

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cxyb.003458

LncRNA MYLK-AS1 调节 miR-141-3p/STMN1 轴 对胃癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

刘洁, 谢兴明, 钮洪霞, 杨先智

(遵义医科大学第三附属医院/遵义市第一人民医院胃肠外科, 遵义 563000)

【摘要】目的:探讨长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)肌球蛋白轻链激酶反义 RNA1(myosin light chain kinase antisense RNA1, MYLK-AS1)调节 miR-141-3p/微管不稳定蛋白 1(stathmin 1, STMN1)轴对胃癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。**方法:**将 HGC27 细胞分为 NC 组、si-NC 组、si-MYLK-AS1 组、si-MYLK-AS1+inhibitor NC 组、si-MYLK-AS1+miR-141-3p inhibitor 组。双萤光素酶报告基因实验检测 LncRNA MYLK-AS1、miR-141-3p、STMN1 的关系; qRT-PCR 检测 HGC27 细胞中 LncRNA MYLK-AS1、miR-141-3p 表达; CCK-8 法检测 HGC27 细胞增殖情况; 流式细胞术检测 HGC27 细胞凋亡; 使用 Transwell 实验评估了 HGC27 细胞的侵袭和迁移能力, 并统计了穿透基质膜的细胞数量; 同时采用 Western blot 技术检测了 HGC27 细胞中 STMN1、E-cadherin、Vimentin 及 N-cadherin 这几种蛋白表达量的变化。**结果:**HGC27 细胞中 LncRNA MYLK-AS1、STMN1 水平高于 GES-1 细胞($P<0.05$), miR-141-3p 水平低于 GES-1 细胞($P<0.05$)。si-MYLK-AS1 组 HGC27 细胞 $A_{450\text{nm}}$ 值、迁移、侵袭细胞数量、LncRNA MYLK-AS1 表达量、STMN1、N-cadherin、Vimentin 蛋白水平低于 NC 组、si-NC 组($P<0.05$), HGC27 细胞凋亡率、miR-141-3p 表达量、E-cadherin 蛋白水平高于 NC 组、si-NC 组($P<0.05$); 而 miR-141-3p 低表达减弱了沉默 LncRNA MYLK-AS1 抑制 HGC27 细胞发展的作用; LncRNA MYLK-AS1 靶向调节 miR-141-3p/STMN1 轴。**结论:**LncRNA MYLK-AS1 可能通过上调 microRNA-141-3p 的表达水平, 间接导致 STMN1 基因表达受到抑制, 这一过程可能对胃癌细胞的增殖、凋亡及侵袭特性产生明显影响。

【关键词】长链非编码 RNA 肌球蛋白轻链激酶反义 RNA1; 微小 RNA-141-3p/微管不稳定蛋白 1 轴; 胃癌; 增殖; 凋亡; 侵袭

【中图分类号】R735.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-06-27

Impacts of LncRNA MYLK-AS1 on proliferation, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells by regulating the miR-141-3p/STMN1 axis

Liu Jie, Xie Xingming, Niu Hongxia, Yang Xianzhi

(Department of Gastrointestinal Surgery, The Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University/

The First People's Hospital of Zunyi)

【Abstract】Objective: To investigate the impacts of long non-coding RNA (LncRNA) myosin light chain kinase antisense RNA1 (MYLK-AS1) on proliferation, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells by regulating the miR-141-3p/stathmin 1 (STMN1) axis. **Methods:** HGC27 cells were grouped into negative control (NC) group, si-NC group, si-MYLK-AS1 group, si-MYLK-AS1+inhibitor NC group, and si-MYLK-AS1+miR-141-3p inhibitor group. The relationship among LncRNA MYLK-AS1, miR-141-3p, and STMN1 was determined by the dual-luciferase reporter gene assay; the expression of LncRNA MYLK-AS1 and miR-141-3p in HGC27 cells was measured by qRT-PCR; the CCK-8 method and flow cytometry were used to determine the proliferation and apoptosis of HGC27 cells, respectively; the numbers of invading and migrating HGC27 cells were counted by Transwell; the protein levels of STMN1, E-cadherin, Vimentin, and N-cadherin in HGC27 cells were measured by Western blot. **Results:** Compared with GES-1 cells, the levels of LncRNA MYLK-AS1 and STMN1 in HGC27 cells were significantly up-regulated ($P<0.05$), and the level of miR-141-3p was significantly down-regulated ($P<0.05$). Compared with the NC group and si-NC group, the si-MYLK-AS1 group showed significant decreases in the optical density at 450 nm, numbers of migrating and invading cells, expression level of LncRNA MYLK-AS1, and protein levels of STMN1, N-cadherin, and Vimentin ($P<0.05$), as well as significant increases in the apoptosis rate, expression level of miR-141-3p, and protein level of E-cadherin ($P<0.05$). However, the low expression of miR-141-3p attenuated the inhibition of HGC27 cell development by silencing LncRNA MYLK-AS1; LncRNA MYLK-AS1 regulated the miR-141-3p/STMN1 axis in a targeted manner. **Conclusion:** Silencing LncRNA MYLK-AS1 may inhibit the expression of STMN1 by up-regulating miR-141-3p, thus affecting the proliferation, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells.

作者介绍:刘洁, Email:lj19901990lj@163.com,

研究方向:胃肠系肿瘤基础与临床研究。

通信作者:杨先智, Email:549768349@qq.com。

基金项目:遵义市科技局科技计划资助项目(编号:遵义科合 HZ 字 [2019]159)。

优先出版:<https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240401.1122.002>

(2024-04-01)

【Key words】long non-coding RNA myosin light chain kinase antisense RNA1; miR-141-3p/stathmin 1 axis; gastric cancer; proliferation; apoptosis; invasion

胃癌是一种起源于胃黏膜上皮的消化道恶性肿瘤。截至 2020 年,新增病例超过 100 万例,死亡病例为 76.9 万例。在癌症中,胃癌发病率排名第 5,死亡率排名第 4^[1]。胃癌早期没有明显症状,由于缺乏有效的早期诊断分子,大多数患者在诊断时已处于晚期^[2]。尽管化疗可延长患者生存时间,但预后仍不容乐观。因此,迫切需要寻找有效的靶向分子,以改善患者预后。已有研究证实长链非编码 RNA (long non coding RNA, lncRNA) 可用作诊断和治疗胃癌的生物标志物^[3]。有研究通过体内外实验发现,沉默 LncRNA 肌球蛋白轻链激酶反义 RNA1 (myosin light chain kinase antisense RNA1, MYLK-AS1) 可以抑制胃癌小鼠肿瘤生长,抑制胃癌细胞迁移和侵袭^[4]。Target Scan 网站及双萤光素酶报告基因实验发现,LncRNA MYLK-AS1 可以靶向调节 miR-141-3p/STMN1 轴。上调 miR-1-141p 水平可以抑制胃癌细胞活力、迁移和侵袭^[5],而 STMN1 与胃癌患者化学抵抗和预后不良有关^[6]。本研究对 LncRNA MYLK-AS1 是否可以通过调节 miR-141-3p/微管不稳定蛋白 1 (stathmin1, STMN1) 轴对胃癌细胞增殖、凋亡和侵袭产生影响,进行研究报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

HGC27 人胃癌细胞株是从赛百康生物技术(上海)有限公司获得的,GES-1 人胃黏膜上皮细胞是由上海致备生物科技有限公司提供的。此外,实验中使用的 si-NC、si-MYLK-AS1、inhibitor NC 和 miR-141-3p inhibitor 等产品均购于上海生工生物科技有限公司。用于检测细胞增殖能力的 CCK-8 试剂盒,由无锡普禾生物医药技术有限公司生产。实行双萤光素酶报告基因分析和细胞凋亡检测的试剂盒,包括膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (annexin V-FITC/PI) 双染试剂盒,是北京百奥莱博科技有限公司所供应的。针对 STMN1、E 钙黏蛋白 (E-cadherin)、N 钙黏蛋白 (N-cadherin) 及波形蛋白 (vimentin) 的专用抗体,是由 Abcam 公司销售的。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组^[7-8] 所有细胞种类在添加了 1% 的青霉素/链霉素和 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的杜尔伯科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 里进行了培养。这些细胞在 37 °C、含有 5% CO₂ 的饱和湿度条件下的稳定温度培养箱中进行了培养。在 6 孔培养板上,每孔种植 3×10⁴ 个 HGC27 细胞。接下来,根据转染试剂盒的指导说明,分别将 si-NC、si-MYLK-AS1、si-MYLK-AS1 与 inhibitor NC 组合,以及 si-MYLK-AS1 与 miR-141-3p inhibitor 组合转染入 HGC27 细胞。这些处理分别标识为 si-NC 组、si-MYLK-AS1 组、si-MYLK-AS1+inhibitor NC 组和 si-MYLK-AS1+miR-141-3p inhibitor 组。同时,设置一组未接受任何处理的 HGC27 细胞作为对照组,此组被称为 NC 组。转染完成后,所有细胞继续在培养条件下培养 48 h。

1.2.2 LncRNA MYLK-AS1、miR-141-3p、STMN1 关系

为了探究 MYLK-AS1 和 STMN1 基因与 miR-141-3p 的相互作用,首先构建 MYLK-AS1 的野生型载体 (MYLK-AS1-WT) 及其突变型载体 (MYLK-AS1-MUT),并将这 2 个质粒分别与 mimic NC 或 miR-141-3p mimic 共同转染至 HGC27 细胞中,由此形成了 4 个实验组:miR-NC+MYLK-AS1-WT 组、miR-141-3p mimic+MYLK-AS1-WT 组、miR-NC+MYLK-AS1-MUT 组及 miR-141-3p mimic+MYLK-AS1-MUT 组。

同时,构建 STMN1 基因的野生型质粒 (STMN1-WT) 和突变型质粒 (STMN1-MUT),同样将这 2 类质粒各自与 mimic NC 或 miR-141-3p mimic 共转染至 HGC27 细胞内,从而设立了以下 4 个对照组:miR-NC+STMN1-WT 组、miR-141-3p mimic+STMN1-WT 组、miR-NC+STMN1-MUT 组及 miR-141-3p mimic+STMN1-MUT 组。转染 48 h 后,对 HGC27 细胞中的萤光素酶活性变化进行评价分析^[7-8]。

1.2.3 qRT-PCR 检测 LncRNA MYLK-AS1、miR-141-3p 表达 采用 Trizol 试剂,依据产品说明书进行操作,从 HGC27 和 GES-1 细胞样本中提取总 RNA。挑选纯度和浓度接近 2.0 的样本,进而使用反转录试剂盒将其转化为 cDNA,以分析 LncRNA MYLK-AS1 和 miR-141-3p 的表达。配置包含 cDNA、引物、MIX 的混合溶液 20 μL,置于 qRT-PCR 仪扩增。qRT-PCR 的条件如下:95 °C 持续 10 min,40 个循环 (95 °C 持续 15 s,60 °C 持续 1 min)。采用 GAPDH 和 U6 作为参考基因,通过 2^{-ΔΔCt} 技术评估 LncRNA MYLK-AS1 与 miR-141-3p 的相对表达水平。引物如下。miR-141-3p, F: 5'-GCGCGTAA CACTGTCTGG-3', R: 5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3'; LncRNA MYLK-AS1, F: 5'-TCTCCTTGCAACCTCC-3', R: 5'-CCCACATTGAGCGAATGCC-3'; U6, F: 5'-GCTTCGG CAGCACATATACTAAAT-3', R: 5'-CGCTTCACGAATTG CGTGTCA-3'; GAPDH, F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATAC TAAAAT-3', R: 5'-CGCTTCACGAATTGCGTGTCA-3'。

1.2.4 Western blot 检测 STMN1、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达^[7-8] 使用 RIPA 裂解缓冲液对转染 HGC27 细胞进行裂解后,样本在 4 °C 下进行 12 000 g 离心 15 min。随后,BCA 蛋白定量试剂盒用于测定总蛋白浓度。等量的蛋白样品通过 10% SDS-PAGE 进行分离,并转印至 PVDF 膜上,维持 2 h。PVDF 膜随后用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,室温条件下。之后,膜在 4 °C 条件下与以下初级抗体孵育过夜:E-cadherin(稀释比 1:2 000)、vimentin(稀释比 1:2 000)、N-cadherin(稀释比 1:1 000)、STMN1(稀释比 1:1 000) 和 GAPDH(稀释比 1:1 000)。次日,继续在室温下使膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗孵育 2 h。最后,添加 ECL 试剂以实现目标条带的化学发光显色,应用 Image J 软件对目的条带的灰度值进行量化分析。

1.2.5 CCK-8 法检测 HGC27 细胞增殖情况 在 96 孔板上,每孔接种 4×10³ 个转染 HGC27 细胞,并在培养 48 h 后,在 37 °C 下向每孔添加 10 μL CCK-8 试剂,孵化 4 h。随后,使用酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 仪器,测定 450 nm 波长下的吸光度 (absorbance, A) 值。

1.2.6 流式细胞术检测 HGC27 细胞凋亡 HGC27 细胞在 6 孔板中以每孔 4×10⁵ 细胞的密度种植并培养。24 h 培养后,收集浮游细胞,并将这些细胞暴露于含有各 5 μL Annexin V-FITC 和 PI 的混合溶液中,避光孵育 15 min。接着,利用流

式细胞分析仪准确评估 HGC27 细胞的凋亡比例^[7-8]。

1.2.7 Transwell 试验测定 HGC27 细胞迁移和侵袭^[7-8] 检测迁移和侵袭性能时, 使用了 Matrigel 基质涂层的 Transwell 室(用于侵袭性评估)和未经 Matrigel 基质覆盖的 Transwell 室(用于迁移性评估)。对已转染的 HGC27 细胞进行收集, 并将其重新溶解于不含血清的 DMEM 培养基中。将 5×10^4 个/mL HGC27 细胞接种在上室, 将含有 20% FBS 的 DMEM 培养基作为化学引诱剂添加到 Transwell 下室。将细胞培养 24 h 后, 用棉签去除聚碳酸酯膜上表面的细胞, 在 Transwell 室内, 迁移和侵袭的细胞用 4% 的多聚甲醛进行固定后, 再用 0.05% 的结晶紫溶液进行染色。接下来, 在显微镜下捕获图像, 并从中随机选择 5 个有代表性的区域, 以便对这些区域内的侵袭或迁移细胞进行计数。

1.3 统计学方法

利用 SPSS 25.0 对全部数据进行了统计学处理。在经过正态性及方差齐性验证之后, 符合要求的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。2 组之间的比较, 采用独立样本 *t* 检验方法; 多组数据的比较时, 首选单因素方差分析。为进一步明确各组之间的差异, 使用 SNK-*q* 检验进行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 LncRNA MYLK-AS1 靶向调控 miR-141-3p/STMN1 轴

使用 TargetScan 预测工具分析显示, LncRNA MYLK-AS1 与 miR-141-3p, 以及 miR-141-3p 与 STMN1 之间存在潜在的相互作用结合位点。在 HGC27 细胞中, miR-141-3p mimic+MYLK-AS1-WT 组显示出的荧光素酶活性明显低于 miR-NC+MYLK-AS1-WT 组的活性 [(0.37 ± 0.03) vs. (1.06 ± 0.14)], 有明显差异 ($q=14.852, P<0.001$)。另一方面, miR-141-3p mimic+MYLK-AS1-MUT 组共转染至 HGC27 细胞时, 所测定的荧光素酶活性为 (1.04 ± 0.12), 与 miR-NC+MYLK-AS1-MUT 组的活性 (1.07 ± 0.13) 相比并无差异 ($q=0.656, P=0.968$)。

相似地, 相较于 miR-NC+STMN1-WT 组的荧光素酶活性 (1.06 ± 0.13), miR-141-3p mimic+STMN1-WT 组 HGC27 细胞的荧光素酶活性降低至 (0.44 ± 0.05) ($q=12.463, P<0.001$)。然而, miR-141-3p mimic+STMN1-MUT 组的荧光素酶活性 (1.08 ± 0.16) 相较于 miR-NC+STMN1-MUT 组 (1.05 ± 0.12) 并无差异 ($q=0.603, P=0.973$), 见图 1。

miR-141-3p	3' GGUAGAAAUGGUCUGACAAU5'
WT-MYLK-AS	5' GAUGAAGUAAAUGCAGUGUUC3'
MUT-MYLK-AS	5' GAUGAAGUAAAUGGUCCAGUGU3'
miR-141-3p	3' GGUAGAAAUGGUCUGACAAU5'
WT-STMN1	5' AGGGGAGAACUGAAAGUGUUU3'
MUT-STMN1	5' AGGGGAGAACUGUUAAAGUGU3'

图 1 TargetScan 网站预测 LncRNA MYLK-AS1 与 miR-141-3p、miR-141-3p 与 STMN1 的结合点

2.2 LncRNA MYLK-AS1、miR-141-3p、STMN1 在细胞中的表达

相较于 GES-1 细胞, HGC27 细胞内 LncRNA MYLK-AS1 和 STMN1 的表达水平平均有所上调 ($t=6.736, 9.321$, 均 $P=0.000$), 而 miR-141-3p 的表达在 HGC27 细胞中则表现为下调 ($t=15.513, P=0.000$), 见图 2、3。

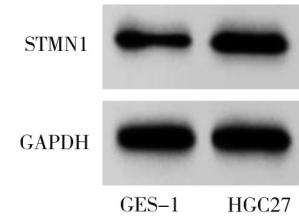
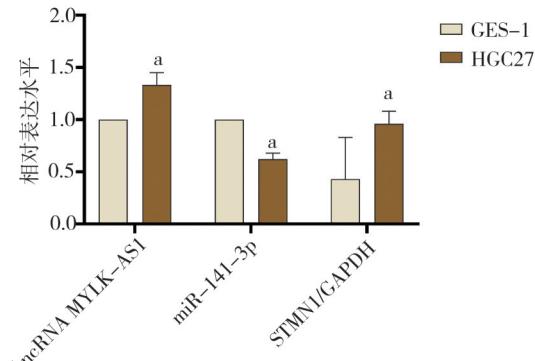


图 2 Western blot 检测细胞中 STMN1 蛋白水平



注: a, 与 GES-1 细胞比较, $P<0.05$

图 3 LncRNA MYLK-AS1、miR-141-3p、STMN1 蛋白在细胞中的表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.3 LncRNA MYLK-AS1、miR-141-3p、STMN1 蛋白在 HGC27 细胞中的表达

相较于 NC 组和 si-NC 组, si-MYLK-AS1 组中 LncRNA MYLK-AS1 及 STMN1 的表达水平均下调 ($q=34.721, 18.924, 36.168, 19.840$, 均 $P<0.05$), miR-141-3p 的表达量却上调 ($q=14.374, 14.209$, 均 $P<0.05$); 与 MYLK-AS1+miR-141-3p inhibitor 组相比较, si-MYLK-AS1 组、si-MYLK-AS1+inhibitor NC 组 STMN1 水平下降 ($q=21.366, 21.061$, 均 $P<0.05$), miR-141-3p 表达量上升 ($q=13.878, 14.374$, 均 $P<0.05$), 见图 4、5。

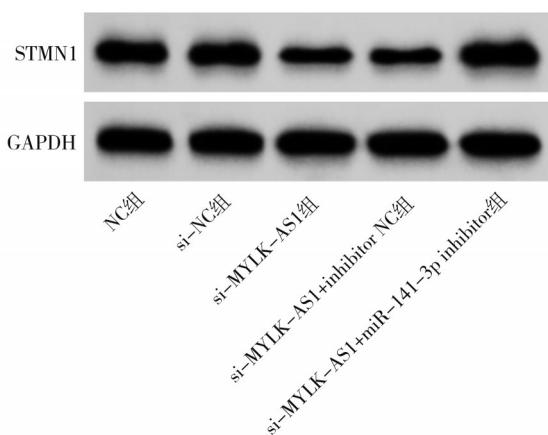
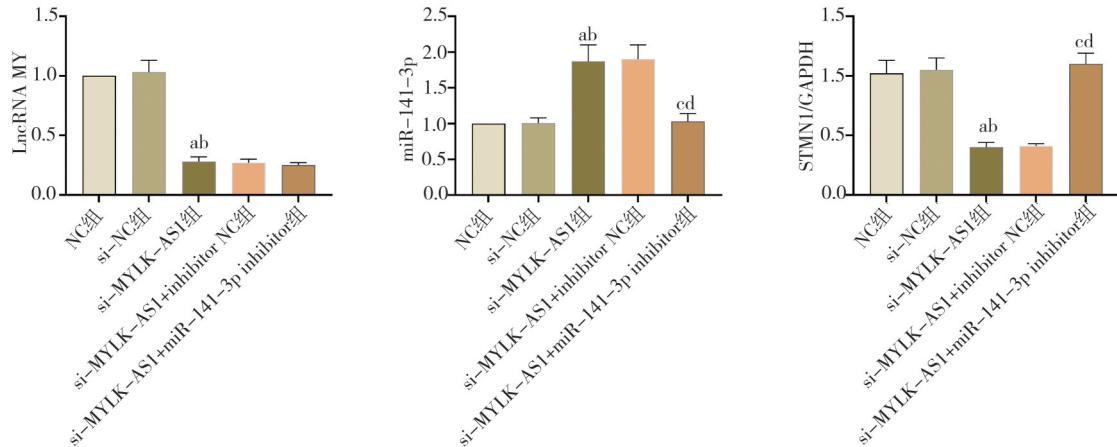


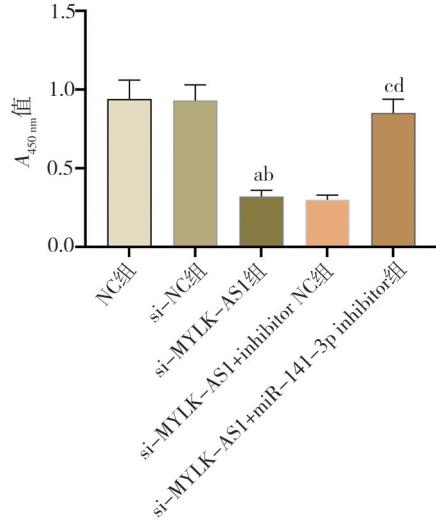
图 4 Western blot 检测 HGC27 细胞 STMN1 蛋白表达



注:a,与NC组比较, $P<0.05$;b,与si-NC组比较, $P<0.05$;c,与si-MYLK-AS1组比较, $P<0.05$;d,与si-MYLK-AS1+inhibitor NC组比较, $P<0.05$
图5 LncRNA MYLK-AS1、miR-141-3p、STMN1蛋白在HGC27细胞中的表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.4 沉默LncRNA MYLK-AS1或下调miR-141-3p对HGC27细胞增殖的影响

与NC组和si-NC组相比,si-MYLK-AS1组在HGC27细胞的 $A_{450\text{nm}}$ 值检测到减少($q=18.152, 17.859$,均 $P<0.05$)。进一步,与si-MYLK-AS1+miR-141-3p inhibitor组进行比较时,si-MYLK-AS1组和si-MYLK-AS1+inhibitor NC组的 $A_{450\text{nm}}$ 值同样表现出下降($q=15.517, 16.102$,均 $P<0.05$),见图6。



注:a,与NC组比较, $P<0.05$;b,与si-NC组比较, $P<0.05$;c,与si-MYLK-AS1组比较, $P<0.05$;d,与si-MYLK-AS1+inhibitor NC组比较, $P<0.05$

图6 沉默LncRNA MYLK-AS1或下调miR-141-3p对HGC27细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.5 沉默LncRNA MYLK-AS1或下调miR-141-3p对HGC27细胞凋亡的影响

相较于si-MYLK-AS1处理的组别,未处理的NC组及si-NC处理的HGC27细胞组展现了更低的细胞凋亡率($q=42.675, 42.836$,均 $P<0.05$);与si-MYLK-AS1+miR-141-3p inhibitor组相比较,si-MYLK-AS1组、si-MYLK-AS1+inhibitor

tor NC组 HGC27 细胞凋亡率上升($q=33.004, 33.907$,均 $P<0.05$),见图7、8。

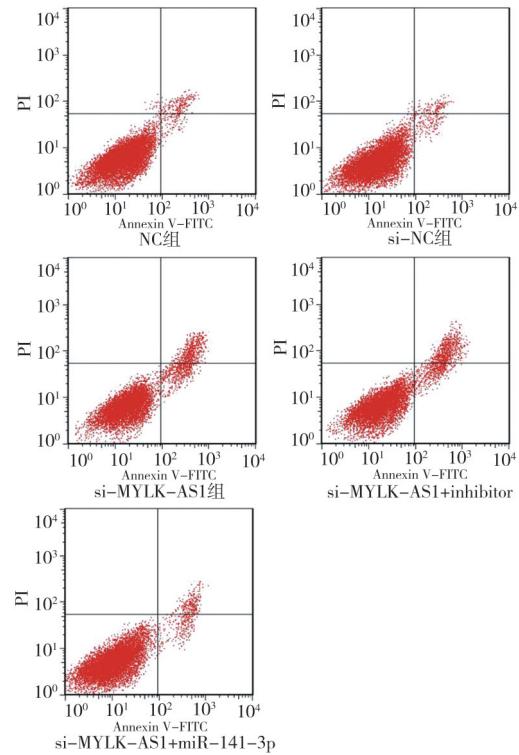
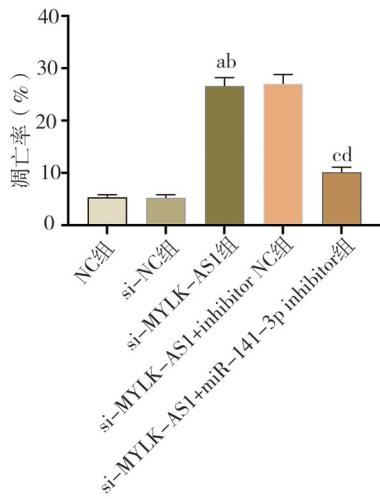


图7 流式细胞术检测HGC27细胞凋亡

2.6 沉默LncRNA MYLK-AS1或下调miR-141-3p对HGC27细胞侵袭、迁移及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白的影响

在NC组和si-NC组中,相比于si-MYLK-AS1组,HGC27细胞的迁移和侵袭能力及N-cadherin和Vimentin蛋白的水平有所增加($q=14.726, 10.898, 25.852, 17.000$ 和 $14.033, 11.587, 24.961, 17.667$,均 $P<0.05$),而E-cadherin蛋白水平则表现为下降($q=23.668, 24.083$,均 $P<0.05$)。另一方面,与si-MYLK-AS1+miR-141-3p inhibitor组相比,si-MYLK-AS1

组和 si-MYLK-AS1+inhibitor NC 组在 HGC27 细胞迁移和侵袭能力及 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白水平上明显下降 ($q=6.207, 4.061, 14.263, 14.667$ 和 $7.656, 3.546, 15.601, 16.000, P<0.05$)，而 E-cadherin 蛋白水平则呈现上升趋势 ($q=17.024, 17.440$ ，均 $P<0.05$)，见图 9~13。



注：a，与 NC 组比较， $P<0.05$ ；b，与 si-NC 组比较， $P<0.05$ ；c，与 si-MYLK-AS1 组比较， $P<0.05$ ；d，与 si-MYLK-AS1+inhibitor NC 组比较， $P<0.05$

图 8 沉默 LncRNA MYLK-AS1 或下调 miR-141-3p 对 HGC27 细胞凋亡的影响

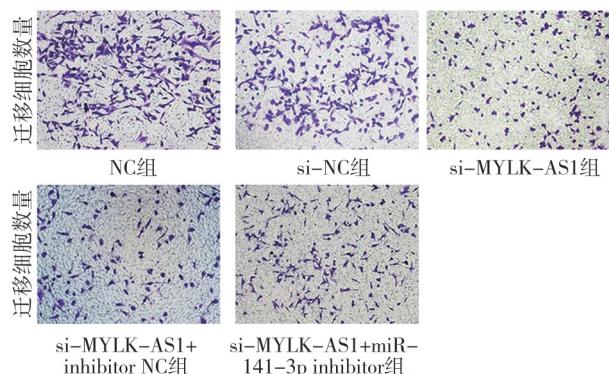


图 9 Transwell 检测 HGC27 细胞迁移 (200×)

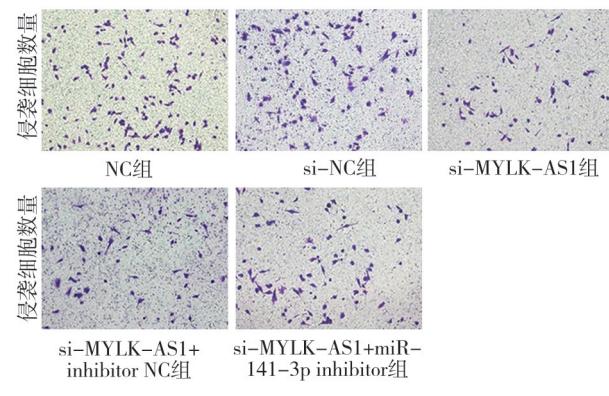
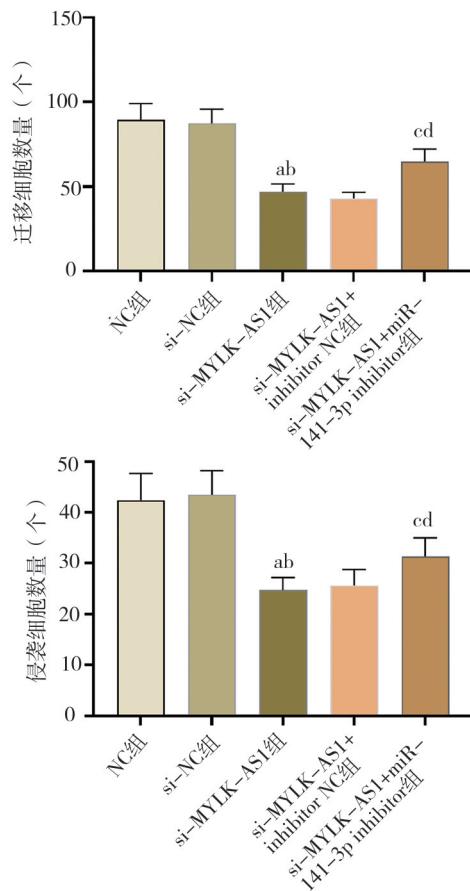


图 10 Transwell 检测 HGC27 细胞侵袭 (200×)



注：a，与 NC 组比较， $P<0.05$ ；b，与 si-NC 组比较， $P<0.05$ ；c，与 si-MYLK-AS1 组比较， $P<0.05$ ；d，与 si-MYLK-AS1+inhibitor NC 组比较， $P<0.05$

图 11 沉默 LncRNA MYLK-AS1 或下调 miR-141-3p 对 HGC27 细胞侵袭和迁移细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

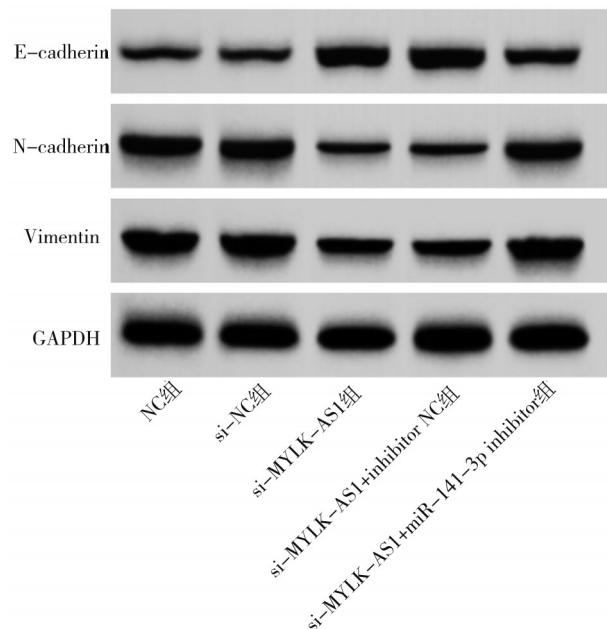
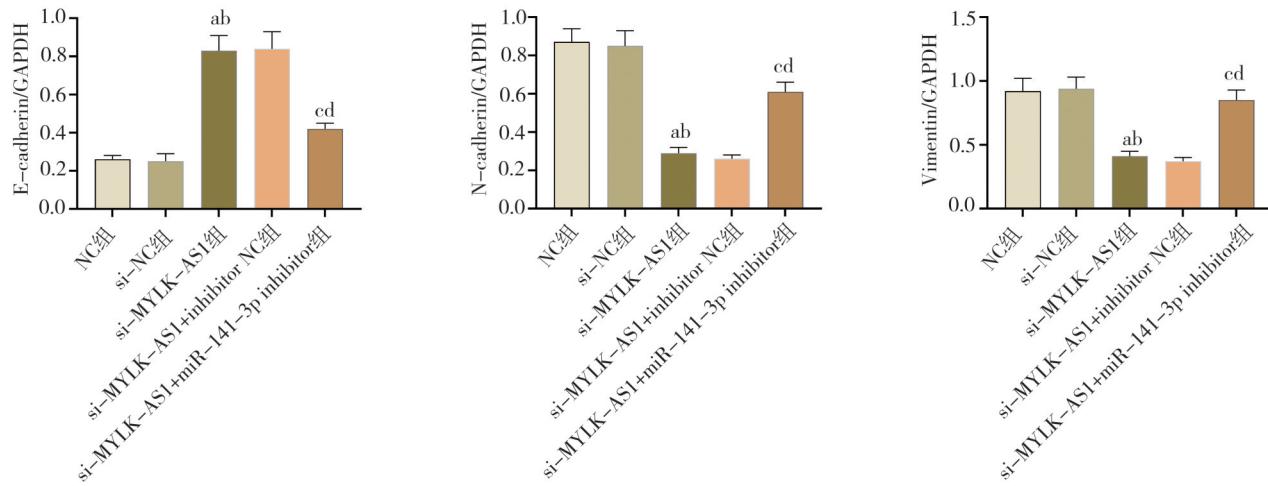


图 12 Western blot 检测细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达



注:a,与NC组比较, $P<0.05$;b,与si-NC组比较, $P<0.05$;c,与si-MYLK-AS1组比较, $P<0.05$;d,与si-MYLK-AS1+inhibitor NC组比较, $P<0.05$

图13 沉默LncRNA MYLK-AS1或下调miR-141-3p对HGC27细胞中EMT相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨 论

近几年,胃癌发病率及死亡率在持续增长,研究报道称,胃癌患者死亡率高的主要原因是发生转移^[9]。有大量研究报道称,lncRNA可以调控胃癌进展。例如,LINC01116可以促进胃癌细胞增殖,抑制胃癌细胞凋亡^[10]。LncRNA MYLK-AS1是各种人类癌症中的癌基因,LncRNA MYLK-AS1沉默对肾母细胞瘤细胞体内致瘤能力起抑制作用^[11]。LncRNA MYLK-AS1上调可以促进肝癌肿瘤进展和血管生成^[12]。近期,还有研究发现,LncRNA MYLK-AS1沉默抑制胃癌细胞增殖、细胞周期、迁移和侵袭^[4]。由此可见,LncRNA MYLK-AS1可能是胃癌分子诊断的潜在标志物。本项研究揭示了在HGC27细胞中,LncRNA MYLK-AS1的表达水平较高,暗示LncRNA MYLK-AS1有可能在胃癌的发展过程中起促进作用。进一步研究发现,当LncRNA MYLK-AS1被沉默之后,HGC27细胞的 $A_{450\text{ nm}}$ 值降低,凋亡率提高,这表明通过抑制LncRNA MYLK-AS1的表达,可以抑制胃癌细胞的增殖并促进其凋亡,从而可能对胃癌的发展产生抑制作用。

在胃癌细胞的转移和侵袭过程中,EMT被激活。在EMT中,上皮细胞失去其特有的上皮特性,例如E-cadherin的下调,而获得间质细胞的特征,表现为N-cadherin和Vimentin的上调,并激活一系列下游转录因子,如Snail、Slug、Twist等^[13]。通过EMT过程,胃癌细胞获得了向周围基质迁移和侵入的能力,之后可以通过血液和淋巴管扩散到相邻组织^[14]。

鉴于抑制EMT对防止胃癌进展至关重要,本研究所揭示的结果表明,在沉默LncRNA MYLK-AS1后,HGC27胃癌细胞的迁移和侵袭潜能明显减弱,表现为迁移和侵袭细胞的数量减少,同时N-cadherin和Vimentin这2种间质标志蛋白的表达下调。另一方面,E-cadherin这一上皮标志蛋白的表达水平则得到了提升。据此可以推断,沉默LncRNA MYLK-AS1能够有效阻止胃上皮细胞向间质型转变,从而有效限制胃癌细胞向周围组织的扩散和侵入,最终有助于抑制胃癌病情的恶化和发展。

生物信息学分析揭示了LncRNA MYLK-AS1与miR-141-3p之间存在结合位点。此外,miR-141-3p在肺癌中的低表达已被证实具有临床意义。例如,Chen DL等^[15]的研究表明,降低miR-141-3p的表达可以促进胃癌的进展和化疗耐药性,指出了miR-141-3p在肿瘤发展中的潜在作用。Zhou YC等^[16]发现,miR-141-3p不仅可限制胃癌细胞迁移和侵袭,还抑制正常成纤维细胞向癌症相关成纤维细胞的转变。以上研究均表明上调miR-141-3p可以对胃癌的发展起到抑制作用。本研究所揭示的数据指出,miR-141-3p在HGC27细胞系中呈现低表达状态。在对miR-141-3p的功能抑制后,发现其削弱了LncRNA MYLK-AS1对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制效应。这一现象暗示,LncRNA MYLK-AS1可能借助上调miR-141-3p的表达途径,来有效地阻抑胃癌的恶性进展。另外,通过生物信息学手段已确认miR-141-3p与STMN1基因存在相互作用的结合位点,这为进一步理解两者间的调控关系提供了依据。有研究报道称,STMN1的异

常表达可能通过影响EMT促进肿瘤进展^[17]。STMN1基因沉默可以抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭^[18]。

研究揭示了STMN1在胃癌细胞中表达水平偏高,而在对HGC27细胞进行LncRNA MYLK-AS1沉默处理后,miR-141-3p表达量增加,同时STMN1蛋白水平下降。反之,如果miR-141-3p表达下调,则STMN1蛋白水平上升,上述实验结果揭示了这样一个机制可能性:即LncRNA MYLK-AS1可能通过介导miR-141-3p的上调作用,间接导致STMN1表达下调,这一系列连锁反应可能对HGC27细胞的增殖潜能、EMT进程及迁移和侵袭能力产生抑制效应,并且有利于促进此类细胞发生凋亡。此外,双荧光素酶实验进一步确认了LncRNA MYLK-AS1直接靶向调控miR-141-3p与STMN1之间的相互作用。

综上所述,通过沉默LncRNA MYLK-AS1,可能会导致miR-141-3p的表达水平提升,进而抑制STMN1蛋白的表达。这一连串的分子事件有助于有效抑制HGC27胃癌细胞的增殖、阻断EMT进程,以及减少细胞的迁移和侵袭能力,同时促进细胞凋亡。鉴于这些发现,本课题组计划在未来的研究中使用小鼠模型进行体内实验,以进一步验证这些结果和探索LncRNA MYLK-AS1在胃癌发展中的作用机制。

参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209–249.
- [2] Tan ZY. Recent advances in the surgical treatment of advanced gastric cancer: a review[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:3537–3541.
- [3] Yang YJ, Luo S, Wang LS. Effects of lncRNA-HEIH on proliferation, apoptosis and invasion of gastric cancer cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(18):9400–9407.
- [4] Luo J, Xiang HF. LncRNA MYLK-AS1 acts as an oncogene by epigenetically silencing large tumor suppressor 2(LATS2) in gastric cancer [J]. Bioengineered, 2021, 12(1):3101–3112.
- [5] Liu Y, Lin WJ, Dong YY, et al. Long noncoding RNA HCG18 up-regulates the expression of WIPF₁ and YAP/TAZ by inhibiting miR-141-3p in gastric cancer[J]. Cancer Med, 2020, 9(18):6752–6765.
- [6] Bai TY, Yokobori T, Altan B, et al. High STMN1 level is associated with chemo-resistance and poor prognosis in gastric cancer patients [J]. Br J Cancer, 2017, 116(9):1177–1185.
- [7] 魏丕喜, 邓玉, 任双双, 等. lncRNA FGD5-AS1 调节 miR-129-5p/SOX4 轴对子宫内膜癌细胞恶性生物行为的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2023, 31(12):2413–2419.
- [8] Wei PX, Deng Y, Ren SS, et al. Impact of lncRNA FGD5-AS1 on the malignant biological behavior of endometrial cancer cells via regulation of miR-129-5p/SOX4 axis[J]. Chin J Birth Health Hered, 2023, 31(12):2413–2419.
- [9] 王金礼, 陈登峰. 沉默lncRNA MCF2L-AS1通过miR-138-5p/AnxA2轴抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(2):240–248.
- [10] Wang JL, Chen DF. Silencing lncRNA MCF2L-AS1 inhibits proliferation, migration and invasion of breast cancer cells via miR-138-5p/AnxA2 axis[J]. J Mod Oncol, 2024, 32(2):240–248.
- [11] Li Y, Yan XL, Shi JJ, et al. Aberrantly expressed miR-188-5p promotes gastric cancer metastasis by activating Wnt/β-catenin signaling [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):505.
- [12] Chen J, Yuan ZH, Hou XH, et al. LINC01116 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of gastric cancer cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(4):1807–1814.
- [13] Zhu SB, Zhang JQ, Gao XF, et al. Silencing of long noncoding RNA MYLK-AS1 suppresses nephroblastoma via down-regulation of CCNE1 through transcription factor TCF7L2[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(8):5757–5770.
- [14] Teng F, Zhang JX, Chang QM, et al. LncRNA MYLK-AS1 facilitates tumor progression and angiogenesis by targeting miR-424-5p/E2F7 axis and activating VEGFR-2 signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1):235.
- [15] Liu MY, Zhang MK, Yin HS. Linc-ROR promotes invasion and metastasis of gastric cancer by activating epithelial-mesenchymal transition[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2022, 65(3):545–550.
- [16] Yonemura Y, Ishibashi H, Mizumoto A, et al. The development of peritoneal metastasis from gastric cancer and rationale of treatment according to the mechanism[J]. J Clin Med, 2022, 11(2):458.
- [17] Chen DL, Sheng H, Zhang DS, et al. The circular RNA circDLG1 promotes gastric cancer progression and anti-PD-1 resistance through the regulation of CXCL12 by sponging miR-141-3p[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1):166.
- [18] Zhou YC, Zhong JH, Gong FS, et al. MiR-141-3p suppresses gastric cancer induced transition of normal fibroblast and BMSC to cancer-associated fibroblasts via targeting STAT4[J]. Exp Mol Pathol, 2019, 107:85–94.
- [19] Ke B, Guo XF, Li N, et al. Clinical significance of Stathmin1 expression and epithelial-mesenchymal transition in curatively resected gastric cancer[J]. Mol Clin Oncol, 2019, 10(2):214–222.
- [20] Shu F, Zou XQ, Tuo H, et al. Stathmin gene silencing suppresses proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells via AKT/sCLU and STAT3 signaling[J]. Int J Oncol, 2019, 54(3):1086–1098.

(责任编辑:曾玲)