

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.24.002

lncRNA CEBPA-AS1 靶向 miR-455-3p 调控胃癌细胞生物学行为的分子机制研究*

吉 鸿¹ 索 丹² 赵 耀¹ 李顺乐¹ 徐 心¹ 常 帅^{1Δ}

(1 西安交通大学第二附属医院普通外科 陕西 西安 710004; 2 西安交通大学第一附属医院普通外科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探讨 lncRNA CEBPA-AS1 对胃癌细胞生物学行为的影响及其可能作用机制。**方法:**qRT-PCR 法检测胃癌组织、癌旁组织与正常人胃上皮 GES1 细胞和人胃癌 SNU-1、AGS、HS-746T 细胞系中 lncRNA CEBPA-AS1、miR-455-3p 的表达量。si-NC、si-lncRNA CEBPA-AS1、miR-NC、miR-455-3p mimics、si-lncRNA CEBPA-AS1 与 anti-miR-NC、si-lncRNA CEBPA-AS1 与 anti-miR-455-3p 分别转染至 SNU-1 细胞(分别命名为 si-NC 组、si-lncRNA CEBPA-AS1 组、miR-NC 组、miR-455-3p 组、si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-NC 组和 si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-455-3p 组)后,MTT 实验与平板克隆形成实验分别检测细胞增殖及克隆形成能力,Transwell 小室实验检测细胞迁移及侵袭能力,双荧光素酶报告基因实验与 qRT-PCR 实验验证 lncRNA CEBPA-AS1 与 miR-455-3p 的靶向调控关系,Western blot 法检测 MMP2、MMP9 蛋白表达情况。**结果:**与癌旁组织比较,胃癌组织中 lncRNA CEBPA-AS1 的表达量显著升高,miR-455-3p 的表达量显著降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与 GES1 细胞比较,SNU-1、AGS、HS-746T 细胞中 lncRNA CEBPA-AS1 的表达量显著升高,miR-455-3p 的表达量显著降低,其中 SNU-1 细胞的 lncRNA CEBPA-AS1 表达量最高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与 si-NC 组比较,si-lncRNA CEBPA-AS1 组细胞活力降低,细胞克隆形成数、迁移及侵袭细胞数减少,MMP2、MMP9 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 miR-NC 组比较,miR-455-3p 组细胞活力降低,细胞克隆形成数、迁移及侵袭细胞数减少,MMP2、MMP9 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。lncRNA CEBPA-AS1 可靶向结合 miR-455-3p,并可负调控 miR-455-3p 的表达。与 si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-NC 组比较,si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-455-3p 组细胞活力升高,细胞克隆形成数、迁移及侵袭细胞数增多,MMP2、MMP9 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**干扰 lncRNA CEBPA-AS1 表达可通过靶向调控 miR-455-3p 而抑制胃癌细胞增殖、克隆形成、迁移及侵袭。

关键词:lncRNA CEBPA-AS1; miR-455-3p; 胃癌; 细胞增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号:R-33; R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)24-4609-08

Study on the Molecular Mechanism of lncRNA CEBPA-AS1 on Regulating the Biological Behavior of Gastric Cancer Cells by Targeting miR-455-3p*

JI Hong¹, SUO Dan², ZHAO Yao¹, LI Shun-le¹, XU Xin¹, CHANG Shuai^{1Δ}

(1 General Surgery Department, the 2nd Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

2 General Surgery Department, the 1st Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of lncRNA CEBPA-AS1 on the biological behavior of gastric cancer cells and its possible mechanism. **Methods:** qRT-PCR was used to detect the expression levels of lncRNA CEBPA-AS1 and miR-455-3p in gastric cancer tissues, adjacent tissues, normal human gastric epithelial GES1 cells and human gastric cancer cell lines SNU-1, AGS and HS-746T. After si-NC, si-lncRNA CEBPA-AS1, miR-NC, miR-455-3p mimics, si-lncRNA CEBPA-AS1 and anti-miR-NC, si-lncRNA CEBPA-AS1 and anti-miR-455-3p were respectively transfected into SNU-1 cells (which were respectively named as si-NC group, si-lncRNA CEBPA-AS1 group, miR-NC group, miR-455-3p group, si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-NC group and si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-455-3p group), the MTT experiment and the plate clone formation experiment were used to detect cell proliferation and clone formation ability, the Transwell chamber experiment was used to detect cell migration and invasion ability, the dual-luciferase reporter assay and qRT-PCR experiment were used to verify the targeted regulation relationship between lncRNA CEBPA-AS1 and miR-455-3p, the Western blot method was used to detect the protein expression of MMP2 and MMP9. **Results:** Compared with adjacent tissues, the expression of lncRNA CEBPA-AS1 in gastric cancer tissues was significantly increased, while the expression of miR-455-3p was significantly decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with GES1 cells, the expression of lncRNA CEB-

* 基金项目:陕西省自然科学基金研究计划项目(2019JQ-967)

作者简介:吉鸿(1968-),男,硕士,主任医师

Δ 通讯作者:常帅(1985-),男,博士,助理研究员, E-mail: changshuai_xjtu@yeah.net

(收稿日期:2021-05-10 接受日期:2021-05-31)

PA-AS1 in SNU-1, AGS, HS-746T cells was significantly increased, the expression of miR-455-3p was significantly decreased, while the expression of lncRNA CEBPA-AS1 in SNU-1 cells was the highest, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the cell viability, the number of cell clone formation, migration and invasion, and the protein expression levels of MMP2 and MMP9 in the si-lncRNA CEBPA-AS1 group were significantly decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the miR-NC group, the cell viability, the number of cell clone formation, migration and invasion, and the protein expression levels of MMP2 and MMP9 in the miR-455-3p group were significantly decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). lncRNA CEBPA-AS1 could target miR-455-3p and negatively regulate the expression of miR-455-3p. Compared with the si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-NC group, the cell viability, the number of cell clone formation, migration and invasion, and the protein expression levels of MMP2 and MMP9 in the si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-455-3p group were significantly increased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** Interference of the expression of lncRNA CEBPA-AS1 could inhibit the proliferation, clone formation, migration and invasion of gastric cancer cells through targeted regulating of miR-455-3p.

Key words: lncRNA CEBPA-AS1; miR-455-3p; Gastric cancer; Cell proliferation; Migration; Invasion

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)24-4609-08

前言

胃癌是我国肿瘤相关致死性恶性肿瘤的第三大病因,患者预后差且病死率高。多种癌基因激活或抑癌基因失活均可促进胃癌发生、发展,近年虽分子靶向治疗、基因治疗、生物治疗等均取得了一定进展,但胃癌患者5年生存率仅为20%左右^[1]。因此,寻找胃癌发展进程中的有效靶点并用于研发靶向治疗药物,对改善患者预后具有重要意义。

长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度在 200-100000 nt 之间的非编码 RNA 分子,在基因转录、蛋白翻译等过程中均发挥重要作用,可通过调控复杂的分子生物网络参与胃癌等肿瘤的发生发展,其表达异常与胃癌细胞迁移、侵袭等恶性生物学行为有关,因此可能用于评估患者预后,或作为胃癌分子靶向治疗的潜在靶点^[2-4]。

有研究发现,lncRNA CEBPA-AS1 在胃癌细胞中高表达,可促进细胞增殖并抑制细胞凋亡从而诱导胃癌细胞的恶性行为^[5]。我们通过生物信息学预测发现,lncRNA CEBPA-AS1 与 miR-455-3p 存在结合位点。因有研究表明,miR-455-3p 过表达可能通过抑制 Wnt/ 连环蛋白(β -catenin)信号通路促进胰腺癌细胞凋亡并抑制细胞迁移及侵袭^[6]。所以我们推测,lncRNA CEBPA-AS1 可能通过靶向调控 miR-455-3p 继而调节胃癌细胞的生物学行为。因此我们开展实验并报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

选取 2019 年 1 月至 2020 年 3 月在本院接受胃癌根治术的 42 例患者为研究对象,其中男 22 例,女 20 例,年龄 55-69 岁,平均年龄(62.74 ± 4.31)岁。将患者胃癌组织或癌组织周围 5 cm 处的癌旁组织标本分别建成 1 mm³ 小块后置于 RNA 保护液中,然后置于液氮中保存;在提取组织 RNA 前将组织标本转移至预冷研钵中研碎。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

正常人胃上皮 GES1 和人胃癌 SNU-1、AGS、HS-746T 细胞系均购自上海通派生物;Trizol 试剂、Lipofectamine 2000 为美国 Invitrogen 公司产品;反转录试剂与荧光定量 PCR 试剂为北京天根生化公司产品;lncRNA CEBPA-AS1 小分子干扰

RNA (si-lncRNA CEBPA-AS1) 及其阴性对照 (si-NC)、miR-455-3p 寡核苷酸模拟物 (miR-455-3p mimics) 及阴性对照 mimic NC 序列 (miR-NC)、miR-455-3p 特异性寡核苷酸抑制剂 (anti-miR-455-3p) 及其阴性对照 (anti-miR-NC) 为广州锐博生物公司产品;pcDNA 载体与 lncRNA CEBPA-AS1 过表达载体 (pcDNA-lncRNA CEBPA-AS1) 为上海远慕生物公司产品;MTT 试剂、Transwell 小室、Matrigel 基质胶为北京索莱宝公司产品;兔抗人 MMP2、MMP9 抗体与二抗为美国 Abcam 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 GES1、SNU-1、AGS、HS-746T 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素与 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,于 37℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱培养,待细胞生长融合度达到 80% 时传代培养用于实验。

1.2.2 qRT-PCR 检测 lncRNA CEBPA-AS1、miR-455-3p 的表达水平 向癌旁组织、胃癌组织或各组 GES1、SNU-1、AGS、HS-746T 细胞中分别加入 Trizol 试剂,4℃ 条件下经 12000 r/min 离心 1 min,依次加入氯仿、异丙醇,弃上清,加入 1 mL 75% 乙醇,充分洗涤 RNA 沉淀,随后提取细胞中的总 RNA,并应用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。反转录体系:5 $\times$ g DNA Buffer 2 μ L,10 $\times$ King RT Buffer 2 μ L,FastKing RT Enzyme Mix 1 μ L,FQ-RT Primer Mix 2 μ L,RNA (2 μ g),RNase-Free ddH₂O 补足体系至 20 μ L。反应条件:42℃ 15 min,95℃ 3 min。RNA 反转录合成 cDNA,以 cDNA 2 μ L 进行 qRT-PCR 反应,按照荧光定量 PCR 试剂盒配制反应体系。反应条件:95℃ 预变性 2 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 40 次循环 (参照基因为 36 次循环)。用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分别计算 lncRNA CEBPA-AS1 (以 β -actin 为内参基因) 和 miR-455-3p (以 U6 为内参基因) 的相对表达量。

1.2.3 实验分组 根据 SNU-1、AGS、HS-746T 细胞中 lncRNA CEBPA-AS1 的表达情况,选择 SNU-1 细胞系用于后续实验。取对数生长期 SNU-1 细胞按照每孔 5000 个的密度接种于 96 孔板,利用脂质体转染技术分别将 si-NC、si-lncRNA CEBPA-AS1、miR-NC、miR-455-3p mimics、si-lncRNA CEBPA-AS1 与 anti-miR-NC、si-lncRNA CEBPA-AS1 与 anti-miR-455-3p 转染至 SNU-1 细胞,分别记为 si-NC 组、si-lncRNA CEBPA-AS1

组、miR-NC 组、miR-455-3p 组、si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-NC 组、si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-455-3p 组。同时将正常培养的 SNU-1 细胞记为 NC 组。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Names	Forward primer	Reverse primer
lncRNA CEBPA-AS1	5'-GCTTCGTTTTTCGGTCCAGA-3'	5'-CCCTCCACAGGTGAATGCTAT-3'
β -actin	5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3'	5'-TGATGTCACGCACGATTT-3'
miR-455-3p	5'-GAACTGCAGTCCATGGGCATA-3'	5'-GCAGGGTCCGAGGTATTC-3'
U6	5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3'	5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'

1.2.4 MTT 检测细胞增殖 将各组 SNU-1 细胞调整密度为 1×10^4 个/mL, 随后接种于 96 孔板(100 μ L/孔), 于培养箱内培养 24 h, 每孔加入 MTT 溶液 20 μ L, 继续孵育 4 h 后弃上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 室温避光孵育 5 min, 用酶标仪检测波长 490 nm 处的吸光度值(A 值)。每组 3 复孔, 实验重复 3 次。

1.2.5 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 将各组 SNU-1 细胞接种至 6 孔板中(500 个/孔), 培养 14 d 弃培养基, 用 4%多聚甲醛固定 30 min, 然后用 0.5%结晶紫染色液染色 15 min, 采用去离子水漂洗后晾干, 观察和拍照, 将 >50 个细胞的集落定为 1 个克隆, 计数克隆形成数。

1.2.6 Transwell 实验检测细胞迁移与侵袭 迁移实验: 将各组 SNU-1 细胞(5×10^4 个/mL)接种于小室的上室, 每孔 200 μ L, 随后下室加入含有 10%胎牛血清的培养液, 于培养箱内孵育 24 h 后取出小室, 用 PBS 洗涤后分别用多聚甲醛固定 20 min, 然后用 0.1%结晶紫染色液染色 15 min, 200 倍显微镜随机选取 5 个视野观察, 计数迁移细胞数。

侵袭实验: 制备 Matrigel 基质胶稀释液(预冷培养液:Matrigel 基质胶=1:6), 将 Matrigel 基质胶稀释液按照每孔 40 μ L 加入小室的上室, 于培养箱内孵育 5 h, 后续实验步骤同迁移实验。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验检测 lncRNA CEBPA-AS1 与 miR-455-3p 的靶向关系 采用 Starbase 数据库预测 lncRNA CEBPA-AS1 和 miR-455-3p 的结合位点。采用基因定点突变技术突变结合位点, 分别将未突变的结合位点或突变的结合位点片段克隆至 pmirGLO 载体, 构建野生型载体 lncRNA CEBPA-AS1-WT 与突变型载体 lncRNA CEBPA-AS1-MUT。随后利用脂质体转染技术分别将 miR-NC 或 miR-455-3p mimics 与 lncRNA CEBPA-AS1-WT 或 lncRNA CEBPA-AS1-MUT 分别共转染至 SNU-1 细胞, 继续于培养箱内培养 48 h 后收集细胞, 提取蛋白并加入荧光素酶底物, 随后使用酶标仪测量并计算细胞相对荧光素酶活性。

利用脂质体转染技术分别将 si-NC、si-lncRNA CEBPA-AS1、pcDNA、pcDNA-lncRNA CEBPA-AS1 转染至 SNU-1 细胞, 培养 48 h 后收集细胞并采用 qRT-PCR 法检测细胞中 lncRNA CEBPA-AS1、miR-455-3p 的表达量。

1.2.8 Western blot 检测 MMP2、MMP9 蛋白表达 用 RIPA 裂解液在冰上裂解各组 SNU-1 细胞 30 min, 提取细胞总蛋白。向蛋白样品中加入上样缓冲液, 沸水浴 5 min 至蛋白变性, 以每孔 30 μ g 蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳, 然后将蛋白凝胶转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜置于封闭液中封闭 1 h, TBST 洗膜后加入稀释好的基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2)(1:800)、MMP9(1:800)、 β -actin(1:2000)抗体, 4℃孵育过夜。TBST 洗膜后加入二抗稀释液(1:5000), 室温孵育 1 h, 滴加 ECL 显影后用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据, 符合正态分布计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 癌旁组织与胃癌组织 lncRNA CEBPA-AS1 或 miR-455-3p 表达情况的比较采用配对 t 检验, 非配对资料的两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(组间两两比较采用 LSD-t 检验), 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌患者癌组织及癌旁组织中 lncRNA CEBPA-AS1 和 miR-455-3p 表达情况

采用 qRT-PCR 法检测胃癌组织与癌旁组织中 lncRNA CEBPA-AS1、miR-455-3p 的表达量, 结果显示, 与癌旁组织比较, 胃癌组织中 lncRNA CEBPA-AS1 的表达量显著升高, miR-455-3p 的表达量显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 胃癌组织及癌旁组织 lncRNA CEBPA-AS1、miR-455-3p 表达情况($\bar{x} \pm s$, n=42)Table 2 Expression of lncRNA CEBPA-AS1 and miR-455-3p in gastric cancer and paracancerous tissues($\bar{x} \pm s$, n=42)

Groups	lncRNA CEBPA-AS1	miR-455-3p
Paracancerous tissue	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.11
Gastric cancer tissue	2.51 $\pm$ 0.18	0.44 $\pm$ 0.05
t	-9.797	7.199
P	<0.001	<0.001

2.2 胃癌细胞系中 lncRNA CEBPA-AS1 和 miR-455-3p 表达情况

采用 qRT-PCR 法检测正常人胃上皮细胞 GES1 与胃癌细胞中 lncRNA CEBPA-AS1、miR-455-3p 的表达量,结果显示,与 GES1 细胞比较,胃癌 SNU-1、AGS、HS-746T 细胞系中

lncRNA CEBPA-AS1 的表达量均显著升高,miR-455-3p 的表达量均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);其中胃癌细胞 SNU-1 中 lncRNA CEBPA-AS1 的表达量相对最高 ($P<0.05$),因而选用 SNU-1 细胞进行后续研究,见表 3。

表 3 胃癌细胞系中 lncRNA CEBPA-AS1 和 miR-455-3p 表达情况($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 Expression of lncRNA CEBPA-AS1 and miR-455-3p in gastric cancer cell lines($\bar{x} \pm s, n=9$)

Cell lines	lncRNA CEBPA-AS1	miR-455-3p
GES1	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.08
SNU-1	2.54 $\pm$ 0.17*	0.34 $\pm$ 0.04*
AGS	2.17 $\pm$ 0.14**	0.46 $\pm$ 0.04**
HS-746T	1.89 $\pm$ 0.15***	0.52 $\pm$ 0.05***
F	198.519	275.258
P	<0.001	<0.001

Note: Compared with GES1, * $P<0.05$; Compared with SNU-1, ** $P<0.05$; Compared with AGS, *** $P<0.05$.

2.3 低表达 lncRNA CEBPA-AS1 对 SNU-1 细胞增殖、迁移、侵袭及 MMP2、MMP9 表达的影响

采用 qRT-PCR 法验证干扰 lncRNA CEBPA-AS1 表达的效率,随后采用 MTT 实验、平板克隆形成实验、Transwell 实验与 Western blot 法分别检测干扰 lncRNA CEBPA-AS1 表达对

细胞活力、克隆形成、迁移、侵袭及 MMP2、MMP9 表达量的影响。结果显示,与 si-NC 组比较,si-lncRNA CEBPA-AS1 组细胞活力降低,细胞克隆形成数、迁移及侵袭细胞数减少,MMP2、MMP9 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 1、表 4。

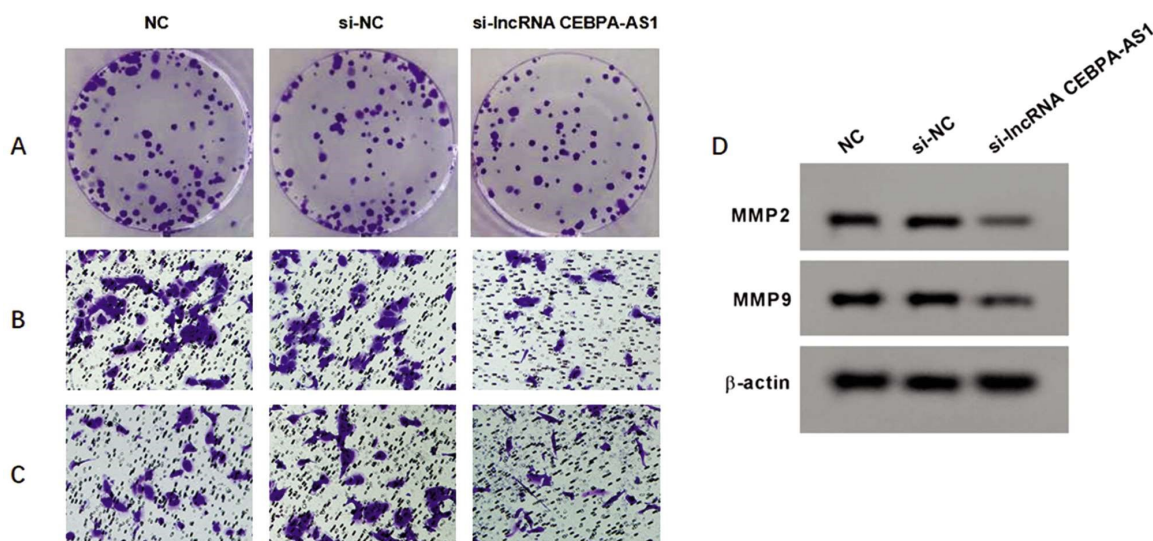


图 1 低表达 lncRNA CEBPA-AS1 对 SNU-1 细胞克隆、迁移、侵袭和 MMP2、MMP9 表达的影响

Fig.1 Effects of low-expression of lncRNA CEBPA-AS1 on the cloning, migration, invasion and the expression of MMP2 and MMP9 in SNU-1 cells

A: 细胞克隆; B: 细胞迁移; C: 细胞侵袭; D: MMP2、MMP9 表达

A: Cell cloning; B: Cell migration; C: Cell invasion; D: Expression of MMP2 and MMP9

2.4 高表达 miR-455-3p 对 SNU-1 细胞增殖、迁移、侵袭及 MMP2、MMP9 表达的影响

采用 qRT-PCR 法验证过表达 miR-455-3p 的效率,随后采用 MTT 实验、平板克隆形成实验、Transwell 实验与 Western blot 法分别检测 miR-455-3p 过表达对细胞活力、克隆形成、迁移、侵袭及 MMP2、MMP9 表达量的影响。结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-455-3p 组细胞活力降低,细胞克隆形成数、迁移及侵袭细胞数减少,MMP2、MMP9 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 2、表 5。

2.5 lncRNA CEBPA-AS1 与 miR-455-3p 的靶向调控关系验证

Starbase 预测显示 lncRNA CEBPA-AS1 与 miR-455-3p 存在结合位点,见图 3。上调 miR-455-3p 的表达后,转染野生型载体 lncRNA CEBPA-AS1-WT 的 SNU-1 细胞的荧光素酶活性降低 ($P<0.05$),而转染突变型载体 lncRNA CEBPA-AS1-MUT 的 SNU-1 细胞的荧光素酶活性无明显变化($P>0.05$),见表 6。

采用 qRT-PCR 法首先验证干预 lncRNA CEBPA-AS1 的效率,随后验证干预 lncRNA CEBPA-AS1 后 miR-455-3p 的表达情况。结果显示,与 si-NC 组比较,si-lncRNA CEBPA-AS1 组

miR-455-3p 的表达量显著升高($P<0.05$);与 pcDNA 组比较, 低($P<0.05$),见表 7。
pcDNA-lncRNA CEBPA-AS1 组 miR-455-3p 的表达量显著降

表 4 低表达 lncRNA CEBPA-AS1 抑制 SNU-1 细胞增殖、迁移、侵袭和 MMP2、MMP9 表达($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 4 Low-expression of lncRNA CEBPA-AS1 inhibits the proliferation, migration, invasion and the expression of MMP2 and MMP9 in SNU-1 cells

($\bar{x} \pm s, n=9$)								
Groups	lncRNA CEBPA-AS1	A value	Number of cell clones	Number of cell migration	Number of cell invasion	MMP2	MMP9	
NC	1.00± 0.06	1.12± 0.08	103.33± 6.56	193.33± 11.86	128.16± 9.04	0.78± 0.07	0.85± 0.06	
si-NC	1.01± 0.10	1.13± 0.09	103.33± 6.18	192.71± 10.47	127.16± 8.83	0.77± 0.08	0.85± 0.06	
si-lncRNA CEBPA-AS1	0.40± 0.04*	0.61± 0.06*	55.11± 3.44*	95.73± 7.07*	72.13± 6.34*	0.34± 0.04*	0.43± 0.03*	
F	181.454	133.108	224.768	284.502	138.822	130.925	195.996	
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

Note: Compared with si-NC group, * $P<0.05$.

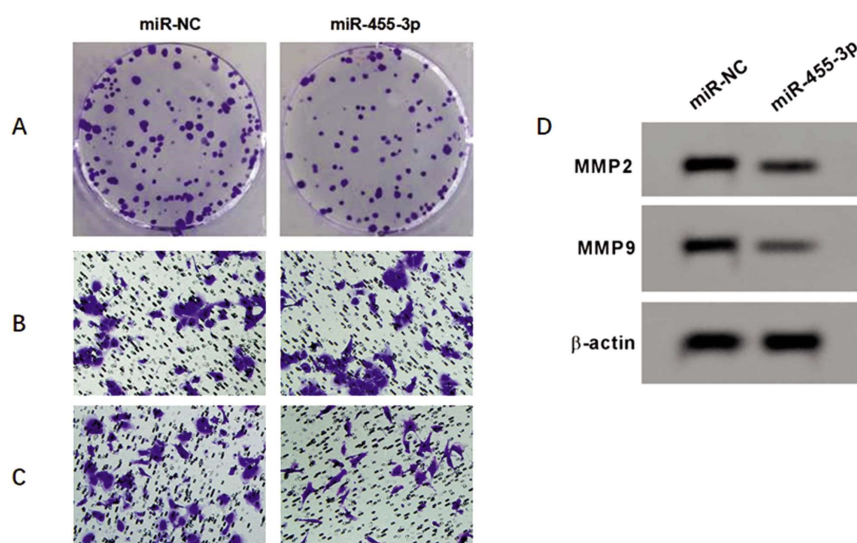


图 2 高表达 miR-455-3p 对 SNU-1 细胞克隆、迁移、侵袭和 MMP2、MMP9 表达的影响

Fig.2 Effects of overexpression of miR-455-3p on the cloning, migration, invasion and the expression of MMP2 and MMP9 in SNU-1 cells

A:细胞克隆;B:细胞迁移;C:细胞侵袭;D:MMP2、MMP9 表达

A: Cell cloning; B: Cell migration; C: Cell invasion; D: Expression of MMP2 and MMP9

表 5 高表达 miR-455-3p 抑制 SNU-1 细胞增殖、迁移、侵袭和 MMP2、MMP9 表达($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 5 Overexpression of miR-455-3p inhibits the proliferation, migration, invasion and the expression of MMP2 and MMP9 in SNU-1 cells($\bar{x} \pm s, n=9$)

Groups	miR-455-3p	A value	Number of cell clones	Number of cell migration	Number of cell invasion	MMP2	MMP9
miR-NC	1.00± 0.09	1.13± 0.09	101.44± 6.19	192.73± 11.05	129.98± 8.83	0.78± 0.08	0.85± 0.06
miR-455-3p	2.03± 0.10	0.59± 0.06	45.22± 3.46	101.38± 7.21	67.36± 4.61	0.41± 0.04	0.32± 0.03
t	-22.879	15.495	23.800	20.770	18.859	12.758	22.530
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

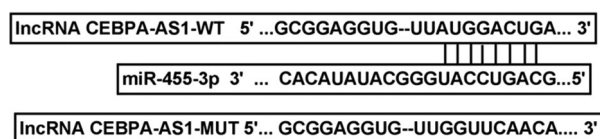


图 3 Starbase 预测 lncRNA CEBPA-AS1 和 miR-455-3p 的结合关系
Fig.3 Starbase used to predict the binding relationship between lncRNA CEBPA-AS1 and miR-455-3p

2.6 低表达 miR-455-3p 对 lncRNA CEBPA-AS1 低表达的 SNU-1 细胞增殖、迁移、侵袭及 MMP2、MMP9 表达的影响

采用 qRT-PCR 法验证干扰 lncRNA CEBPA-AS1 表达后再抑制 miR-455-3p 表达的效率,随后采用 MTT 实验、平板克隆形成实验、Transwell 实验与 Western blot 法分别检测 si-lncRNA CEBPA-AS1 与 anti-miR-455-3p 共转染对细胞活力、克隆形成、迁移、侵袭及 MMP2、MMP9 表达量的影响,结果

显示,与 si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-NC 组比较,si-lncRNA CEBPA-AS1+anti-miR-455-3p 组细胞活力升高,细胞克隆形成数、迁移及侵袭细胞数增多,MMP2、MMP9 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 4、表 8。

表 6 双荧光素酶报告基因实验检测 lncRNA CEBPA-AS1 和 miR-455-3p 的靶向结合关系($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 6 Double luciferase reporter gene assay used to detect the targeted binding relationship between lncRNA CEBPA-AS1 and miR-455-3p($\bar{x}\pm s, n=9$)

Groups	Luciferase activity	
	lncRNA CEBPA-AS1-WT	lncRNA CEBPA-AS1-MUT
miR-NC	1.00± 0.08	1.00± 0.08
miR-455-3p	0.40± 0.04	0.98± 0.08
t	20.895	0.521
P	<0.001	0.609

表 7 qRT-PCR 检测干预 lncRNA CEBPA-AS1 后 miR-455-3p 的表达情况($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 7 The expression of miR-455-3p detected by qRT-PCR after intervention of lncRNA CEBPA-AS1($\bar{x}\pm s, n=9$)

Groups	lncRNA CEBPA-AS1	miR-455-3p
si-NC	1.00± 0.07	1.00± 0.09
si-lncRNA CEBPA-AS1	0.39± 0.04*	2.41± 0.15*
pcDNA	0.99± 0.08	1.00± 0.08
pcDNA-lncRNA CEBPA-AS1	1.91± 0.11 [#]	0.48± 0.03 [#]
F	598.553	643.035
P	<0.001	<0.001

Note: Compared with si-NC group, * $P<0.05$; Compared with pcDNA group, [#] $P<0.05$.

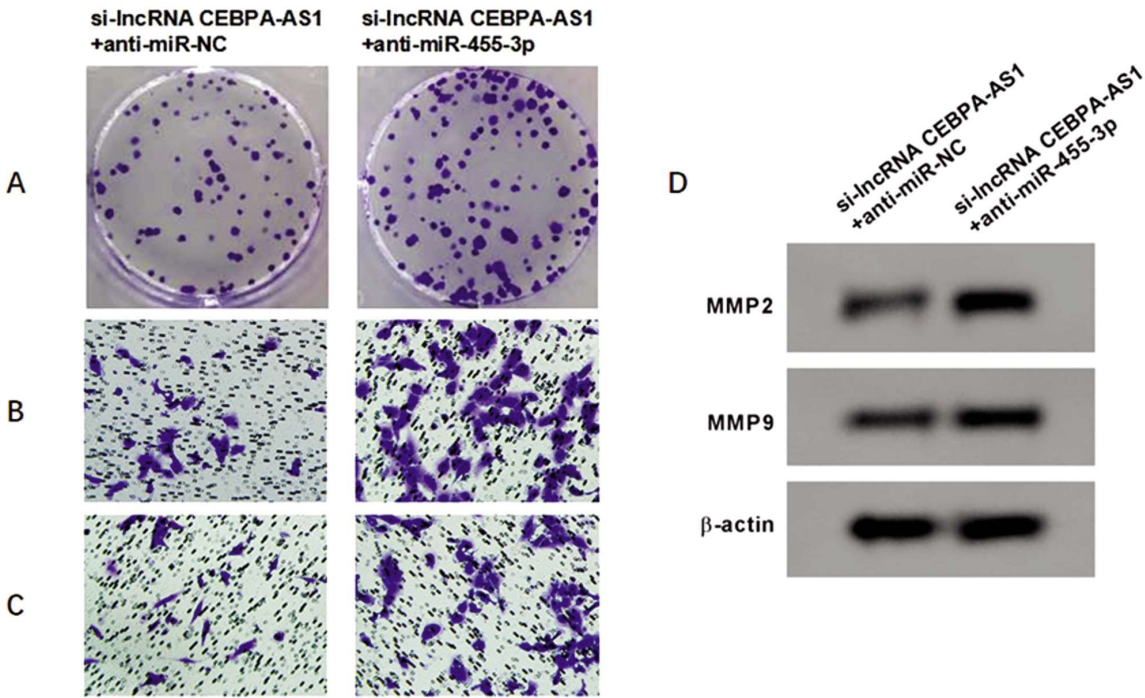


图 4 低表达 miR-455-3p 对 lncRNA CEBPA-AS1 低表达的 SNU-1 细胞克隆、迁移、侵袭和 MMP2、MMP9 表达的影响

Fig.4 Effects of low-expression of miR-455-3p on the cloning, migration, invasion and the expression of MMP2 and MMP9 in SNU-1 cells with low-expression of lncRNA CEBPA-AS1

A:细胞克隆;B:细胞迁移;C:细胞侵袭;D:MMP2、MMP9 表达

A: Cell cloning; B: Cell migration; C: Cell invasion; D: Expression of MMP2 and MMP9

3 讨论

lncRNA 在多种肿瘤中广泛表达,其中多种 lncRNA 在胃

癌发生发展过程中均存在异常表达并发挥重要调控作用,例如 lncRNA ZEB2-AS1 可通过激活 Wnt/ β -catenin 途径促进胃癌发生,lncRNA HOTAIR 可通过靶向结合 miR-126 而调节趋化因

表 8 低表达 miR-455-3p 逆转 lncRNA CEBPA-AS1 低表达对 SNU-1 细胞增殖、迁移、侵袭和 MMP2、MMP9 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 8 Low-expression of miR-455-3p reverses the effect of low-expression of lncRNA CEBPA-AS1 on the proliferation, migration, invasion and the expression of MMP2 and MMP9 in SNU-1 cells($\bar{x} \pm s, n=9$)

Groups	miR-455-3p	A value	Number of cell clones	Number of cell migration	Number of cell invasion	MMP2	MMP9
si-lncRNA							
CEBPA-AS1	1.00± 0.11	0.61± 0.08	56.44± 3.13	95.00± 7.90	73.00± 5.31	0.34± 0.04	0.44± 0.03
+anti-miR-NC							
si-lncRNA							
CEBPA-AS1	0.46± 0.03	1.27± 0.09	129.56± 7.97	220.71± 14.34	165.47± 14.39	0.83± 0.07	0.75± 0.06
+anti-miR-455-3p							
t	9.160	-16.857	-14.764	-23.038	-11.319	-18.851	-14.569
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

子受体 4 型(chemokine receptor4, CXCR4)和 RAS 同源基因家族成员 A(ras homolog gene family member A, RhoA)信号通路从而促进胃癌细胞的增殖和转移, LINC01133 可通过充当 miR-106a-3p 的竞争内源性 RNA(competing endogenous RNAs, ceRNA)而调节结肠腺瘤样息肉(adenomatous polyposis coli, APC)基因表达进而抑制胃癌的进展, lncRNA ADAMTS9-AS2 可通过调节 miR-223-3p/NOD 样受体家族 3(NOD-like receptors, NLRP3)信号轴进而抑制胃癌的发展^[7-10]。虽然有研究表明, lncRNA CEBPA-AS1 参与诱导了胃癌细胞的恶性行为^[9], 但其在胃癌中的具体功能及作用机制尚未明确。

lncRNA CEBPA-AS1 位于细胞质中, 其表达上调与口腔鳞状细胞癌细胞分化程度、淋巴结转移和临床高分期有关, 可能是评估患者预后的生物标志物, 沉默 lncRNA CEBPA-AS1 可通过靶向 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer binding protein α , CEBPA)基因而抑制癌细胞增殖、迁移和侵袭并诱导细胞凋亡^[11]。肝癌组织中 lncRNA CEBPA-AS1 的表达量也升高, 其表达量与肿瘤大小、门静脉肿瘤血栓和侵袭转移有关, 下调 lncRNA CEBPA-AS1 可抑制细胞增殖、侵袭^[12]。本研究结果显示, 胃癌组织与细胞系中 lncRNA CEBPA-AS1 的表达量均显著升高, 干扰 lncRNA CEBPA-AS1 表达可降低胃癌细胞活力、减少细胞克隆形成数, 提示干扰 lncRNA CEBPA-AS1 表达可抑制胃癌细胞增殖。MMP2、MMP9 属于基质金属蛋白酶, 抑制其表达可防止细胞外基质过度降解从而抑制肿瘤细胞转移^[13,14]。本研究结果显示, 干扰 lncRNA CEBPA-AS1 表达后, 胃癌迁移及侵袭细胞数减少, MMP2、MMP9 蛋白水平降低, 提示干扰 lncRNA CEBPA-AS1 表达可抑制胃癌细胞转移, 且该抑制作用可能与减少 MMP2、MMP9 蛋白表达有关。

通过进一步研究, 初步证实 lncRNA CEBPA-AS1 可靶向结合 miR-455-3p, 并可负向调控 miR-455-3p 的表达。有研究表明, miR-455-3p 表达下调可促进骨肉瘤细胞增殖和侵袭^[15]; lncRNA ZEB1-AS1 抑制 miR-455-3p 表达可促进 P21 激活激酶 2(p21 activated kinase 2, PAK2)表达从而促进结肠腺瘤样细胞增殖及转移^[16]; 而上调 miR-455-3p 表达可抑制结肠癌细胞增殖并诱导细胞凋亡^[17]。另外, miR-455-3p 还可通过抑制转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路进而抑制乳腺癌细胞增殖^[18]。本研究结果显示, 胃癌组织及其细胞系中

miR-455-3p 的表达量显著降低, 上调 miR-455-3p 表达可降低胃癌细胞活力、减少细胞克隆形成数以及迁移、侵袭细胞数, 提示 miR-455-3p 过表达可抑制胃癌细胞增殖、转移等恶性生物学行为。随后, 为进一步证实 lncRNA CEBPA-AS1 靶向调控 miR-455-3p 在胃癌发生发展过程中的作用, 通过挽救实验发现, 抑制 miR-455-3p 表达可拮抗干扰 lncRNA CEBPA-AS1 表达对胃癌细胞增殖、克隆形成、迁移及侵袭的抑制作用, 并增加 MMP2、MMP9 蛋白表达, 提示 lncRNA CEBPA-AS1 可通过靶向调控 miR-455-3p 进而促进胃癌细胞生长及转移。

综上所述, 胃癌组织与细胞系中 lncRNA CEBPA-AS1 的表达量升高, 而 miR-455-3p 的表达量降低, 干扰 lncRNA CEBPA-AS1 表达可通过上调 miR-455-3p 表达而抑制胃癌细胞增殖、克隆形成、迁移及侵袭, lncRNA CEBPA-AS1 可能作为胃癌的潜在治疗靶点。因此, 我们将通过动物实验进一步验证 lncRNA CEBPA-AS1/miR-455-3p 在胃癌发生及发展进程中的作用。

另外, 虽然目前围绕 lncRNA CEBPA-AS1 的研究很少, 但已证实其在口腔鳞状细胞癌中可调控 CEBPA/Bcl2 信号轴^[11], 在肝癌中可以通过 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)调控上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[12], 在骨肉瘤中可通过 miR-10b-5p/核受体辅助抑制因子 2(nuclear receptor corepressor 2, NCOR2)信号轴调控 Notch 信号通路^[19]。因此, lncRNA CEBPA-AS1 是否可能通过靶向调控上述微小 RNA(microRNA, miRNA)、蛋白甚至信号通路而发挥作用也需进一步探究。

参考文献(References)

- [1] 智亮辉, 刘伟, 李伟, 等. lncRNA-ATB 在胃癌细胞中的表达及体外功能实验研究[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(11): 16-20, 44
- [2] 袁正泰, 王永恒, 黄湘俊. 长链非编码 RNA FOXD2-AS1 对胃癌细胞增殖、侵袭和转移的影响及其机制[J]. 肿瘤防治研究, 2020, 47(8): 583-589
- [3] Luo M, Liang CB. lncRNA LINC00483 promotes gastric cancer development through regulating MAPK1 expression by sponging miR-490-3p[J]. Biol Res, 2020, 53(1): 14
- [4] Zhang XZ, Mao HL, Zhang SJ, et al. lncRNA PCAT18 inhibits proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells through miR-135b suppression to promote CLDN11 expression [J]. Life Sci,

- 2020, 249: 117478
- [5] Piao HY, Guo S, Wang Y, et al. Exosomal Long Non-Coding RNA CEBPA-AS1 inhibits tumor apoptosis and functions as a non-invasive biomarker for diagnosis of gastric cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 1365-1374
- [6] Zhan T, Zhu QX, Han Z, et al. miR-455-3p functions as a tumor suppressor by restraining Wnt/ β -Catenin signaling via taz in pancreatic cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 1483-1492
- [7] Wang FX, Zhu W, Yang RL, et al. LncRNA ZEB2-AS1 contributes to the tumorigenesis of gastric cancer via activating the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 456(1-2): 73-83
- [8] Xiao J, Lai H, Wei SH, et al. lncRNA HOTAIR promotes gastric cancer proliferation and metastasis via targeting miR-126 to active CXCR4 and RhoA signaling pathway [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(15): 6768-6779
- [9] Yang XZ, Cheng TT, He QJ, et al. LINC01133 as ceRNA inhibits gastric cancer progression by sponging miR-106a-3p to regulate APC expression and the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 126
- [10] Ren NS, Jiang T, Wang CB, et al. LncRNA ADAMTS9-AS2 inhibits gastric cancer (GC) development and sensitizes chemoresistant GC cells to cisplatin by regulating miR-223-3p/NLRP3 axis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(11): 11025-11041
- [11] Guo Y, Ma YJ, Hu XH, et al. Long non-coding RNA CEBPA-AS1 correlates with poor prognosis and promotes tumorigenesis via CEBPA/Bcl2 in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(3): 205-213
- [12] Wu C, Tang ZY, Chen HY, et al. High-expression of lncRNA CEBPA-AS1 promotes liver cancer progression[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(19): 8295-8302
- [13] Wu YJ, Lin SH, Din ZH, et al. Sinulariolide inhibits gastric cancer cell migration and invasion through downregulation of the EMT process and suppression of FAK/PI3K/AKT/mTOR and MAPKs signaling pathways[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(12): 668
- [14] Su YZ, Cui MF, Du J, et al. LncRNA DCST1-AS1 regulated cell proliferation, migration, invasion and apoptosis in gastric cancer by targeting miR-605-3p [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(3): 1158-1167
- [15] Yi XJ, Wang YF, Xu SJ. MiR-455-3p downregulation facilitates cell proliferation and invasion and predicts poor prognosis of osteosarcoma[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 454
- [16] Ni X, Ding YT, Yuan HT, et al. Long non-coding RNA ZEB1-AS1 promotes colon adenocarcinoma malignant progression via miR-455-3p/PAK2 axis[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(1): e12723
- [17] Zheng JT, Lin ZL, Zhang L, et al. MicroRNA-455-3p inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis in HCT116 human colon cancer cells[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 4431-4437
- [18] Zeng Y, Gao TY, Huang W, et al. MicroRNA-455-3p mediates GATA3 tumor suppression in mammary epithelial cells by inhibiting TGF- β signaling[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(43): 15808-15825
- [19] Xia P, Gu R, Zhang W, et al. lncRNA CEBPA-AS1 overexpression inhibits proliferation and migration and stimulates apoptosis of OS cells via Notch signaling [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 1470-1481

(上接第 4693 页)

- [21] Ma X, Liu W. Calcium signaling in brain microvascular endothelial cells and its roles in the function of the blood-brain barrier [J]. *Neuroreport*, 2019, 30(18): 1271-1277
- [22] De Bock M, Wang N, Decroock E, et al. Endothelial calcium dynamics, connexin channels and blood-brain barrier function[J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 108(9): 1-20
- [23] Mohammad S, Mishra A, Ashraf MZ. Emerging Role of Vitamin D and its Associated Molecules in Pathways Related to Pathogenesis of Thrombosis[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(11): 649
- [24] Jafari M, Di Napoli M, Datta YH, et al. The Role of Serum Calcium Level in Intracerebral Hemorrhage Hematoma Expansion: Is There Any[J]. *Neurocrit Care*, 2019, 31(1): 188-195
- [25] Moore HB, Tessmer MT, Moore EE, et al. Forgot calcium? Admission ionized-calcium in two civilian randomized controlled trials of prehospital plasma for traumatic hemorrhagic shock [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2020, 88(5): 588-596
- [26] Pinton P, Giorgi C, Siviero R, et al. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis[J]. *Oncogene*, 2008, 27(50): 6407-6418
- [27] Patergnani S, Danese A, Bouhamida E, et al. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8323
- [28] Charidimou A, Turc G, Oppenheim C, et al. Microbleeds, Cerebral Hemorrhage, and Functional Outcome After Stroke Thrombolysis[J]. *Stroke*, 2017, 48(8): 2084-2090
- [29] McCarthy DJ, Tonetti DA, Stone J, et al. More expansive horizons: a review of endovascular therapy for patients with low NIHSS scores [J]. *J Neurointerv Surg*, 2021, 13(2): 146-151
- [30] Lindgren A, Vergouwen MD, van der Schaaf I, et al. Endovascular coiling versus neurosurgical clipping for people with aneurysmal subarachnoid haemorrhage [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 8(8): CD003085