

长链非编码 RNA LINC00222 对肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及作用机制的研究

胡艳正, 牛彦杰, 石鹏飞 (咸阳市第一人民医院胸外科, 陕西咸阳 712000)

摘要: **目的** 检测肺腺癌组织及细胞系中 LncRNA LINC00222 表达, 探究其对肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响和相关作用机制。**方法** 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法和 Western blot 实验检测肺腺癌组织及细胞中 LINC00222 表达; 构建 LINC00222 过表达载体, 验证其转染效率; 采用 CCK-8 法、Hoechst 33342/PI 染色法、划痕实验及 Transwell 实验分别检测过表达 LINC00222 对肺腺癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响; 采用 Western blot 法检测肺腺癌细胞中 P-GSK-3 β , GSK-3 β 蛋白及 β -catenin 核蛋白表达; 采用荧光素酶基因实验及 RIP 实验验证探究 LINC00222 影响肺腺癌生物学行为的相关作用机制。**结果** 肺腺癌组织中 LINC00222 mRNA 和蛋白表达明显低于癌旁正常组织, 差异有统计学意义 ($t=7.388, 15.100$, 均 $P<0.001$); 肺腺癌细胞系中 LINC00222 表达明显低于人正常肺胚细胞 ($F=21.926, P<0.001$)。过表达 LINC00222 后, 肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力明显抑制, 细胞凋亡数目明显增多 ($P<0.01$)。过表达 LINC00222 后, GSK-3 β 磷酸化明显降低, GSK-3 β 催化活性明显增强, β -catenin 核转位受到抑制 ($P<0.01$)。LINC00222 靶向调控结合 GSK-3 β 和 GSK-3 β 蛋白共沉淀中 LINC00222 表达显著高于 IgG 蛋白共沉淀 ($P<0.05$)。**结论** 肺腺癌中 LncRNA LINC00222 低表达, 其过表达可抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭, 促进细胞凋亡, 可能与其调控 GSK-3 β 催化活性, 抑制 β -catenin 核转位有关。

关键词: 长链非编码 RNAs LINC00222; 肺腺癌; 生物学行为

中图分类号: R734.2; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 05-016-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.05.004

Effect of Long Non Coding RNA LINC00222 on Proliferation, Migration, Invasion and Apoptosis of Lung Adenocarcinoma Cells and Its Mechanism

HU Yan-zheng, NIU Yan-jie, SHI Peng-fei

(Department of Thoracic Surgery, Xianyang First People's Hospital, Shaanxi Xianyang 712000, China)

Abstract: **Objective** The expression of lncRNA LINC00222 in lung adenocarcinoma tissues and cell lines was detected to explore the effects of lncRNA LINC00222 on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of lung adenocarcinoma cells and the related mechanisms. **Methods** The expression of LINC00222 in lung adenocarcinoma tissues and cells was detected by qRT-PCR and Western blot. Overexpression vector LINC00222 was constructed to verify its transfection efficiency. CCK-8 assay, Hoechst 33342/PI staining assay, scratch assay and Transwell assay were used to detect the effects of overexpression of LINC00222 on proliferation, apoptosis, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells. Western blot was used to detect the expression of P-GSK-3 β , GSK-3 β protein and β -catenin nuclear protein in lung adenocarcinoma cells. Luciferin gene experiment and RIP experiment were used to investigate the mechanism of LINC00222 affecting the biological behavior of lung adenocarcinoma. **Results** The mRNA and protein expressions of LINC00222 in lung adenocarcinoma tissues were significantly lower than those in adjacent normal tissues, the difference were statistically significant ($t=7.388, 15.100$, all $P<0.001$). The expression of LINC00222 in lung adenocarcinoma cell lines was significantly lower than that in normal human lung embryo cell lines ($F=21.926, P<0.001$). After the overexpression of LINC00222, the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells were significantly inhibited, and the number of cell apoptosis was significantly increased ($P<0.01$). After overexpression of LINC00222, GSK-3 β phosphorylation was significantly decreased, GSK-3 β catalytic activity was significantly enhanced, and β -catenin nuclear translocation was inhibited ($P<0.01$). LINC00222 targeted the binding of GSK-3 β , and the expression of LINC00222 in GSK-3 β protein co-precipitation was significantly higher than that in IgG protein co-precipitation ($P<0.05$). **Conclusion** LncRNA LINC00222 was low expressed in lung adenocarcinoma, and its overexpression inhibited the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells, and promoted cell apoptosis, which may be

基金项目: 陕西省社会发展科技攻关项目 (2018SF081)。

作者简介: 胡艳正 (1986-), 男, 研究生, 主治医师, 研究方向: 肺癌、食管癌、纵隔肿瘤。

通讯作者: 石鹏飞 (1979-), 男, 副主任医师, E-mail: ringring5452000@163.com。

related to its regulation of GSK-3 β catalytic activity and inhibition of β -catenin nuclear translocation.

Keywords: LncRNAs LINC00222; lung adenocarcinoma tissues; biological behavior

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是临床常见的恶性肿瘤, 约占肺癌类型的 85%, 而肺腺癌是 NSCLC 的一种, 约占 NSCLC 的 20%~30%^[1]。肺腺癌早期症状不明显, 临床检出率低, 晚期转移患者较多, 预后不佳。因此对其进行积极防治已成为医学领域亟待解决的重要问题。既往研究表明^[2-3], 长链非编码 RNA (LncRNAs) 能够调控基因表达, 参与肿瘤细胞的多种生物学行为, 影响癌症的发生发展。且越来越多研究证明^[4-6], LncRNAs 在肿瘤进展和转移中扮演重要角色。故基于分子生物学角度探究肺腺癌的发生发展机制, 找寻特异性治疗靶点, 对临床攻克具有积极意义。LncRNA LINC00222 是位于 6 号染色体, 具有 5 个外显子的非编码 RNA。既往相关研究指出^[7], 肝母细胞瘤中 LINC00222 低表达, 参与调控肿瘤的发生发展进程, 可作为评估细胞生物学行为及预后的预测标志。然目前有关 LINC00222 在肺腺癌发生发展中的生物学功能及分子机制尚不明确且相关报道较少。因此, 本研究通过构建 LINC00222 过表达载体, 探究了其对肺腺癌细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响及分子作用机制, 以期探寻新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2019 年 10 月~2020 年 10 月期间在我院行手术治疗的 34 例肺腺癌患者的癌组织及其对应癌旁正常组织, 所有组织由术中获取经病理确诊后制成组织标本于低温液氮中保存备用。人肺腺癌细胞系 A549, LTP-a-2 及人正常肺胚细胞系 MRC-5 购自中国科学院细胞库, 于含 10 ml/dl 胎牛血清 1640 培养液, 37℃, 5 ml/dl CO₂ 培养箱孵育培养, 每 48 h 传代一次。

1.2 试剂及仪器 1640 培养液购自美国 GIBCO 公司; pCDNA3.1 载体、empty vector 空载体及 GSK-3 β 3'UTR 野生型 (WT) 或突变型 (MUT) 双荧光素酶报告基因载体购自中国金斯瑞公司; Lipo2000, Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录反应试剂盒购自日本 Takara 公司; CCK-8 反应液、Hoechst33342 10 染液购自日本 Dojindo 公司; 酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司; Matrigel 购自美国 BD 公司; 倒置荧光显微镜购自美国 Leica 公司; 免疫印迹鼠抗兔 p-GSK-3 β , β -catenin, GSK-3 β 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记二抗购自美国 CST 公司; ECL 发光液购自中国碧云天公司; RIP 试剂盒购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 LINC00222 生物信息学分析: 通过检索生物信息学网站及 Gene Bank 数据库, 利用 Primer5. 引物设计软件以 GAPDH 为内参检索设计 LINC00222 引物序列, LINC00222 上游: 5'-GGCTCTGATCAGGCTAAGAGCA-3', 下游: 5'-TGTTTCGTCTGTAACAGGTGTCATGG-3'; GAPDH 上游: 5'-TGGACGACTAACTGGTTAGG-3', 下游: 5'-GGTATGCACTGTAGTCATCAG-3', 均由 GenePharma 公司合成, 于 -20℃ 保存。

1.3.2 LINC00222 过表达载体及质粒构建: 将 LINC00222 序列全长连接至 pCDNA3.1 载体构建 pCDNA-LINC00222 质粒, 同时构建 empty vector 空载体作为对照。融化的 Jm109 感受态细胞加入构建质粒进行转化挑取白色克隆, 于 LB 培养液震荡过夜培养; 将菌液移入 EP 管离心弃上清, 分次加入 Buffer S1/S2/S3 反应获得白色沉淀, 离心, 弃出液; 分次加入 Buffer W1/W2/W3 液, 离心, 弃出液, 获得质粒 DNA 并测定其浓度及纯度。

1.3.3 细胞转染实验: 转染前一天以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 每孔加入无抗培养液; 双无培养液稀释质粒 DNA, Lipo2000 溶于双无培养液, 室温混匀静置制成转染液加入每孔进行转染, 每 4~6 h 更换一次培养液, 37℃, 5ml/dl CO₂ 培养箱培养 12~48 h 行基因表达检测。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 实验: 采用 Trizol 试剂盒提取组织、细胞总 RNA 并检测其浓度及纯度; 按照 M-MLV 逆转录反应试剂盒及其反应体系进行逆转录获取 cDNA, 并以此为模板进行 PCR 扩增及基因检测。引物由 Invitrogen 公司合成, LINC00222 引物序列上游: 5'-GCGTGTGTACTGCCAAGGAGCA-3', 下游: 5'-TGTTTCGTGTCTAAGAGCTGTCAACG-3'; 内参 GAPDH 序列上游: 5'-TGCACGACGAACTGCTTACG-3', 下游: 5'-GCGATGCACTGTGCTCATCAG-3'。反应条件 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 72℃ 10 min, 70℃ 30 s, 循环 40 次。使用美国 Applied Biosystems 7900 仪器及 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行基因表达检测分析。

1.3.5 细胞增殖实验: 含 10 ml/dl 胎牛血清 1640 培养液培养细胞接种于 6 孔板, 转染 6 h 后更换正常培养液; 24 h 收集制成细胞悬液接种于 96 孔板, 100 μ l/孔, 37℃, 5ml/dl CO₂ 培养箱培养; 每孔加入 CCK-8 反应液, 采用酶标仪分别于 0, 24, 48, 72, 96 h 测定细胞 450 nm 处吸光度值并绘制生长曲线。

1.3.6 细胞凋亡实验: 细胞培养、铺板、转染, 制成细胞悬液; 将 10^5 个细胞悬浮于培养液, 加入

Hoechst33342 10 染液,混匀孵育,离心弃上清;加入 PBS 液悬浮细胞,避光加入 PI 染液,混匀;取细胞悬液滴于载玻片,封片,共聚焦显微镜下观察细胞凋亡情况(细胞凋亡时细胞核呈浓染红色)。

1.3.7 细胞迁移实验:采用 Marker 笔于 6 孔板背面均匀画线横穿过孔;细胞培养、铺板、转染 24 h 后用枪头垂直入背面横线划痕;PBS 液清洗,加入 1640 培养液,拍照并标记位置,37℃,5 ml/dl CO₂ 培养箱培养 48 h 取出 6 孔板,再次同位拍照记录。

1.3.8 细胞侵袭实验:稀释 Matrigel,包被于 Transwell 小室上室温风干,每孔加入含 10g/L BSA 的无血清培养液孵育;常规消化、离心取沉淀,PBS 液清洗,10 g/dl BSA 的无血清培养液重悬,密度 10⁵ 个/ml;取细胞悬液加入 Transwell 小室,24 孔板下室加入含 10 ml/dl 胎牛血清 1640 培养液,培养箱培养 24 h;取出小室,PBS 液清洗,95ml/dl 酒精固定,DAPI 染色;随机选取 5 个视野于倒置荧光显微镜下计数,取平均值。

1.3.9 免疫印迹实验:细胞转染、培养后用冷 PBS 液清洗收集于 EP 管,离心、弃上清,加入 RIPA 液裂解(蛋白磷酸化水平检测时按 100:1 比例在裂解液中加入 Na₃VO₄),提取总蛋白。同方法获取沉淀依次加入细胞浆蛋白抽提试剂 A 和 B,涡旋、水浴、离心,取沉淀加入含 PMSF 细胞核蛋白抽提剂,提取细胞核蛋白。配置 SDS-聚丙烯酰胺凝胶体系行上样与电泳分离、转印及封闭;TBST 液洗膜,加入 p-GSK-3β 一抗,β-catenin 抗体及 GSK-3β 抗体,孵育过夜;洗膜加入二抗辣根过氧化物酶,室温孵育,PVDF 膜滴加 ECL 发光液,检测条带。

1.3.10 双荧光素酶报告实验:利用生物信息学方法预测 LINC00222 与 GSK-3β 的结合位点并经体外克隆扩增,设计具有预测靶位点的 GSK-3β 3'UTR 野生型(WT)或突变型(MUT)双荧光素酶报告基因载体,突变的 3'UTR 区作为对照组。转染前 24 h 将 A549, LTP-a-2 细胞接种至 24 孔板培养,使用 Lipofectamine 2000 将构建的荧光素酶报告基因载体和含有海肾荧光素酶的对照载体共转染,在转染 48 h 后使用双荧光素酶报告基因测定系统测定荧光素酶活性,测定 LINC00222 对 GSK-3β 荧光素酶活性的调控情况,实验重复 3 次。

1.3.11 RNA 结合蛋白免疫沉淀实验:细胞经转染、培养,加入甲醛固定,PBS 液清洗,甘氨酸停止液终止反应;加入含 PMSF 的 PBS 刮除液收集细胞至 EP 管,离心、弃上清,滴入 Complete lysis buffer 裂解液重悬,冰上裂解,离心,弃上清,加入超声

液重悬(冰上操作),离心取上清加入 DNA 酶处理样品。EP 管洗磁珠,加入反应体系,旋转过夜;利用 RIP 试剂盒行样本收集及检测。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件进行实验数据录入分析,所有实验均重复 3 次取平均值数据,采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组比较采用方差分析,重复测量数据采用重复测量方差分析。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肺腺癌组织及癌旁正常组织中 LINC00222 表达 qRT-PCR 检测 34 例肺腺癌组织中 LINC00222 mRNA 相对表达,结果显示:肺腺癌组织中 LINC00222 相对表达量(0.324 ± 0.186)显著低于癌旁正常组织(1.056 ± 0.547),差异有统计学意义(*t* = 7.388, *P* < 0.001)。Western blot 实验检测肺腺癌组织 LI 中 NC00222 蛋白表达,结果显示:肺腺癌组织中 LINC00222 蛋白表达(0.427 ± 0.149)同样较癌旁正常组织明显降低(0.997 ± 0.162),差异有统计学意义(*t* = 15.100, *P* < 0.001)。

2.2 肺腺癌细胞系中 LINC00222 低表达 qRT-PCR 检测显示:人正常肺胚细胞系 MRC-5 及肺腺癌 A549, LTP-a-2 细胞系中 LINC00222 表达量分别是 1.147 ± 0.251, 0.283 ± 0.176, 0.159 ± 0.153,较正常肺胚细胞系相比,肺腺癌细胞系中 LINC00222 显著低表达(*F* = 21.926, *P* = 0.002)。

2.3 LINC00222 转染效率验证 分别转染 pCDNA-LINC00222 及 empty vector 载体至 A549, LTP-a-2 细胞系,qRT-PCR 检测显示:与转染 empty vector 载体(1.001 ± 0.004)相比,转染 pCDNA-LINC00222 载体后 A549(8.351 ± 1.554),LTP-a-2(12.347 ± 2.143)细胞中 LINC00222 表达显著提高,差异有统计学意义(*F* = 42.538, *P* < 0.001)。

2.4 LINC00222 抑制肺腺癌细胞增殖 见图 1。CCK-8 法检测显示:与转染 empty vector 载体相比,转染 pCDNA-LINC00222 载体后 A549, LTP-a-2 细胞增殖能力显著降低(*P* < 0.05)。

2.5 LINC00222 促进肺腺癌细胞凋亡 见图 2。Hoechst 33342/PI 染色法检测显示:与转染 empty vector 载体相比,转染 pCDNA-LINC00222 载体后 A549, LTP-a-2 细胞凋亡数目显著增加(*P* < 0.01)。

2.6 LINC00222 抑制肺腺癌细胞迁移及侵袭 见图 3。划痕实验及 Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力,结果显示:与转染 empty vector 载体相比,转染 pCDNA-LINC00222 载体后 A549, LTP-a-2 细胞迁移、侵袭能力受到明显抑制。

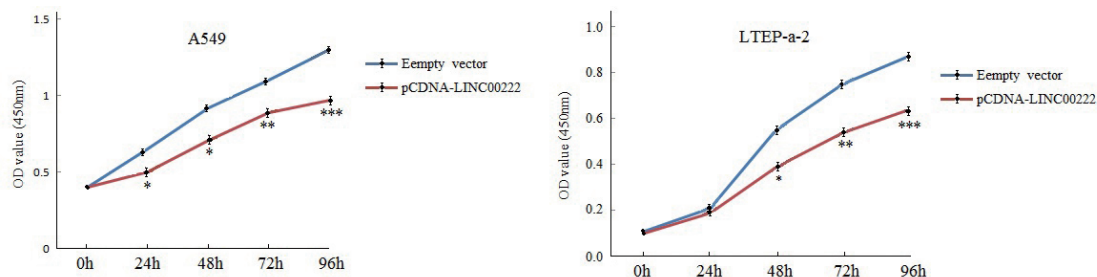


图1 CCK-8 检测转染 pCDNA-LINC00222 后 A549, LTP-a-2 细胞增殖 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

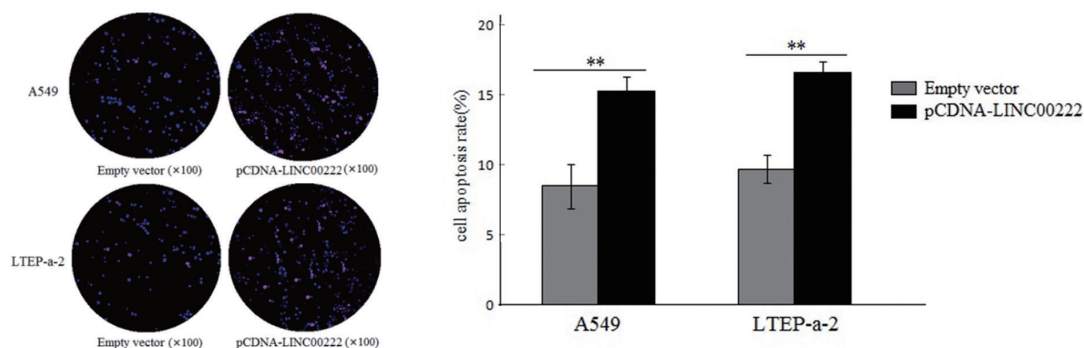


图2 Hoechst 33342/PI 染色法检测转染 pCDNA-LINC00222 后 A549, LTP-a-2 细胞凋亡情况 (** $P<0.01$)

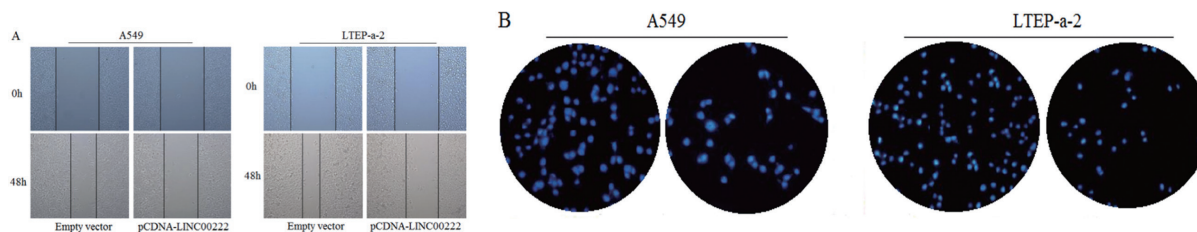


图3 划痕实验 (A)、Transwell 实验 (B) 检测转染 pCDNA-LINC00222 后 A549, LTP-a-2 细胞迁移、侵袭情况

2.7 过表达 LINC00222 增强 GSK-3 β 激酶活性, 抑制 β -catenin 核转位 为验证肺腺癌中 LINC00222 对 GSK-3 β 激酶活性的影响, 研究分别转染 pCDNA-LINC00222 及 empty vector 载体至 A549, LTP-a-2 细胞。qRT-PCR 法检测显示: 转染后 A549, LTP-a-2 细胞中两组 GSK-3 β mRNA 表达

无显著差异 ($P>0.05$), 见图 4。Western blot 法检测转染后 GSK-3 β 在 Ser9 磷酸化水平表达差异显示: 转染后 A549, LTP-a-2 细胞 GSK-3 β 磷酸化水平显著降低, GSK-3 β 总蛋白无明显差异, 见图 5, 提示过表达 LINC00222 增强 GSK-3 β 激酶活性。

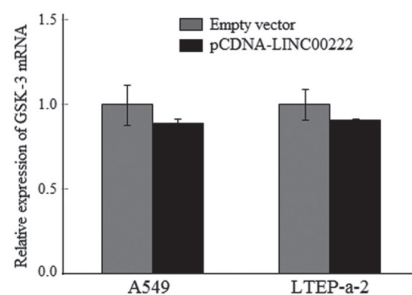


图4 qRT-PCR 检测转染 pCDNA-LINC00222 后 A549, LTP-a-2 细胞中 GSK-3 β mRNA 水平表达

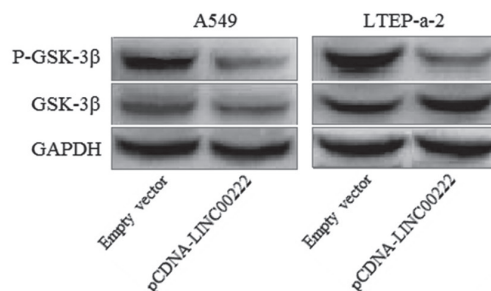


图5 Western blot 法检测转染 pCDNA-LINC00222 后 A549, LTP-a-2 细胞中 P-GSK-3 β 和 GSK-3 β 蛋白表达

下游基因 β -catenin 是否转入细胞核继续发挥作用由 GSK-3 β 催化活性直接调控影响。研究对肺腺癌中 LINC00222 影响 β -catenin 核转位的作用机制进行了验证。Western blot 法检测显示, 转染过表达 LINC00222 后, 细胞核内 β -catenin 蛋白表

达降低 ($P<0.05$) ; 当加入 TWS119 抑制 GSK-3 β 活性后, β -catenin 蛋白水平明显恢复, 见图 6, 提示 LINC00222 通过调控 GSK-3 β 催化活性进而抑制 β -catenin 核转位。

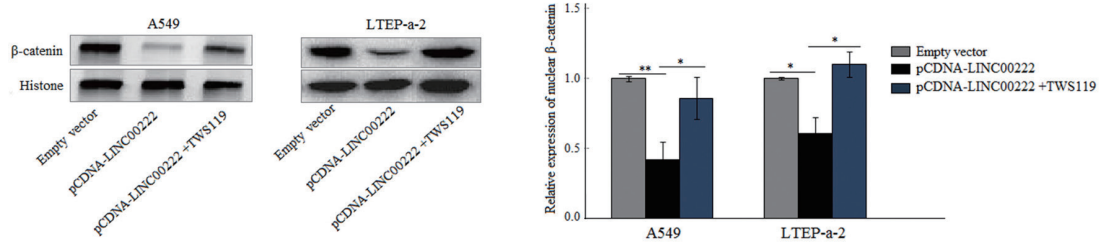


图6 Western blot 法检测转染 pCDNA-LINC00222 或 pCDNA-LINC00222+TWS119 后 A549, LTP-a-2 细胞核内 β -catenin 蛋白表达 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$) .

2.8 荧光素酶报告基因验证 LINC00222 与 GSK-3 β 靶向关系 见图 7。为探究 LINC00222 在肺腺癌中是否直接调控 GSK-3 β 表达, 研究构建了 GSK-3 β 的荧光素酶报告基因载体, 利用生物信息学检测分析发现 GSK-3 β 是 LINC00222 的靶标, 通过双荧光素酶标记实验验证了 LINC00222 与 GSK-3 β 存在相互结合位点, 提示两者具备可能的调控关系。后将 GSK-3 β -3'UTR 质粒及 empty vector 和 pCDNA-LINC00222 载体共转染 A549,

LTP-a-2 细胞, 采用荧光素酶报告基因实验检测各组细胞中 GSK-3 β 表达活性, 结果显示: 与 empty vector 组相比, A549, LTP-a-2 细胞转染 pCDNA-LINC00222 后含有野生型 GSK-3 β -3'UTR 报告质粒荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$), 而含有突变型 GSK-3 β -3'UTR 的报告质粒荧光素酶活性降低不明显 ($P>0.05$)。表明在基因水平上 GSK-3 β 受 LINC00222 直接调控, GSK-3 β 蛋白是 LncRNA LINC00222 的靶标。

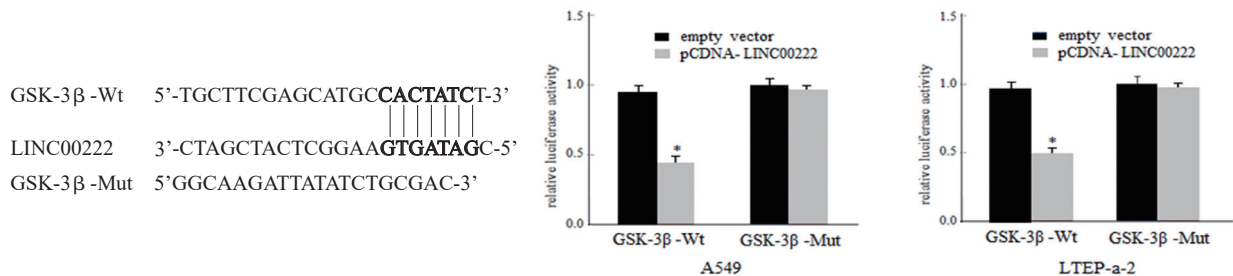
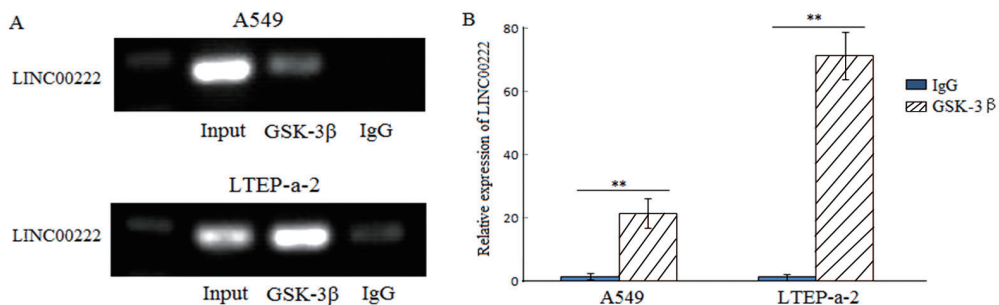


图7 荧光素酶报告基因实验验证 LINC00222 与 GSK-3 β 的调控关系 (* $P<0.05$)

2.9 LINC00222 与 GSK-3 β 结合再次验证 见图 8。研究利用 RIPSeq 在线预测软件对 LINC00222 与 GSK-3 β 蛋白的结合进行了预测, 通过转染 pCDNA-LINC00222 载体, 采用 RIP 法检测显示: LINC00222 与 GSK-3 β 蛋白相互结合。qRT-PCR

法检测显示, GSK-3 β 蛋白共沉淀中 LINC00222 表达显著高于 IgG 蛋白共沉淀 ($P<0.01$)。进一步证实 LINC00222 通过与 GSK-3 β 蛋白相互结合调控 GSK-3 β 催化活性进而抑制 β -catenin 核转位。



(A) RIP 法检测 LINC00222 与 GSK-3 β 共沉淀反应; (B) qRT-PCR 法检测 GSK-3 β 蛋白共沉淀中 LINC00222 表达 (** $P<0.01$)。

图8 LINC00222 与 GSK-3 β 结合验证

3 讨论

近年越来越多研究发现,癌症的发生发展是多基因、多因素共同作用的结果,表明 LncRNAs 在疾病的发生发展中扮演重要角色,参与调节肿瘤细胞的全部过程,与肿瘤患者的预后密切相关。SHI 等^[8-10]研究指出,LncRNAs 在胰腺癌、NSCLC 及前列腺癌中与患者预后密切相关,是影响患者预后的潜在因素。大量研究证实^[11-12],LncRNAs 在多种细胞过程中发挥着分化和发育、基因印记及抗病毒反应等多种功能,可通过与染色质修饰复合物作用,参与并影响细胞核转录活性;部分 LncRNAs 可作为转录后修饰因子,对蛋白质翻译、mRNA 衰变及维持蛋白质稳定等进行调控。此外,ZHANG 等^[13-14]研究证实,乳腺癌、肝癌、卵巢癌及 NSCLC 中多种 LncRNA 均差异性表达,对肿瘤细胞的增殖、凋亡等生物学行为发挥促癌或抑癌作用,揭示了异常表达的 LncRNA 是癌的一个标志,可作为肿瘤潜在生物标志物。LncRNA 与黏附蛋白相关基因及细胞黏附基因等的表达密切相关^[15],从侧面反映了 LncRNA 参与癌症发生发展的作用机制。因此,探寻新的与肺腺癌相关的 LncRNA,找寻安全有效的新的基因靶点,对肺腺癌临床诊治及提高患者预后具有重要意义。

LncRNAs 按其基因组位置可分为基因间、基因内、双向、正义及反义 LncRNAs,而基因间 LncRNAs 由两个编码基因间转录产生,参与各级邻近基因的调节,也可作为转录调节器同 RNA 间的相互作用来改变 mRNA 的稳定性^[16-17]。而指导 LncRNA,分子支架和诱捕 LncRNA 是目前已被证实的 LncRNA 作用模式。UCSC 基因组浏览器显示,LINC00324 及 LINC00222 均为基因间 LncRNA。研究证实,LINC00324 在 NSCLC 中低表达,抑制细胞增殖、侵袭及迁移,促进细胞凋亡,发挥抑癌作用^[18];系统性红斑狼疮患者中 LINC00324 表达上调,是评估疗效的辅助指标^[19];LINC00324 参与胃癌、白血病的发生发展^[20]。目前有关 LncRNA LINC00222 在肿瘤中的作用研究较为缺乏,推测其在肺腺癌中应与 LINC00324 发挥同样作用。为验证其猜想,本研究经检测显示肺腺癌组织及细胞系中 LINC00222 显著低表达,通过构建 LINC00222 过表达载体,实验探究发现过表达 LINC00222 能够抑制肺腺癌细胞增殖、迁移及侵袭,促进细胞凋亡,提示 LINC00222 发挥抑癌基因作用。

肿瘤发生发展过程中 Wnt 信号通路发挥重要作用,GSK-3 亚型 GSK-3 β 作用于众多结构蛋白、信号蛋白及转录因子,调控细胞的分化、凋亡,发挥抑癌作用^[21]。正常生理条件下,Wnt/ β -catenin 信

号通路未被激活,GSK-3 β 通过与 Axin/GSK-3 β /APC/ β -catenin 形成蛋白复合物,磷酸化 β -catenin 使其降解。当肿瘤处于病理状态时,Wnt 通路激活造成蛋白复合物解聚,抑制、介导 β -catenin 磷酸化,激活下游基因表达,诱导肿瘤发生^[22]。GSK-3 β 催化活性是 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键^[23]。研究表明^[24-25],GSK-3 β 参与调节细胞信号,细胞生长、分化、凋亡和转录因子调节器官生长、死亡,起到抑癌作用;当抑制 GSK-3 β 活性后, β -catenin 转位入核,诱导下游基因表达,Wnt 通路激活,促进细胞生长;Wnt 信号通路中 GSK-3 β 至关重要,其可磷酸化底物从而激活或失活 Wnt 通路。且研究显示,GSK-3 β 介导 Wnt/ β -catenin 致癌通路活性进而参与结肠癌的发展进程^[26]。CEBPA 介导的 LncRNA PLIN2 上调通过 GSK3 和 Wnt/ β -catenin 信号通路促进慢性粒细胞白血病的发展^[27]。MicroRNA-940 靶向 INPP4A 或 GSK-3 β ,激活 Wnt/ β -Catenin 通路,调节膀胱癌细胞的恶性行为^[28]。故本研究探究了肺腺癌中 LINC00222 是否通过调控 GSK-3 β / β -catenin 信号通路进而发挥作用,发现过表达 LINC00222 能够降低 GSK-3 β Ser9 位点磷酸化水平,增加 GSK-3 β 激酶催化活性,抑制 β -catenin 核转位,当降低 GSK-3 β 催化活性时该抑制作用明显减弱,提示 LINC00222 可能通过调节 GSK-3 β 激酶活性影响下游 β -catenin 核转位,进而影响肺腺癌细胞的生物学行为。另研究通过生物学信息软件预测 LINC00222 与 GSK-3 β 结合位点经体外克隆扩增,设计构建了具有预测靶位点的 GSK-3 β 3'UTR 野生型或突变型报告基因载体,经双荧光素酶基因实验验证发现,GSK-3 β 受 LINC00222 直接调控,GSK-3 β 是 LINC00222 的靶标; RIP 实验也验证了 LINC00222 与 GSK-3 β 蛋白存在相互结合,且发现 GSK-3 β 蛋白共沉淀中 LINC00222 表达显著升高,推测可能是由于两者的结合阻止 GSK-3 β 磷酸化,增强 GSK-3 β 活性,抑制 β -catenin 核转位发挥作用进而调节细胞过程。然而肺腺癌发病机制复杂,其更深入的作用机制还需后续大量研究进一步证实。

综上所述,肺腺癌中 LINC00222 低表达,其可能通过调控 GSK-3 β 催化活性,抑制 β -catenin 核转位,进而调控肺腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭,为肺腺癌的治疗提供了新的研究方向。

参考文献:

- [1] BENDELS MICHAEL H K, BRÜGGMANN D, SCHÖFFEL N, et al. Gendermetrics of cancer research: results from a global analysis on lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60): 101911-101921.

- [2] SUN Weiliang, YANG Yunben, XU Chunjing, et al. Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs on gene expression in cancers[J]. *Cancer Genetics*, 2017, 216-217: 105-110.
- [3] ENGREITZ J M, HAINES J E, PEREZ E M, et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing[J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 452-455.
- [4] DYKES I M, EMANUELI C. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2017, 15(3): 177-186.
- [5] CHEN Dong, SUN Qiang, CHENG Xiaofei, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA (lncRNA) expression in colorectal cancer tissues from patients with liver metastasis[J]. *Cancer Medicine*, 2016, 5(7): 1629-1639.
- [6] XIE Shanshan, JIN Juan, XU Xiao, et al. Emerging roles of non-coding RNAs in gastric cancer: Pathogenesis and clinical implications[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(3): 1213-1223.
- [7] DONG Rui, JIA Deshui, XUE Ping, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA (lncRNA) expression in hepatoblastoma tissues[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85599.
- [8] SHI Xiuhui, ZHAO Yan, HE Ruizhi, et al. Three-lnc RNA signature is a potential prognostic biomarker for pancreatic adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(36): 24248-24259.
- [9] YIN Dandan, LU Xiyi, SU Jun, et al. Long noncoding RNA AFAP1-AS1 predicts a poor prognosis and regulates non-small cell lung cancer cell proliferation by epigenetically repressing p21 expression[J]. *Molecular Cancer*, 2018, 17(1): 92.
- [10] ZHANG Yajia, PITCHIAYA S, CIEŚLIK M, et al. Analysis of the androgen receptor-regulated lncRNA landscape identifies a role for ARLNC1 in prostate cancer progression[J]. *Nature Genetics*, 2018, 50(6): 814-824.
- [11] ENGREITZ J M, OLLIKAINEN N, GUTTMAN M. Long non-coding RNAs: spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17(12): 756-770.
- [12] QUINN J J, CHANG H Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17(1): 47-62.
- [13] XI Jie, FENG Jing, ZENG Saitian. Long noncoding RNA lncBRM facilitates the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells via upregulation of Sox4[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2017, 7(11): 2180-2189.
- [14] ZHANG Junyong, ZHANG Di, ZHAO Qi, et al. A distinctively expressed long noncoding RNA, RP11-466I1.1, may serve as a prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Medicine*, 2018, 7(7): 2960-2968.
- [15] LI Shuqin, ZHOU Jun, WANG Zhaoxin, et al. Long noncoding RNA GAS5 suppresses triple negative breast cancer progression through inhibition of proliferation and invasion by competitively binding miR-196a-5p[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 104: 451-457.
- [16] KOPP F, MENDELL J T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393-407.
- [17] ENGREITZ J M, HAINES J E, PEREZ E M, et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing[J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 452-455.
- [18] 周征宇, 向颖, 袁帅, 等. 长链非编码 RNA LINC00324 对非小细胞肺癌细胞生物学功能的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(4): 331-338.
- ZHOU Zhengyu, XIANG Ying, YUAN Shuai, et al. Effect of long non-coding RNA LINC00324 on biological functions of non-small cell lung cancer cells [J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2019, 41(4): 331-338.
- [19] CHEN Y G, SATPATHY A T, CHANG H Y. Gene regulation in the immune system by long noncoding RNAs[J]. *Nature Immunology*, 2017, 18(9): 962-972.
- [20] ZOU Zigui, MA Tianshi, HE Xuezhi, et al. Long intergenic non-coding RNA 00324 promotes gastric cancer cell proliferation via binding with HuR and stabilizing FAM83B expression[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(7): 717.
- [21] PANDEY M K, DEGRADO T R. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)-Targeted therapy and imaging[J]. *Theranostics*, 2016, 6(4): 571-593.
- [22] ZHAN T, RINDTORFF N, BOUTROS M. Wnt signaling in cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(11): 1461-1473.
- [23] MANCINELLI R, CARPINO G, PETRUNGARO S, et al. Multifaceted roles of GSK-3 in cancer and autophagy-related diseases[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2017: 4629495.
- [24] GU Ye, WANG Zhirong, SHI Jiawei, et al. Titanium particle-induced osteogenic inhibition and bone destruction are mediated by the GSK-3 β / β -catenin signal pathway[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(6): e2878.
- [25] JAHAN S, SINGH S, SRIVASTAVA A, et al. PKA-GSK3 β and β -Catenin signaling play a critical role in Trans-Resveratrol mediated neuronal differentiation in human cord blood stem cells[J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55(4): 2828-2839.
- [26] JAIN S, GHANGHAS P, RANA C, et al. Role of GSK-3 β in regulation of canonical Wnt/ β -catenin signaling and PI3-K/Akt oncogenic pathway in colon cancer[J]. *Cancer Investigation*, 2017, 35(7): 473-483.
- [27] SUN Chengming, LUAN Shuping, ZHANG Guili, et al. CEBPA-mediated upregulation of the lncRNA PLIN2 promotes the development of chronic myelogenous leukemia via the GSK3 and Wnt/ β -catenin signaling pathways[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2017, 7(5): 1054-1067.

收稿日期: 2021-03-08

修回日期: 2021-03-31