DOI:10.16016/j.1000-5404.202006247

LINC00525 靶向 miR-338-3p 促进胃癌细胞凋亡和降低其耐药性

孙玉成,刘晓巍,于红雷 133000 吉林延吉,延边大学附属医院普外一科

[摘要] **目的** 研究 LINC00525 靶向 miR-338-3p 对胃癌细胞凋亡及耐药性的影响。**方法** 将紫杉醇耐药胃癌细胞(HGC-27/PTX)分为 si-NC 组、si-LINC00525 组、miR-NC 组、miR-338-3p 组、si-LINC00525+anti-miR-NC 组、si-LINC00525+anti-miR-338-3p 组。细胞计数试剂盒 8(cell counting kit 8, CCK-8)检测细胞存活率;实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 LINC00525 和 miR-338-3p 表达水平;蛋白质印迹(Western blot)法检测蛋白表达;Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡;Transwell 检测细胞迁移和侵袭;双荧光素酶报告实验验证 LINC00525 和 miR-338-3p 的靶向关系。**结果** HGC-27 和 HGC-27/PTX 细胞中 LINC00525 表达水平升高,miR-338-3p 表达水平降低。敲除 LINC00525 和过表达 miR-338-3p,caspase-3、P21、E-cadherin 表达水平升高,MMP-2 表达水平降低,细胞存活率降低,细胞凋亡率升高,细胞迁移、侵袭数降低。LINC00525 靶向调控 miR-338-3p,抑制 miR-338-3p 能减弱敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 的存活率、迁移、侵袭及凋亡的影响。**结论** 敲除 LINC00525 通过上调 miR-338-3p 表达抑制 HGC-27/PTX 细胞增殖、迁移和侵袭,促进胃癌细胞凋亡,降低胃癌细胞对紫杉醇的耐药性。

[关键词] LINC00525;miR-338-3p;胃癌细胞;增殖;迁移;侵袭;凋亡;耐药性
[中图法分类号] R73-362; R735.2; R915 [文献标志码] A

LINC00525 targeting miR-338-3p promotes apoptosis and reduces paclitaxel resistance in gastric cancer cells

SUN Yucheng, LIU Xiaowei, YU Honglei First Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji, Jilin Province, 133000, China

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of modulating the expression of LINC00525 targeting miR-338-3p on apoptosis and drug resistance of gastric cancer cells. **Methods** Paclitaxel-resistant gastric cancer cells (HGC-27/PTX) were transfected with si-NC, si-LINC00525, miR-NC, miR-338-3p, si-LINC00525+anti-miR-NC, or si-LINC00525+anti-miR-338-3p. Cell counting kit 8 (CCK-8) was used to determine the cell survival rate after the treatments. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to detect LINC00525 and miR-338-3p expression levels, and Western blotting was used to detect the protein expression in the cells. The changes in cell apoptosis and migration and invasion abilities were analyzed using annexin V-FITC/PI double staining and Transwell assays. Dual luciferase reporter assay was performed to verify the targeting relationship between LINC00525 and miR-338-3p. **Results** The expression of LINC00525 was increased and that of miR-338-3p was decreased in both in HGC-27 and HGC-27/PTX cells. Knocking down LINC00525 and overexpression of miR-338-3p significantly increased the expression of caspase-3, P21, and E-cadherin, lowered the expression of MMP-2, decreased the cell survival rate, increased the cell apoptotic rate, and suppressed cell migration and invasion. Dual luciferase reporter assay showed that LINC00525 was capable of regulating the targeted miR-338-3p, and inhibition of miR-338-3p obviously attenuated the effects of LINC00525 knockdown on the survival, migration, invasion, and apoptosis

[通信作者] 孙玉成,E-mail:ybyysyc@163.com

of HGC-27/PTX cells. **Conclusion** LINC00525 knockdown can inhibit the proliferation, migration and invasion, promote apoptosis and reduce paclitaxel resistance of HGC-27/PTX cells by up-regulating miR-338-3.

[**Key words**] LINC00525; miR-338-3p; gastric cancer cells; proliferation; migration; invasion; apoptosis; drug resistance

Corresponding author: SUN Yucheng, E-mail: ybyysyc@163.com

胃癌是消化系统恶性肿瘤,化疗是其主要治疗方式之一。紫杉醇是胃癌化疗常用药物,耐药性的产生会严重限制其疗效,是治疗失败的重要原因。研究胃癌的耐药机制,降低化疗药物的多药耐性,对胃癌患者治疗和预后具有重要意义[1-2]。研究发现,长链非编码RNA和微小RNA均与胃癌的诊断、预后及耐药密切相关[3-4]。研究报道抑制lncRNA UCA1通过上调miR-27b表达增强了胃癌细胞对阿霉素、顺铂、5-氟尿嘧啶的敏感性[5]。过表达lncRNA MEG3可降低胃癌细胞活力并诱导细胞凋亡,增加顺铂的化疗敏感性[6]。长基因非蛋白质编码RNA 525(long intergenic non-protein coding RNA 525,LINC00525)是一种lncRNA,在非小细胞肺癌组织中上调表达,可作为非小细胞肺癌预后的有价值的生物标志物[7]。LINC00525高表达与结直肠癌患者预后不良有关,LINC00525通过靶向miR-507/ELK3轴增强了干细胞特性,并增强了结直肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性[8]。然而LINC00525对胃癌细胞凋亡及紫杉醇耐药性的影响及机制尚不清楚。有研究报道miR-338-3p在胃癌组织中低表达预示胃癌的不良预后[9]。miR-338-3p过表达减弱了胃癌细胞的迁移并促进了细胞凋亡,起到抑癌作用[10]。且有研究通过microRNA阵列鉴定胃癌患者敏感组和非敏感组之间差异表达的miRNA和miR-338-3p可作为鉴定敏感性的预测生物标志物[11]。miR-338-3p与结肠癌细胞的5-氟尿嘧啶耐药性有关[12]。本实验旨在研究LINC00525对胃癌细胞凋亡及紫杉醇耐药性的影响及其机制是否与miR-338-3p有关。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞(HGC-27)购自广州弗尔博生物科技有限公司;胎牛血清、RPMI-1640培养基购自广州硕恒生物科技有限公司;细胞计数试剂盒8(cell counting kit 8, CCK-8)购自北京利维平生物科技有限公司;Trizol试剂、cDNA合成试剂盒购自北京百奥创新科技有限公司;SYBR Green荧光定量试剂盒、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙锭(Annexin V-FITC/PI)双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海臻诺生物科技有限公司;Lipofectamine™ 2000转染试剂购自上海伯易生物科技有限公司;RIPA蛋白裂解液、二辛可宁酸(BCA)试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶快速配制试剂盒购自上海经科化学科技有限公司;Transwell小室、Matrigel胶购于上海翊圣生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 细胞培养及紫杉醇耐药胃癌细胞的建立

实验利用浓度为10%的胎牛血清RPMI-1640培养基,针对人类胃癌细胞开展培养。具体环境为5%二氧化碳、温度设定为37 ℃。用逐步递增紫杉醇浓度、间歇作用体外诱导法建立紫杉醇耐药胃癌细胞。取对数生长期细胞HGC-27,用紫杉醇初始浓度为1 nmol/L培养,存活细胞用增加浓度的紫杉醇培养,同时每一浓度连续传代3次以稳定耐药特征,直至HGC-27细胞在紫杉醇浓度为150 nmol/L的培养基中可稳定传代培养,将该细胞命名为HGC-27/PTX。

1.3 细胞转染与分组

将si-NC、si-LINC00525、miR-NC、miR-338-3p转染至HGC-27/PTX细胞中分别记为si-NC组、si-LINC00525组、miR-NC组、miR-338-3p组;将si-LINC00525分别与anti-miR-NC、anti-miR-338-3p共转染至HGC-27/PTX细胞中,记为si-LINC00525+anti-miR-NC组、si-LINC00525+anti-miR-338-3p组。

1.4 细胞存活率检测

分别用0、1、2、4、8、16 nmol/L浓度的紫杉醇处理HGC-27和HGC-27/PTX细胞,检测其细胞存活率,将培养48 h的细胞,每孔中加入10 μL CCK-8试剂,孵育2 h后,应用酶标仪,于490 nm位置的D(490)值进行测定,测量细胞存活率,实验进行共计3次。其他各组细胞存活率按上述方法检测。

1.5 实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测LINC00525和miR-338-3p表达水平

提取细胞总RNA,反转录成cDNA。LINC00525和miR-338-3p分别以GAPDH和U6为内参进行PCR,

LINC00525 上游引物序列:5′-AGACCCTATGACTCCCG-3′,下游引物序列:5′-TTGGCAAGAAGCAAATC-3′;GAPDH 上游引物序列:5′-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3′,下游引物序列:5′-GCCATCACGCCACAGTTTC-3′;miR-338-3p 上游引物序列:5′-ACACTCCAGTGGGTCCAGCATCAGTGATTTT-3′,下游引物序列:5′-CTCAACTGGTGTCGTGGA-3′;U6 上游引物序列:5′-CGCTTCGGCAGCACATATACTA-3′,下游引物序列:5′-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-3′。

1.6 蛋白质印迹法测定 P21、caspase-3、E-cadherin、MMP-2 蛋白表达情况

针对各个组的细胞总蛋白进行提取处理,使用 BCA 试剂盒实施蛋白定量,每组蛋白进样量设定在 40 μg。完成 SDS-PAGE 处理之后,将蛋白转移到 PVDF 之上,利用脱脂后牛奶室温环境下封闭处理,时间在 90 min 左右。后加入一抗,利用 PBS 洗涤共计 3 次,在 4 ℃环境下孵育过夜处理。加入二抗,孵育处理 2 h,利用 PBS 洗涤处理共计 3 次。显影定影之后,使用相关软件对于蛋白条带灰度值加以测定,后把 GAPDH 条带、目的条带之比视为蛋白表达最终水平。

1.7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

小组细胞培养 48 h 之后使用事先预冷处理的 PBS 完成漂洗,共计 2 次。与 500 μL 的结合缓冲液混匀。先放入剂量为 10 μL Annexin V-FITC。在此之后放入剂量为 5 μL 的 PI,避光处理、混合均匀之后孵育处理,时间为 10 min。后对细胞凋亡率完成测定。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.8 细胞迁移以及侵袭测定

细胞侵袭实验步骤:在 Transwell 小室上室加入 100 μL 稀释好的 Matrigel 胶,加完后十字摇匀,在 37 ℃培养箱放置 40 min 使之凝固。在 Transwell 小室上室加 100 μL 细胞悬液,下室加 500 μL 含血清培养液,37 ℃培养 24 h,取出培养板,利用浓度为 0.1%的结晶紫染色处理 30 min,后应用 PBS 开展漂洗工作共计 2 次,去掉上层没有穿透基底膜细胞,择取 5 个视野,计数,进行 3 次实验。细胞迁移实验:除不用 Matrigel 胶包被 Transwell 小室的上室,其余与细胞侵袭实验操作相同。

1.9 双荧光素酶报告实验验证 LINC00525 和 miR-338-3p 靶向关系情况

应用 PCR 扩增法,全面处理 LINC00525 序列片段,并将其构建于荧光素酶表达载体以内,取得 LINC00525 野生型载体(WT-LINC00525),将 LINC00525 序列 GATGCTGG 突变为 CCAAGACA,获得 LINC00525 突变型载体(MUT-LINC00525),将 WT-LINC00525、MUT-LINC00525 分别与 miR-NC、miR-338-3p 共转染到 HGC-27 细胞之内,经转染 48 h 之后,依照试剂盒中的说明,全面测定荧光素酶活性度详情。将 si-NC、si-LINC00525、pcDNA3.1、pcDNA3.1-LINC00525 转染至 HGC-27 细胞中,按 1.5 中方法检测 miR-338-3p 表达水平。

1.10 统计学分析

实验数据经 SPSS 20.0 分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组比较行 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 HGC-27 及 HGC-27/PTX 对紫杉醇的敏感性

与未经紫杉醇处理组相比,不同浓度紫杉醇浓度处理组 HGC-27 细胞存活率均显著降低($P<0.05$);而不同浓度紫杉醇浓度的 HGC-27/PTX 细胞存活率无显著变化($P>0.05$,表 1)。说明 HGC-27/PTX 对紫杉醇不敏感,为紫杉醇耐药细胞。

表 1 HGC-27 及 HGC-27/PTX 对紫杉醇的敏感性($\bar{x}\pm s$,$n=9$)

紫杉醇浓度(nmol/L)	存活率(%)	
	HGC-27	HGC-27/PTX
0	100.00±10.00	99.89±10.01
1	91.13±9.26[a]	99.07±9.85
2	81.31±8.37[a]	98.46±9.78
4	63.04±6.11[a]	97.23±9.66
8	40.41±4.28[a]	96.10±9.51
16	33.06±3.25[a]	90.01±9.00
F	125.522	1.255
P	<0.001	0.2987

a:$P<0.05$,与 0 nmol/L 组比较

2.2 LINC00525、miR-338-3p 在 HGC-27、HGC-27/PTX 和 GES-1 中的表达

与人胃黏膜细胞 GES-1 相比,HGC-27 和 HGC-27/PTX 细胞中 LINC00525 表达水平升高,miR-338-3p 表达水平降低($P<0.05$);与 HGC-27 细胞相比,紫杉醇耐药细胞 HGC-27/PTX 中 LINC00525 表达水平升高,miR-338-3p 表达水平降低($P<0.05$,表 2)。

表 2 LINC00525、miR-338-3p 在 HGC-27、HGC-27/PTX 和 GES-1 中的表达($\bar{x}\pm s$,$n=9$)

细胞	LINC00525	miR-338-3p
GES-1	1.00±0.10	1.01±0.10
HGC-27	1.98±0.21[a]	0.36±0.03[a]
HGC-27/PTX	3.55±0.35[ab]	0.11±0.01[ab]
F	258.986	529.773
P	<0.001	<0.001

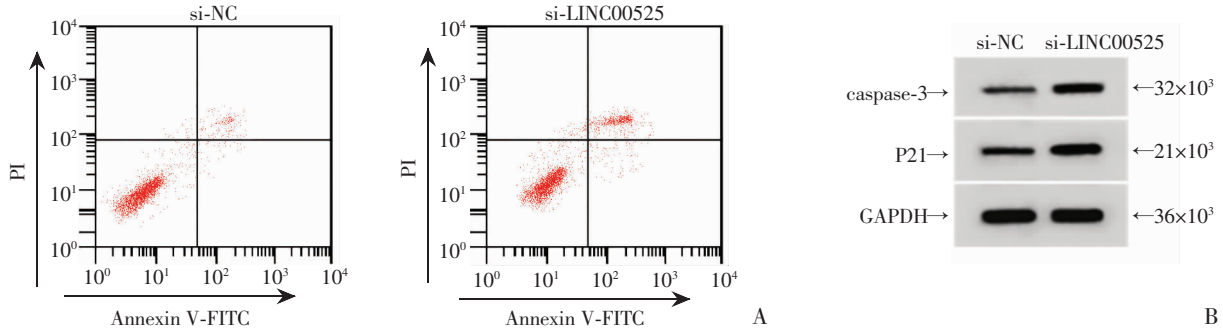
a:$P<0.05$,与 GES-1 组比较;b:$P<0.05$,与 HGC-27 组比较

2.3　敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 的细胞存活率、凋亡的影响

与 si-NC 组相比,si-LINC00525 组 HGC-27/PTX 细胞中 LINC00525 表达水平降低,caspase-3、P21 表达水平升高,细胞存活率降低,细胞凋亡率升高($P<0.05$,图 1,表 3)。

2.4　敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 的细胞迁移、侵袭的影响

与 si-NC 组相比,si-LINC00525 组 HGC-27/PTX 细胞中 E-cadherin 表达水平升高,MMP-2 表达水平降低,细胞迁移、侵袭数降低($P<0.05$,图 2,表 4)。



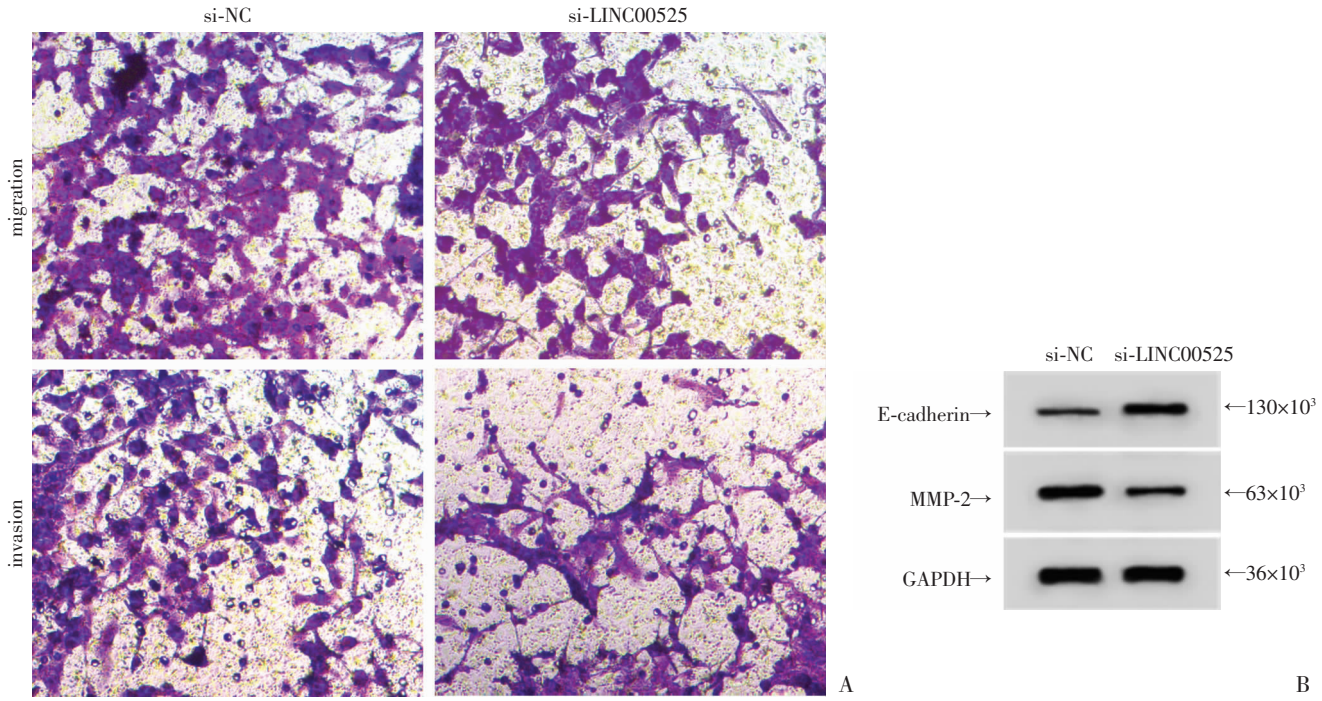
A:敲除 LINC00525 促进细胞 HGC-27/PTX 凋亡;B:敲除 LINC00525 促进 P21、caspase-3 蛋白的表达

图 1　敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 凋亡及 P21、caspase-3 蛋白表达的影响

表 3　敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 的细胞存活率、凋亡及 P21、caspase-3 蛋白的影响($\bar{x}\pm s$,$n=9$)

组别	LINC00525	caspase-3	P21	存活率(%)	凋亡率(%)
si-NC	0.98±0.10	0.10±0.01	0.20±0.02	100.01±10.02	8.91±1.01
si-LINC00525	0.31±0.03[a]	0.52±0.05[a]	0.61±0.06[a]	54.68±5.39[a]	23.26±1.68[a]
t	19.252	24.711	19.448	11.952	21.962
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.001	<0.001

a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较



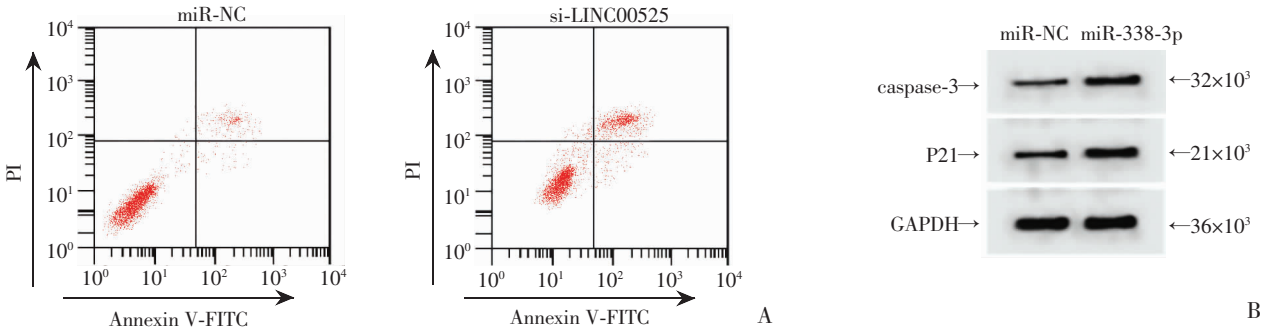
A:敲除 LINC00525 抑制细胞 HGC-27/PTX 的细胞迁移、侵袭(×200);B:敲除 LINC00525 促进 E-cadherin、抑制 MMP-2 蛋白的表达

图 2　敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 的细胞迁移、侵袭及 E-cadherin、MMP-2 蛋白表达的影响

表 4 敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 的迁移、侵袭及 E-cadherin、MMP-2 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

分组	E-cadherin	MMP-2	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)
si-NC	0.13±0.01	0.71±0.07	226.15±21.31	145.21±13.72
si-LINC00525	0.59±0.06[a]	0.19±0.02[a]	124.23±12.30[a]	69.12±7.02[a]
t	22.687	21.428	12.437	14.794
P	<0.05	<0.05	<0.001	<0.001

a：$P<0.05$，与 si-NC 组比较



A：过表达 miR-338-3p 促进细胞 HGC-27/PTX 凋亡；B：过表达 miR-338-3p 促进 P21、caspase-3 蛋白的表达

图 3 过表达 miR-338-3p 对细胞 HGC-27/PTX 凋亡及 P21、caspase-3 蛋白表达的影响

表 5 过表达 miR-338-3p 对细胞 HGC-27/PTX 的细胞存活率、凋亡及 P21、caspase-3 蛋白的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

分组	miR-338-3p	caspase-3	P21	存活率(%)	凋亡率(%)
miR-NC	1.01±0.10	0.11±0.01	0.21±0.02	100.00±10.03	8.84±1.00
miR-338-3p	3.44±0.31[a]	0.58±0.05[a]	0.76±0.07[a]	47.68±4.92[a]	25.16±1.94[a]
t	22.381	27.652	22.665	14.047	22.432
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.001	<0.001

a：$P<0.05$，与 miR-NC 组比较

2.5 过表达 miR-338-3p 对细胞 HGC-27/PTX 的细胞存活率、凋亡的影响

相较于 miR-NC 组而言，miR-338-3p 组的细胞内 HGC-27/PTX 细胞中 miR-338-3p 表达显著上升，P21 以及 caspase-3 表达水平明显偏高，细胞存活率下降（$P<0.05$，图 3，表 5）。

2.6 过表达 miR-338-3p 对细胞 HGC-27/PTX 的迁移、侵袭的影响

与 miR-NC 组相比，miR-338-3p 组 HGC-27/PTX 细胞中 E-cadherin 表达水平升高，MMP-2 表达水平降低，细胞迁移、侵袭数降低（$P<0.05$，图 4，表 6）。

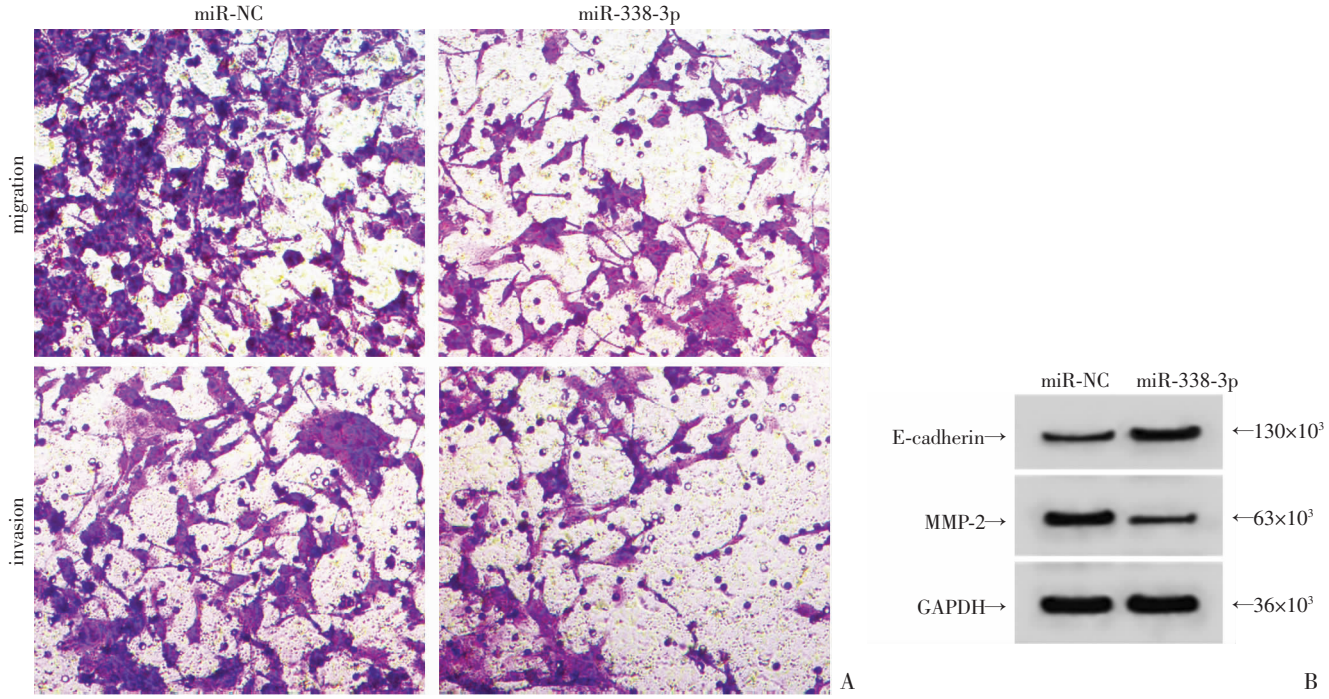
2.7 LINC00525 靶向、调控 miR-338-3p

Starbase 数据库预测显示 LINC00525 与 miR-338-3p 存在结合位点（图 5）。荧光素酶报告实验显示，与 miR-NC 组比较，miR-338-3p 组中转染野生型表达载体 WT-LINC00525 的细胞荧光素酶活性显著降低［(0.95±0.09) *vs* (0.16±0.01)，$P<0.05$］；而转染突变型表达载体 MUT-LINC00525 的细胞荧光素酶活性无显著差异［(0.97±0.09) *vs* (0.99±0.09)，$P>0.05$］。与 si-NC 组比较（1.01±0.10），si-LINC00525 组 miR-338-3p 表达水平（2.21±0.22）显著升高（$P<0.05$）；与 pcDNA3.1 组（1.00±0.10）比较，pcDNA3.1-LINC00525 组 miR-338-3p 表达水平（0.29±0.03）显著降低（$P<0.05$）。

表 6 过表达 miR-338-3p 对细胞 HGC-27/PTX 迁移、侵袭及 E-cadherin、MMP-2 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

分组	E-cadherin	MMP-2	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个
miR-NC	0.14±0.01	0.70±0.07	228.31±22.47	147.08±14.25
miR-338-3p	0.66±0.06[a]	0.11±0.01[a]	110.24±11.03[a]	61.20±6.11[a]
t	25.646	25.032	14.142	16.640
P	<0.05	<0.05	<0.001	<0.05

a：$P<0.05$，与 miR-NC 组比较



A:过表达 miR-338-3p 抑制细胞 HGC-27/PTX 的迁移、侵袭(×200);B:过表达 miR-338-3p 促进 E-cadherin、抑制 MMP-2 蛋白的表达

图 4 过表达 miR-338-3p 对细胞 HGC-27/PTX 的迁移、侵袭及 E-cadherin、MMP-2 蛋白表达的影响

表 7 抑制 miR-338-3p 能减弱敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 的细胞存活率、迁移、侵袭及凋亡的影响($\bar{x}\pm s$,$n=9$)

分组	miR-338-3p	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	存活率(%)	凋亡率(%)
si-LINC00525+anti-miR-NC	0.99±0.10	122.21±12.03	70.15±7.02	54.73±5.36	23.19±1.66
si-LINC00525+anti-miR-338-3p	0.28±0.03[a]	195.14±19.27[a]	121.27±12.03[a]	91.02±9.07[a]	11.07±1.10[a]
t	20.402	9.640	10.985	10.334	18.259
P	<0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a:$P<0.05$,与 si-LINC00525+anti-miR-NC 组比较

WT-LINC00525	5′	cccCAGTTTCATGGATGCTGGc	3′
miR-338-3p	3′	gttGTTTTAGTGACTACGACCt	5′
MUT-LINC00525	5′	cccCAGTTTCATGCCAAGACAc	3′

图 5 LINC00525 靶向 miR-338-3p

2.8 抑制 miR-338-3p 能减弱敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 的细胞存活率、迁移、侵袭及凋亡的影响

与 si-LINC00525+anti-miR-NC 组相比,si-LINC00525+anti-miR-338-3p 组 GC-27/PTX 细胞中 miR-338-3p 表达水平降低,细胞迁移、侵袭数升高,细胞存活率升高,细胞凋亡率降低,caspase-3、P21、E-cadherin 表达水平降低,MMP-2 表达水平升高($P<0.05$,图 6,表 7、8)。

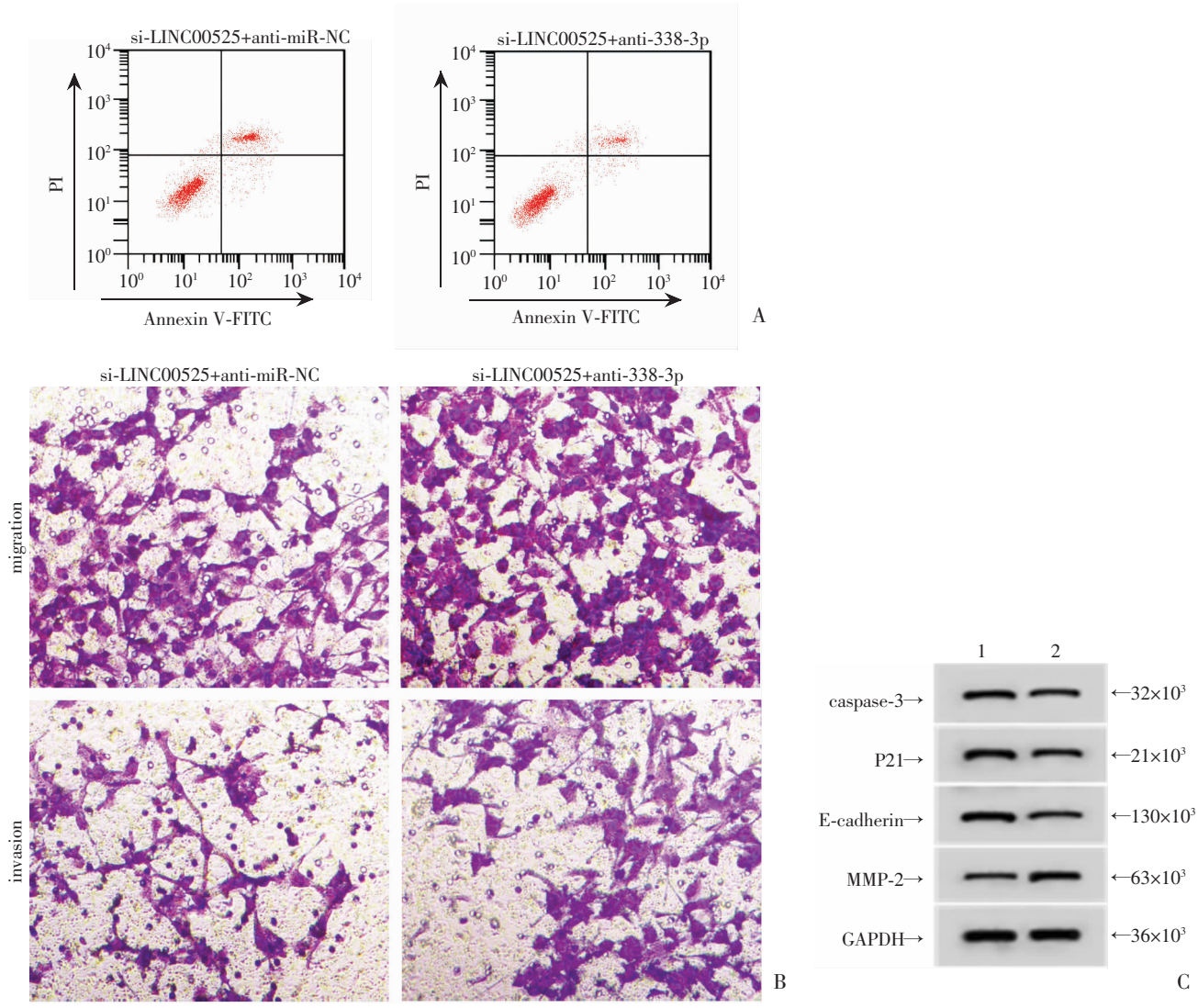
3 讨论

lncRNA 不仅参与调节肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭及迁移等生物学过程,还可参与肿瘤耐药机制,可为治疗恶性肿瘤提供潜在靶点[13]。研究报道 LINC00525 在结直肠癌组织和细胞系中明显上调表达,其过表达与临床分期和肿瘤大小呈正相关,敲低 LINC00525 可以抑制癌细胞增殖并诱导细胞凋亡[14]。LINC00525 还增强了结直肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性[8]。本实验通过用紫杉醇诱导胃癌细胞 HGC-27 建立紫杉醇耐药胃癌细胞 HGC-27/PTX,经不同浓度紫杉醇处理 HGC-27/PTX 细胞活性无显著变化,表明耐药细胞建立成功。本实验结果显示,LINC00525 在 HGC-27 和 HGC-27/PTX 细胞中表达上调,且在 HGC-27/PTX 细胞中表达更高。敲除 LINC00525 后 HGC-27/PTX 细胞中 caspase-3、P21、E-cadherin 表达水平以及细胞凋亡率显著上升,细胞存活率以及 MMP-2 表达水平下降。细胞迁移、侵袭数降低。说明敲除 LINC00525 可抑制 HGC-27/PTX 细胞增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡。表明敲除 LINC00525 可促进紫杉醇耐药胃癌细胞,降低胃癌细胞对紫杉醇的耐药性。

表 8 抑制 miR-338-3p 能减弱敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 中 caspase-3、P21、E-cadherin、MMP-2 蛋白表达的影响
($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

分组	caspase-3	P21	E-cadherin	MMP-2
si-LINC00525+anti-miR-NC	0.53±0.05	0.62±0.06	0.60±0.06	0.21±0.02
si-LINC00525+anti-miR-338-3p	0.20±0.02[a]	0.28±0.03[a]	0.21±0.02[a]	0.64±0.06[a]
t	18.384	15.205	18.499	20.397
P	<0.05	<0.001	<0.05	<0.05

a:$P<0.05$,与 si-LINC00525+anti-miR-NC 组比较



A:抑制 miR-338-3p 能减弱敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 凋亡的作用;B:抑制 miR-338-3p 能减弱敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 迁移、侵袭的作用(×200);C:抑制 miR-338-3p 能减弱敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 中 caspase-3、P21、E-cadherin、MMP-2 蛋白的表达,1:si-LINC00525+anti-miR-NC 组,2:si-LINC00525+anti-miR-338-3p 组

图 6 抑制 miR-338-3p 能减弱敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 迁移、侵袭、凋亡的影响及相关蛋白的表达

已有研究报道 miR-338-3p 与胃癌进展相关,miR-338-3p 过表达抑制胃癌细胞的增殖和克隆形成,并诱导 G1/S 阻滞和细胞凋亡[15]。miR-338-3p 通过靶向 ADAM17 抑制胃癌细胞的增殖和迁移[16]。本实验结果显示,HGC-27 和 HGC-27/PTX 细胞中 miR-338-3p 表达水平降低。过表达 miR-338-3p 可抑制 HGC-27/PTX 细胞增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡。且有研究报道 miR-338-3p 可抑制肝癌细胞肿瘤生长并使肝癌细胞对索拉非尼敏感[17]。miR-338-3p 高表达抑制细胞增殖,运动性和上皮-间质转化(EMT)和促进细胞凋亡,增强卵巢癌细胞对顺铂的敏感性[18]。说明 miR-338-3p 高表达可增强部分肿瘤对化疗药物的敏

感性。本实验中过表达 miR-338-3p 促进紫杉醇耐药胃癌细胞凋亡,说明其降低了胃癌细胞对紫杉醇的耐药性。且本实验还发现,LINC00525 可靶向调控 miR-338-3p,而抑制 mi-R-338-3p 减弱了敲除 LINC00525 对细胞 HGC-27/PTX 的增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响。

综上所述,敲除 LINC00525 可能通过上调 miR-338-3p 表达抑制 HGC-27/PTX 细胞增殖、迁移和侵袭,促进胃癌细胞凋亡,降低胃癌细胞对紫杉醇的耐药性。

参考文献:

[1] 关露露, 赵青芳, 陈小兵. 胃癌多药耐药研究进展[J]. 肿瘤研究与临床, 2017, 29(6): 422-425. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2017.06.018.
GUAN L L, ZHAO Q F, CHEN X B. Progress in multidrug resistance of gastric cancer[J]. Cancer Res Clin, 2017, 29(6): 422-425. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2017.06.018.

[2] 沈丽平, 范理宏. 紫杉醇耐药的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(8): 1975-1978. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2014.08.72.
SHEN L P, FAN L H. Research progress of neoplasms resistance[J]. J Mod Oncol, 2014, 22(8): 1975-1978. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2014.08.72.

[3] 黄世庆, 韦忠恒. 长链非编码 RNA 在胃癌预后和耐药中的研究进展[J]. 中国癌症防治杂志, 2017, 9(5): 404-408. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5671.2017.05.15.
HUANG S Q, WEI Z H. Research progress of long-chain non-coding RNA in the prognosis and drug resistance of gastric cancer[J]. Chin J Oncol Preu Treat, 2017, 9(5): 404-408. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5671.2017.05.15.

[4] 张弛, 张雷. 微 RNA 在胃癌中的相关机制及诊断治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2019, 25(1): 55-59. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2019.01.011.
ZHANG C, ZHANG L. Research progress in microRNA-associated mechanism, diagnosis and treatment of gastriccancer[J]. Me Recapitulate, 2019, 25(1): 55-59. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2019.01.011.

[5] 房群. LncRNA UCA1 通过下调 miR-27b 表达增强胃癌多药耐药性的研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
FANG Q. LncRNA UCA1 enhances multidrug resistance of gastric cancer by down-regulating the expression of miR-27b[D]. Jinan: Shandong University, 2017.

[6] 郭苹, 程鹏, 王鹏飞, 等. LncRNA-MEG3 对胃癌生物学特性及铂类化疗敏感性的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(6): 16-21.
GUO P, CHENG P, WNAG P F, *et al*. Effect of LncRNA-MEG3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer and chemosensitivity of cisplatin[J]. Chin J Mod Med, 2019, 29(6): 16-21.

[7] WANG X W, GUO Q Q, WEI Y, *et al*. Construction of a competing endogenous RNA network using differentially expressed lncRNAs, miRNAs and mRNAs in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 2019, 42(6): 2402-2415. DOI: 10.3892/or.2019.7378.

[8] WANG S S, LI J, YANG X P. Long non-coding RNA LINC00525 promotes the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by targeting miR-507/ELK3 axis[J]. Int J Stem Cells, 2019, 12(2): 347-359. DOI: 10.15283/ijsc19041.

[9] LIU S N, SUO J, WANG C X, *et al*. Downregulation of tissue miR-338-3p predicts unfavorable prognosis of gastric cancer[J]. Cancer Biomark, 2017, 21(1): 117-122. DOI: 10.3233/cbm-170339.

[10] SUN F, YU M C, YU J, *et al*. miR-338-3p functions as a tumor suppressor in gastric cancer by targeting PTP1B[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(5): 522. DOI: 10.1038/s41419-018-0611-0.

[11] LIU X W, CAI H, SHENG W Q, *et al*. microRNAs expression profile related with response to preoperative radiochemotherapy in patients with locally advanced gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 1-8. DOI: 10.1186/s12885-018-4967-4.

[12] HAN J, LI J, TANG K J, *et al*. miR-338-3p confers 5-fluorouracil resistance in p53 mutant colon cancer cells by targeting the mammalian target of rapamycin[J]. Exp Cell Res, 2017, 360(2): 328-336. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.09.023.

[13] 周浩泽, 李梦玮, 徐寒梅. 长链非编码 RNA 参与肿瘤耐药机制的研究进展[J]. 药物生物技术, 2018, 25(1): 75-80.
ZHOU H Z, LI M W, XU H M. Recent progress in molecular mechanism of tumor drug resistance regulated by long non-coding RNA[J]. Pharm Biotechnol, 2018, 25(1): 75-80.

[14] PENG P, ZHENG Q. Long non-coding RNA Linc00525 as a prognostic factor to regulate proliferation and apoptosis in colorectalcancer[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(15_suppl): e15085. DOI: 10.1200/jco.2019.37.15_suppl.e15085.

[15] GUO B, LIU L Y, YAO J Y, *et al*. miR-338-3p suppresses gastric cancer progression through a PTEN-AKT axis by targeting P-REX2a[J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(3): 313-321. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0507.

[16] XU H T, ZHAO L, FANG Q J, *et al*. MiR-338-3p inhibits hepatocarcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib by targeting hypoxia-induced factor 1α[J]. PLoS ONE, 2014, 9(12): e115565. DOI: 10.1371/journal.pone.0115565.

[17] NIU Q, LIU Z H, GAO J, *et al*. MiR-338-3p enhances ovarian cancer cell sensitivity tocisplatin by downregulating WNT2B[J]. Yonsei Med J, 2019, 60(12): 1146-1156. DOI: 10.3349/ymj.2019.60.12.1146.

(**收稿**:2020-06-29;**修回**:2020-08-13)
(编辑 邓强庭)