doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.11.001

·基础研究·

长链非编码 RNA n336928 对胃肠胰神经内分泌肿瘤细胞增殖及迁移的影响 *

潘佳玲 柏建安 严丽军 陈挑调 汤琪云△

（南京医科大学第一附属医院老年消化科 江苏 南京 210029）

摘要 目的：从基础实验层面研究长链非编码 RAN n336928(LncRNA n336928,即 n336928)在胃肠胰神经内分泌肿瘤(Gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors，GEP-NETs)进展中的作用与影响。**方法：**首先采用实时定量荧光聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 n336928 在人正常胰腺导管上皮细胞系(hTERT-HPNE)、GEP-NETs 细胞株(QGP-1、STC-1)中表达情况。采用靶向 n336928 的小干扰(si-RNA)，以转染试剂 lipo3000 为载体进行敲降。通过 CCK8 法、克隆实验和 EdU 实验观察细胞增殖活力，通过 Transwell 实验观察细胞迁移能力变化，通过流式分析实验检测 n336928 敲低是否与周期阻滞和细胞凋亡相关，并用 Western blotting 检测周期和凋亡相关标志性蛋白表达。**结果：**QGP-1 和 STC-1 中 n336928 的 mRNA 水平的表达相较于 hTERT-HPNE 明显升高（$P<0.05$），抑制 QGP-1 及 STC-1 中 n336928 的表达后，细胞的增殖及迁移能力明显减弱($P<0.05$)。QGP-1 细胞转染 n336928 小干扰后，细胞周期主要阻滞在 G1/S 期，且细胞凋亡明显增加。与对照组相比，敲降组的周期相关蛋白（CyclinD1）明显减少，相反凋亡相关蛋白(Caspase3)明显升高($P<0.05$)。为了进一步研究基因作用机制，我们用 RNA 免疫沉淀反应（RIP）验证 n336928 可与 EZH2 结合，并共同调控下游基因 P21。**结论：**LncRNA n336928 可通过结合 EZH2 并表观调控下游基因 P21，而参与胃肠胰神经内分泌肿瘤的发生发展过程。

关键词：LncRNA n336928；胃肠胰神经内分泌肿瘤；EZH2；细胞周期；凋亡；P21

中图分类号：R-33；R735 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2022）11-2001-07

Effects of Long Non-coding RNA N336928 on Proliferation and Migration of Gastrointestinal Pancreatic Neuroendocrine Tumor Cells*

PAN Jia-ling, BAI Jian-an, YAN Li-jun, CHEN Tiao-tiao, TANG Qi-yun△

(Department of Geriatric Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the function and influence of long non-coding RAN n336928 (LncRNA n336928, n336928) on Gastro-Entero-pancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) from the basic-experimental level. **Methods:** The expression of n336928 in human normal pancreatic ductal epithelial cell lines (hTERT-HPNE) and GEP-Nets cell lines (QGP-1, STC-1) was detected by real-time quantitative fluorescence polymerase chain reaction (qRT-PCR). LncRNA n336928 was knocked down by small interference using transfection reagent Lipo3000 as a carrier. Cell proliferation activity was observed by CCK8 assay, colony assay and EdU assay, cell migration ability was observed by transwell assay, flow cytometry assay was used to detect whether lessen expression of n336928 was related to cell cycle arrest and cell apoptosis, and the expression of related proteins were detected by western blotting. **Results:** The mRNA expression of n336928 in QGP-1 and STC-1 was significantly higher than that of hTERT-HPNE ($P<0.05$). After inhibiting the expression of n336928 in QGP-1 and STC-1, the proliferation and migration of the cells were significantly decreased ($P<0.05$). After transfection of QGP-1 cells with si-n336928, the cell cycle was mainly arrested at G1/S phase, and cell apoptosis was significantly increased. Compared with the control group, cycle-related protein cyclinD1 was significantly decreased in knockout group, while apoptosis-related protein caspase3 was significantly increased ($P<0.05$). To furtherly investigate the relevant mechanism, RNA immunoprecipitation reaction (RIP) was used to verify that n336928 could bind to EZH2 and jointly regulate the downstream gene P21. **Conclusion:** LncRNA n336928 can be involved in the development of GEP-NETs by binding to EZH2 and epigeneticly regulation of downstream gene P21.

Key words: LncRNA n336928; GEP-NETs; EZH2; Cell cycle; Apoptosis; P21

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

Article ID: 1673-6273(2022)11-2001-07

* 基金项目：江苏省医学重点人才资助项目（ZDRCA2016008）；江苏省 "333" 工程项目（BRA2017535）；南京医科大学科技发展基金 - 重点项目（2017NJMUZD130）

作者简介：潘佳玲（1988-），女，硕士，研究方向：神经内分泌肿瘤，E-mail: 295428785@qq.com

△ 通讯作者：汤琪云，女，博士，博士生导师，研究方向：神经内分泌肿瘤，E-mail: tqy831@163.com

（收稿日期：2022-01-11 接受日期：2022-01-31）

前言

神经内分泌肿瘤(Neuroendocrine tumors,NETs)是一种具有不同生物学特性的异质肿瘤,细胞起源于弥散内分泌系统[1]。胃肠道胰腺神经内分泌肿瘤 (Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors,GEP-NETs)是神经内分泌肿瘤中位于胃、小肠、胰腺和阑尾的一个亚群[2]。虽然是罕见病种,近年来全球范围内 GEP-NETs 发病率却连年增加,美国每年有约 8000 例确诊病例[2]。从患病率来说,GEP-NETs 目前是第二常见的消化道癌症[3]。其发病率和流行率在过去 20 年显著增加,甚至高于其他胃肠癌(胃、胰、食道、肝胆腺癌)[4]。GEP-NETs 的预后主要依赖于肿瘤分化和组织学分级,如 Ki-67 率以及有丝分裂指数[5]。目前,该疾病的详细分子机制尚未被很好地了解,而更好地了解其癌变过程对于为 GEP-NETs 患者提供先进的诊断方法和新型有效疗法至关重要。

长链非编码 RNA(Long non-coding RNAs, LncRNAs)通常被定义为长度超过 200 个核苷酸,但蛋白质编码能力有限的非蛋白质编码转录本[6]。生物学研究表明,lncRNA 的潜在分子功能很多,许多 lncRNA 显示出细胞类型特异性表达[6,7],并与人类疾病相关[8]。例如,有报道称 lncRNA PVT1 提示胃癌预后不良,并通过表观遗传调控 p15 和 p16 促进细胞增殖[9]。到目前为止,关于 lncRNA 与我们的 GEP-NETs 的研究文献很少,直至近期有一篇文章探讨了 lncRNA HOTAIR 的异常表达与 GEP-NETs 的侵袭行为之间的联系[10]。为了填补相关研究的空白,我们应该加强对长链非编码 RNA 的研究。

近日,我们通过对 GEP-NETs 的癌及癌旁组织测序得到一个在 GEP-NETs 癌组织中特异性表达的 lncRNA n336928。LncRNA n336928,是一个包含 305 个碱基的非编码 RNA (http://www.noncode.org/show_rna.php?id=NONHSAT097329&version=2&utd=1#)。曾有文献报道其与膀胱癌的分期、分级以及总生存期有关[11],但关于 lncRNA n336928 在 GEP-NETs 这方面的研究还没有,本研究旨在探 lncRNA n336928 对 GEP-NETs 发生发展的影响,为临床治疗新策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与转染

1640 和 DMEM 培养基内均加入 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素,其中 QGP-1 细胞用 1640 培养基,hTERT-HPNE 和 STC-1 用 DMEM 培养基,均置于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养。将 QGP-1、STC-1 和 hTERT-HPNE 接种于六孔板中,当细胞密度达到 30%～40%时,用转染试剂 Lipofectamine 3000 (Invitrogen,上海,中国)按照说明书进行转染,转染 48 小时后,收集细胞进行细胞表型、qPCR 或 Western blot 分析。

1.2 总 RNA 提取与实时定量荧光聚合酶链反应(qRT-PCR)

采用 Trizol 方法提取细胞中的 RNA,根据说明书提取 RNA 后测量各处理组 RAN 浓度以及分光光度值(A260/280 在 1.8～2.0)。按照 Takara 说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 实验,GAPDH 作为内参。涉及到的相关基因引物序列如表 1 所示。

表 1 相关基因引物序列

Table 1 Primers sequences for qRT-PC

	Sequences
LncRNA n336928	forward, 5'-CACCTGTGCCATACCATTAAACA-3' reverse, 5'-GGGCTAGGAGATTCTGCTTCTG-3'
GAPDH	forward, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' reverse, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
EZH2	forward, 5'-AATCAGAGTACATGCGACTGAGA-3' reverse, 5'-GCTGTATCCTTCGCTGTTTCC-3'
P15	forward, 5'-GGACTAGTGGAGAAGGTGCG-3' reverse, 5'-GGGCGCTGCCCATCATCATG-3'
P21	forward, 5'-GCCTCCTCATCCCGTGTTCTCC-3' reverse, 5'-AGGGTACCACCCAGCGGACA-3'
P27	forward, 5'-TGCAACCGACGATTCTTCTACTCAA-3' reverse, 5'-CAAGCAGTGATGTATCTGATAAACAAGG-3'
P57	forward, 5'-CTAGCCAGCAGGCATCGAG-3' reverse, 5'-GTGGTGGACTCTTCTGCGTC-3'

1.3 CCK8 法检测细胞活力

将处于对数期生长的对照组和敲降组细胞接种于 96 孔板,每组 6 个复孔,每孔 2500 个细胞,待细胞贴壁后加入 100 μL CCK8 稀释液 (全培 1640:CCK8 试剂为 9:1),2 h 后采用酶标仪测量 450 nm 处吸光度值(OD),共测 5 天,数据整理后用 GraphPad 软件作趋势图。

1.4 克隆实验

将处于对数期生长的对照组和敲降组细胞接种于 96 孔板,每组 3 个复孔,每孔 1250 个细胞,置于培养箱中孵育 14-18 天(时间不等),期间每三天换一次液,等克隆集落肉眼可见时取出。PBS 洗两遍,后用 4%的多聚甲醛固定细胞 30 min,加结晶紫染色 30 分钟。然后用 PBS 洗两遍,自然风干或烘干后,拍照并计数。

1.5 Transwell 实验

将对照组和敲降组用 0.5%含 EDTA 的胰酶消化后,分别取 15 万个细胞种于 Transwell 小室的上层,下层加入 700 μL 含有 10%胎牛血清的 1640 培养基,置于培养箱培养 96 h 后用 4%的多聚甲醛固定细胞 30 min,用结晶紫染色 30 分钟,自然风干或烘干后,显微镜下对下层细胞进行拍照和计数。

1.6 胸腺嘧啶核苷类似物(EdU)细胞增殖实验

首先将 24 孔板中铺上细胞爬片,后将处于敲降组和对照组的细胞分别接种于铺了爬片的 24 孔板,每组 4 个复孔,48 h 后按照 EdU 试剂盒说明书进行操作,经荧光显微镜拍照,Image 软件处理后计算两组细胞 EdU 阳性率并作对比。

1.7 Western blotting 实验

将细胞接种于六孔板并经过转染处理 48 小时后,用裂解液(RIPA:PMSF=100:1)从细胞中提取总蛋白,并检测蛋白浓度。每孔加入 30 mg 总蛋白,经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,在 2 小时 200 mA 恒流电流下,将蛋白转至 PVDF 膜上(0.22 μm),分别经过封闭,敷一抗(4℃,过夜)以及敷二抗(常温,2 小时)等步骤后。泡显影剂后,用密度法定量放射曝光条带 (软件 Quantity One,Bio-Rad)。

1.8 流式分析

包括周期检测和凋亡检测。周期检测步骤如下，将对照组和敲降组用预冷的 PBS 洗两遍，最后一遍吸干净残液，用不含 EDTA 的胰酶消化细胞，放入孵育箱孵育 5 分钟，后 1 毫升全培终止消化，收集到流式管中，1000 rpm，离心 5 分钟。用预冷的 PBS 洗两遍，最后一遍小心吸去上清，最后用 75%的乙醇重悬细胞沉淀，放 -20℃冰箱保存，择期送检。

凋亡检测使用 FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒 (BD Biosciences)，用不含 EDTA 得胰蛋白酶消化收集凋亡细胞，并用异硫氰酸荧光素(FITC)-Annexin V 和碘化丙啶双染色。注意染色时应避光操作，并在一小时内送检。

1.9 RIP 实验

根据制造商的说明，使用 Magna RIP™RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒(Millipore，美国)，进行 RIP 实验。首先铺两个超大皿(直径 15 厘米)QGP-1 细胞，长满后细胞数约 1.5×10^7。第一天，将细胞小心刮下并分别收集于 15 毫升 EP 管中。经过细胞裂解以及核裂解后，将上清与抗体和磁珠等混匀，放四度冰箱匀速旋转过夜。第二天将磁珠清洗数遍后，浸入水浴锅(55℃，半小时)并不断摇晃，除去与磁珠结合的蛋白和其他杂质，弃磁珠留上清，纯化两次后加入 RNA 沉淀增强剂并放入负 80℃冰箱过夜。第三天继续纯化并提取 RNA。EZH2 抗体来自 Abcam。

1.10 CHIP 实验

根据制造商的说明，使用 Magna CHIP™RNA 剂盒(Millipore，美国)，进行 CHIP 实验。首先铺两个大皿(直径 10 厘米)QGP-1 细胞，长满后细胞数约 1.0×10^7。第一天，将细胞小心刮下并分别收集于 15 毫升 EP 管中。经过细胞裂解以及核裂解后，将细胞提取物与抗体和磁珠等混匀，放四度冰箱匀速旋转过夜。第二天将磁珠清洗数遍后，先后放入水浴锅(62 度，2 小时)，金属浴(95 度，10 分钟)后，弃磁珠留上清，并用试剂盒配套的滤过柱纯化上清，最终收集纯化的 cDNA。EZH2 抗体和 H3K27 抗体来自 Abcam。

1.11 统计学分析

每项实验均进行至少 3 次，采用 GraphPad Prism 软件对数据进行处理，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。* 代表 $P<0.05$，** 代表 $P<0.01$。

2 结果

2.1 LncRNA n336928 促进 GEP-NETs 细胞体外增殖和迁移

为了验证测序结果(图 1，A)，我们首先在不同的细胞系验证，分别为胰腺正常上皮细胞(HPNE)、胰腺神经内分泌细胞(QGP-1)和小肠神经内分泌细胞(STC-1)。结果可见 LncRNA n336928 在两株神经内分泌肿瘤细胞中的表达远远高于在 HPNE 中的表达(图 1，B)。

随后我们分别用 n336928 1 号和 3 号小干扰分别转染 QGP-1 和 STC-1 细胞，降低 n336928 的表达，并用 qRT-PCR 方法检测其敲降效率(图 2，A)。为了验证降低 n336928 对于细胞功能的影响，我们进行了一系列的细胞表型实验。CCK8 实验、克隆实验显示降低 n336928 水平后可显著降低细胞增殖水平(图 2，B-C)，小室迁移实验显示敲降 n336928 后可显著抑制细胞迁移的水平(图 2，D)。随后 EdU 荧光实验表明，当 n336928 表达水平降低后，细胞增殖率也显著减少(图 3)。以上结果显示，n336928 可促进 GEP-NETs 细胞的增殖和迁移功能。

2.2 LncRNA n336928 在 GEP-NETs 中调控细胞周期和凋亡

流式细胞检测显示，当 n336928 水平敲低时，QGP-1 细胞周期主要阻滞在 G1 期(图 4，A)。同时，当下调 n336928 表达时，QGP-1 细胞的凋亡水平增加，增殖水平降低 (图 4，B)。Western blot 检测细胞周期相关蛋白(Cyclin D1)和凋亡相关蛋白(Caspase 3)的表达(图 4，C)，结果显示当 n336928 减少时，细胞周期相关蛋白下降，同时细胞凋亡相关蛋白增加。

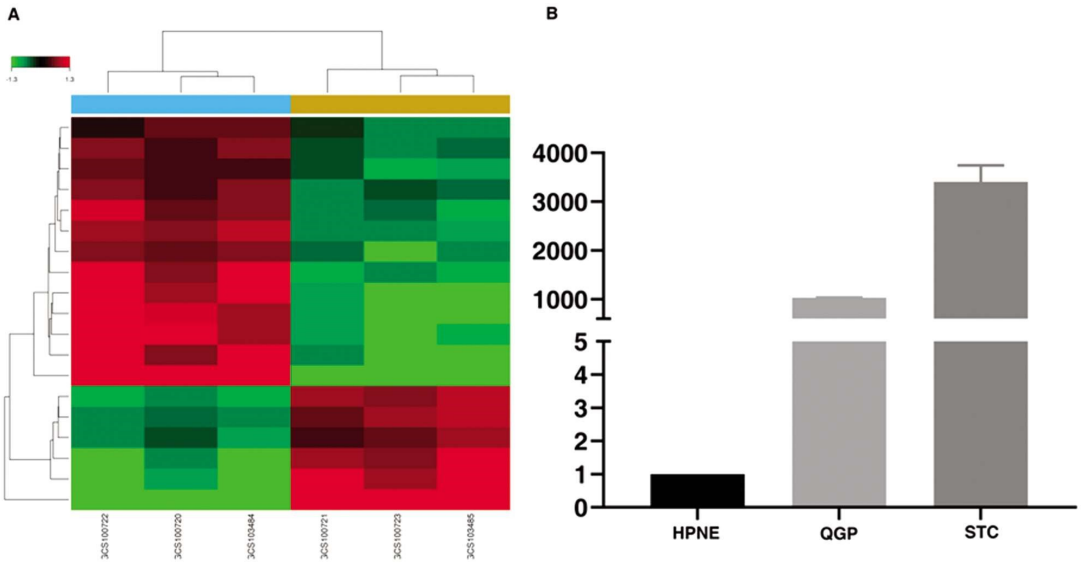

图 1 测序结果及表达差异

Fig.1 The results of sequence and expression difference

Note: A.Sequencing results of neuroendocrine tumors; B.LncRNA n336928 was expressed differently in HPNE, QGP-1 and STC-1.

2.3 LncRNA n336928 通过影响 p21 调控 GEP-NETs 的肿瘤发生

由于流式细胞检测显示，当 lncRNA n336928 水平敲低时，QGP-1 细胞周期主要阻滞在 G1 期，这使我们有理由猜想 lncRNA n336928 的下游靶点也可能与细胞周期有一定的关联。

然后我们确定尝试确定 lncRNA n336928 的下游靶点。如前所述，周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (CKIs)(p15,p16,p19,p21,p27 等)在各种癌症中起抑癌作用，而 CKI 基因启动子区域的异常甲基化与基因沉默和表达下调有关[12]。我们使用 qRT-PCR 检测一系列 CKIs 的表达，包括 p21, p27，p57 和 p15(图 5，A)，其中 p21 引起我们的注意，因为它在 lncRNA n336928 减少后表达量上调且最高（图 5，B）。Western blot 实验也证实当 lncRNA n336928 被敲除后，细胞周期调节基因 p21 在 QGP-1 中的表达明显上调(图 5，B)。这些数据表明 lncRNA n336928 通过抑制 p21 来促进 GEP-NETs 细胞的增殖。为了进一步证实 p21 参与了 lncRNA n336928 诱导的细胞增殖，我们进行了回复实验(图 5，D-F)。LncRNA n336928 小干扰和 p21 小干扰共转染可部分逆转 n336928 下调引起的细胞增殖和迁移下降，这进一步说明 n336928 可通过抑制 p21 促进细胞增殖和迁移。

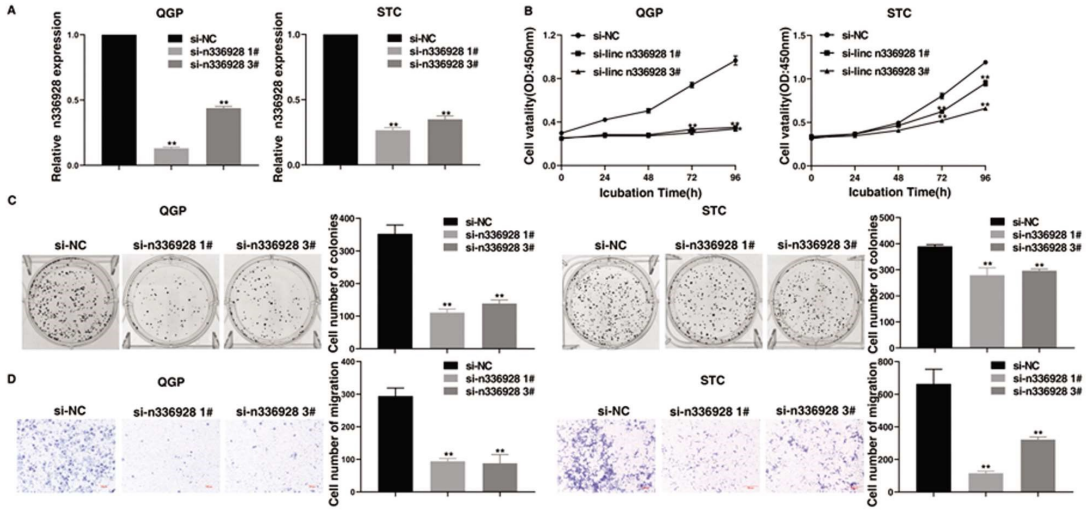

图 2 LncRNA n336928 对 GEP-NETs 细胞增殖和迁移的影响

Fig.2 Effects of n336928 on GEP-NETs cell proliferation and migration

Note: A.Knockdown efficiency of QGP and STC cell lines; B-D.CCK8 assay, colony assay and transwell assay between control and si-n336928 group.

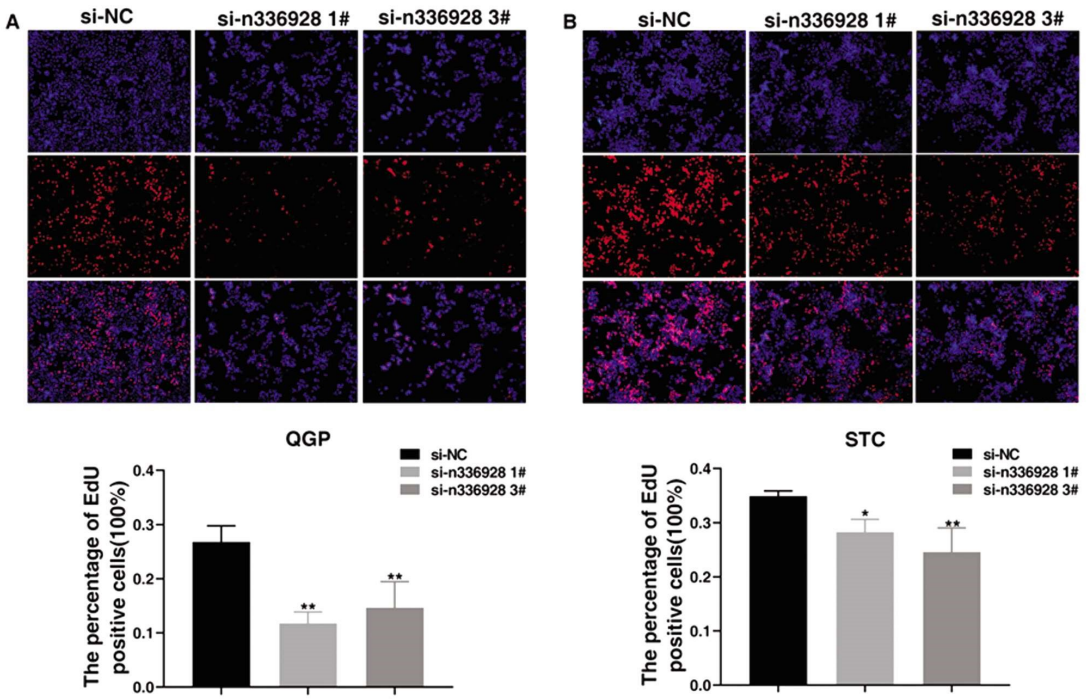

图 3 LncRNA n336928 对 GEP-NETs 细胞增殖的影响

Fig.3 Effects of lncRNA n336928 on GEP-NETs cell proliferation

Note: A-B. EdU assay between control and si-n336928 group.

2.4 LncRNA n336928 通过与 EZH2 结合，表观遗传抑制 p21 的表达，从而促进 GEP-NETs 的肿瘤发生

先前的研究表明，大约 20%的人类 lncRNA 可以与多梳抑制复合体 2 (PRC2) 关联，这表明 lncRNA 可能具有通过将 PRC2 招募到其靶基因的作用[13]。PRC2 是一种甲基转移酶，由 EZH2、SUZ12 和 EED16 组成 [14]。我们利用生物信息学网站 (http://bioinfo.bjmu.edu.cn/lncpro/) 分别预测 lncRNA n336928 和 PRC2 (EZH2、SUZ12 和 EED)的结合得分，结果显示得分最高的是 EZH2(图 6，A)。我们用 RIP 实验证明这个预测(图 6，B)，即在 QGP-1 细胞中，使用 EZH2 抗体比用 IgG 抗体富集了更多的 n336928(约 30 倍)。此外，我们用 EZH2 小干扰转染了 QGP-1(图 6，C)，之后的 western blot 和 qRT-PCR 均显示 p21 的表达随着 EZH2 的减少而增加(图 6，D)。

为了验证 lncRNA n336928 是否通过将 EZH2 招募到 p21 的启动子来抑制转录，我们在 QGP-1 细胞中进行了染色质免疫沉淀(ChIP)检测(图 6，E)。结果表明，与转染阴性对照相比，n336928 下调降低了 p21 启动子中 EZH2 和 H3K27me3 的结合水平。这些数据表明，lncRNA n336928 可以将 EZH2 结合到

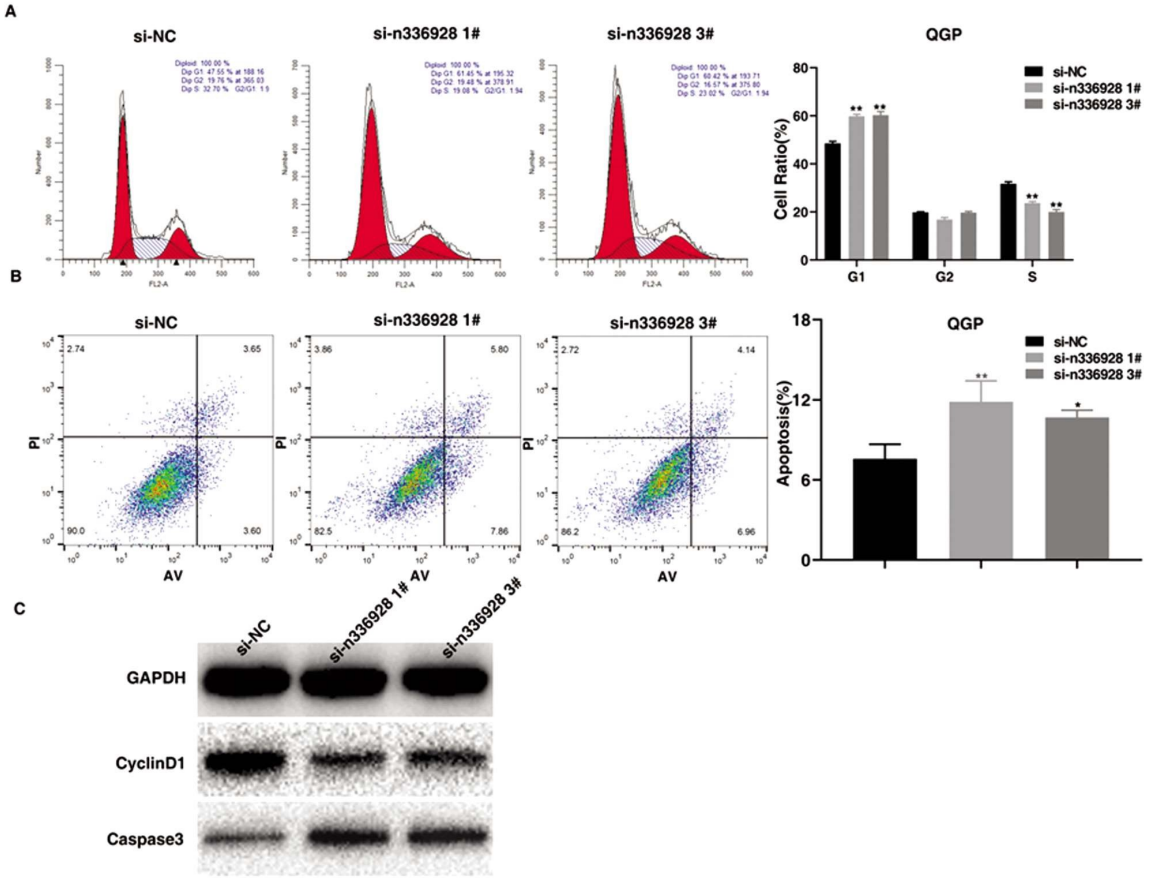

图 4 LncRNA n336928 对 GEP-NETs 细胞细胞周期和凋亡的影响

Fig.4 Effects of LncRNA n336928 on GEP-NETs cell cell cycle and apoptosis

Note: A-B.Cell cycle and apoptosis assay in both control and si-n336928 group;C.Western blot was used to detect expression of cycle-related proteins (Cyclin D1) and apoptosis-related protein (Caspase 3) in both control and si-n336928 group.

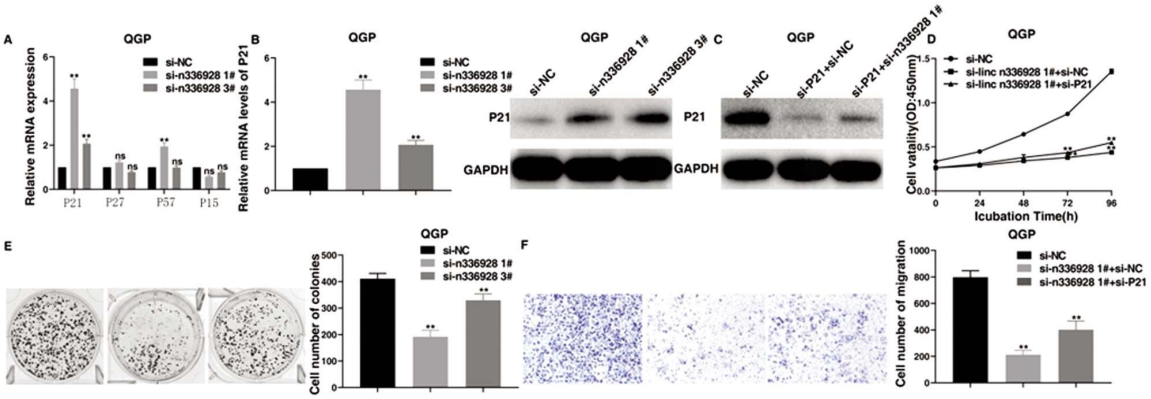

图 5 LncRNA n336928 通过抑制 P21 的表达促进 GEP-NETs 的增殖和迁移的体外实验

Fig.5 LncRNA n336928 promotes GEP-NETs proliferation and migration by inhibiting p21 expression in vitro.

Note: A.The altered mRNA levels of genes were selectively confirmed by qRT-PCR in knockdown of n336928; B.Western blot and qRT-PCR were usd to detect expression of p21 in QGP-1 with transfected with negative control or n336928 siRNAs; C-F.Rescue experiments.

p21 启动子上，并通过组蛋白 H3 在赖氨酸 27 残基的三甲基化(H3K27me3)引起对 p21 表观遗传的抑制，从而抑制 GEP-NETs 的肿瘤发生。

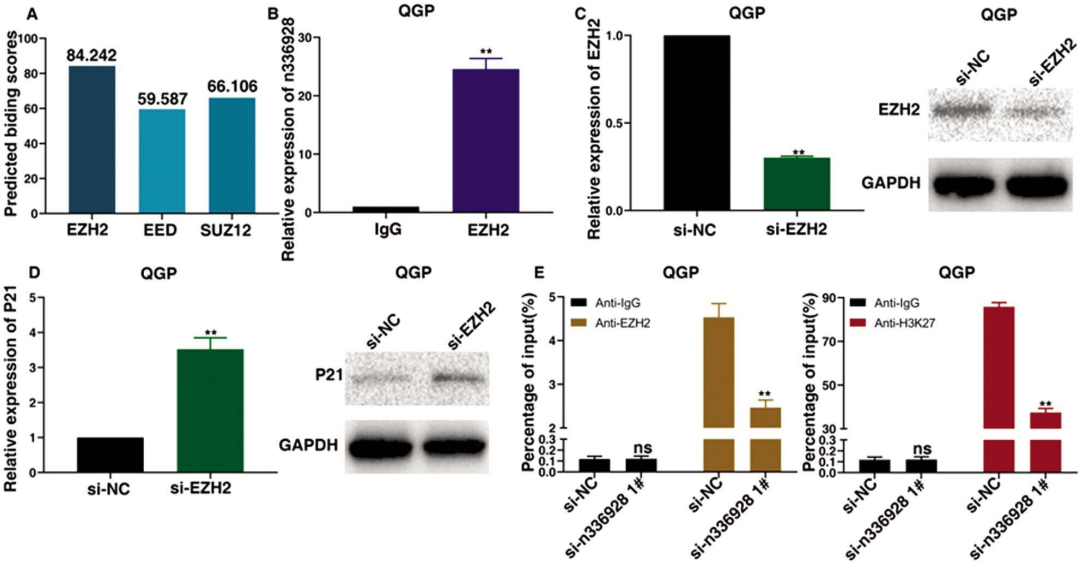

图 6 LncRNA n336928 通过结合 EZH2 引起对 p21 表观遗传的抑制，从而抑制 GEP-NETs 的肿瘤发生

Fig.6 LncRNA n336928 inhibits the tumorigenesis of GEP-NETs by binding EZH2 to induce epigenetic inhibition of P21 in vitro

Note: A.We used bioinformatics (http://bioinfo.bjmu.edu.cn/lncpro/) to predict their binding scores between n336928 and PRC2 (EZH2, SUZ12and EED) possibility respectively; B. RIP experiment was used to confirm n336928 biding to EZH2; C.Knockdown efficiency of EZH2; D.Western blot and qRT-PCR were usd to detect expression of p21 in QGP-1 with transfected with EZH2 siRNAs; F.ChIP of H3K27me and EZH2 in the p21 promoter regions after siRNA treatment targeting si-NC or si-n336928 in QGP-1.

3 讨论

近年来，在哺乳动物基因组中发现了数千个 lncRNA[15,13]，而越来越清楚的一点是 lncRNA 的异常表达在 GEP-NETs 的癌变中发挥了关键作用[10]。许多 lncRNA 具有多种生物学功能，如影响细胞增殖、凋亡、周期阻滞、细胞迁移和侵袭等[16-19]。近期的基因测序表明，lncRNA n336928 在胃肠胰神经内分泌肿瘤组织中特异性增高，同时经过我们的 qRT-PCR 验证，此非编码 RNA 在神经内分泌肿瘤细胞系 QGP-1 及 STC-1 中的表达也很高。所以我们有理由相信 lncRNA n336928 可能在 GEP-NETs 的发生发展中发挥重要作用。这篇文章中，我们的研究结果表明 lncRNA n336928 可能通过加速细胞周期进程和抑制细胞凋亡来促进细胞增殖和迁移。

由于流式细胞检测显示，lncRNA n336928 敲低后 QGP-1 细胞的周期在主要阻滞在 G1/S 期，这致使我们考虑到 GEP-NETs 的进展可能会受到周期蛋白依赖性激酶抑制剂(CKIs)的影响。P21 作为 CKI 家族中最重要的成员之一[20,21]，在肿瘤中经常出现其导致的 G1/S 过度的失调[21,22]。来自生物化学和遗传学研究的大量证据表明，p21 作为多种肿瘤抑制通路的主分子，促进癌细胞的抗增殖活性[23,24]。在我们的研究中，我们首次发现下调 p21 可以抑制 GEP-NETs 中由于 lncRNA n336928 减少引起的细胞增殖和迁移的降低。即 lncRNA n336928 通过影响 p21 部分影响 GEP-NETs 细胞的进程。

EZSTE 同源基因增强子 2 (Enhancer of zeste homolog2, EZH2)是多梳基因(PRC2)群中的一员，是一个核心的表观遗传调控因子，在细胞周期调控中发挥着关键作用，它也可以通过改变组蛋白 H3 在赖氨酸 27 残基的三甲基化(H3K27me)和沉默转录来影响癌症进展[25,26]。已有多篇报道提及 lncRNA 可通过与 EZH2 相互作用影响下游基因表达[27]，且 EZH2 常在前列腺癌[28]、乳腺癌[29]、肝细胞癌[30]和小细胞肺癌[31]等多种肿瘤中过表达。例如，LncRNA AFAP1-AS1 被报道通过与 EZH2 结合并抑制 p21 调控 NSCLC 的增殖[13]。此次研究第一次采用 RIP 法验证 lncRNA n336928 在 GEP-NETs 细胞 QGP-1 中能够与 EZH2 结合。此外在我们的研究中，qRT-PCR 数据和 western blot 结果均显示，当 EZH2 基因下调后，p21 表达显著上调，证明了 EZH2 在 P21 基因组中存在结合位点。最后，ChIP 实验验证了 lncRNA n336928 基因的敲除后导致 H3K27 三甲基化的缺失以及与 p21 基因组位点的结合的 EZH2 水平下降。这些结果有力地证明了 p21 是 lncRNA n336928/ EZH2 调控基因的真正靶点。

总之，我们的结果首次表明在 GEP-NETs 细胞中，EZH2 是 lncRNA n336928 的结合蛋白。此外，lncRNA n336928/EZH2 轴通过降低 p21 的表达，在 GEP-NETs 细胞的增殖、迁移、细胞周期和凋亡中发挥重要作用。所以，lncRNA n336928 可能代表了一种新的 GEP-NETs 早期诊断标志物，也可能会发展成为 GEP-NETs 患者临床诊治的一种有效的策略。

但是由于 GET-NETs 本身就是罕见疾病，虽近年来发病率有所上升，但可供研究的数据库以及临床病例和标本尚且不足，为了进一步发掘 lncRNA n336928 在 GEP-NETs 中的临床应用潜力，我们需要收集和追踪更多临床患者的相关数据，以提供更确凿的证据，并进行更深入的研究。

参 考 文 献(References)

[1] Xu Z, Wang L, Dai S, et al. Epidemiologic Trends of and Factors Associated with Overall Survival for Patients with

Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors in the United States [J]. JAMA Netw Open, 2021, 4(9): e2124750

[2] Lopez-Aguiar A G, Postlewait L M, Ethun C G, et al. STAT3 Inhibition for Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: Potential for a New Therapeutic Target? [J]. J Gastrointest Surg, 2020, 24 (5): 1138-1148

[3] Cives M, Strosberg J R. Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 471-87

[4] Laing E, Kiss N, Michael M, et al. Nutritional Complications and the Management of Patients with Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors[J]. Neuroendocrinology, 2020, 110(5): 430-442

[5] Scoville S D, Cloyd J M, Pawlik T M. New and emerging systemic therapy options for well-differentiated gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors [J]. Expert Opin Pharmacother, 2020, 21(2): 183-191

[6] Li L, Ma T, Ma Y, et al. LncRNA HCG18 contributes to nasopharyngeal carcinoma development by modulating miR-140/CCND1 and Hedgehog signaling pathway [J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23 (23): 10387-10399

[7] Jathar S, Kumar V, Srivastava J, et al. Technological Developments in lncRNA Biology[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1008(1008): 283-323

[8] Wilusz J E, Sunwoo H, Spector D L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world [J]. Genes Dev, 2009, 23 (13): 1494-504

[9] Kong R, Zhang E B, Yin D D, et al. Long noncoding RNA PVT1 indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes cell proliferation through epigenetically regulating p15 and p16 [J]. Mol Cancer, 2015, 14(14): 82

[10] Di Mauro A, Scognamiglio G, Aquino G, et al. Aberrant Expression of Long Non Coding RNA HOTAIR and De-Regulation of the Paralogous 13 HOX Genes Are Strongly Associated with Aggressive Behavior of Gastro-Entero-Pancreatic Neuroendocrine Tumors[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 7049

[11] Chen T, Xie W, Xie L, et al. Expression of long noncoding RNA lncRNA-n336928 is correlated with tumor stage and grade and overall survival in bladder cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 468(4): 666-670

[12] Daa T, Kashima K, Kondo Y, et al. Aberrant methylation in promoter regions of cyclin-dependent kinase inhibitor genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland[J]. APMIS, 2008, 116(1): 21-26

[13] Yin D, Lu X, Su J, 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]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 92

[14] Cao R, Wang L, Wang H, et al. Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing [J]. Science, 2002, 298 (5595): 1039-1043

[15] Hu Y, Xu J, Fang J Y. Long Noncoding RNA GAPLINC Regulates CD44-dependent Cell Invasiveness and Associates with Poor Prognosis of Gastric Cancer [J]. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2015, 13(7): e100-e1

[16] Li W, Pan T, Jiang W, et al. HCG18/miR-34a-5p/HMMR axis accelerates the progression of lung adenocarcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129(129): 110217

[17] Liu Y, Lin W, Dong Y, 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

[18] Ma P, Li L, Liu F, et al. HNF1A-Induced lncRNA HCG18 Facilitates Gastric Cancer Progression by Upregulating DNAJB12 via miR-152-3p [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13(1): 7641-7652

[19] Zou Y, Sun Z, Sun S. LncRNA HCG18 contributes to the progression of hepatocellular carcinoma via miR-214-3p/CENPM axis [J]. J Biochem, 2020, 168(5): 535-546

[20] Sherr C J, Roberts J M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases [J]. Genes and Development, 1995, 9(10): 1149-1163

[21] Gartel A L, Radhakrishnan S K. Lost in Transcription: p21 Repression, Mechanisms, and Consequences [J]. Cancer Research 2005, 65(10): 3980-3985

[22] Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The Prognostic Significance of Altered Cyclin-de-pendent Kinase Inhibitors in Human Cancer [J]. Annual Review of Medicine, 1999, 50(50): 401-423

[23] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(6): 400-414

[24] Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer [J]. Nature Publishing Group, 2004, 432(7015): 298-306

[25] Faviana P, Marconcini R, Ricci S, et al. EZH2 Expression in Intestinal Neuroendocrine Tumors [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2018, 27(9): 689-693

[26] Chen W, Huang M, Sun D, et al. Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes tumor cell cycle progression by binding to EZH2 and repressing p15 and p21 in gastric cancer [J]. Oncotarget, 2015, 7(9): 9773-9787

[27] Liu J Q, Feng Y H, Zeng S, et al. linc01088 promotes cell proliferation by scaffolding EZH2 and repressing p21 in human non-small cell lung cancer[J]. Life Sci, 2020, 241(1): 117134

[28] Cebria F, Kobayashi C, Umesono Y, et al. FGFR-related gene nou-darake restricts brain tissues to the head region of planarians [J]. Nature, 2002, 419(6907): 620-624

[29] Kleer C, Cao Q, Varambally S, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells[J]. PNAS, 2003, 100(20): 11606-11611

[30] Sudo T, Utsunomity T, Mimori K, et al. Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer, 2005, 92(9): 1754-1758

[31] Poulsen T T, Pedersen N, Juel H, et al. A chimeric fusion of the hASH1 and EZH2 promoters mediates high and specific reporter and suicide gene expression and cytotoxicity in small cell lung cancer cells [J]. Cancer Gene Ther, 2008, 15(9): 563-575