 LINC00958 或同时敲减 VEGF-C 的 Caski 细胞的上清液共培养的 HLEC 的成管能力的代表性图像和定量分析结果( $\times 20$ )。与 Ctrl 组相比, $***P<0.001$ ;与 LINC00958 组相比, $\Delta\Delta P<0.01$ 、 $\Delta\Delta\Delta P<0.001$ 。

图4 VEGF-C 是 LINC00958 的下游靶蛋白

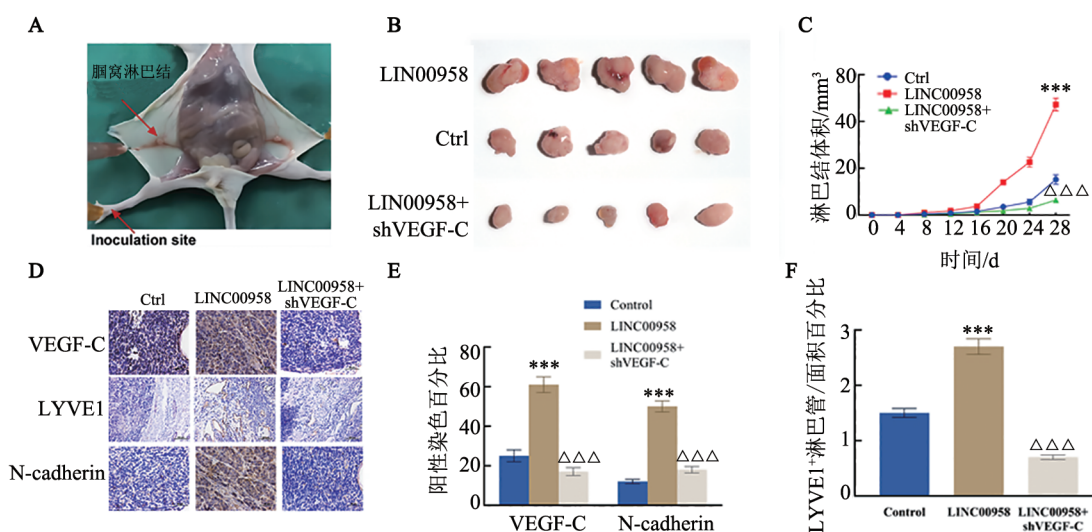
### 2.5 LINC00958 通过 VEGF-C 增强宫颈癌的侵袭、淋巴管生成和淋巴结转移

为了进一步确定 LINC00958/VEGF-C 轴在宫颈癌

淋巴结转移中的潜在作用,使用 Caski 细胞在裸鼠中建立了腋窝淋巴结转移的体内模型。注射后 4 周,与对照组相比,LINC00958 组小鼠腋窝淋巴结的体积明显增大

( $P < 0.001$ ), LINC00958+shVEGF-C组膈窝淋巴结的体积明显低于LINC00958组( $P < 0.001$ ) (图5A~C)。IHC分析结果(图5D~F)表明,与对照组相比,LINC00958组中VEGF-C蛋白和EMT标志物N-cadherin、LYVE-1的阳性染色均显著增加(均 $P < 0.001$ );与LINC00958组相

比,LINC00958+shVEGF-C组VEGF-C蛋白、N-cadherin蛋白以及LYVE-1的阳性染色均显著减少(均 $P < 0.001$ )。这些结果表明LINC00958/VEGF-C轴与宫颈癌体内淋巴结转移有关。



A~C: 膈窝淋巴结的代表性图像,以及对所示组中淋巴结的生长的分析;D~F:通过免疫组织化学检测足垫肿瘤样品连续切片中VEGF-C、N-cadherin和LYVE-1表达的代表性图像和定量分析( $\times 50$ )。与Ctrl组相比,\*\*\* $P < 0.001$ ;与LINC00958组相比, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图5 LINC00958通过促进VEGF-C表达增强Caski细胞小鼠宫颈癌移植瘤模型的淋巴结转移

### 3 讨论

研究<sup>[13]</sup>表明,lncRNA与多种癌症的发生和发展密切相关。虽然lncRNA在宫颈癌和高危人乳头瘤病毒感染诱导的宫颈癌发生中已得到广泛研究<sup>[14]</sup>,但很少有研究关注lncRNA在宫颈癌淋巴转移中的生物学功能和机制。本研究探讨了课题组先前证实的宫颈癌相关的LINC00958在淋巴结转移中的作用。临床数据分析结果显示,LINC00958在宫颈癌组织中表达上调,并与淋巴结转移密切相关,宫颈癌患者原发癌组织中LINC00958的高表达与远处淋巴转移的风险增加有关,表明LINC00958可能成为生物标志物,帮助后续的研究人员进一步阐明其在宫颈癌调控和临床靶向药物开发中的作用。

LINC00958主要位于细胞核中,其转录位点位于11号染色体的12,877,466和12,989,597之间<sup>[15]</sup>。先前的研究<sup>[16]</sup>表明,LINC00958失调表现在多种恶性肿瘤中,参与肿瘤细胞恶性进展的调节。还发现LINC00958与抗凋亡、化学放射治疗抗性和淋巴管生成密切相关。LINC00958作为一种ceRNA,可以通过sponging miRNA调控靶基因的表达。此外,它还参与JAK/STAT3和其他信号通路的激活<sup>[17]</sup>。尽管如此,目前对LINC00958在宫颈癌的研究是有限的。本研究表明,LINC00958在体

外促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭,LINC00958过表达细胞的培养上清液能够促进HLEC形成新的淋巴管。此外,在小鼠模型中,LINC00958促进宫颈癌细胞向膈窝淋巴结的转移。本研究证实的LINC00958在体外和体内的淋巴管生成作用强调了其作为肿瘤淋巴转移的预测性生物标志物和宫颈癌患者的治疗靶点的潜在意义。

淋巴结转移是一个复杂的过程,涉及肿瘤内和肿瘤周围的淋巴管生成、肿瘤细胞向淋巴管的扩散,以及通过淋巴系统运输到淋巴结以进一步定植和扩张<sup>[11]</sup>。研究<sup>[18]</sup>表明,淋巴结淋巴管生成是评估多种肿瘤细胞转移和患者OS的标志。临床上,淋巴管生成对伴有淋巴结转移的肌浸润性膀胱癌预后不良至关重要。肿瘤细胞的转移是癌症患者死亡的主要原因,并且主要通过淋巴管和血管发生进行转移。肿瘤细胞可以产生生长因子,如VEGF-C、VEGF-D和CSF1,从而促进实体瘤内和周围的初始和集合淋巴管的扩大<sup>[19]</sup>。目前认为VEGF-C是与人类癌症相关的淋巴管生成的关键调节因子,伴有淋巴结转移的宫颈癌患者的VEGF-C水平较高<sup>[4]</sup>。此外,VEGF-C通过与血管内皮生长因子受体3结合并促进淋巴结转移来驱动新淋巴管的形成<sup>[19]</sup>。然而,VEGF-C在宫颈癌的淋巴管生成和淋巴结转移中的具体作用仍然未知。本研究发现,LINC00958诱导VEGF-C表达上调,用shRNA敲低VEGF-C则显著抑制LINC00958诱导的

宫颈癌淋巴管生成,表明 VEGF-C 是淋巴管生成的重要诱导剂。先前研究<sup>[20]</sup>已证实, LINC00958 正向调节 VEGF-C, 其可能通过将 WD 重复结构域 5 募集到 VEGF-C 的启动子以形成三链体, 促进启动子 H3K4 三甲基化, 这反过来促进靶基因 VEGF-C 的转录。本研究的数据表明 LINC00958 特异性结合宫颈癌细胞中的 VEGF-C, 其中 LINC00958 的 1~379 nt、621~981 nt 或 380~981 nt 片段分别介导其与 VEGF-C 的相互作用。这些数据表明 LINC00958 可以通过直接结合或间接影响 VEGF-C 表达。VEGF-C 是一种淋巴血管特异性生长因子, 它对于破坏内皮淋巴血管屏障和促进癌细胞的淋巴管侵袭是必不可少的, 下调 LINC00958 具有抗淋巴和抗转移作用, 包括阻断淋巴管生成和抑制细胞侵袭。因此, 本研究的结果揭示了 LINC00958 诱导的 VEGF-C 表达在淋巴管生成中的调节机制, 并可能为宫颈癌中淋巴管转移的调节提供见解。

总之, 本研究的数据显示, LINC00958 直接与 VEGF-C 蛋白相互作用, 以增强宫颈癌的增殖、侵袭、淋巴管生成, 并促进宫颈癌中的淋巴管转移。因此, LINC00958 可能成为转移性宫颈癌的潜在预测生物标志物和治疗靶点。

## 【参考文献】

- [1] 李道娟, 师金, 靳晶, 等. 宫颈癌的流行病学趋势[J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(9): 912-916. DOI: 10.3760/cma.j.cn112152-20190904-00573.
- [2] OLTHOF E P, VAN DER AA M A, ADAM J A, *et al.* The role of lymph nodes in cervical cancer: incidence and identification of lymph node metastases—a literature review[J]. *Int J Clin Oncol*, 2021, 26(9): 1600-1610. DOI: 10.1007/s10147-021-01980-2.
- [3] DU Y, CAO M L, LIU Y W, *et al.* Tumor microenvironment remodeling modulates macrophage phenotype in breast cancer lymphangiogenesis [J/OL]. *FASEB J*, 2022, 36(4): e22248 [2023-08-26]. <https://doi.org/10.1096/fj.202101230r>. DOI: 10.1096/fj.202101230r.
- [4] WANG C A, LI C F, HUANG R C, *et al.* Suppression of extracellular vesicle VEGF-C-mediated lymphangiogenesis and pancreatic cancer early dissemination by a selective HDAC1/2 inhibitor[J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20(9): 1550-1560. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0963.
- [5] ZHENG H H, CHEN C H, LUO Y M, *et al.* Tumor-derived exosomal BCYRN1 activates WNT5A/VEGF-C/VEGFR3 feedforward loop to drive lymphatic metastasis of bladder cancer[J/OL]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(7): e497 [2023-08-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8288020/>. DOI: 10.1002/ctm2.497.
- [6] KONG D G, ZHOU H B, NEELAKANTAN D, *et al.* VEGF-C mediates tumor growth and metastasis through promoting EMT-epithelial breast cancer cell crosstalk[J/OL]. *Oncogene*, 2021, 40(5): 964-979 [2023-08-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7867573/>. DOI: 10.1038/s41388-020-01539-x.
- [7] YANG M Y, LU H F, LIU J J, *et al.* lncRNAfunc: a knowledgebase of lncRNA function in human cancer[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D1295-D1306 [2023-08-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8728133/>. DOI: 10.1093/nar/gkab1035.
- [8] MCCABE E M, RASMUSSEN T P. lncRNA involvement in cancer stem cell function and epithelial-mesenchymal transitions[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 75: 38-48. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.12.012.
- [9] WANG L F, ZHONG Y B, YANG B H, *et al.* LINC00958 facilitates cervical cancer cell proliferation and metastasis by sponging miR-625-5p to upregulate LRRC8E expression[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(3): 2500-2509. DOI: 10.1002/jcb.29472.
- [10] ZHEN H T, DU P, YI Q, *et al.* LINC00958 promotes bladder cancer carcinogenesis by targeting miR-490-3p and AURKA[J/OL]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1145 [2023-08-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34702201/>. DOI: 10.1186/s12885-021-08882-6.
- [11] HE W, ZHONG G Z, JIANG N, *et al.* Long noncoding RNA BLACAT2 promotes bladder cancer-associated lymphangiogenesis and lymphatic metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(2): 861-875. DOI: 10.1172/JCI96218.
- [12] ZHENG W Q, LI J, ZHOU X, *et al.* The lncRNA XIST promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting miR-337[J]. *Arab J Gastroenterol*, 2020, 21(3): 199-206. DOI: 10.1016/j.ajg.2020.07.010.
- [13] ZHONG Q H, LU M Z, YUAN W Q, *et al.* Eight-lncRNA signature of cervical cancer were identified by integrating DNA methylation, copy number variation and transcriptome data[J/OL]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 58 [2023-08-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33557879/>. DOI: 10.1186/s12967-021-02705-9.
- [14] SHARMA S, MUNGER K. Expression of the long noncoding RNA DINO in human papillomavirus-positive cervical cancer cells reactivates the dormant TP53 tumor suppressor through ATM/CHK2 signaling[J]. *mBio*, 2020, 11(3): e01190-e01120 [2023-08-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32546626/>. DOI: 10.1128/mBio.01190-20.
- [15] ZHANG T, SU F, LU Y B, *et al.* MYC/MAX-activated LINC00958 promotes lung adenocarcinoma by oncogenic transcriptional reprogramming through HOXA1 activation[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 807507 [2023-08-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35223488/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.807507.
- [16] CHEN S, CHEN J Z, ZHANG J Q, *et al.* Silencing of long noncoding RNA LINC00958 prevents tumor initiation of pancreatic cancer by acting as a sponge of microRNA-330-5p to down-regulate PAX8[J]. *Cancer Lett*, 2019, 446: 49-61. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.12.017.
- [17] JIA B, DAO J F, HAN J S, *et al.* LINC00958 promotes the proliferation of TSCC via miR-211-5p/CENPK axis and activating the JAK/STAT3 signaling pathway[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 147 [2023-08-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33658048/>. DOI: 10.1186/s12935-021-01808-z.
- [18] ROY S, BANERJEE P, EKSER B, *et al.* Targeting lymphangiogenesis and lymph node metastasis in liver cancer[J]. *Am J Pathol*, 2021, 191(12): 2052-2063. DOI: 10.1016/j.ajpath.2021.08.011.
- [19] LI W N, HSIAO K Y, WANG C, *et al.* Extracellular vesicle-associated VEGF-C promotes lymphangiogenesis and immune cells infiltration in endometriosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(41): 25859-25868. DOI: 10.1073/pnas.1920037117.
- [20] LI H X, GAO J, LIU L, *et al.* LINC00958: a promising long non-coding RNA related to cancer[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113087 [2023-08-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35569349/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113087.

[收稿日期] 2023-08-27

[修回日期] 2024-01-03

[本文编辑] 黄静怡