

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.005

## LINC01018 通过 miR-297 调控胃癌 HGC-27 细胞的增殖、凋亡及放射敏感性

杨世荣, 王嵘, 李国权(青海省第五人民医院 肿瘤放疗二病区, 青海 西宁 810000)

**[摘要]** **目的:** 探讨长基因间非编码 RNA (long intergene non-coding RNA, LINC) 01018 是否通过抑制 miR-297 调控胃癌 HGC-27 细胞的增殖、凋亡及放射敏感性。**方法:** 收集于青海省第五人民医院接受手术的胃癌患者(21 例)及化疗抵抗胃癌患者(19 例)的癌组织和癌旁组织, 以 qPCR 检测胃癌组织、化疗抵抗胃癌组织和胃癌 HGC-27 细胞中 LINC01018、miR-297 的表达。双荧光素酶报告基因实验验证 LINC01018 与 miR-297 之间的靶向关系。在 HGC-27 细胞中转染 LINC01018 过表达质粒 pcDNA-LINC01018 或 miR-297 抑制剂, 或共转染 pcDNA-LINC01018 和 miR-297 模拟物, 以 qPCR 检测验证细胞转染效果。MTT 和克隆形成实验检测转染后 HGC-27 细胞的增殖活力与克隆形成能力, 流式细胞术检测转染后 HGC-27 细胞的凋亡率, 克隆形成实验检测各组转染后 HGC-27 细胞的放射敏感性, WB 实验检测细胞中 Ki67、cleaved-caspase3、pro-caspase3 蛋白的表达。**结果:** 与癌旁组织或胃正常黏膜上皮细胞 GES-1 相比, 胃癌组织、化疗抵抗胃癌组织和胃癌 HGC-27 细胞中 LINC01018 呈低表达、miR-297 呈高表达(均  $P < 0.01$ )。LINC01018 与 miR-297 存在靶向结合关系, LINC01018 负向调控 miR-297 的表达。过表达 LINC01018 或敲减 miR-297 可抑制 HGC-27 细胞的增殖活力与克隆形成能力、降低细胞存活率, 促进细胞的凋亡、下调 Ki67 和 pro-caspase3 蛋白表达水平、上调 cleaved-caspase3 蛋白表达水平、提高 HGC-27 细胞的放射敏感性(均  $P < 0.01$ )。共转染 pcDNA-LINC01018 和 miR-297 模拟物可逆转过表达 LINC01018 对 HGC-27 细胞的所有上述作用, 尤其可逆转其对 HGC-27 细胞的放射增敏作用( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** LINC01018 通过下调 miR-297 表达抑制胃癌 HGC-27 细胞增殖而促进凋亡和增强细胞的放射敏感性, 该作用与 Ki67 和 caspase3 的表达变化有关。

**[关键词]** 胃癌; HGC-27 细胞; 放射敏感性; LINC01018; miR-297; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R735.2; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)06-0583-08

## LINC01018 regulates the proliferation, apoptosis and radiosensitivity of gastric cancer HGC-27 cells through miR-297

YANG Shirong, WANG Rong, LI Guoquan (Second Ward of Cancer Radiotherapy, the Fifth People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810000, Qinghai, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate whether long intergene non-coding RNA (LINC) 01018 regulates the proliferation, apoptosis and radiosensitivity of gastric cancer HGC-27 cells by inhibiting miR-297. **Methods:** The cancer tissues and para-cancerous tissues from gastric cancer patients (21 cases) who underwent surgery or chemo-resistant gastric cancer patients (19 cases) in the Fifth People's Hospital of Qinghai Province were collected, and the expressions of LINC01018 and miR-297 in gastric cancer tissues, chemo-resistant gastric cancer tissues and gastric cancer HGC-27 cells were detected by qPCR. Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between LINC01018 and miR-297. The LINC01018 overexpression plasmid pcDNA-LINC01018, miR-297 inhibitor, or pcDNA-LINC01018+miR-297 mimic was transfected into HGC-27 cells, and the transfection efficiency was verified by qPCR. MTT and Clone formation experiment were employed to assess the proliferation viability and the clone formation ability of HGC-27 cells after transfection. The apoptosis rate of HGC-27 cells was evaluated by Flow cytometry, and the radiosensitivity of HGC-27 cells after transfection in each group was determined with Clone formation experiment. WB was used to detect the protein expressions of Ki67, cleaved-caspase3 and pro-caspase3 in the cells. **Results:** Compared with para-cancerous tissues or normal gastric mucosal epithelial GES-1 cells, the expression level of LINC01018 decreased while the expression level of miR-297 increased in gastric cancer tissues, chemo-resistant gastric cancer tissues and gastric cancer HGC-27 cells (all  $P < 0.01$ ). LINC01018 had a targeted binding

**[基金项目]** 青海省医药卫生科技项目指导性计划课题(No. 2018-Wjzdx-46)。Project supported by the Guiding Plan of Medical and Health Science and Technology Program in Qinghai Province (No. 2018-Wjzdx-46)

**[作者简介]** 杨世荣(1982—),男,副主任医师,主要从事胃癌治疗的基础和临床研究,E-mail: ysu097@163.com

**[通信作者]** 李国权(LI Guoquan, corresponding author),博士,主任医师,主要从事肿瘤放射生物学的研究,E-mail: lgqjym@163.com

relationship with miR-297, and LINC01018 negatively regulated the expression of miR-297. LINC01018 overexpression or miR-297 knockdown inhibited the proliferation viability, clone formation and cell survival of HGC-27 cells, down-regulated the protein expression level of Ki67 and pro-caspase3, but promoted the apoptosis and radiosensitivity of HGC-27 cells as well as up-regulated the expression level of cleaved-caspase3 protein (all  $P < 0.01$ ). Co-transfection of pcDNA-LINC01018 and miR-297 mimic could reverse all the above-mentioned effects of LINC01018 overexpression on HGC-27 cells, especially its radio-sensitization effect on HGC-27 cells ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** LINC01018 inhibits the proliferation of gastric cancer HGC-27 cells by down-regulating the expression of miR-297 to promote apoptosis and enhance the radiosensitivity of cells, which may be related to the expression of Ki67 and caspase3.

**[Key words]** gastric cancer; HGC-27 cell; radiosensitivity; LINC01018; miR-297; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(6): 582-589. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.005]

胃癌是全球第五的常见癌症和第三的癌症致死原因,2018年胃癌新增病例超过100万例、死亡病例约78.3万例<sup>[1]</sup>。现阶段,放射疗法是无法进行手术切除胃癌患者的主要局部控制方法,但细胞固有的放射抗性导致许多患者放射治疗失败<sup>[2]</sup>。因此,必须找到新的放射增敏剂,以增强癌细胞对放射疗法的敏感性,提高具有放射抵抗力胃癌患者的生存率。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是长度超过200个核苷酸的非蛋白质编码RNA,参与多种生物学和病理学过程,以及肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭、血管生成和免疫逃逸<sup>[3]</sup>。lncRNA在多种癌症中作为癌基因或抑癌基因发挥重要作用<sup>[4]</sup>。此外,放射前后恶性肿瘤细胞中lncRNA的异常表达可能参与了癌症的发展<sup>[5]</sup>。最近的研究<sup>[6]</sup>表明,一种基因间型的lncRNA长基因间非编码RNA(long intergene non-coding RNA, LINC)01018在胃癌组织中呈低表达,可能是胃癌患者预后的生物标志物。LINC01018在非小细胞肺癌中低表达,其过表达抑制非小细胞肺癌细胞的增殖<sup>[7]</sup>。迄今为止,尚无关于胃癌发生发展中LINC01018的作用及其对放射敏感性影响的研究报道。微小RNA(microRNA, miRNA)是参与胃癌进展的另一类非编码RNA,miR-297已被证明在胃癌组织中表达水平超过正常胃上皮组织的2倍<sup>[8]</sup>。因此,本研究测定了胃癌组织中LINC01018的表达,研究LINC01018对胃癌HGC-27细胞增殖、凋亡和放射敏感性的影响,并结合miR-297探讨其潜在的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用细胞、试剂及胃癌组织标本

胃癌HGC-27细胞、胃正常黏膜上皮细胞GES-1购自中科院上海细胞库。RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司,TRIzol试剂、Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司,SYBR Green qPCR Master mix购自美国Applied Biosystems公司,聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购自美国Millipore公司。

21例胃癌组织及相匹配的癌旁组织标本来自青海省第五人民医院接受手术的胃癌患者(术前未接受过放、化疗),19例化疗抵抗癌组织来源于本院化疗抵抗的胃癌患者,标本收集于2011年至2014年,所有患者经病理分析确诊为胃癌,获得标本后立即于液氮中冻存。本研究获得医院伦理委员会批准通过,并获得所有患者的知情同意并签署知情同意书。

### 1.2 细胞转染及其分组

胃癌HGC-27细胞、胃正常黏膜上皮细胞GES-1用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每周换液2~3次。选取对数生长期的细胞进行实验。

胃癌HGC-27细胞以 $1 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板,当细胞生长汇合度达到80%时,按照Lipofectamine 2000转染试剂盒的说明进行转染。将HGC-27细胞分为pcDNA-LINC01018组(转染LINC01018过表达质粒pcDNA-LINC01018),pcDNA组(转染空载质粒pcDNA),anti-miR-297组(转染miR-297抑制剂),anti-miR-NC组(转染miR-297抑制剂阴性对照anti-miR-NC),pcDNA-LINC01018+miR-297模拟物组(共转染LINC01018过表达质粒pcDNA-LINC01018和miR-297模拟物),pcDNA-LINC01018+miR-NC组(共转染LINC01018过表达质粒pcDNA-LINC01018和miR-297模拟物阴性对照miR-NC)。上述转染质粒或核苷酸均购自上海吉玛公司。转染6h后,在含有10%胎牛血清的新鲜培养基中培养48h,采用实时定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)评估转染效率。

### 1.3 qPCR法检测胃癌组织和细胞中LINC01018、miR-297的表达

使用TRIzol试剂从胃癌组织、癌旁组织、HGC-27细胞中提取总RNA,使用NanoDrop分光光度计检测RNA浓度。随后将RNA逆转录为cDNA,并根据试剂盒的操作说明,利用SYBR Green qPCR Master mix和Applied Biosystems 7500快速实时PCR系统检测标本中LINC01018和miR-297的相对表达水平。

miR-297 和 U6 引物购自广州 RiboBio 公司。LINC01018 正向引物序列为 5'-TGAGTGCATCTCATGCTGG-3', 反向引物序列为 5'-GGCAATGCTCATTACCGTC-3'; GAPDH 正向引物序列为 5'-CCACCCAGAAGACTGTGGAT-3', 反向引物序列为 5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法对 lncRNA 和 miRNA 水平进行定量分析。

#### 1.4 MTT 和克隆形成实验检测 HGC-27 细胞的增殖

使用 MTT 实验检测 HGC-27 细胞的增殖活力。首先将 HGC-27 细胞接种在 96 孔板中(每孔  $3 \times 10^3$  个)培养 24 h, 然后进行转染。将 MTT 加至培养 48 h 的转染后 HGC-27 细胞中, 并在 37 °C 下孵育 4 h。随后添加 DMSO 以溶解甲瓖。用 Multiscan Spectrum 检测波长 490 nm 处的光密度(D)值, 以表示细胞增殖活力。使用克隆形成实验测量 HGC-27 细胞的克隆形成数。用胰蛋白酶消化转染后的 HGC-27 细胞, 计数并以 500 个细胞孔接种到 6 孔板中, 孵育 14 d 左右, 出现明显的细胞克隆时, 在室温下用甲醇固定 20 min, 并用 1% 结晶紫染色 10 min, 在倒置显微镜下计数。

#### 1.5 流式细胞术检测 HGC-27 细胞的凋亡率

收集转染后的 HGC-27 细胞  $1 \times 10^6$  个, 重悬于 500  $\mu$ l 的结合缓冲液中, 然后加入 5  $\mu$ l 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(FITC)和 5  $\mu$ l 碘化丙啶(PI), 在室温下避光放置 20 min, 用流式细胞仪进行细胞凋亡分析。

#### 1.6 克隆形成实验检测 HGC-27 细胞的放射敏感性

收集转染后的 HGC-27 细胞, 采用 Rad Source RS2000 辐射器产生的 X 射线(0、2、4、6、8 Gy 剂量)照射, 照射距离为 48.6 cm, 剂量率为 1.31 Gy/min。照射后细胞于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 14 d, 当出现明显的细胞克隆时, 甲醇固定 20 min, 并用 1% 结晶紫染色 10 min, 在显微镜下计数, 计算细胞的克隆形成率。其中, 克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times$ 100%, 存活分数(SF)=受照射细胞克隆形成率/对照细胞克隆形成率 $\times$ 100%。通过 GraphPad Prism 7 软件进行单击多靶模型获得细胞存活曲线, 分析放射相关的参数: 平均致死量(D<sub>0</sub>)和准阈剂量(D<sub>q</sub>), 并计算增敏比(SER), SER=对照组 D<sub>0</sub>/实验组 D<sub>0</sub>, 以评估各组处理对胃癌细胞放射敏感性的影响。

#### 1.7 双荧光素酶报告基因实验验证 LINC01018 与 miR-297 之间的靶向关系

生物信息学分析(DIANA Tools 数据库)预测到 LINC01018 与 miR-297 存在靶向结合位点, 采用双荧光素酶报告基因实验进行验证。包含 miR-297 结合位点的野生型(WT)或突变型(MUT)LINC01018 片段被克隆到荧光素酶报告质粒中, 分别记为 WT-LINC01018、MUT-LINC01018。使用 Lipofectamine

2000 将 WT-LINC01018 或 MUT-LINC01018 和 miR-NC 或 miR-297 共转染到 HGC-27 细胞中, 48 h 后用双荧光素酶测定系统检测各组细胞的荧光素酶活性。

#### 1.8 WB 检测细胞 Ki67、cleaved-caspase3 蛋白的表达

使用 RIPA 裂解缓冲液从 HGC-27 细胞中提取总蛋白。蛋白质用 10% SDS-PAGE 分离, 然后电转移到 PVDF 膜上。随后, 将膜用 5% 脱脂奶粉封闭, 然后与以下购自美国 Abcam 公司的抗 Ki67(1:3 000)、cleaved-caspase3(1:3 000)、pro-caspase3(1:2 000)、对照 GAPDH(1:3 000)的一抗 4 °C 孵育过夜。次日与购自美国 Santa Cruz 公司的辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:3 000)室温孵育 2 h, 用增强的化学发光试剂盒检测 Ki67、cleaved-caspase3 蛋白的表达。

#### 1.9 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析, 符合正态分布的计量资料表示为平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ ), 两组间数据比较采用 *t* 检验, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LINC01018、miR-297 在胃癌组织和 HGC-27 细胞中的表达

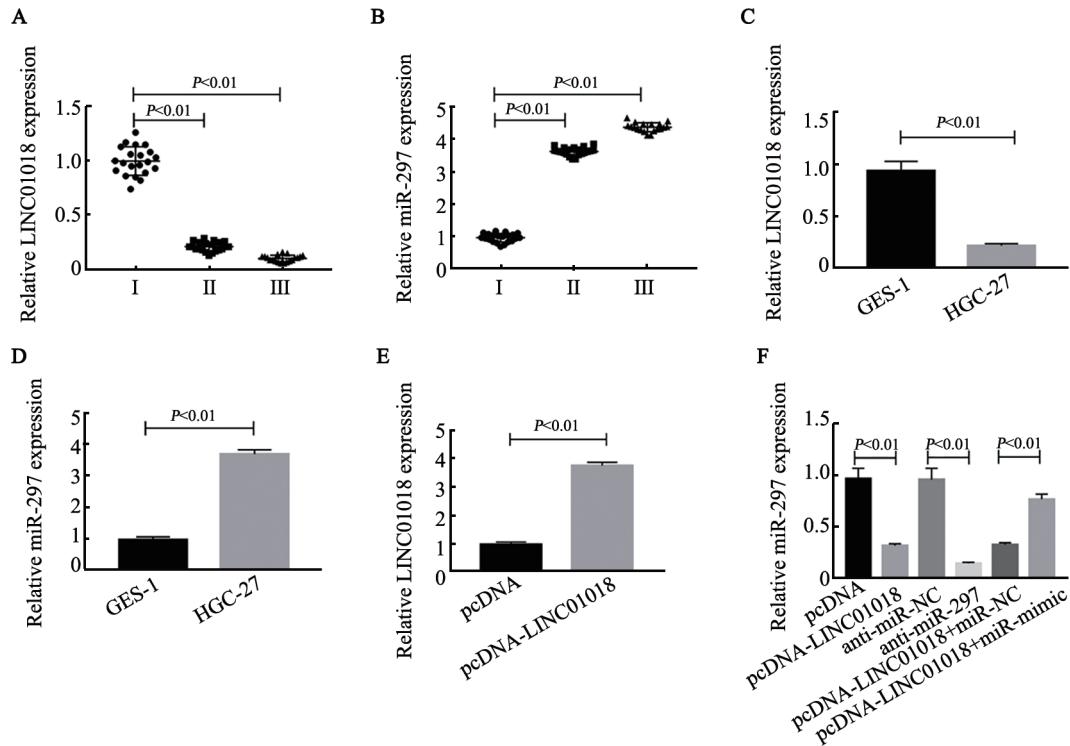
qPCR 检测胃癌组织和细胞中 LINC01018、miR-297 的表达, 结果见图 1。与癌旁组织相比, 胃癌组织和化疗抵抗癌组织中 LINC01018 表达呈低水平、miR-297 表达呈高水平, 差异均具有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。与胃正常黏膜上皮细胞 GES-1 相比, 胃癌 HGC-27 细胞中 LINC01018 呈低表达、miR-297 呈高表达, 差异均具有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。与 pcDNA 组相比, pcDNA-LINC01018 组胃癌 HGC-27 细胞中 LINC01018 的表达水平提高、miR-297 表达水平降低; 与 anti-miR-NC 组相比, anti-miR-297 组降低了 miR-297 的表达水平; 与 pcDNA-LINC01018+miR-NC 组相比, pcDNA-LINC01018+miR-297 模拟物组增加了 miR-297 的表达水平, 上述差异均具有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。结果说明, LINC01018 在胃癌组织和细胞中呈低表达而 miR-297 呈高表达。

### 2.2 双荧光素酶报告基因实验验证 LINC01018 和 miR-297 的靶向关系

双荧光素酶报告基因实验验证 LINC01018 与 miR-297 之间的靶向关系, 结果见图 2、表 1。LINC01018 与 miR-297 存在互补配对的碱基序列。表 1 显示, 与 miR-NC 组相比, miR-297 组降低转染 WT-LINC01018 细胞荧光素酶活性; 过表达 LINC01018 可下调 miR-297 表达( $P < 0.01$ )。miR-NC



组、miR-297转染MUT-LINC01018细胞的酶活性无显著差异( $P>0.05$ )。结果提示, LINC01018靶向于miR-297, 而且其负向调控miR-297的表达。



I: Para-cancerous tissues (21 cases); II: Gastric cancer tissues (21 cases); III: Chemosistant gastric cancer tissues (19 cases)

A: Expression of LINC01018 in gastric cancer tissues; B: The expression of miR-297 in gastric cancer tissues;

C: Expression of LINC01018 in HGC-27 cells; D: Expression of miR-297 in HGC-27 cells; E: Detection of LINC01018 expression after overexpression treatment; F: Detection of miR-297 expression in HGC-27 cells in each treatment group

图1 LINC01018、miR-297在胃癌组织和HGC-27细胞中的表达

Fig.1 Expression of LINC01018 and miR-297 in gastric cancer tissues and HGC-27 cells



图2 LINC01018和miR-297之间存在靶向结合位点

Fig.2 LINC01018 and miR-297 have targeted binding sites

表1 LINC01018和miR-297靶向关系的验证实验数据( $n=3$ )

Tab.1 Validation test data of the targeting relationship between LINC01018 and miR-297 ( $n=3$ )

Group	WT-LINC01018	MUT-LINC01018
miR-NC	0.96±0.10	0.98±0.09
miR-297	0.26±0.04	0.96±0.10
<i>t</i>	11.257	0.257
<i>P</i>	0.000	0.810

2.3 LINC01018和miR-297对HGC-27细胞增殖的影响

MTT和克隆形成实验检测HGC-27细胞的增殖

活力与克隆形成数,结果见图3。pcDNA-LINC01018组细胞的增殖活力、克隆形成数低于pcDNA组, anti-miR-297组细胞的活力、克隆形成数低于anti-miR-NC组, pcDNA-LINC01018+miR-297模拟物组细胞的增殖活力、克隆形成数高于pcDNA-LINC01018+miR-NC组(均 $P<0.01$ )。结果提示,高表达LINC01018可显著抑制HGC-27细胞的增殖能力,而同时高表达miR-297可逆转LINC01018对HGC-27细胞增殖的抑制作用。

2.4 LINC01018和miR-297对HGC-27细胞凋亡的影响

流式细胞术检测HGC-27细胞的凋亡率,结果见图4。与pcDNA组相比,pcDNA-LINC01018组细胞的凋亡率升高;与anti-miR-NC组相比,anti-miR-297组细胞的凋亡率升高;与pcDNA-LINC01018+miR-NC组相比,pcDNA-LINC01018+miR-297模拟物组细胞的凋亡率降低,上述差异均具有统计学意义(均 $P<0.01$ )。结果提示,高表达LINC01018可显著促进HGC-27细胞的凋亡,而同时高表达miR-

297可逆转LINC01018对HGC-27细胞凋亡的促进作用。

### 2.5 LINC01018 和 miR-297 对 HGC-27 细胞放射敏感性的影响

联合放射的条件下各分组处理对HGC-27细胞存活率的测定结果见图5、表2。与pcDNA组相比, pcDNA-LINC01018组降低细胞的存活率, SER为1.617; 与anti-miR-NC组相比, anti-miR-297组降低细

胞的存活率, SER为1.865; 与pcDNA-LINC01018+miR-NC组相比, pcDNA-LINC01018+miR-297模拟物组提高细胞的存活率, SER为0.677, 上述差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$ )。结果提示, 高表达LINC01018可显著提高HGC-27细胞放射敏感性, 而同时高表达miR-297则可逆转LINC01018对HGC-27细胞放射增敏作用。

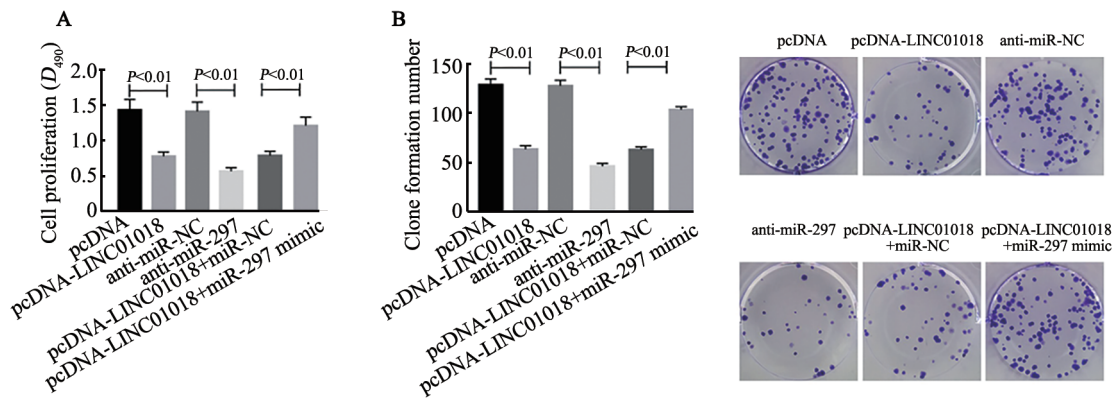


图3 LINC01018和miR-297对HGC-27细胞增殖活性(A)和克隆形成数(B)的影响

Fig.3 Effects of LINC01018 and miR-297 on the proliferative viability (A) and clone formation number (B) of HGC-27 cells

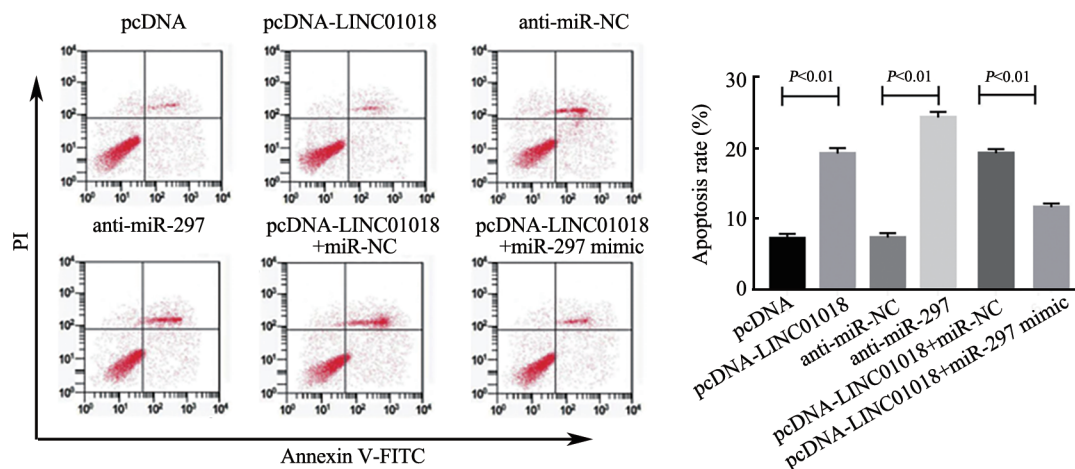


图4 LINC01018和miR-297对HGC-27细胞凋亡的影响

Fig.4 Effects of LINC01018 and miR-297 on apoptosis of HGC-27 cells

### 2.6 LINC01018 和 miR-297 对 HGC-27 细胞的作用效应与Ki67、caspase3蛋白表达有关

WB检测Ki67、cleaved-caspase3蛋白的表达, 结果见图6。与pcDNA组相比, pcDNA-LINC01018组细胞中Ki67、pro-caspase3蛋白表达水平降低, cleaved-caspase3蛋白表达水平升高; 与anti-miR-NC组相比, anti-miR-297组Ki67、pro-caspase3蛋白表达水平降低, cleaved-caspase3蛋白表达水平升高; 与pcDNA-LINC01018+miR-NC组相比, pcDNA-LINC01018+miR-297模拟物组细胞的Ki67、pro-caspase3蛋白表达

水平升高, cleaved-caspase3蛋白表达水平降低, 上述差异均具有统计学意义(均 $P<0.01$ )。结果提示, LINC01018和miR-297均可调节HGC-27细胞中Ki67、pro-caspase3蛋白的表达, 说明LINC01018和miR-297对HGC-27细胞的作用效应与Ki67、caspase3蛋白的表达变化有关。

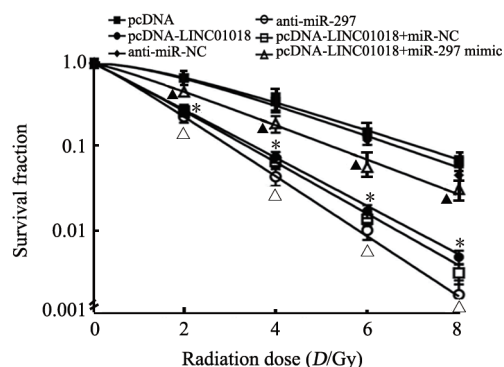
## 3 讨论

放射疗法作为胃癌患者的标准疗法之一, 对于不适用手术和晚期癌症患者的治疗至关重要<sup>[9]</sup>。分子标志物的鉴定有助于开发新的胃癌靶向治疗方

法,参与许多复杂调控网络的 lncRNA 近年来已成为研究热点<sup>[10-12]</sup>。LINC01018 (lnckb.42285) 是染色体 5 上的非保守基因间 lncRNA,在体内调节肝脏代谢基因的表达<sup>[13]</sup>。LINC01018 在乙型肝炎病毒阳性肝细胞癌中异常表达,影响癌症的发生、发展<sup>[4]</sup>,LINC01018 的过表达通过海绵化 miR-182-5p 来抑制肝细胞癌的细胞增殖并促进细胞的凋亡,表明了 LINC01018 的抗肿瘤作用<sup>[15]</sup>。相关研究<sup>[6]</sup>显示,LINC01018 在胃癌患者中呈现低表达,然而尚未见有关 LINC01018 在胃癌中作用的研究报道。本研究揭示了 LINC01018 在胃癌组织、化疗抵抗胃癌组织和胃癌 HGC-27 细胞中的低表达,与前人报道<sup>[6]</sup>一致,提示 LINC01018 可能对胃癌的发生和发展及放射敏感性具有一定的影响。为了验证 LINC01018 对胃癌细胞放射敏感性的作用,本研究采用细胞克隆形成实验评估细胞活力,此前 LI 等<sup>[16]</sup>采用克隆形成实验分析 lncRNA Rpph1 的沉默可以增强食管癌细胞的放射敏感性。

本研究的结果表明,LINC01018 过表达后,胃癌 HGC-27 细胞的活力、克隆形成能力减弱,增殖相关蛋白 Ki67 表达降低,并且胃癌 HGC-27 细胞的存活分数随照射剂量的增加而逐渐降低;而且过表达 LINC01018 组胃癌 HGC-27 细胞的凋亡率要高于阴

性对照 pcDNA 组,并且凋亡相关蛋白 cleaved-caspase3 的表达也高于 pcDNA 组,pro-caspase3 表达低于 pcDNA 组。结果表明过表达 LINC01018 可以抑制胃癌细胞的增殖,诱导细胞凋亡,并显著增强胃癌细胞的放射敏感性。这些数据说明 LINC01018 充当抑癌因子影响胃癌细胞的增殖、凋亡,并提高胃癌细胞对放射的敏感性。



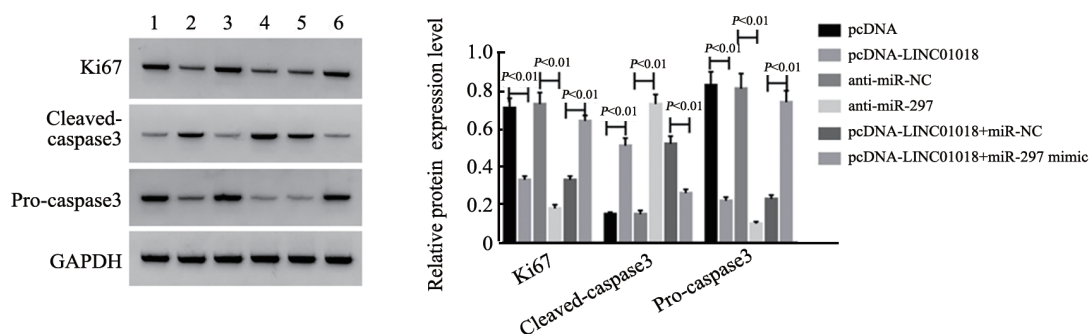
\* $P < 0.05$  vs pcDNA group;  $\Delta P < 0.05$  vs anti-miR-NC group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs pcDNA-LINC01018+miR-NC group

图5 各分组处理联合不同剂量照射后 HGC-27 细胞的存活曲线  
Fig. 5 Survival curve of HGC-27 cells after each treatment combined with different doses of irradiation

表2 LINC01018 和 miR-297 联合放射对 HGC-27 细胞作用的单击多靶模型参数

Tab.2 Single-click multi-target model parameters of LINC01018 and miR-297 combined with radiation on HGC-27 cells

Group	$D_0$ (Gy)	$D_q$ (Gy)	N	$SF_2$	k	SER
pcDNA	2.424	1.613	1.845	0.674	0.413	-
pcDNA-LINC01018	1.499	0.110	1.076	0.280	0.667	1.617
anti-miR-NC	2.247	1.581	2.021	0.657	0.445	-
anti-miR-297	1.205	0.258	1.239	0.230	0.830	1.865
pcDNA-LINC01018+miR-NC	1.404	0.183	1.139	0.269	0.712	-
pcDNA-LINC01018+miR-297 mimic	2.075	0.504	2.275	0.458	0.482	0.677



1: pcDNA; 2: pcDNA-LINC01018; 3: anti-miR-NC; 4: anti-miR-297;  
5: pcDNA-LINC01018+miR-NC; 6: pcDNA-LINC01018+miR-297 mimic

图6 LINC01018 和 miR-297 对 HGC-27 细胞的作用与 Ki67、cleaved-caspase3、pro-caspase3 蛋白表达有关  
Fig. 6 Effects of LINC01018 and miR-297 on HGC-27 cells were related to the protein expressions  
Ki67, cleaved-caspase3 and pro-caspase3



越来越多的证据表明,miR-297在几种人类疾病中异常表达<sup>[17-18]</sup>,包括癌症<sup>[19]</sup>。根据报道<sup>[20]</sup>,miR-297在口腔鳞状细胞癌组织和细胞中表达下调,充当口腔鳞状细胞癌的肿瘤抑制因子,而LINC00668充当miR-297的竞争内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)促进口腔鳞状细胞癌进展。但也有报道<sup>[21]</sup>称,miR-297在肺腺癌中表达上调,其过表达增强了肺腺癌细胞的增殖和集落形成,促进细胞迁移和侵袭,miR-297可以作为肺腺癌致癌的miRNA发挥作用。可见miR-297的抗癌或致癌作用受肿瘤细胞类型影响。另有报道<sup>[8]</sup>指出,miR-297在胃癌中表达上调,然而其具体的功能仍不明确。本实验发现,与癌旁组织或胃正常黏膜上皮细胞GES-1相比,胃癌组织、化疗抵抗胃癌组织和HGC-27细胞中miR-297高表达,与前人报道<sup>[8,21]</sup>相符,提示miR-297可能作为胃癌的肿瘤抑制因子发挥作用。敲减miR-297可以显著抑制胃癌HGC-27细胞的活力、克隆形成数、降低细胞的存活分数,促进细胞的凋亡,以及提高HGC-27细胞的放射敏感性。表明了miR-297与胃癌细胞的增殖、凋亡和放射敏感性密切相关。

lncRNA可以作为miRNA的ceRNA调节癌症进展及放射敏感性<sup>[22]</sup>。例如宫颈癌中lncRNA LINC00958对放射疗法的细胞敏感性的调节作用与竞争性结合miR-5095调节RRM2有关<sup>[23]</sup>,lncRNA CCAT2通过miR-145/p70S6K1和p53途径增强人食道癌细胞的放射治疗抵抗力<sup>[24]</sup>。本研究的生物信息学预测与双荧光素酶报告基因证实LINC01018可以靶向调控miR-297的表达。过表达LINC01018时miR-297被下调。此外,共转染pcDNA-LINC01018和miR-297 mimic后,LINC01018过表达对胃癌细胞的增殖、凋亡率、放射敏感性的作用被miR-297过表达所逆转。这些结果显示,LINC01018通过靶向miR-297影响胃癌细胞的增殖、凋亡和放射敏感性。

总之,本研究表明,LINC01018在胃癌中低表达,其过表达可以抑制胃癌细胞的增殖,促进细胞凋亡,并增强放射敏感性,重要的是,靶向miR-297的表达是LINC01018发挥抗胃癌效果的机制之一,这可能为胃癌的诊断和治疗提供新的靶点。

#### [参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] GENG W, TIAN D, WANG Q, et al. DNA-PKcs inhibitor increases the sensitivity of gastric cancer cells to radiotherapy[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(2): 561-570. DOI: 10.3892/or.2019.7187.
- [3] LORENZI L, AVILA C F, DECOCK A, et al. Long noncoding RNA expression profiling in cancer: Challenges and opportunities[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58(4): 191-199. DOI: 10.1002/gcc.22709.
- [4] SANCHEZ C A, KAWAMURA Y, YAMAMOTO Y, et al. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(7): 2093-2100. DOI: 10.1111/cas.13642.
- [5] YAO Z, ZHANG Y, XU D, et al. Research progress on long non-coding RNA and radiotherapy[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(1): 5757-5770. DOI: 10.12659/MSM.915647.
- [6] MIAO Y, SUI J, XU S Y, et al. Comprehensive analysis of a novel four-lncRNA signature as a prognostic biomarker for human gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 75007-75024. DOI: 10.18632/oncotarget.20496.
- [7] 王子博, 鲁继斌, 张洪岩. 长链非编码RNA LINC01018在非小细胞肺癌中的表达与意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(18): 2907-2910. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2017.18.013.
- [8] 马筱秋, 王霖沛, 骆启聪, 等. 微小RNA-29c表达水平与胃癌生物学行为的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2013, 35(5): 325-330. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2013.05.002.
- [9] PARISI E, GENESTRETI G, SARNELLI A, et al. Accelerated hypofractionated radiotherapy plus chemotherapy for inoperable locally advanced non-small-cell lung cancer: final results of a prospective phase-II trial with a long-term follow-up[J]. *Radiat Oncol*, 2019, 14(1): 112-121. DOI: 10.1186/s13014-019-1317-x.
- [10] ZHUO W, LIU Y, LI S, et al. Long noncoding RNA GMAN, up-regulated in gastric cancer tissues, is associated with metastasis in patients and promotes translation of ephrin A1 by competitively binding GMAN-AS[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(3): 676-691. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.10.054.
- [11] ZHANG R, LIU Y, LIU H, et al. The long non-coding RNA SNHG12 promotes gastric cancer by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(23): 10902-10922. DOI: 10.1248/bpb.b17-00769.
- [12] FENG L, ZHU Y, ZHANG Y, et al. lncRNA GACAT3 promotes gastric cancer progression by negatively regulating miR-497 expression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97(7): 136-142. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.074.
- [13] RUAN X, LI P, CHEN Y, et al. In vivo functional analysis of non-conserved human lncRNAs associated with cardiometabolic traits [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 45-57. DOI: 10.1038/s41467-019-13688-z.
- [14] 涂晓丽, 文荃, 闫军. HBV+肝细胞癌患者lncRNA-mRNA共表达网络分析及作用[J]. *第三军医大学学报*, 2018, 40(1): 37-44. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201708015.
- [15] WANG S, XU M, SUN Z, et al. LINC01018 confers a novel tumor suppressor role in hepatocellular carcinoma through sponging microRNA-182-5p[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 317(2): G116-G126. DOI: 10.1152/ajpgi.00005.2019.
- [16] LI Z Y, LI H F, ZHANG Y Y, et al. Value of long non-coding RNA Rpph1 in esophageal cancer and its effect on cancer cell sensitivity to radiotherapy[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(15): 1775-1791. DOI: 10.3748/wjg.v26.i15.1775.
- [17] YAO Y, JIA H, WANG G, et al. miR-297 protects human umbilical vein endothelial cells against LPS-induced inflammatory response and apoptosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(4): 696-707.

- DOI: 10.33594/0000000049.
- [18] XI X, YAO Y, LIU N, et al. miR-297 alleviates LPS-induced A549 cell and mice lung injury via targeting cyclin dependent kinase 8[J]. *Int immunopharmacol*, 2020, 80(1): 106197-106203. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106197.
- [19] OSIP'YANTS A I, KNYAZEY E N, GALATENKO A V, et al. Changes in the level of circulating hsa-miR-297 and hsa-miR-19b-3p miRNA are associated with generalization of prostate cancer[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2017, 162(3): 379-382. DOI: 10.1007/s10517-017-3620-6.
- [20] ZHANG C Z. Long intergenic non-coding RNA 668 regulates VEGFA signaling through inhibition of miR-297 in oral squamous cell carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 489(4): 404-412. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.155.
- [21] SUN Y, ZHAO J, YIN X, et al. miR-297 acts as an oncogene by targeting GPC5 in lung adenocarcinoma[J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(5): 636-643. DOI: 10.1111/cpr.12288.
- [22] HU X, LI Y, KONG D, et al. Long noncoding RNA CASC9 promotes LIN7A expression via miR-758-3p to facilitate the malignancy of ovarian cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10800-10808. DOI: 10.1002/jcp.27903.
- [23] ZHAO H, ZHENG G H, LI G C, et al. Long noncoding RNA LINC00958 regulates cell sensitivity to radiotherapy through RRM2 by binding to microRNA-5095 in cervical cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 23349-23359. DOI: 10.1002/jcp.28902.
- [24] WANG M, WANG L, HE X, et al. lncRNA CCAT2 promotes radiotherapy resistance for human esophageal carcinoma cells via the miR-145/p70S6K1 and p53 pathway[J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(1): 327-336. DOI: 10.3892/ijo.2019.4929.
- [收稿日期] 2021-03-20 [修回日期] 2021-05-13  
[本文编辑] 沈志超