DOI:10.16016/j.1000-5404.201912296

LINC01006 对肾母细胞瘤细胞增殖、侵袭和凋亡的作用及其机制

赵 婷,刘安生,王 华,傅 蔷 710003 西安,西安市儿童医院血液肿瘤科

[**摘要**] **目的** 探讨长链非编码 RNA LINC01006 对肾母细胞瘤细胞增殖、侵袭和凋亡的影响及分子机制。**方法** 通过实时定量 PCR 检测肾母细胞瘤组织、细胞系中 LINC01006 的表达。在人肾母细胞瘤细胞中转染 LINC01006 的腺病毒过表达载体和 siRNA,分别采用 CCK-8、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)细胞增殖检测试剂盒、Transwell 侵袭实验、流式细胞术检测细胞活力、增殖、侵袭及凋亡能力的变化。通过生物信息学分析预测 LINC01006 的靶基因,双荧光素酶报告基因分析验证预测结果;检测过表达和敲低 LINC01006 后 miR-148a-3p 及其靶基因中胚层同源盒基因(mesoderm homoobox2, MEOX2)表达水平的变化。随后,分别在裸鼠皮下注射转染腺病毒空载体和 LINC01006 过表达载体的肾母细胞瘤细胞系,建立小鼠移植瘤模型,测定移植瘤的体积及质量,以及肿瘤组织中 LINC01006、miR-148a-3p、MEOX2 和磷酸化的磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphorylated-phosphatidylinositol-3 kinase, p-PI3K)、磷酸化的丝氨酸/苏氨酸激酶,即蛋白激酶 B(phosphorylated-protein kinase B, p-PKB/p-Akt)的表达。**结果** 肾母细胞瘤组织和细胞系中 LINC01006 的表达水平显著低于对照组织和细胞($P<0.01$)。LINC01006 可抑制肾母细胞瘤细胞的活力($P<0.01$)、体外增殖能力($P<0.01$)和侵袭能力[(166.00±13.75) *vs* (103.00±9.24), $P<0.05$],促进细胞凋亡[(11.30±0.24) *vs* (37.25±1.57), $P<0.01$]。双荧光素酶报告基因实验证实 LINC01006 与 miR-148a-3p 直接结合,而 MEOX2 是 miR-148a-3p 的靶基因。过表达 LINC01006 抑制了 miR-148a-3p 的表达[(1.07±0.02) *vs* (0.32±0.03), $P<0.01$],而抑制 miR-148a-3p 的表达促进了 MEOX2 mRNA 和蛋白水平的表达($P<0.01$),进而抑制了 PI3K/Akt 信号通路的活性($P<0.05$)。与转染 pcDNA-LINC01006 组相比,共转染 LINC01006 和 miR-148a-3p mimic 组中 MEOX2 的表达下调($P<0.01$),促进了 PI3K/Akt 信号通路的活性($P<0.01$),细胞活力、增殖和侵袭能力均显著提高($P<0.01$),细胞凋亡能力降低($P<0.01$)。此外,过表达 LINC01006 抑制了裸鼠移植瘤的生长($P<0.01$)。**结论** LINC01006 可直接与 miR-148a-3 相互作用并下调其表达水平,从而阻断 MEOX2/PI3K/Akt 通路的活性,抑制肾母细胞瘤细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡,抑制肿瘤的生长。

[**关键词**] 肾母细胞瘤;LINC01006;miR-148a-3p;MEOX2/PI3K/Akt 通路;增殖与侵袭;凋亡
[**中图法分类号**] R394.3;R730.23;R737.11 [**文献标志码**] A

LINC01006 inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of nephroblastoma cells by down-regulating miR-148a-3p to block MEOX2/PI3K/Akt pathway

ZHAO Ting, LIU Ansheng, WANG Hua, FU Qiang Department of Hematology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi Province, 710003, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of long noncoding RNA LINC01006 in regulating the proliferation, invasion and apoptosis of nephroblastoma cells and explore the molecular mechanism. **Methods** We detected the expression of LINC01006 in nephroblastoma tissues and cell lines using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). We subsequently tested the effects of transfection with an adenovirus vector for LINC01006 overexpression or a siRNA targeting LINC01006 on cell viability, proliferation, invasion and apoptosis in human nephroblastoma cells using cell counting kit-8 (CCK-8), 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) cell proliferation assay kit, Transwell assay or flow cytometry as appropriate. Bioinformatics analysis was conducted

[**通信作者**] 赵 婷,E-mail:tingzhanghb@sina.com

to identify the target gene of LINC01006, and the results were verified by luciferase reporter gene analysis. The expression of miR-148a-3p and its target gene mesoderm homeobox2 (MEOX2) was detected in human nephroblastoma cells with overexpression and knockdown of LINC01006. The tumor cell lines transfected with an empty adenovirus vector or a LINC01006-overexpressing vector were injected subcutaneously into nude mice to establish mouse models bearing transplanted nephroblastoma, in which the tumor growth dynamics were observed. The expression levels of LINC01006, miR-148a-3p, MEOX2, phosphorylated-phosphatidylinositol-3 kinase (p-PI3K), and phosphorylated-protein kinase B (p-PKB/p-Akt) were examined in the tumor tissues. **Results** The nephroblastoma tissues and cell lines expressed significantly lower level of LINC01006 than normal tissues and control cell lines ($P<0.01$). LINC01006 over-expression significantly inhibited the viability ($P<0.01$), proliferation ($P<0.01$) and invasion (166.00 ± 13.75 *vs* 103.00 ± 9.24, $P<0.05$) and promoted apoptosis (11.30 ± 0.24 *vs* 37.25 ± 1.57, $P<0.01$) of nephroblastoma cells *in vitro*. Luciferase reporter gene analysis confirmed that LINC01006 bound directly to miR-148a-3p, which targets MEOX2 gene. Overexpression of LINC01006 obviously inhibited the expression of miR-148a-3p (1.07 ± 0.02 *vs* 0.32 ± 0.03, $P<0.01$), while inhibiting miR-148a-3p promoted the expression of MEOX2 ($P<0.01$) and inhibited the activation of the PI3K/Akt signaling pathway ($P<0.05$). Compared with the cells transfected with pcDNA-LINC01006, the cells co-transfected with LINC01006 and miR-148a-3p exhibited a lowered expression of MEOX2 ($P<0.01$) with enhanced activity of PI3K/Akt signaling pathway ($P<0.01$), significantly increased cell viability, proliferation and invasion ($P<0.01$), and decreased cell apoptosis ($P<0.01$). Overexpression of LINC01006 in the tumor cells significantly inhibited the growth of the transplanted tumors in nude mice ($P<0.01$). **Conclusion** LINC01006 can directly interact with miR-148a-3p to down-regulate the expression of the latter, thus blocking the activity of MEOX2/PI3K/Akt pathway to inhibit the proliferation and invasion and promote apoptosis of nephroblastoma cells.

[**Key words**] nephroblastoma; LINC01006; miR-148a-3p; MEOX2/PI3K/Akt pathway; proliferation and invasion; apoptosis

Corresponding author: ZHAO Ting, E-mail: tingzhanghb@sina.com

肾母细胞瘤(nephroblastoma)又叫 Wilms 瘤,是一种来源于胚胎性肾组织的混合性胚胎瘤,也是婴幼儿泌尿系统最常见的恶性肿瘤[1]。越来越多的证据表明,长度超过 200 个核苷酸的长链非编码 RNA(long noncoding RNAs, lncRNAs)在癌症的发生发展过程中起着至关重要的作用[2]。然而,大多数 lncRNA 与肾母细胞瘤之间的关系尚不清楚。LINC01006 是一个基因间区长链非编码 RNA(large intergenic non-coding RNA, lincRNA),位于 7 号染色体长臂 3 区 6 带(7q36)上[3]。有研究表明 LINC01006 是一种新的胃癌标志物[4]。然而,LINC01006 在肾母细胞瘤中的相关研究较少。本研究通过检测肾母细胞瘤组织和细胞系中 LINC01006 的表达水平,分析 LINC01006 对肾母细胞瘤细胞增殖、侵袭及凋亡能力的影响及其相关机制,并通过体内实验进一步验证其功能。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 临床样本收集 收集来自西安市儿童医院 2017 年 9 月至 2018 年 7 月血液肿瘤科肾母细胞瘤患者组织和瘤旁组织(肿瘤未侵及)20 例,男女各 10 例,年龄(3.25±1.45)岁,新鲜组织从体内取出后立即置于-80 ℃保存。肾母细胞瘤患者必须符合以下标准:①肾母细胞瘤的诊断必须经影像学检查确认;②既往有癌症病史的患者不纳入本研究;③患者未接受化疗或放疗。本研究 2017 年 7 月经本院医学伦理委员会批准(004 号),所有受试者获得书面知情同意书。

1.1.2 细胞系与试剂 人胚胎肾正常细胞系 CCC-HEK-1,肾母细胞瘤细胞系 SK-NEP-1、G-401 和 WT-CLS1,人源胚胎肾细胞 HEK-293T 均来自本实验室细胞库。4~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠购自成都达硕实验动物有限公司。胎牛血清(FBS)、McCoy's 5A 培养基、高糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;TRIzol、逆转录试剂盒、RT-qPCR 试剂均购自大连 TaKaRa 公司;RIPA 裂解液、GAPDH 单克隆抗体和鼠源 IgG 抗体购自康为世纪生物科技有限公司;中胚层同源盒基因(mesoderm homoobox2, MEOX2)、磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)、p-

PI3K、丝氨酸/苏氨酸激酶,即蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/Akt)、p-Akt 抗体均购自美国 Abcam 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;膜联蛋白(Annexin)V-碘化丙啶(PI)双染凋亡试剂盒购自美国 DB 公司;细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自中国 BioTeke 公司;BrdU 细胞增殖检测试剂盒购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.3 主要仪器设备 细胞培养箱、酶标仪购自 Thermo 公司;实时荧光定量 PCR 仪、凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 *方法*

1.2.1 质粒构建及转染 通过 PCR 扩增得到 LINC01006 片段,将其克隆到 pShuttle-CMV 载体,随后将其酶切后转化 BJ5183 大肠杆菌进行重组,得到腺病毒载体 pAD-Shuttle-CMV-LINC01006。此外,以 5′-GGAAGCTTTCATAAGTGCGTGCTCCAG-3′和 5′-AAGGTACCCATGGAACACCCCCTCTTTGGC-3′为引物,扩增得到 MEOX2 片段,将其克隆到 pcDNA3.1 载体构建过表达质粒,同时,设置空载体作对照。miR-148a-3p、LINC01006 和 MEOX2 的 siRNA 及其阴性对照由公司设计并合成。将细胞接种于培养板,待其密度大约为 70%时,根据 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行质粒转染。

1.2.2 RNA 提取及 RT-qPCR 按照说明书,用 TRIzol 试剂提取组织或细胞中的总 RNA,测定 RNA 浓度,通过反转录产生 cDNA,将其作为模板进行 RT-qPCR,反应条件如下:95 ℃ 1 min;94 ℃ 15 s、54 ℃ 30 s、72 ℃ 20 s,共 35 个循环。分别以 U6 和 GAPDH 作为内源性对照,结果利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行计算。引物序列见表 1。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活性 转染 48 h 后,调整细胞数至 2×10^5/mL 接种于 96 孔板,于培养后 24、48、72 h 分别加入 15 μL CCK-8 溶液,孵育 4 h 之后弃培养液,每孔加 150 μL DMSO 震荡 15 min,酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度值[D(450)]。

1.2.4 BrdU 法检测细胞增殖 将细胞以 1.5×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板,于转染质粒培养 24、48、72 h 之后,每孔添加 10 μL 10×BrdU 溶液。37 ℃孵育 12 h 之后弃培养液,添加 Fixing/Denaturing Solution 室温孵育 30 min。去除溶液后添加 1×检测抗体溶液,室温孵育 1 h。弃上清,洗涤之后添加 1×辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗溶液,室温孵育 30 min。去除溶液,洗涤之后,添加 100 μL TMB Substrate 室温孵育 30 min,随后添加 100 μL STOP Solution,30 min 内读取 450 nm 处的 D(450)值。

1.2.5 细胞侵袭实验 在 Transwell 平板上涂 Matrigel 胶,孵育 2~3 h。然后将无血清培养液制备的 200 μL 2×10^5/mL 的细胞悬液加至上室,800 μL 含 10% FBS 的培养基加至下室,在 37 ℃培养箱继续培养 24 h。去除上室底部膜表面的细胞,将细胞用甲醛溶液固定后,结晶紫染色,在显微镜下进行观察和计数。

1.2.6 细胞凋亡检测 进行细胞计数之后将 2×10^5~5×10^5/mL 细胞离心,弃上清,重悬于 195 μL 结合缓冲溶液中,与 5 μL Annexin V-FITC 孵育 10 min,然后与 10 μL PI(20 μg/mL)在避光条件下孵育 5 min。设立空白对照、Annexin V-FITC 和 PI 单染色组。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行实验。

1.2.7 靶基因预测及双荧光素酶报告基因实验 通过生物信息学分析预测得到 LINC01006 可靶向结合的 miRNA,及 miRNA 所靶向的基因。分别构建含有 miR-148a-3p 结合位点的 LINC01006 和 MEOX2 3′-非翻译区(untranslated region, UTR)的野生型(wild type, WT)和突变型(mutant, MUT)荧光素酶报告载体,即 pGL3-LINC01006-WT/MUT 和 pGL3-MEOX2 3′-UTR-WT/MUT。将荧光素酶报告载体分别与 miR-148a-3p 模拟物或阴性对照(negative control, NC)寡核苷酸共转染 HEK-293T 细胞。48 h 之后裂解细胞,加入底物,通过双荧光素酶报告分析系统测定荧光素酶活性。

1.2.8 RNA Pull-down 实验 用生物素标记的 miR-148a-3p 转染 HEK-293T 细胞,48 h 后将细胞裂解液与链亲和素包被磁珠 4 ℃孵育 3 h。充分洗涤珠子后,洗脱 RNA-RNA 复合物,对 RNA 提取物进行特异性 RT-qPCR 检测。

表 1 RT-qPCR 引物序列与片段长度

基因	上游引物(5′→3′)	下游引物(5′→3′)	片段长度/bp
LINC01006	TTTGTGGTGGTGAAGACGTG	TCCTCAAGAATAAGGAACATAGG	120
miR-148a-3p	TCAGTGCACTACAGAACTTTGT	GCTGTCAACGATACGCTACGT	74
MEOX2	TCTGGGACCACCTTCTTTTG	CCACCACCCTCTGTCACTTT	219
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT	94
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT	100

1.2.9 Western blot 分析 转染 48 h 之后,使用 RIPA 裂解液提取组织或细胞的总蛋白,通过 BCA 试剂盒测定每个样品的蛋白浓度。等量蛋白经 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,将其转移到 PVDF 膜上,然后用 5%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 1 h,分别用相应的抗 MEOX2、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 抗体 4 ℃孵育过夜,用 TBST 漂洗之后,与 HRP 标记的 IgG 抗体室温孵育 1 h。TBST 漂洗之后,ECL 显影液曝光显影。基于每种蛋白质与 GAPDH 的灰度比,使用 Image J 软件进行蛋白质定量分析。

1.2.10 动物实验 将 18 只 4~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠按体质量从小到大编号,然后从随机数字表连续抄取 18 个数字,分别除以 3 求余数,余数 0、1、2 分别代表进入第 1、2、3 组。得到第 3 组小鼠数量为 8 只,查随机数字表下一个数字为 14,用该数字除以组内分得的小鼠数量,即 14/8,所得余数为 6,则将第 3 组内第 6 只小鼠调整到第 2 组,以此类推,将小鼠随机分为 3 组(每组 6 只):空白对照组、空载体对照组、过表达 LINC01006 组。分别将转染腺病毒空载体和 LINC01006 过表达腺病毒载体的 SK-NEP-1 细胞悬液接种于裸鼠右前腋皮下,建立肾母细胞瘤皮下移植瘤模型。接下来,每隔一周测量肿瘤体积,在第 4 周对裸鼠实施安乐死,测量其肿瘤的质量。提取肿瘤组织的 RNA 和蛋白,检测 LINC01006、miR-148a-3p、MEOX2、p-PI3K 和 p-Akt 的表达。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间的数据比较采用独立性 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 LINC01006 在肾母细胞瘤组织及细胞中表达下调

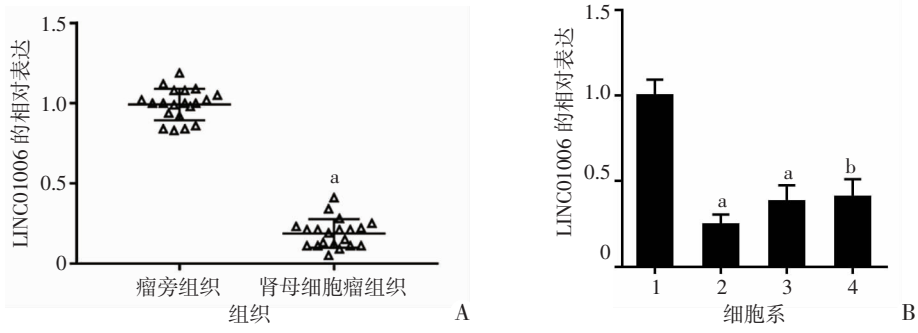
通过 RT-qPCR 检测了肾母细胞瘤组织及细胞中 LINC01006 的表达,观察到肿瘤组织中 LINC01006 的相对表达量显著低于正常组织($P<0.01$,图 1A)。然后,我们检测了人胚胎肾正常细胞和 3 个不同的肾母细胞瘤细胞系中 LINC01006 的表达水平,结果如图 1B 所示,与正常细胞系相比,肾母细胞瘤细胞系中 LINC01006 的表达水平显著降低。

2.2 过表达 LINC01006 可以抑制肾母细胞瘤细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡

分别通过 CCK-8、BrdU、Transwell 侵袭实验和 Annexin V-FITC/PI 染色实验检测过表达和干扰 LINC01006 之后肾母细胞瘤细胞的活力、增殖、侵袭和凋亡能力。腺病毒载体过表达 LINC01006 以及 si-RNA 干扰的效果见图 2A。CCK-8 结果显示过表达 LINC01006 可以降低肾母细胞瘤细胞的存活率($P<0.05$,图 2B)。BrdU 结果显示过表达 LINC01006 可以抑制肾母细胞瘤细胞的增殖($P<0.01$,图 2C)。Transwell 实验结果显示,过表达 LINC01006 后,肾母细胞瘤细胞的侵袭能力减弱($P<0.05$,图 2D)。图 2E 显示过表达 LINC01006 可以促进肾母细胞瘤细胞的凋亡。以上结果说明,LINC01006 可以抑制肾母细胞瘤细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡。

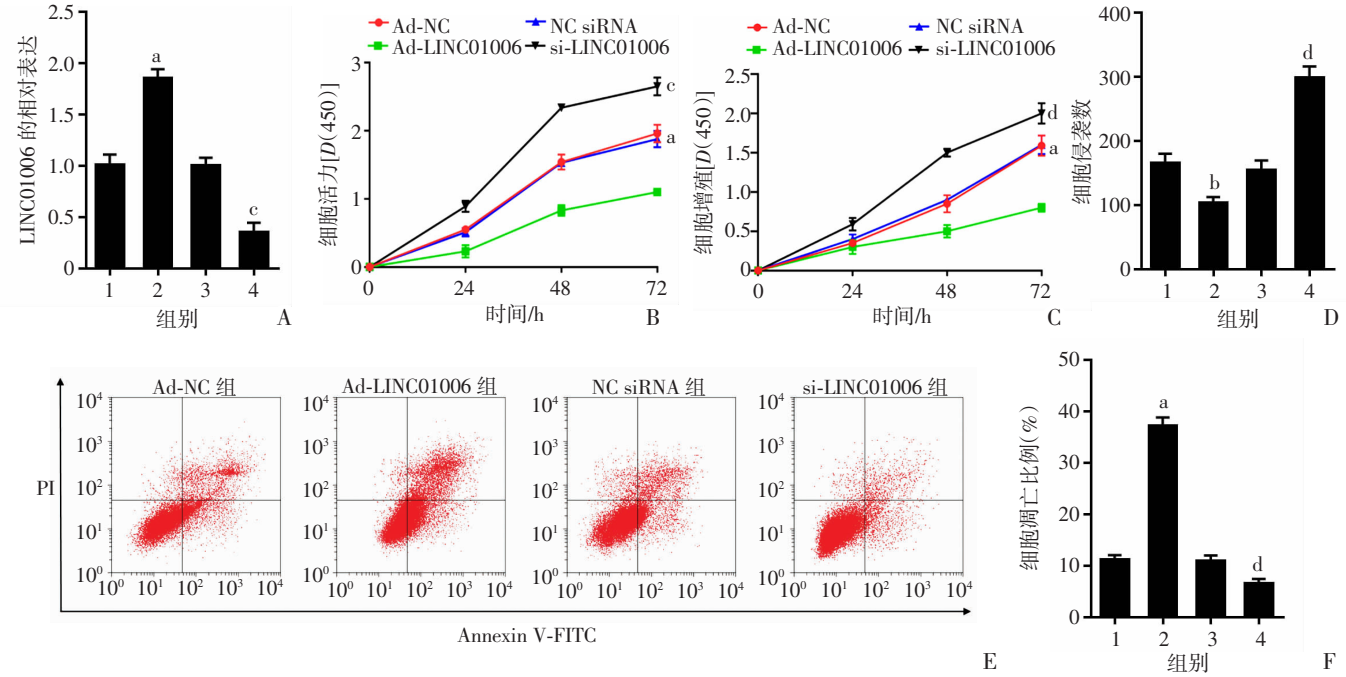
2.3 LINC01006 与 miR-148a-3p 直接结合

通过生物信息学分析预测得到 LINC01006 与 miR-148a-3p 直接结合(图 3A)。如图 3B 所示构建野生型(WT)和突变型(MUT)载体进行双荧光素酶报告基因实验,结果显示 miR-148a-3p 抑制 LINC01006-WT 的荧光素酶活性($P<0.01$),不影响 LINC01006-MUT 的活性(图 3C)。与对照相比,生物素化的 miR-148a-3p 使 LINC01006 的表达增加(图 3D)。图 3E 显示过表达 LINC01006 之后,miR-148a-3p 的相对表达量下降,而干扰 LINC01006 之后,miR-148a-3p 的相对表达量升高($P<0.01$)。以上结果说明,LINC01006 在肾母细胞瘤细胞中可直接与 miR-148a-3p 结合发挥作用。



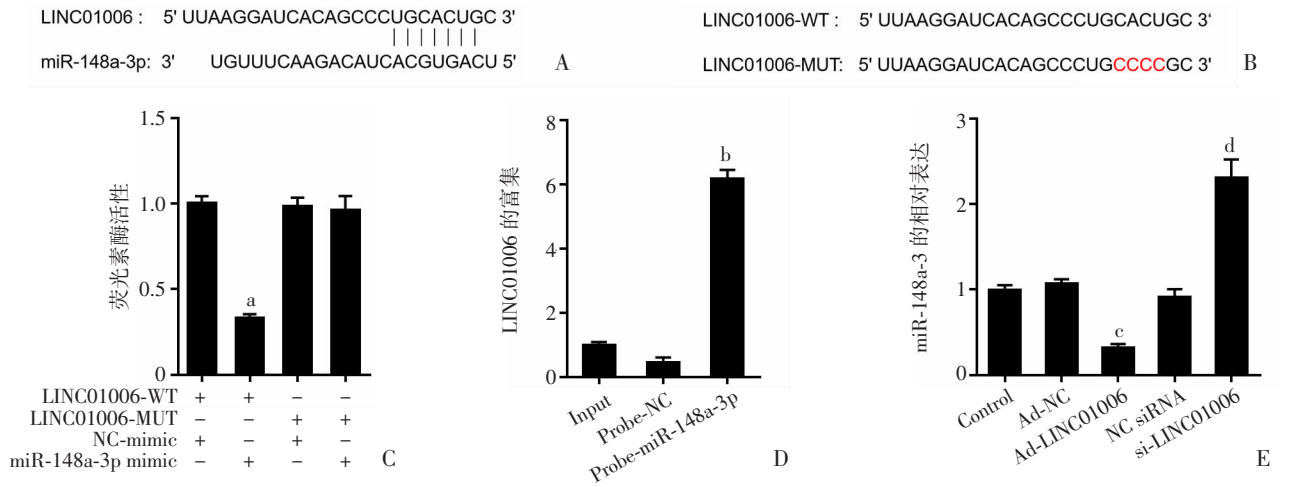
A:肾母细胞瘤组织 a:$P<0.01$,与瘤旁组织比较;B:不同细胞系 1:CCC-HEK-1;2:SK-NEP-1;3:G-401;4:WT-CLS1 a:$P<0.01$,与 CCC-HEK-1 比较,b:$P<0.05$,细胞系之间比较

图 1 肾母细胞瘤组织及细胞系中 LINC01006 的相对表达量



A：LINC01006 过表达与干扰效果的鉴定；B：LINC01006 对肾母细胞瘤细胞活性的影响；C：LINC01006 对肾母细胞瘤细胞增殖的影响；D：LINC01006 对肾母细胞瘤细胞侵袭的影响；E、F：LINC01006 对肾母细胞瘤细胞凋亡的影响与统计结果　1：Ad-NC 组；2：Ad-LINC01006 组；3：NC siRNA 组；4：si-LINC01006 组　a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 Ad-NC 组比较；c：$P<0.01$，d：$P<0.05$，与 NC siRNA 组比较

图 2　LINC01006 对肾母细胞瘤细胞增殖、侵袭能力及凋亡的影响

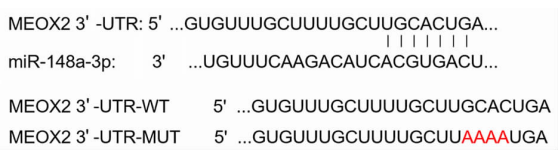


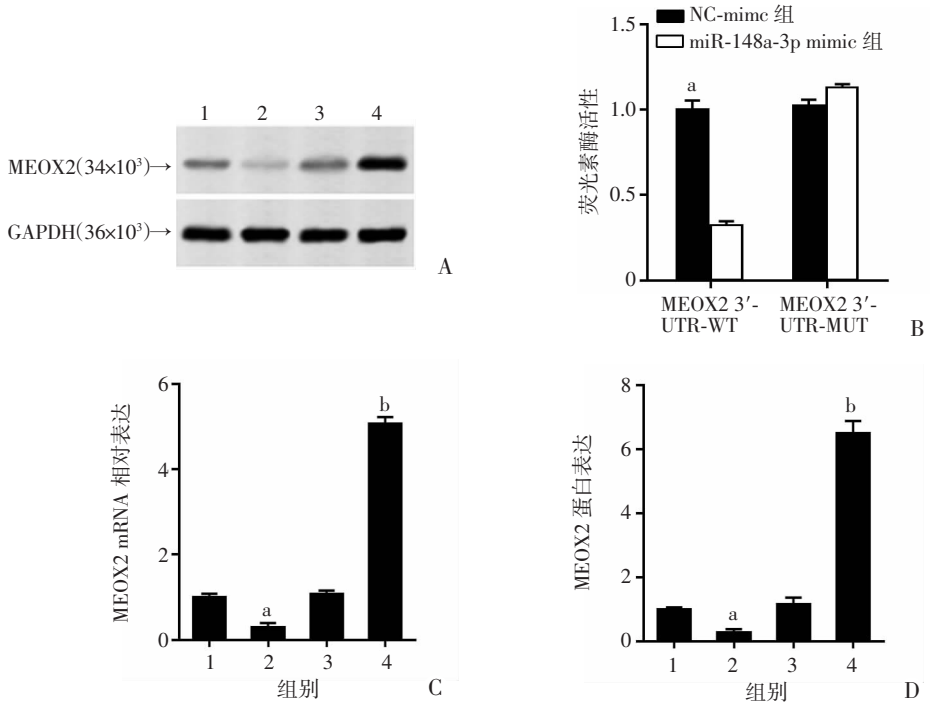
A：LINC01006 与 miR-148a-3p 结合的区域；B：LINC01006 序列中与 miR-148a-3p 结合的野生型(WT)序列及突变型(MUT)序列；C：双荧光素酶报告基因实验检测荧光素酶活性的变化；D：RNA Pull-down 实验进一步验证 LINC01006 与 miR-148a-3p 直接结合；E：LINC01006 对 miR-148a-3p 表达的影响　a：$P<0.01$，与 NC-mimic 组比较；b：$P<0.001$，与 Probe-NC 组比较；c：$P<0.01$，与 Ad-NC 组比较；d：$P<0.01$，与 NC siRNA 组比较

图 3　LINC01006 直接与 miR-148a-3p 结合

2.4　MEOX2 是 miR-148a-3p 的靶基因

通过生物信息学分析预测得到 MEOX2 是 miR-148a-3p 的靶基因，miR-148a-3p 与 MEOX2 3′-UTR 互补序列如下。





A：双荧光素酶报告基因实验检测结果；B：荧光素酶活性检测结果；C：MEOX2 mRNA 相对表达量分析；D：MEOX2 蛋白定量分析　1：NC-mimic 组；2：miR-148a-3p mimic 组；3：NC-antagomir 组；4：miR-148a-3p antagomir 组　a：$P<0.05$，与 NC-mimic 组比较；b：$P<0.01$，与 NC-antagomir 组比较

图 4　miR-148a-3p 靶向 MEOX2 的 3′-UTR

miR-148a-3p mimic 降低了野生型（WT）MEOX2 3′-UTR 报告载体的荧光素酶活性，而对突变型（MUT）没有影响（$P<0.05$，图 4A、B）。过表达、干扰 miR-148a-3p 之后发现其对 MEOX2 的表达起负向调节作用（$P<0.01$，图 4C、D）。

2.5　MEOX2 在肾母细胞瘤中抑制 PI3K/Akt 信号通路的活性

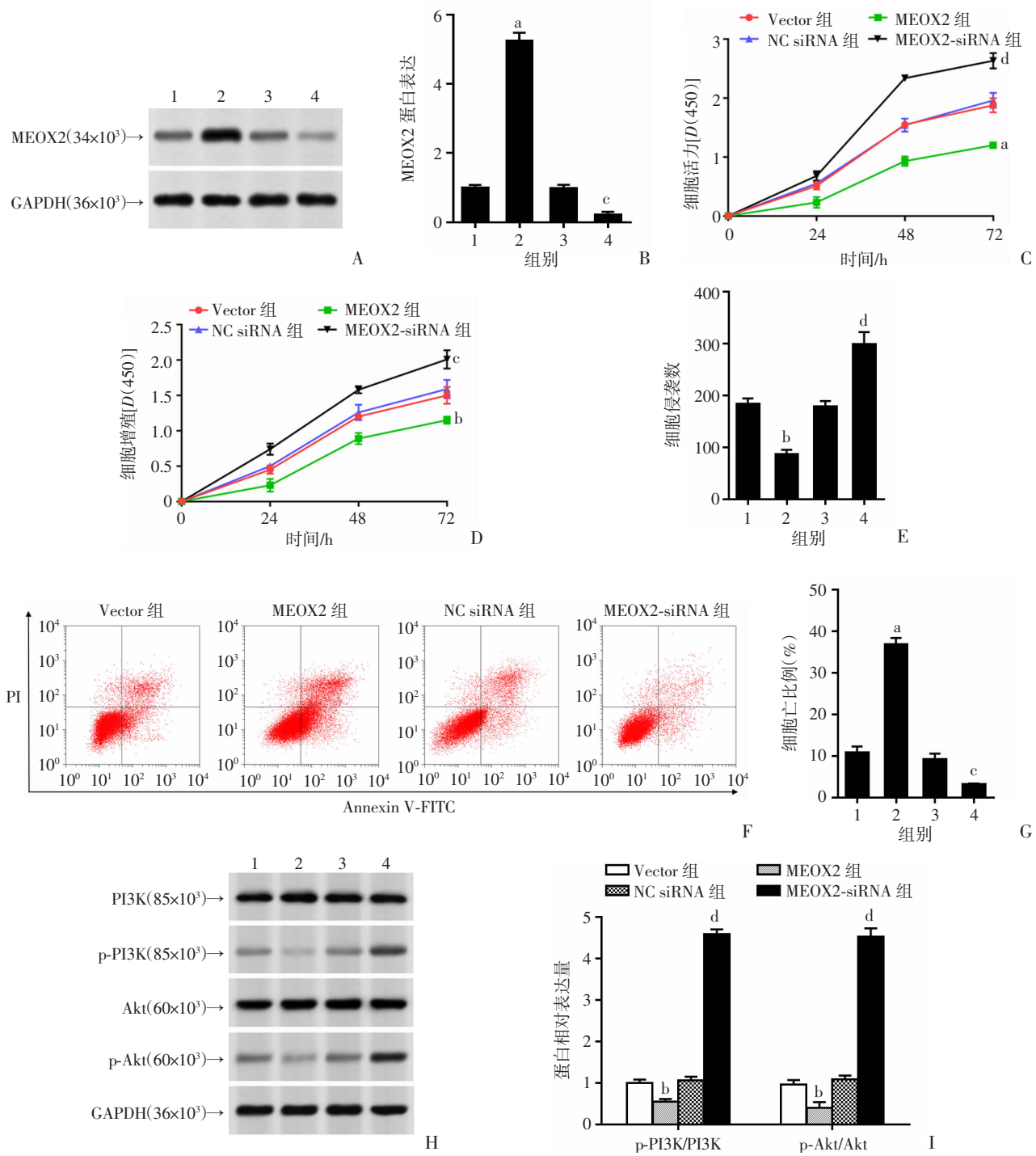
SK-NEP-1 细胞系转染 MEOX2 过表达载体或 si-RNA 48 h 之后通过 Western blot 检测其作用效果（图 5A）。分别检测过表达和干扰 MEOX2 之后细胞的活力、增殖、侵袭和凋亡能力，结果显示过表达 MEOX2 可以抑制肾母细胞瘤细胞的活力、增殖和侵袭（$P<0.01$，图 5B～D），促进细胞凋亡（$P<0.01$，图 5E）。Western blot 检测结果显示，过表达 MEOX2 可以抑制 PI3K/Akt 通路的活性，导致 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达显著降低（$P<0.01$，图 5F）。

2.6　LINC01006 通过与 miR-148a-3p 相互作用来促进 MEOX2 的表达进而抑制 PI3K/Akt 信号通路的活性，抑制肾母细胞瘤细胞的增殖和侵袭，促进细胞凋亡

过表达 LINC01006 可以促进 MEOX2 的表达，共同转染 miR-148a-3p mimic 之后可以减弱其促进作用（图 6A）。同样地，miR-148a-3p mimic 可以减弱 LINC01006 对 PI3K/Akt 信号通路活性，对细胞活力、增殖和侵袭能力的抑制作用以及其促细胞凋亡作用（$P<0.01$，图 6B～F）。以上结果说明，LINC01006 通过竞争性结合 miR-148a-3p，减弱 miR-148a-3p 对靶基因 MEOX2 的抑制作用，从而促进其表达，增强对 PI3K/Akt 信号通路活性的抑制作用，进而抑制肾母细胞瘤细胞的增殖和侵袭能力，促进细胞凋亡。

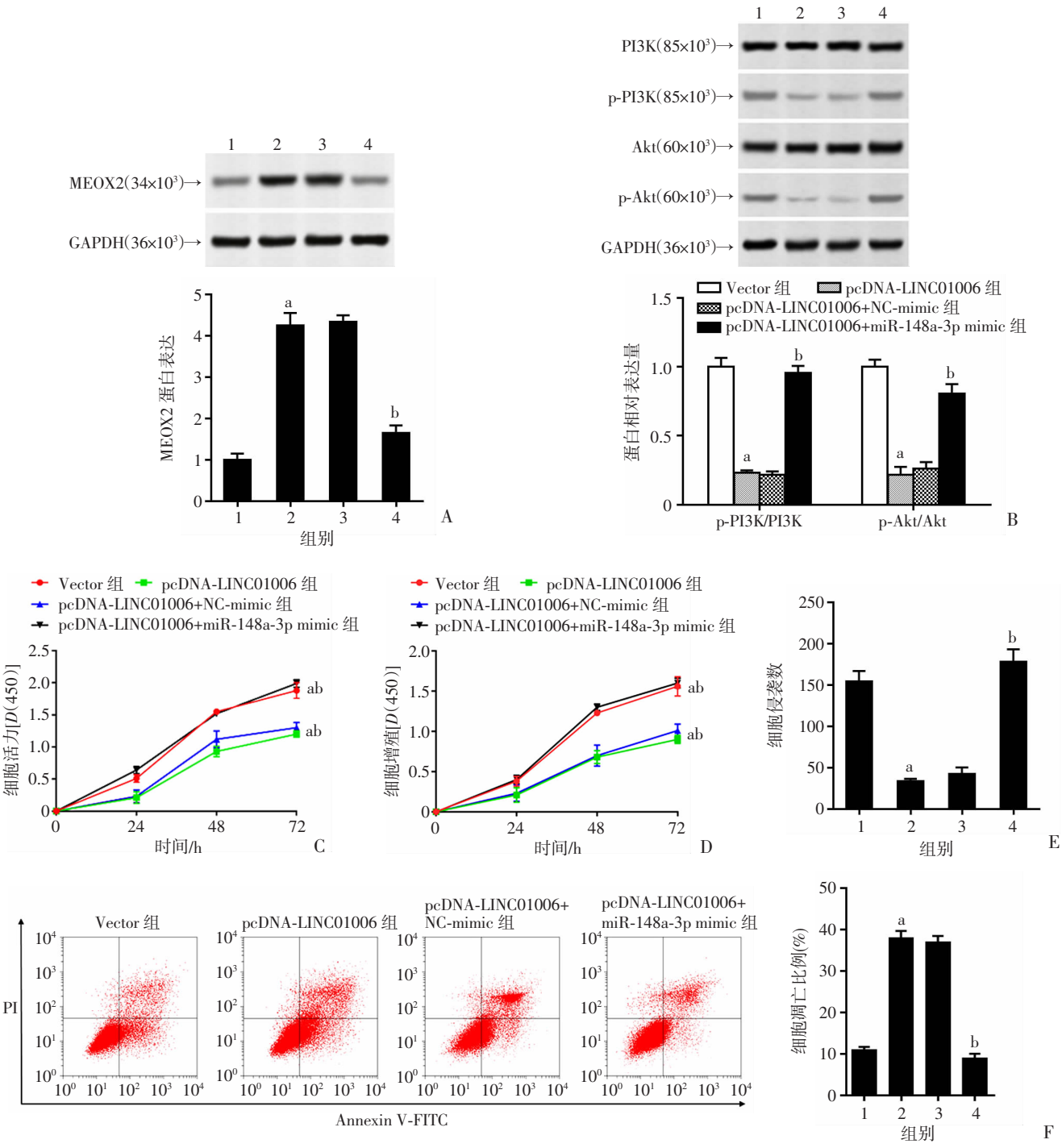
2.7　LINC01006 能抑制裸鼠体内移植瘤的生长

裸鼠接种转染腺病毒空载体和 LINC01006 腺病毒过表达载体的 SK-NEP-1 细胞后，建立肾母细胞瘤皮下移植瘤模型。监测肿瘤体积可以发现 Control 组与 Vector 组移植瘤体积显著增大，两者差异无统计学意义；Ad-LINC01006 组瘤体体积变化最小（$P<0.01$，图 7A）。处死小鼠之后，测量其瘤质量发现，Ad-LINC01006 组瘤质量最轻（$P<0.01$，图 7B）。RT-qPCR 及 Western blot 检测结果显示 Ad-LINC01006 组肾母细胞瘤组织中 LINC01006、MEOX2 表达上调，miR-148a-3p、p-PI3K、p-Akt 的表达下调（$P<0.01$，图 7C～F）。



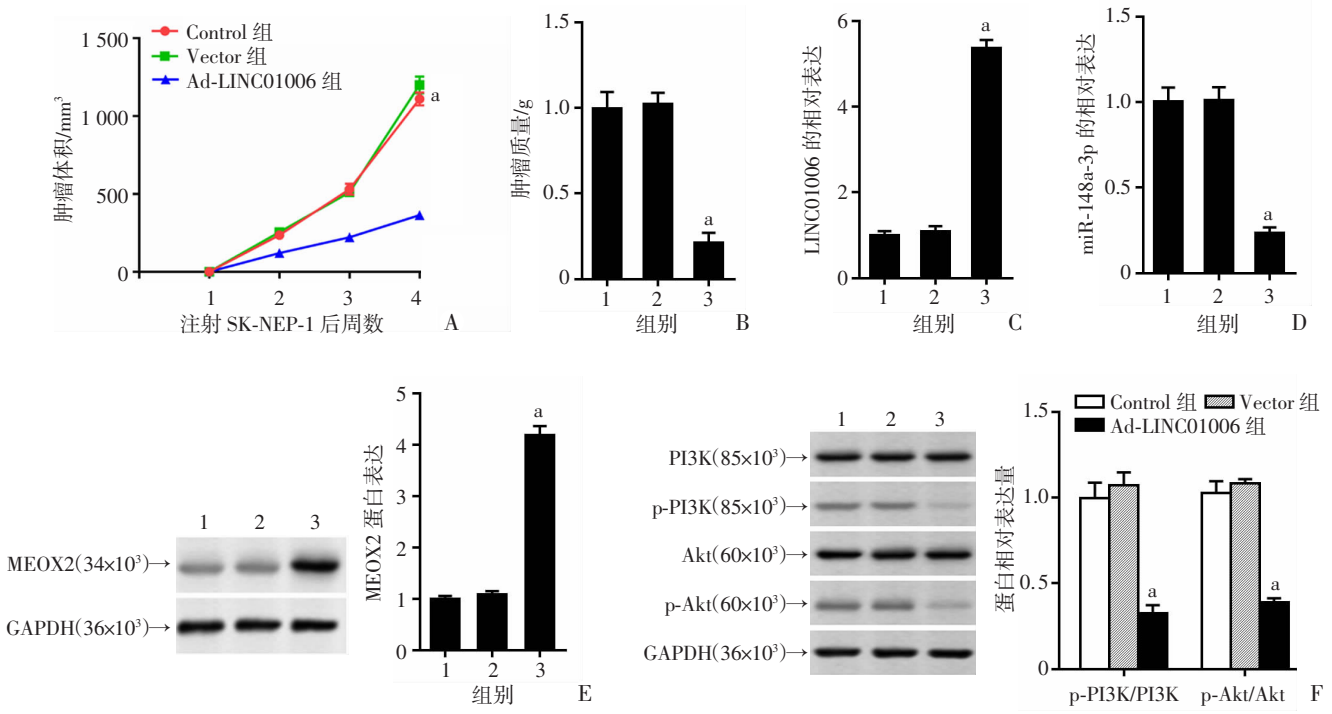
A:MEOX2 过表达与干扰效果的鉴定与统计结果;B~G:MEOX2 对肾母细胞瘤细胞活力、增殖、侵袭和凋亡的影响;H~I: Western blot 检测 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达与半定量分析 1:Vector;2:MEOX2;3:NC siRNA;4:MEOX2-siRNA;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 Vector 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 NC siRNA 组比较

图 5 MEOX2 对肾母细胞瘤细胞中 PI3K/Akt 信号通路的影响



A:Western blot 检测 MEOX2 的表达;B:Western blot 检测 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达;C~F:分别为 CCK-8 法、BrdU 法、Transwell 侵袭实验、Annexinv/PI 染色法分别检测细胞活力、增殖、侵袭和凋亡能力的变化 1:Vector 组;2:pcDNA-LINC01006 组;3:pcDNA-LINC01006+NC-mimic 组;4:pcDNA-LINC01006+miR-148a-3p mimic 组;a:$P<0.01$,与 Vector 组比较;b:$P<0.01$,与 pcDNA-LINC01006+NC-mimic 组比较

图 6 LINC01006 与 miR-148a-3p 相互作用通过 MEOX2/PI3K/Akt 途径影响肾母细胞瘤细胞的增殖、侵袭和凋亡



A:各组不同时间移植瘤体积变化;B:接种第 28 天裸鼠瘤质量;C~F: RT-qPCR 及 Western blot 检测移植瘤组织中 LINC01006、miR-148a-3p、MEOX2、p-PI3K 和 p-Akt 的表达 1:Control 组;2:Vector 组;3:Ad-LINC01006 组; a:$P<0.01$,与 Vector 组比较

图 7 LINC01006 抑制裸鼠体内移植瘤的生长

3 讨论

肾母细胞瘤是婴幼儿泌尿系统最常见的恶性肿瘤,随着近年来治疗方案的不断改进,生存率有所提高[5]。但对该病进行早期诊断和治疗的研究及应用比较滞后,因此找到其有效标记物,提高诊疗水平成为当前社会关注的主要问题[6]。LncRNAs 在各种生命活动过程中扮演着重要角色,例如在细胞周期、增殖、凋亡和侵袭过程中发挥重要作用[7]。其中 lincRNA 在基因表达中发挥关键的调控作用,尤其是在邻近基因之间[8]。研究表明 LINC01006 与肥胖相关[9],其可以通过调节体质量,对体质指数(BMI)进行调整,减弱 LINC01006 与骨关节炎(OA)之间的联系[3]。有研究表明 LINC01006 在胰腺癌组织和细胞中表达上调,其可以通过 miR-2682-5p/HOXB8 轴促进胰腺癌细胞的增殖和转移[10]。还有研究表明 LINC01006 在胃癌组织和细胞系中表达降低,其表达水平与年龄、肿瘤位置和肿瘤大小有关[4]。然而,LINC01006 在肾母细胞瘤中的功能研究较少。本研究检测了肾母细胞瘤组织、细胞系中 LINC01006 的表达。之后过表达和敲低 LINC01006,检测细胞增殖、侵袭及凋亡能力的变化,结果显示 LINC01006 在肾母细胞瘤中表达下调,过表达 LINC01006 可以抑制肾母细胞瘤细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡。

研究证明 lncRNAs 可作为 miRNAs 的“分子海绵”发挥作用,调控癌症的发生、发展[11]。miRNAs 是一种内源性非编码 RNA,长度为 18~25 个核苷酸,其在病理和生理过程中起调节作用[12]。miRNAs 可以在转录水平抑制靶基因的表达,起到癌基因或抑癌基因的作用[13]。我们通过生物信息学分析发现,LINC01006 序列中包含 miR-148a-3p 的结合位点,miR-148a-3p 可以直接靶向 MEOX2,随后通过双荧光素酶报告基因实验和 RNA Pull-down 实验对预测结果进行了验证。通过以往研究发现在不同的肿瘤类型中,miR-148 可以作为癌基因,也可以作为肿瘤抑制因子发挥作用。在食管鳞状细胞癌(ESCC)患者中,miR-148 的下调与生存期的显著缩短相关。在食管腺癌(EAC)中却发现 miR-148 上调之后,患者的生存期明显缩短,表明 miR-148 在 EAC 和 ESCC 中的功能相反[14]。有研究表明 miR-148a 在卵巢癌细胞株中表达下调,过表达 miR-148a 可以明显抑制细胞增殖[15]。miR-148 在胃癌中也发挥抑癌作用[16-18]。还有研究表明 miR-148a 在肝细胞癌(HCC)、脊索瘤、喉鳞状细胞癌(LSCC)组织中表达上调[19-21]。miR-148a 在骨肉瘤组织中的表达显著增加,可以促进 PI3K 信号通路的激活而发挥促肿瘤作用[22]。另外,miR-148a 的高表达可以促进胶质母

细胞瘤细胞的生长、存活、迁移和侵袭[23-24]。我们在肾母细胞瘤细胞中发现过表达 LINC01006 和敲低 miR-148a-3p 均能显著提高 MEOX2 的表达,从而初步表明 LINC01006 通过作为 miR-148a-3p 的"分子海绵"来调控 MEOX2 的表达。

有研究表明 MEOX2 在多种疾病中发挥重要作用,其在肺癌[25]、喉癌[26]和肾母细胞癌[27]等多种癌症中发挥抑癌作用。MEOX2 可以通过抑制血管生成和 Wnt 信号通路的激活抑制肾母细胞癌的发展[27]。MEOX2 可以阻滞细胞周期,诱导细胞凋亡,抑制血管周围脂肪细胞(PVAC)的增殖,还可以抑制 ERK1/2 和 Akt1/2 信号通路的激活[28]。MEOX2 在喉癌组织中的表达水平低于正常组织,其可以通过抑制 PI3K/Akt 途径抑制细胞活性,促进细胞凋亡[26]。PI3K 是脂肪细胞生物活性特定的信号传导途径,会影响细胞的增殖和分化[29]。Akt 影响脂肪生成,通过影响细胞周期来促进增殖[30],Akt 的活化可以抑制细胞凋亡,增强细胞代谢[31]。PI3K/Akt 信号通路参与抗凋亡机制的激活、葡萄糖代谢和蛋白质合成,促进生物体内细胞的生长和增殖[32],其异常激活与大多数癌症的进展密切相关[33-35]。本研究发现 MEOX2 可以抑制 PI3K/Akt 通路的活性,进而抑制肾母细胞瘤细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡。另外,体内实验表明过表达 LINC01006 能抑制移植瘤的生长。

本研究发现 LINC01006 在肾母细胞瘤组织及细胞中呈低表达。过表达 LINC01006 可以抑制肾母细胞瘤细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡。作用机制可能是 LINC01006 通过与 miR-148a-3p 相互作用,促进 MEOX2 的表达,进而阻断 PI3K/Akt 通路的活性,抑制肾母细胞瘤细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡,抑制肿瘤的生长。

参考文献:

[1] VERSCHUUR A C, VUJANIC G M, VAN TINTEREN H, *et al*. Stromal and epithelial predominant Wilms tumours have an excellent outcome: The SIOP 93 01 experience[J]. Pediatr Blood Cancer, 2010, 55(2): 233-238. DOI: 10.1002/pbc.22496.

[2] GUTSCHNER T, DIEDERICHS S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view[J]. RNA Biol, 2012, 9(6): 703-719. DOI: 10.4161/rna.20481.

[3] LIU Y F, YAU M S, YERGES-ARMSTRONG L M, *et al*. Genetic determinants of radiographic knee osteoarthritis in African Americans[J]. J Rheumatol, 2017, 44(11): 1652-1658. DOI: 10.3899/jrheum.161488.

[4] ZHU X Q, CHEN F, SHAO Y F, *et al*. Long intergenic non-protein coding RNA 1006 used as a potential novel biomarker of gastric cancer[J]. Cancer Biomark, 2017, 21(1): 73-80. DOI: 10.3233/CBM-170273.

[5] ISRAELS T, PIDINI D, BORGSTEIN E, *et al*. Survival of children with a wilms tumor in Blantyre, Malawi[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2018, 35(3): 196-202. DOI: 10.1080/08880018.2018.1498564.

[6] VUJANIĆ G M, D'HOOGHE E, POPOV S D, *et al*. The effect of preoperative chemotherapy on histological subtyping and staging of Wilms tumors: The United Kingdom Children's Cancer Study Group (UKCCSG) Wilms tumor trial 3 (UKW3) experience[J]. Pediatr Blood Cancer, 2019, 66(3): e27549. DOI: 10.1002/pbc.27549.

[7] PONTING C P, OLIVER P L, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 629-641. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.006.

[8] QUINN J J, CHANG H Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(1): 47-62. DOI: 10.1038/nrg.2015.10.

[9] WU Y L, WANG W J, JIANG W J, *et al*. An investigation of obesity susceptibility genes in Northern Han Chinese by targeted resequencing[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(7): e6117. DOI: 10.1097/MD.0000000000006117.

[10] ZHANG L Y, WANG Y J, ZHANG L, *et al*. LINC01006 promotes cell proliferation and metastasis in pancreatic cancer *via* miR-2682-5p/HOXB8 Axis[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 320. DOI: 10.1186/s12935-019-1036-2.

[11] TAY Y, RINN J, PANDOLFI P P. The multilayered complexity of Cerna crosstalk and competition[J]. Nature, 2014, 505(7483): 344-352. DOI: 10.1038/nature12986.

[12] HA M J, KIM V N. Regulation of microRNA biogenesis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(8): 509-524. DOI: 10.1038/nrm3838.

[13] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.002.

[14] HEZOVA R, KOVARIKOVA A, SROVNAL J, *et al*. Diagnostic and prognostic potential of miR-21, miR-29c, miR-148 and miR-203 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of esophagus[J]. Diagn Pathol, 2015, 10: 42. DOI: 10.1186/s13000-015-0280-6.

[15] ZHOU X, ZHAO F, WANG Z N, *et al*. Altered expression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation[J]. Oncol Rep, 2012, 27(2): 447-454. DOI: 10.3892/or.2011.1482.

[16] SAKAMOTO N, NAITO Y, OUE N, *et al*. MicroRNA-148a is downregulated in gastric cancer, targets MMP7, and indicates tumor invasiveness and poor prognosis[J]. Cancer

Sci, 2014, 105(2): 236-243. DOI: 10.1111/cas.12330.
[17] WANG S H, LI X, ZHOU L S, *et al*. MicroRNA-148a suppresses human gastric cancer cell metastasis by reversing epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Tumour Biol, 2013, 34(6): 3705-3712. DOI: 10.1007/s13277-013-0954-1.
[18] YU B Q, LV X, SU L P, *et al*. MiR-148a functions as a tumor suppressor by targeting CCK-BR *via* inactivating STAT3 and akt in human gastric cancer[J]. PLoS ONE, 2016, 11(8): e0158961. DOI: 10.1371/journal.pone.0158961.
[19] HUANG Y S, DAI Y, YU X F, *et al*. Microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma and nontumorous tissues without viral hepatitis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(1): 87-94. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05223.x.
[20] BAYRAK O F, GULLUOGLU S, AYDEMIR E, *et al*. MicroRNA expression profiling reveals the potential function of microRNA-31 in chordomas[J]. J Neurooncol, 2013, 115(2): 143-151. DOI: 10.1007/s11060-013-1211-6.
[21] WU Y, YU J, MA Y N, *et al*. MiR-148a and miR-375 may serve as predictive biomarkers for early diagnosis of laryngeal carcinoma[J]. Oncol Lett, 2016, 12(2): 871-878. DOI: 10.3892/ol.2016.4707.
[22] ZHANG H, WANG Y, XU T M, *et al*. Increased expression of microRNA-148a in osteosarcoma promotes cancer cell growth by targeting PTEN[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 3208-3214. DOI: 10.3892/ol.2016.5050.
[23] KIM J, ZHANG Y, SKALSKI M, *et al*. MicroRNA-148a is a prognostic oncomiR that targets MIG6 and BIM to regulate EGFR and apoptosis in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2014, 74(5): 1541-1553. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1449.
[24] CUI D M, SAJAN P, SHI J L, *et al*. MiR-148a increases glioma cell migration and invasion by downregulating GADD45A in human gliomas with IDH1 R132H mutations[J]. Oncotarget, 2017, 8(15): 25345-25361. DOI: 10.18632/oncotarget.15867.
[25] CAO G, HUANG B, LIU Z, *et al*. Intronic miR-301 feedback regulates its host gene, ska2, in A549 cells by targeting MEOX2 to affect ERK/CREB pathways[J]. Biochem Biophys Res Comm, 2010, 396(4): 978-982. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.037.
[26] TIAN L, TAO Z Z, YE H P, *et al*. Over-expression of MEOX2 promotes apoptosis through inhibiting the PI3K/Akt pathway in laryngeal cancer cells[J]. Neoplasma, 2018, 65(5): 745-752. DOI: 10.4149/neo_2018_171218N824.
[27] OHSHIMA J, HARUTA M, ARAI Y, *et al*. Two candidate tumor suppressor genes, MEOX2 and SOSTDC1, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor[J]. Gene Chromosome Cancer, 2009, 48(12): 1037-1050. DOI: 10.1002/gcc.20705.
[28] LIU P, KONG F, WANG J, *et al*. Involvement of IGF-1 and MEOX2 in PI3K/Akt1/2 and ERK1/2 pathways mediated proliferation and differentiation of perivascular adipocytes[J]. Exp Cell Res, 2015, 331(1): 82-96. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.09.011.
[29] KWAK D H, LEE J H, KIM D G, *et al*. Inhibitory effects of hwangryunhaedok-Tang in 3T3-L1 adipogenesis by regulation of raf/MEK1/ERK1/2 pathway and PDK1/akt phosphorylation[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 413906. DOI: 10.1155/2013/413906.
[30] CLEVELAND-DONOVAN K, MAILE L A, TSIARAS W G, *et al*. IGF-I activation of the AKT pathway is impaired in visceral but not subcutaneous preadipocytes from obese subjects[J]. Endocrinology, 2010, 151(8): 3752-3763. DOI: 10.1210/en.2010-0043.
[31] TSUCHIYA A, KANNO T, NISHIZAKI T. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway[J]. J Endocrinol, 2014, 220(1): 49-59. DOI: 10.1530/JOE-13-0172.
[32] CHIAPPINI P B O, DE MEDEIROS I U D, LIMA L G C, *et al*. Prognostic implications of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway activation in gastric carcinomas[J]. Arch Med Sci, 2017, 13(6): 1262-1268. DOI: 10.5114/aoms.2016.60394.
[33] LIU Z, WANG F, ZHOU Z W, *et al*. Alisertib induces G_2/M arrest, apoptosis, and autophagy via PI3K/Akt/mTOR- and p38 MAPK-mediated pathways in human glioblastoma cells[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3): 845-873.
[34] WANG H, DENG X B, ZHANG J S, *et al*. Elevated expression of zinc finger protein 703 promotes cell proliferation and metastasis through PI3K/AKT/GSK-3β signalling in oral squamous cell carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(3): 920-934. DOI: 10.1159/000485360.
[35] GARCÍA-CARRACEDO D, VILLARONGA M Á, ÁLVAREZ-TEIJEIRO S, *et al*. Impact of PI3K/AKT/mTOR pathway activation on the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinomas[J]. Oncotarget, 2016, 7(20): 29780-29793. DOI: 10.18632/oncotarget.8957.

(收稿:2019-12-31;修回:2020-03-13)
(编辑 黄 超)