doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.02.009

下调 lncRNA MCF2L-AS1 靶向 miR-33b-5p 抑制胃癌细胞增殖、 迁移、侵袭并促进凋亡*

常帅1索丹2赵耀1李顺乐1徐心1吉鸿14

(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 MCF2L-AS1 对胃癌细胞恶性生物学行为的影响及分子机制。方法:选取45 例胃癌患者的癌组织及癌旁 正常组织,或培养胃黏膜上皮细胞GES-1、胃癌细胞HGC-27,采用RT-qPCR 检测MCF2L-AS1和miR-33b-5p的表达水平。采用 双荧光素酶报告实验检测MCF2L-AS1和miR-33b-5p的靶向关系。将HGC-27细胞分为si-NC组、si-MCF2L-AS1组、mimic NC 组、miR-33b-5pmimic组、si-MCF2L-AS1+inhibitorNC组、si-MCF2L-AS1+miR-33b-5pinhibitor组,分别转染si-NC、 si-MCF2L-AS1、mimic NC、miR-33b-5pmimic或共转染si-MCF2L-AS1+inhibitorNC、si-MCF2L-AS1+miR-33b-5pinhibitor。采用 MTT实验检测细胞增殖情况,流式细胞术检测细胞凋亡率,克隆形成实验检测细胞克隆形成数,Transwell实验检测迁移和侵袭 细胞数。结果:与癌旁正常组织或GES-1 细胞相比,胃癌组织或HGC-27 细胞中MCF2L-AS1表达水平升高、miR-33b-5p表达水 平降低,差异均有统计学意义(P<0.05)。MCF2L-AS1可靶向调控miR-33b-5p。下调MCF2L-AS1或过表达miR-33b-5p表达水 平降低,差异均有统计学意义(P<0.05)。MCF2L-AS1可靶向调控miR-33b-5p。下调MCF2L-AS1或过表达miR-33b-5p,前制胃癌细胞 miR-33b-5p可减弱下调MCF2L-AS1对HGC-27 细胞的生物学作用。结论:下调MCF2L-AS1通过上调miR-33b-5p抑制胃癌细胞 增殖、迁移、侵袭并促进凋亡;MCF2L-AS1通过靶向调控miR-33b-5p表达进而参与胃癌细胞的恶性生物学行为。

关键词:MCF2L-AS1;miR-33b-5p;胃癌;增殖;迁移;侵袭;凋亡

中图分类号:R-33;R735.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)02-251-07

Downregulation of lncRNA MCF2L-AS1 Targeting miR-33b-5p Inhibits Gastric Cancer Cell Proliferation, Migration and Invasion, and Promotes Apoptosis*

CHANG Shuai¹, SUO Dan², ZHAO Yao¹, LI Shun-le¹, XU Xin¹, JI Hong¹

(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 investigate the effect of lncRNA MCF2L-AS1 on the malignant biological behavior of gastric cancer cells and its molecular mechanism. Methods: The expression levels of MCF2L-AS1 and miR-33b-5p in cancer tissues and paracancerous tissues of 45 patients with gastric cancer, or in cultured gastric mucosal epithelial cells GES-1 and gastric cancer cells HGC-27 were detected by RT-qPCR. The targeting relationship between MCF2L-AS1 and miR-33b-5p was detected by dual luciferase reporter assay. HGC-27 cells were divided into si-NC group, si-MCF2L-AS1 group, mimic NC group, miR-33b-5p mimic group, si-MCF2L-AS1+inhibitor NC group, si-MCF2L-AS1+miR-33b-5p inhibitor group, respectively transfected with si-NC, si-MCF2L-AS1, mimic NC, miR-33b-5p mimic or co-transfected with si-MCF2L-AS1+inhibitor NC, si-MCF2L-AS1+miR-33b-5p inhibitor. MTT assay was used to detect the cell proliferation, flow cytometry was used to detect the apoptosis rate, clone formation assay was used to detect the number of cell clones, and Transwell assay was used to detect the number of migration and invasion cells. Results: The expression level of MCF2L-AS1 was increased and the expression level of miR-33b-5p was decreased in gastric cancer tissues or HGC-27 cells compared with paracancerous tissues or GES-1 cells (P<0.05). MCF2L-AS1 can target and regulate miR-33b-5p. Downregulation of MCF2L-AS1 or overexpression of miR-33b-5p could increase the expression level of miR-33b-5p, increase the apoptosis rate but decrease the cell proliferation, clone formation number, migration and invasion number of HGC-27 cells, with statistical significance (P<0.05). Inhibition of miR-33b-5p could attenuate the biological effect of downregulating MCF2L-AS1 on HGC-27 cells. Conclusions: Downregulation of MCF2L-AS1 inhibits the proliferation, migration and invasion and promotes apoptosis of gastric cancer cells by upregulating miR-33b-5p; MCF2L-AS1 participates in the malignant biological behavior of gastric cancer cells by targeting the expression of miR-33b-5p.

Key words: MCF2L-AS1; miR-33b-5p; Gastric cancer; Proliferation; Migration; Invasion; Apoptosis Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 Document code: A Article ID: 1673-6273(2023)02-251-07

^{*}基金项目:陕西省自然科学基础研究计划项目(2019JQ-967)

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

[△] 通讯作者:吉鸿(1968-),男,硕士,主任医师,E-mail: jehoung@163.com

⁽收稿日期:2022-04-28 接受日期:2022-05-23)

前言

胃癌是全世界癌症相关发病率和死亡率的主要原因。全球 范围内,每年新确诊病例超过100万,而死亡人数则达数千人; 在中国,其发病率和死亡率也仅次于肺癌,严重威胁了人类的 健康安全^[12]。由于胃癌的早期诊断率较低,因此较多患者在确 诊时已错过了最佳治疗时机。伴随分子靶向治疗的进展,其与 化疗药物的联合方案不断扩大了晚期胃癌患者的治疗选择,不 仅为患者的生存带来获益,也提高了后者的生存预期。所以,研 究胃癌的基因组和表观基因异质性,有助于确定新的特异性和 敏感性靶点进而开发新的靶向治疗药物,对胃癌患者具有重要 的意义。

微小 RNA(miRNAs)作为非编码 RNA,在基因表达调控 中发挥了重要的作用,可以抑制或减少靶基因的表达。miRNAs 可以调节癌基因的表达继而发挥抑癌作用,也可以调节肿瘤抑 制基因进而发挥癌基因的作用,而且其在体液中也具有较高的 稳定性,因此,miRNAs 不仅可以作为胃癌的生物标志物,也可 能成为胃癌的治疗靶点^[34]。研究报道,miR-33b-5p 在胃癌细胞 系中低表达,上调 miR-33b-5p 可抑制胃癌细胞增殖和 EMT, 并可增加胃癌细胞对化疗药物的敏感性^[56]。然而 miR-33b-5p 对胃癌细胞恶性生物学行为的上游调控机制尚不清楚。

长链非编码 RNA(lncRNA)可通过调控 miRNA-mRNA 调 控网络进而影响胃癌的发生和进展,研究它们之间的关系,可 为胃癌的早期诊断和治疗提供新见解^[7]。通过生物信息学分析 软件进行预测发现,miR-33b-5p 与 lncRNA MCF2L 反义 RNA 1(MCF2L antisense RNA 1,MCF2L-AS1)存在结合位点。研究 报道,MCF2L-AS1 在结直肠癌中高表达,敲低 MCF2L-AS1 明显 抑制了结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡^[8]。 然而 MCF2L-AS1 对胃癌细胞的生物学行为的影响尚不清楚。 因此,本实验旨在研究 MCF2L-AS1 对胃癌细胞恶性生物学行 为的影响,并验证其对 miR-33b-5p 的调控作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取本院 2020 年 5 月至 2021 年 1 月 45 例胃癌患者的癌 组织及癌旁正常组织(距癌组织≥5 cm)。所有患者均经病理检 测确诊,手术前未进行放化疗。所有患者均同意且签署知情同 意书。

1.2 细胞与主要试剂

胃黏膜上皮细胞 GES-1、胃癌细胞 HGC-27 购自上海通派 生物;RPMI-1640 培养基为美国 Gibco 产品;Trizol 试剂、Lipofectamine 2000 为美国 Invitrogen 产品;逆转录或荧光定量 PCR 试剂盒为北京天根生化公司产品;MTT 试剂盒、Transwell 小 室、Matrigel 为北京索莱宝公司产品;调亡检测试剂盒为上海经 科化学科技有限公司产品;MCF2L-AS1 干扰表达载体 (si-MCF2L-AS1)及阴性对照 (si-NC)、miR-33b-5p 模拟物 (miR-33b-5p mimic)及阴性对照(mimic NC)、miR-33b-5p 抑制 剂(miR-33b-5p inhibitor)及阴性对照(inhibitor NC)为广州锐博 生物产品。

1.3 细胞处理与分组

胃黏膜上皮细胞 GES-1、胃癌细胞 HGC-27 采用 RP-MI-1640 培养基进行培养。取对数生长期 HGC-27 细胞,按照 Lipofectamine 2000 说明书, 分别将 si-MCF2L-AS1、si-NC、 miR-33b-5p mimic、mimic NC 转染至 HGC-27 细胞(密度 1× 10⁴ 个/mL), 并记为 si-MCF2L-AS1 组、si-NC 组、miR-33b-5p mimic 组、mimic NC 组; 另外分别将 si-MCF2L-AS1 与 miR-33b-5p inhibitor 或 inhibitor NC 共转染至 HGC-27 细胞, 并记为 si-MCF2L-AS1+miR-33b-5p inhibitor 组或 si-MCF2L-AS1+inhibitor NC 组。转染 6 h 后更换培养基继续培养 48 h。 1.4 RT-qPCR 检测 MCF2L-AS1 和 miR-33b-5p 表达水平

分别提取胃癌组织、癌旁正常组织、GES-1 细胞及各组 HGC-27 细胞的总 RNA,反转录成 cDNA,按照荧光定量 PCR 试剂盒说明进行 PCR,相对表达量用 2^{-a,a} 法计算。以 GAPDH 或 U6 为 内 参 。 MCF2L-AS1 上 游 引 物 序 列 为 5'-TCCAGCTCGTGTCTATGCAG-3',下游引物序列为 5'-CT-GCTTCTGCCTCAGCTTCT-3';GAPDH 上 游 引 物 序 列 为 5'-TGTTCGTCATGGGTGTGAAC-3',下游引物序列为 5'-ATG-GCATGGACTGTGGTCAT-3';miR-33b-5p 上 游 引 物 序 列 为 5'-ACACTCCAGCTGGGGTGCATTGCTGTTGCA-3',下游引 物序列为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6 上游引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下 游 引 物 序 列 为 5'-AACGCTTCAGGAATTTGCGT-3'。

1.5 MTT 实验检测细胞增殖

各组 HGC-27 细胞培养 48 h,每孔(细胞密度 1× 10⁴ 个/mL) 加入 MTT 溶液 20 μL,孵育 4 h 后弃去上清液。每孔加入二甲 基亚砜(DMSO)150 μL,振荡反应 10 min,检测波长 490 nm 处 吸光度(OD)值。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

各组 HGC-27 细胞培养 48 h 后用预冷的 PBS 漂洗 2 次, 加入结合缓冲液重悬, 然后分别加入 10 μL 的 Annexin V-FITC 和的 PI, 混匀后避光孵育 10 min, 随后上流式细胞仪检测细胞 凋亡。

1.7 克隆形成实验检测细胞克隆形成数

各组 HGC-27 细胞分别以每孔 100 个细胞接种于 6 孔板, 培养 2 周后 PBS 漂洗 2 遍,4%多聚甲醛固定 30 min,0.5%结晶 紫染色 15 min,光学显微镜下计数 >50 个细胞的集落。

1.8 Transwell 检测迁移和侵袭细胞数

迁移:在 Transwell 小室上室加 100 μL 细胞悬液(密度 1×10⁴ 个/mL),下室加 500 μL 含血清培养液,37℃培养 24 h,取出培养板,0.5%结晶紫染色 15 min,PBS 漂洗 2 遍,棉签擦拭 掉上层未穿过基底膜的细胞,光学显微镜(× 200)下随机选择 5 个视野,计数。侵袭:用 Matrigel 包被 Transwell 上室 5 h,其余 与迁移实验操作相同。

1.9 双荧光素酶报告实验检测 MCF2L-AS1 和 miR-33b-5p 的 靶向关系

将 MCF2L-AS1 野生型(WT-MCF2L-AS1)和突变型荧光 素酶载体(MUT-MCF2L-AS1)分别与 miR-NC 和 miR-33b-5p 共转染至 HGC-27 细胞,48 h 后按照试剂盒说明检测荧光素酶 活性。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,本研究相关数据均 为计量资料,且符合正态分布,用均数标准差(x±s)表示,癌旁 组织与胃癌组织基因表达情况采用配对 t 检验比较,余采用成 组t或t'检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 MCF2L-AS1 和 miR-33b-5p 表达分析

与癌旁正常组织相比,胃癌组织中 MCF2L-AS1 表达水平 升高、miR-33b-5p 表达水平降低,差异有统计学意义(P<0.05)。 见图1。





达水平升高、miR-33b-5p 表达水平降低, 差异有统计学意义 (P<0.05)。见图 2。



Note: Compared with GES-1 cells, *P<0.05.

2.3 下调 MCF2L-AS1 对 HGC-27 细胞的影响

与 si-NC 组相比, si-MCF2L-AS1 组 MCF2L-AS1 表达水平 降低、miR-33b-5p 表达水平升高,HGC-27 细胞凋亡升高,而细 胞增殖、克隆形成数、迁移和侵袭数均减少,差异有统计学意义 (P<0.05)。见图 3、表 1。

2.4 MCF2L-AS1 靶向 miR-33b-5p

Starbase 预测显示 MCF2L-AS1 和 miR-33b-5p 有互补序 列,见图4。

miR-33b-5p 与 WT-MCF2L-AS1 共转染后细胞荧光素酶 MUT-MCF2L-AS1 共转染后细胞荧光素酶活性无显著变化 活 性 降 低 , 差 异 有 统 计 学 意 义 (*P*<0.05), 但 与 (*P*>0.05), 见表 2。



图 3 下调 MCF2L-AS1 促进 HGC-27 凋亡但抑制迁移和侵袭 Fig. 3 Downregulation of MCF2L-AS1 promotes HGC-27 apoptosis but inhibits migration and invasion A:凋亡;B:迁移;C:侵袭

A: Apoptosis; B: Migration; C: Invasion

表 1 下调 MCF2L-AS1 对 HGC-27 增殖、凋亡、克隆、迁移、侵袭的影响(n=9)

Table 1 Effect of MCF2L-AS1 downregulation on proliferation, apoptosis, cloning, migration and invasion of HGC-27(n=9)

Groups	MCF2L-AS1	miR-33b-5p	Proliferation	Apoptosis	Cloning	Migration	Invasion
si-NC	1.00± 0.07	0.98 ± 0.07	1.13± 0.07	7.50± 0.95	116.80± 5.77	174.89± 9.38	139.74± 6.11
si-MCF2L-AS1	0.26± 0.03*	3.03± 0.25*	$0.49 \pm 0.08 *$	23.30± 1.33*	54.34± 2.27*	76.46± 4.06*	62.39± 3.54*
t	15.582	-12.085	18.541	-28.900	16.545	16.967	32.856
Р	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

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

WT-MCF2L-AS1	5'	ggcAUUUGGCAACAAUGCAc 	3'
miR-33b-5p	3'	cguUACGUUGUCGUUACGUg	5'

MUT-MCF2L-AS1 5' ggcAUUUGGCAAGCGAAAGG 3'

图 4 MCF2L-AS1 和 miR-33b-5p 的互补序列

Fig. 4 Complementary sequences of MCF2L-AS1 and miR-33b-5p

— 表 ∠ 双灾光索暇指告头验(n=>

Table 2 Double luciferase report experiment(n=9)

Groups	WT-MCF2L-AS1	MUT-MCF2L-AS1
miR-NC	1.00± 0.12	1.03± 0.11
miR-33b-5p	0.37± 0.04*	0.96± 0.13
t	9.689	1.114
Р	<0.001	0.282

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

2.5 miR-33b-5p 对 HGC-27 细胞的影响

与 mimic NC 组相比, miR-33b-5p mimic 组 miR-33b-5p 表

达水平升高,HGC-27细胞凋亡升高,而细胞增殖、克隆形成数、 迁移和侵袭数均减少,差异有统计学意义(P<0.05)。见图 5、表3。



图 5 miR-33b-5p 促进 HGC-27 凋亡但抑制迁移和侵袭 Fig. 5 miR-33b-5p promotes HGC-27 apoptosis but inhibits migration and invasion

A:凋亡;B:迁移;C:侵袭

A: Apoptosis; B: Migration; C: Invasion

表 3	miR-33b-5p 🛪	HGC-27	增殖、凋亡	、克隆、迁移	、侵袭的影响(n=9)
-----	--------------	--------	-------	--------	---------	------

Table 3 Effect of miR-33b-5p on proliferation, apoptosis, cloning, migration and invasion of HGC-27(n=9)

Groups	miR-33b-5p	Proliferation	Apoptosis	Cloning	Migration	Invasion
mimic NC	1.02± 0.11	1.15± 0.07	7.39± 0.85	113.01± 6.58	173.60± 9.05	145.00± 7.20
miR-33b-5p mimic	2.38± 0.15*	0.63± 0.09*	19.06± 1.34*	63.89± 4.15*	89.73± 4.73*	79.19± 4.15*
t	-22.451	14.208	-22.097	18.942	24.629	23.764
Р	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Note: Compared with mimic NC group, *P<0.05.

2.6 抑制 miR-33b-5p 对下调 MCF2L-AS1 处理的 HGC-27 的 影响 miR-33b-5p inhibitor 组 miR-33b-5p 表达水平降低,HGC-27 细 胞凋亡率降低,而细胞增殖、克隆形成数、迁移和侵袭数均升高,差异有统计学意义(P<0.05)。见图 6、表 4。

与 si-MCF2L-AS1+inhibitor NC 组相比, si-MCF2L-AS1+



图 6 抑制 miR-33b-5p 可减弱下调 MCF2L-AS1 对 HGC-27 凋亡的促进作用和对迁移和侵袭的抑制作用 Fig. 6 Inhibition of miR-33b-5p could attenuate the promotion of apoptosis and inhibition of migration and invasion of HGC-27 by downregulating MCF2L-AS1

A:凋亡;B:迁移;C:侵袭 A: Apoptosis; B: Migration; C: Invasion

表 4 抑制 miR-33b-5p 可减弱下调 MCF2L-AS1 对 HGC-27 增殖、凋亡、克隆、迁移、侵袭的影响(n=9)

Table 4 Inhibition of miR-33b-5p could attenuate the effect of downregulating MCF2L-AS1 on proliferation, apoptosis, cloning, migration and invasion

of HG	C-27	(n=9)	
01110	C-2/1	(n-2)	

			× ,			
Groups	miR-33b-5p	Proliferation	Apoptosis	Cloning	Migration	Invasion
si-MCF2L-AS1+in-	2 10+ 0 18	0.40+ 0.07	22.06+ 1.65	55 04+ 2 76	75 00+ 4 00	62 64+ 2 88
hibitor NC	3.10± 0.18	0.49± 0.07 22.90±	22.90± 1.05	05 55.941 2.70	/3.99± 4.99	03.041 3.88
si-MCF2L-AS1+mi	1 38+ 0 15*	0.03+ 0.08*	12 73+ 1 10*	101 64+ 4 40*	140 43+ 5 03*	117 07+ 6 37*
R-33b-5p inhibitor	1.56± 0.15	0.951 0.08	12.75± 1.10	101.041 4.49	149.451 5.95	117.07± 0.37
t	21.986	-11.905	15.489	-25.998	-28.432	-21.472
Р	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Note: Compared with si-MCF2L-AS1+inhibitor NC group, *P<0.05.

3 讨论

靶向药物治疗是胃癌的治疗方法之一,可以提高治疗效 果,是有希望的未来重要治疗方法。了解胃癌的分子机制,有助 于发现新的靶向治疗的分子靶点,而且可用以发掘更多的分子 靶向治疗联合化疗或免疫治疗胃癌的新方法,不仅有利于提高 患者的生存率、延长生存期,还可以降低化疗的毒性副作用^{19.10}。

有研究报道,肾细胞癌组织中miR-33b-5p 表达降低,过表 达miR-33b-5p可抑制肾癌细胞增殖、迁移和侵袭;miR-33b-5p 低表达与患者的不良预后有关,可以作为肾癌的肿瘤抑制调节 因子并可作为肾癌患者预后的预测生物标志物^[11]。骨肉瘤组织 中,miR-33b-5p 呈低表达,上调 miR-33b-5p 的表达水平可以抑 制肿瘤的发展,而 lncRNA HIF1A-AS2 可通过海绵 miR-33b-5p 进而调节沉默调节蛋白 6(SIRT6)信号轴,从而促进骨肉瘤细 胞存活、细胞周期进展、凋亡以及迁移、侵袭, HIF1A-AS2/miR-33b-5p/SIRT6 信号轴可能是治疗骨肉瘤的新 靶点^[12]。miR-33b-5p在肺腺癌细胞中呈低表达,上调 miR-33b-5p 表达可抑制肺腺癌细胞增殖并加速细胞凋亡; lncRNA MSC-AS1 通过海绵 miR-33b-5p, 可上调线粒体甘油 -3-磷酸酰基转移酶(GPAM)的表达水平进而促进肺腺癌细胞 增殖、抑制细胞凋亡,最终促进肺腺癌的发展[13]。miR-33b-5p在 前列腺肿瘤组织中也呈低表达,过表达 miR-33b-5p 可以抑制 前列腺癌细胞的侵袭性和进展;Cullin 蛋白家族 4B(CUL4B) 可通过表观遗传沉默 miR-33b-5p 的表达,进而上调癌基因 c-Myc 水平从而促进前列腺癌细胞的增殖和侵袭^[14]。另外, miR-33b-5p 在紫杉醇耐药的前列腺癌细胞系(PC3-TXR)中也 呈低表达,过表达 miR-33b-5p 可以增强前列腺癌细胞对紫杉 醇的敏感性; lncRNA-DANCR 通过海绵 miR-33b-5p 进而上调 乳酸脱氢酶 A(LDHA)水平,从而促进糖酵解并导致前列腺癌 进展,同时可增加前列腺癌细胞对紫杉醇的耐药性[15]。鼻咽癌 细胞中 miR-33b-5p 也呈低表达,上调 miR-33b-5p 表达可以减 低鼻咽癌细胞的增殖活性; 脂筏特征蛋白 2 (FLOT2) 抑制 miR-33b-5p 表达后可导致 c-Myc/ 胞浆支链氨基酸转氨酶 1 (BCAT1)信号轴激活,进而促进鼻咽癌细胞增殖,FLOT2/miR-33b-5p/c-Myc/BCAT1 是鼻咽癌的潜在治疗靶点^[16]。以上研究均 表明,miR-33b-5p 是一种抑癌基因,并且参与了多种肿瘤的进 展。另外,已有研究表明,miR-33b-5p 在胃癌细胞系中低表达, 上调 miR-33b-5p 可抑制胃癌细胞的生长 ^[5], 然而 miR-33b-5p 对胃癌细胞凋亡和转移的影响尚不清楚。本实验结果显示,胃 癌组织和 HGC-27 细胞中 miR-33b-5p 表达水平均降低;过表 达 miR-33b-5p 后,HGC-27 细胞凋亡升高,细胞增殖、克隆形成 数、迁移和侵袭数均减少,证实了 miR-33b-5p 在胃癌中发挥了 抑癌基因的作用,与他人的研究结果相符,说明 miR-33b-5p 或 可作为胃癌分子靶向治疗的靶点。

lncRNA 可通过调控 miRNA 影响肿瘤进展。有研究报道, LncRNA MCF2L-AS1 在肺癌组织和细胞中高表达,可通过调 节 miR-873-5p 水平进而促进非小细胞肺癌细胞出现癌症干细 胞样特征; 敲除 MCF2L-AS1 可抑制非小细胞肺癌细胞的癌症 干细胞样特性^[17]。在结直肠癌细胞中,MCF2L-AS1 呈高表达, 可促进癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化(EMT)进程,抑 制 MCF2L-AS1 表达可抑制结直肠癌细胞增殖、侵袭、迁移并 且降低侵袭相关蛋白如基质金属蛋白酶 -2(MMP-2)、MMP-9 的表达^[18]。MCF2L-AS1 可通过内源性海绵 miR-874-3p 进而调 控叉头盒转录因子 M1(FOXM1)信号轴,从而加剧结直肠癌的 发生并促进癌细胞的增殖、侵袭和糖酵解进程18,或通过抑制 miR-874-3p 表达导致细胞周期蛋白 E1(CCNE1)表达上调进而 促进结直肠癌侵袭¹⁸。MCF2L-AS1还可通过靶向调控 miR-105-5p/Rab 相关蛋白 Rab-22A(RAB22A)信号轴加重直肠 癌的恶性进展^[19];通过靶向调控 miR-105/IL-1β 信号轴调节结 直肠癌细胞对奥沙利铂的耐药性, 敲低 MCF2L-AS1 表达可缓 解结直肠癌细胞的化疗耐药性^[20]。另外, MCF2L-AS1 也参与了 肿瘤巨噬细胞的浸润过程,而该浸润情况与肿瘤进展及肿瘤突 变负荷呈正相关,与免疫治疗的免疫检查点呈负相关,并且可 用于预测接受抗程序性死亡受体 -1(PD-1)或抗细胞毒性 T 淋 巴细胞相关蛋白 4(CTLA4)抗体治疗患者的免疫治疗反应 性[21]。而抗 PD-1 抗体目前被应用于与抗 HER2 抗体及化疗药 物联合治疗不可切除或转移的 HER2 阳性胃腺癌患者,其该方 案的疗效已被认可^[22];抗 CTLA4 抗体则可提高应用抗 PD-1 抗 体的胃癌患者的临床获益 [23]。本实验结果显示,胃癌组织和 HGC-27 细胞中 MCF2L-AS1 表达水平均升高,结合上述文献 结论进一步提示,MCF2L-AS1可能在胃癌的发生或发展中发 挥了重要的促进作用。随后,为进一步研究 MCF2L-AS1 对胃 癌细胞的影响及机制,本实验通过下调 MCF2L-AS1 表达并发 现,与对照组相比,HGC-27细胞的凋亡升高,但细胞增殖、克隆 形成数、迁移和侵袭数均减少,证实 MCF2L-AS1 参与了胃癌 的发展过程,进一步提示 MCF2L-AS1 可能作为胃癌靶向治疗 的靶点或诊断、治疗的生物标志物。

当前认为,癌症的发病机制与 lncRNA、miRNA、mRNA之 间的复杂调节作用有关^[7]。研究表明,MCF2L-AS1 可通过调节 miR-33a 表达控制骨髓间充质干细胞的成骨分化^[24],但 MCF2L-AS1 与 miR-33b 在胃癌中的调节关系尚不清楚。因此, 为研究 MCF2L-AS1 和 miR-33b-5p 的关系,本实验首先通过双 荧光素酶报告基因实验证实了二者之间的靶向调控关系,随后 通过 qRT-PCR 验证了抑制 MCF2L-AS1 表达对 miR-33b-5p 表 达的上调作用,最后通过设置 Rescue 实验发现抑制 miR-33b-5p 可减弱下调 MCF2L-AS1 对 HGC-27 细胞恶性生 物学行为的抑制作用。以上实验结果充分说明,lncRNA MCF2L-AS1 可通过靶向调控 miR-33b-5p 的表达水平进而影 响胃癌的进展。

综上所述,下调 MCF2L-AS1 可通过上调 miR-33b-5p 进而 抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭并促进细胞凋亡,因此 MCF2L-AS1 和 miR-33b-5p 均可能成为胃癌分子靶向治疗的 新靶点。另外,Yang 等^[5]研究发现 miR-33b-5p 可通过调控高迁 移率族蛋白 A2(HMGA2)表达进而参与胃癌的进展,Ni 等^[5]研 究发现 miR-33b-5p 可通过调控肉碱氧位甲基转移酶(CROT) 信号轴参与大肠癌的进展,而 MCF2L-AS1 靶向 miR-33b-5p 是 否也是通过 HMGA2 或 CROT 信号轴进而发挥了对胃癌细胞 恶性生物学行为的调控作用则有待进一步研究。

参考文献(References)

- Chen Z, Li Y, Tan B, et al. Progress and current status of molecule-targeted therapy and drug resistance in gastric cancer [J]. Drugs Today (Barc), 2020, 56(7): 469-482
- [2] Pellino A, Riello E, Nappo F, et al. Targeted therapies in metastatic gastric cancer: Current knowledge and future perspectives[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(38): 5773-5788
- [3] Ghafouri-Fard S, Vafaee R, Shoorei H, et al. MicroRNAs in gastric cancer: Biomarkers and therapeutic targets [J]. Gene, 2020, 757: 144937
- [4] Azarbarzin S, Safaralizadeh R, Khojasteh MB, et al. Current perspectives on the dysregulated microRNAs in gastric cancer[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(9): 7253-7264
- [5] Yang X, Zhao Q, Yin H, et al. MiR-33b-5p sensitizes gastric cancer cells to chemotherapy drugs via inhibiting HMGA2 expression [J]. J Drug Target, 2017, 25(7): 653-660
- [6] 赵倩. miR-33b 对人胃癌细胞 EMT 与迁移侵袭的影响[D]. 湖南:南 华大学, 2017
- [7] Wang J, Ding Y, Wu Y, et al. Identification of the complex regulatory relationships related to gastric cancer from lncRNA-miRNA-mRNA network[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(1): 876-887
- [8] Huang FK, Zheng CY, Huang LK, et al. Long non-coding RNA MCF2L-AS1 promotes the aggressiveness of colorectal can cer by sponging miR-874-3p and thereby up-regulating CCNE1 [J]. J Gene Med, 2021, 23(1): e3285
- [9] Patel TH, Cecchini M. Targeted therapies in advanced gastric cancer[J]. Curr Treat Options Oncol, 2020, 21(9): 70
- [10] Cai WY, Dong ZN, Fu XT, et al. Identification of a tumor

microenvironment-relevant gene set-based prognostic signature and related therapy targets in gastric cancer [J]. Theranostics, 2020, 10 (19): 8633-8647

- [11] Huang G, Lai Y, Pan X, et al. Tumor suppressor miR-33b-5p regulates cellular function and acts a prognostic biomarker in RCC[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(7): 3346-3360
- [12] Lin H, Zhao Z, Hao Y, et al. Long noncoding RNA HIF1A-AS2 facilitates cell survival and migration by sponging miR-33b-5p to modulate SIRT6 expression in osteosarcoma [J]. Biochem Cell Biol, 2020, 98(2): 284-292
- [13] Li S, Yang S, Qiu C, et al. LncRNA MSC-AS1 facilitates lung adenocarcinoma through sponging miR-33b-5p to up-regulate GPAM [J]. Biochem Cell Biol, 2021, 99(2): 241-248
- [14] Zhao M, Qi M, Li X, et al. CUL4B/miR-33b/C-MYC axis promotes prostate cancer progression[J]. Prostate, 2019, 79(5): 480-488
- [15] Wang YY, Chen C. lncRNA-DANCR promotes taxol resistance of prostate cancer cells through modulating the miR-33b-5p-LDHA axis [J]. Dis Markers, 2022, 2022: 9516774
- [16] Liu R, Liu J, Wu P, et al. Flotillin-2 promotes cell proliferation via activating the c-Myc/BCAT1 axis by suppressing miR-33b-5p in nasopharyngeal carcinoma [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13 (6): 8078-8094
- [17] Li S, Lin L. Long noncoding RNA MCF2L-AS1 promotes the cancer stem cell-like traits in non-small cell lung cancer cells through regulating miR-873-5p level [J]. Environ Toxicol, 2021, 36 (7): 1457-1465
- [18] Zhang Z, Yang W, Li N, et al. LncRNA MCF2L-AS1 aggravates proliferation, invasion and glycolysis of colorectal cancer cells via the crosstalk with miR-874-3p/FOXM1 signaling axis[J]. Carcinogenesis, 2021, 42(2): 263-271
- [19] Kong W, Li H, Xie L, et al. LncRNA MCF2L-AS1 aggravates the malignant development of colorectal cancer via targeting miR-105-5p/RAB22A axis[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1069
- [20] Cai M, Hu W, Huang C, et al. lncRNA MCF2L-AS1/miR-105/ IL-1β axis regulates colorectal cancer cell oxaliplatin resistance [J]. Cancer Manag Res, 2021, 13: 8685-8694
- [21] Guo Y, Li G, Xu M, et al. A lncRNA signature of tumor-infiltrating macrophages is associated with prognosis and tumor immunity in lung adenocarcinoma[J]. Comput Biol Med, 2022, 148: 105655
- [22] Janjigian YY, Kawazoe A, Yañez P, et al. The KEYNOTE-811 trial of dual PD-1 and HER2 blockade in HER2-positive gastric cancer[J]. Nature, 2021, 600(7890): 727-730
- [23] Dovedi SJ, Elder MJ, Yang C, et al. Design and Efficacy of a Monovalent Bispecific PD-1/CTLA4 Antibody That Enhances CTLA4 Blockade on PD-1+ Activated T Cells [J]. Cancer Discov, 2021, 11(5): 1100-1117
- [24] Chen Q, Wang M, Wu S. The IncRNA MCF2L-AS1 controls osteogenic differentiation by regulating miR-33a[J]. Cell Cycle, 2020, 19(9): 1059-1065
- [25] Ni Y, Li C, Bo C, et al. LncRNA EGOT regulates the proliferation and apoptosis of colorectal cancer by miR-33b-5p/CROT axis [J]. Biosci Rep, 2020, 6: BSR20193893