



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.05.07
文章编号: 2095-1264(2022)05-0599-09

LINC00691 负调控 miR-512-5p 对非小细胞肺癌 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

曹 姝, 晏 军, 陈晓梅

(自贡市第一人民医院肿瘤科, 四川 自贡, 643000)

摘要: **目的** 探讨 LINC00691 对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞恶性生物学行为的影响。**方法** RT-qPCR 检测 30 例 NSCLC 患者癌组织和对应癌旁组织中 LINC00691 和 miR-512-5p 的表达。双荧光素酶报告基因实验验证 LINC00691 和 miR-512-5p 的靶向关系。将 A549 细胞分为 si-NC 组、si-LINC00691 组、miR-NC 组、miR-512-5p 组、si-LINC00691+anti-miR-NC 组和 si-LINC00691+anti-miR-512-5p 组, MTT 和克隆形成实验检测细胞增殖情况, 流式细胞术、Transwell 检测细胞凋亡、迁移和侵袭, Western blotting 检测细胞中 Ki67、Cleaved-caspase3、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达。**结果** LINC00691 在 NSCLC 癌组织中表达水平上升 ($P<0.05$), 而 miR-512-5p 表达水平下降 ($P<0.05$)。LINC00691 在 A549 细胞中负调控 miR-512-5p。沉默 LINC00691 表达或过表达 miR-512-5p 可降低 A549 细胞的存活率、克隆形成数、迁移和侵袭数以及 Ki67、N-cadherin 蛋白表达水平, 提高其凋亡率, 上调 Cleaved-caspase3、E-cadherin 蛋白表达水平 ($P<0.05$)。沉默 miR-512-5p 表达逆转了沉默 LINC00691 表达对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用及凋亡促进作用。**结论** 沉默 LINC00691 可能通过靶向上调 miR-512-5p 表达来抑制 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并促进其凋亡。

关键词: NSCLC; LINC00691; miR-512-5p; 细胞增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

Effects of the negative regulation of miR-512-5p by LINC00691 on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of NSCLC cells

CAO Shu, YAN Jun, CHEN Xiaomei

(Oncology Department, Zigong First People's Hospital, Zigong, 643000, Sichuan, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of LINC00691 on the malignant biological behavior of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods** RT-qPCR was used to detect the expressions of LINC00691 and miR-512-5p in 30 cases of NSCLC tissues and corresponding adjacent tissues. The dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between LINC00691 and miR-512-5p. NSCLC A549 cells were cultured *in vitro*, and were designed into si-NC group, si-LINC00691 group, miR-NC group, miR-512-5p group, si-LINC00691+anti-miR-NC group and si-LINC00691+anti-miR-512-5p group. MTT and clone formation experiment were applied to detect the cell proliferation, and flow cytometry to detect cell apoptosis, and Transwell to detect cell migration and invasion. Western blotting was used to detect the expressions of Ki67, cleaved caspase-3, E-cadherin and N-cadherin proteins. **Results** The expression of LINC00691 increased in NSCLC cancer tissues ($P<0.05$), while the expression of miR-512-5p decreased ($P<0.05$). LINC00691 negatively regulated the miR-512-5p in A549 cells. Silenced LINC00691 or over-expressed miR-512-5p promoted the apoptosis rate and restrained the viability, colony formation, migration and invasion of A549 cells, down-regulated the expressions of Ki67 and N-cadherin proteins ($P<0.05$), but up-regulated the expressions of cleaved-caspase3 and

E-cadherin proteins ($P<0.05$). Silenced miR-512-5p reversed the inhibitory effects of silenced LINC00691 on the proliferation, migration and invasion of A549 cells, as well as their apoptosis-promoting effects. **Conclusion** Silenced LINC00691 could inhibit the proliferation, migration and invasion, and promote the apoptosis of NSCLC cells by targeting up-regulation of miR-512-5p.

Keywords: NSCLC; LINC00691; miR-512-5p; Cell proliferation; Apoptosis; Migration; Invasion

前言

肺癌是当今社会发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,严重威胁人类生命健康。根据组织学类型,肺癌可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其中 80% 为 NSCLC^[1-2]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)参与细胞增殖、分化、凋亡等过程,与肿瘤发生发展相关^[3],如 LINC00691 在肺腺癌组织中表达上调^[4],但其对 NSCLC 细胞恶性生物学行为的影响和作用机制还未知。lncRNA 可作为 miRNA 的“分子海绵”,通过与 miRNA 结合影响 miRNA 对靶基因的调控,进而发挥生物学功能^[5]。信息学软件预测显示 miR-512-5p 是 LINC00691 的靶基因,miR-512-5p 在 NSCLC 患者癌组织中表达下调,过表达 miR-512-5p 可诱导 NSCLC 细胞凋亡^[6]。但目前, LINC00691 与 miR-512-5p 的调控作用如何影响 NSCLC 细胞的恶性生物学行为还未知。因此,本研究主要探究 LINC00691 靶向调控 miR-512-5p 对 A549 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2017 年 5 月至 2019 年 1 月本院收治的 30 例 NSCLC 患者,将手术切除的癌组织和对应的癌旁组织置于液氮中保存。30 例 NSCLC 患者中,男性 19 例,女性 11 例,平均年龄(63.28 ± 7.19)岁;癌组织高分化 6 例,中分化 15 例,低分化 9 例;Ⅰ期 5 例,Ⅱ期 13 例,Ⅲ期 12 例。纳入标准:术后病理结果证实为 NSCLC;术前未进行放疗、化疗等治疗。排除标准:合并其他恶性肿瘤;合并肺炎、肺结核等其他肺部疾病。本研究经本院伦理委员会批准同意,患者自愿签署知情同意书。

1.2 实验细胞和试剂 NSCLC A549 细胞(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 HyClone 公司);RPMI 1640 培养基、Lipofectamine™ 2000 试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒、双荧光素酶活性检测试剂盒(北京索莱宝科技

有限公司);四甲基噻唑蓝(methylthiazolotetrazolium, MTT)、胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);实验所有引物序列、荧光素酶报告基因载体(上海吉玛制药技术有限公司);逆转录试剂盒、PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司);PCR 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司];凋亡试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);兔抗人细胞增殖核抗原(Ki67)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cleaved caspase-3)、和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);兔抗人上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)和神经性钙黏附蛋白(N-cadherin)多克隆抗体(美国 CST 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR 检测 LINC00691 和 miR-512-5p 表达 使用 TRIzol 试剂提取组织或细胞中总 RNA,用逆转录试剂盒将提取的 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增条件:95 °C 5 min,95 °C 15 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 35 个循环。引物序列:LINC00691 正向引物 5'-TCATGGTAGAAGGCAAGGGG-3',反向引物 5'-GTTTGGGTCATGAGGGAGGA-3';miR-512-5p 正向引物 5'-GCTAGCTGGTCCATGTGCG-3',反向引物 5'-CGAACGCTGGCCGAAC-3';GAPDH 正向引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';U6 正向引物 5'-CTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',反向引物 5'-AATATGGAACGCTTCACGA-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 LINC00691 和 miR-512-5p 的相对表达水平,其中 LINC00691 以 GAPDH 为内参,miR-512-5p 以 U6 为内参。

1.3.2 细胞培养 复苏 A549 细胞,加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5%、湿度为 97% 的培养箱中培养。待细胞融合至 80% 时,吸弃培养基,加入适量预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,传代培养。

1.3.3 双荧光素酶报告基因实验 PCR 扩增含 miR-512-5p 结合位点的 LINC00691 的 3'UTR 序列, 插入 psi-CHECK 荧光素酶报告基因载体, 构建 LINC00691 野生型报告质粒(WT-LINC00691)。使用 LINC00691 序列突变引物诱导, 将结合位点突变后插入 psi-CHECK 荧光素酶报告基因载体, 构建 LINC00691 突变型报告质粒(MUT-LINC00691)。将 A549 细胞以每孔 1×10^5 个接种至 6 孔板, 待细胞融合至 60% 时, 更换无血清培养基。分别将 WT-LINC00691、MUT-LINC00691 与 miR-512-5p mimics、miR-NC 共转染至 A549 细胞, 具体转染步骤参照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书。转染 6 h 后, 更换培养基。继续培养 24 h 后, 参照双荧光素酶活性检测试剂盒的操作说明检测荧光素酶活性。

1.3.4 细胞分组转染 将 A549 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板中, 待细胞融合至 60% 时, 更换无血清培养基。分别将 si-NC (si-NC 组)、si-LINC00691 (si-LINC00691 组)、miR-NC (miR-NC 组)、miR-512-5p mimics (miR-512-5p 组)、si-LINC00691 与 anti-miR-NC (si-LINC00691+anti-miR-NC 组)、si-LINC00691 与 anti-miR-512-5p (si-LINC00691+anti-miR-512-5p 组) 转染至 A549 细胞, 具体转染步骤参照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书。转染 6 h 后, 更换培养基, 继续培养 24 h 后, 收集细胞用于后续实验。

1.3.5 MTT 检测细胞增殖 将各组转染后的细胞以每孔 0.5×10^4 个接种至 96 孔板, 培养 24 h, 每孔加 20 μ L 浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT, 孵育 4 h, 弃培养基, 加 150 μ L 二甲基亚砜。酶标仪检测 490 nm 处吸光度值(absorbance, A), 计算细胞存活率。存活率 = $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.3.6 克隆形成实验 将各组转染后的细胞以每孔 0.5×10^4 个接种至 6 孔板, 培养 14 d 后, 弃培养基, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.4% 结晶紫染色 15 min。显微镜下观察拍照, 并计数超过 50 个细胞的克隆数。

1.3.7 Transwell 检测细胞迁移和侵袭 将各组转染后的细胞用不含 FBS 的 RPMI 1640 培养基配制成密度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液。迁移实验: 上室加入 100 μ L 细胞悬液, 下室加入 500 μ L 含 FBS 的 RPMI 1640 培养基, 培养 24 h, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.4% 结晶紫染色 15 min, 显微镜下观察拍照并对穿膜细胞进行计数。侵袭实验: 将 Matrigel 基质

胶以 1:8 的比例用 RPMI 1640 培养基稀释后铺于上室, 自然晾干, 将 100 μ L 细胞悬液加入铺有 Matrigel 基质胶的上室, 后续步骤与迁移实验相同。

1.3.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 将各组转染后的细胞以每孔 1×10^4 个接种至 24 孔板, 培养 24 h, 0.25% 胰蛋白酶消化, PBS 清洗细胞 2 次, 加入 500 μ L 结合缓冲液混悬细胞, 加入 10 μ L Annexin V-FITC, 避光孵育 10 min, 加入 5 μ L PI 混合均匀, 再避光孵育 5 min, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

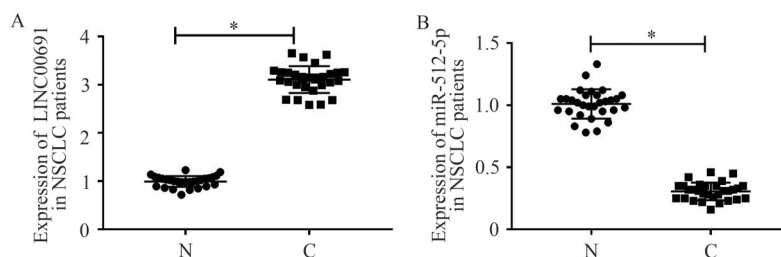
1.3.9 免疫印迹法 (Western blotting) 检测细胞中蛋白表达 使用 RIPA 细胞裂解液提取各组细胞中总蛋白, BCA 蛋白试剂盒测定蛋白含量, 行 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。电泳结束后, 将分离蛋白湿转至聚偏乙烯二氟膜, 置于 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h。分别加入 Ki67 (1:800)、Cleaved caspase-3 (1:1 000)、E-cadherin (1:1 500)、N-cadherin (1:1 500) 和 GAPDH (1:2 000) 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5 000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。加入化学发光试剂避光显影, 凝胶成像系统曝光拍照。以 GAPDH 为内参, 使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件分析实验数据。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 患者癌组织中 LINC00691 和 miR-512-5p 的表达 与癌旁组织比较, NSCLC 患者癌组织中 LINC00691 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), miR-512-5p 表达水平显著降低 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.2 双荧光素酶报告基因实验验证 LINC00691 与 miR-512-5p 靶向结合 生物信息学软件预测结果显示, LINC00691 与 miR-512-5p 的核苷酸序列存在连续的结合位点 (图 2A)。荧光素酶活性检测结果显示, 与共转染 WT-LINC00691 的 miR-NC 组相比, 共转染 WT-LINC00691 的 miR-512-5p 组细胞荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$); 而与共转染 MUT-LINC00691 的 miR-NC 组比较, 共转染 MUT-LINC00691 的 miR-512-5p 组细胞荧光素酶活性无

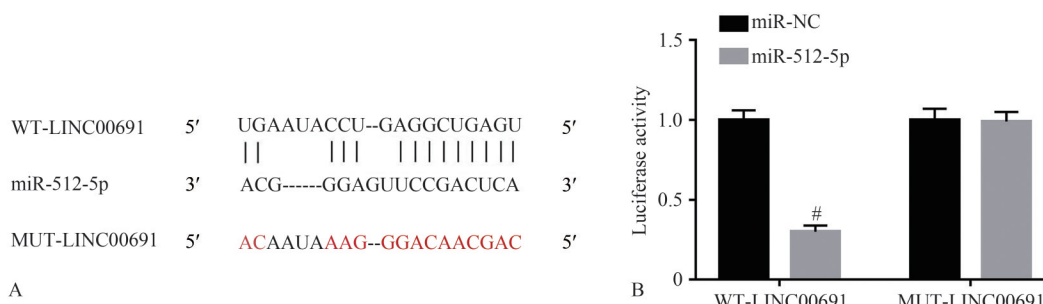


注: N: 癌旁组织(30 例); C: 癌组织(30 例)。与癌旁组织相比, * $P<0.05$ 。

Note: N: adjacent tissue (30 cases); C: cancer tissue (30 cases). Compared with the adjacent tissues, * $P<0.05$.

图 1 LINC00691 和 miR-512-5p 在 NSCLC 患者癌组织中的表达

Fig 1 Expression of LINC00691 and miR-512-5p in NSCLC patients



注: 与 miR-NC 组相比, # $P<0.05$ 。WT-LINC00691: LINC00691 野生型质粒; MUT-LINC00691: LINC00691 突变型质粒。

Note: Compared with miR-NC group, # $P<0.05$. WT-LINC00691: LINC00691 wild type plasmid; MUT-LINC00691: LINC00691 mutant plasmid.

图 2 LINC00691 与 miR-512-5p 的结合位点及荧光素酶活性检测结果

Fig. 2 The binding site of LINC00691 with miR-512-5p and the results of luciferase activity detection

显著变化 ($P>0.05$) (图 2B), 表明 LINC00691 可与 miR-512-5p 靶向结合。

2.3 各组 A549 细胞中 LINC00691 和 miR-512-5p 的表达 si-LINC00691 组 A549 细胞中 LINC00691 表达显著低于 si-NC 组 ($P<0.05$), miR-512-5p 组 A549 细胞中 miR-512-5p 表达水平显著高于 miR-NC 组 ($P<0.05$), si-LINC00691+anti-miR-512-5p 组 A549 细胞中 miR-512-5p 表达水平显著低于 si-LINC00691+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$), 表明 si-LINC00691、miR-512-5p mimics 或 anti-miR-512-5p 转染成功。与 si-NC 组比较, si-LINC00691 组 A549 细胞中 miR-512-5p 的表达水平显著升高 ($P<0.05$), 进一步说明 LINC00691 可负调控 miR-512-5p 的表达 (图 3)。

2.4 各组 A549 细胞存活率 si-LINC00691 组 A549 细胞存活率显著低于 si-NC 组 ($P<0.05$), miR-512-5p 组 A549 细胞存活率显著低于 miR-NC 组 ($P<0.05$), si-LINC00691+anti-miR-512-5p 组 A549 细胞存活率显著高于 si-LINC00691+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$) (表 1)。

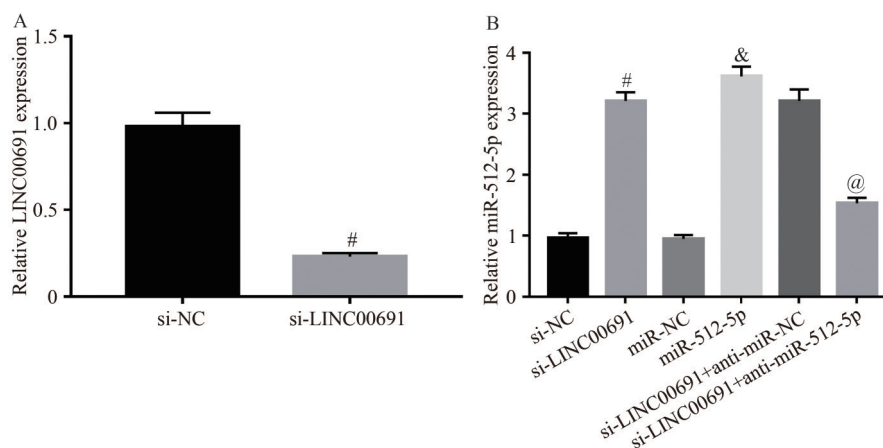
2.5 各组 A549 细胞克隆形成数 si-LINC00691 组

A549 细胞克隆形成数显著低于 si-NC 组 ($P<0.05$), miR-512-5p 组 A549 细胞克隆形成数显著低于 miR-NC 组 ($P<0.05$), si-LINC00691+anti-miR-512-5p 组 A549 细胞克隆形成数显著高于 si-LINC00691+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$) (图 4、表 2)。

2.6 各组 A549 细胞迁移和侵袭数 si-LINC00691 组 A549 细胞迁移和侵袭数显著低于 si-NC 组 ($P<0.05$), miR-512-5p 组 A549 细胞迁移和侵袭数显著低于 miR-NC 组 ($P<0.05$), si-LINC00691+anti-miR-512-5p 组 A549 细胞迁移和侵袭数显著高于 si-LINC00691+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$) (图 5、表 3)。

2.7 各组 A549 细胞凋亡率 si-LINC00691 组 A549 细胞凋亡率显著高于 si-NC 组 ($P<0.05$), miR-512-5p 组 A549 细胞凋亡率显著高于 miR-NC 组 ($P<0.05$), si-LINC00691+anti-miR-512-5p 组 A549 细胞凋亡率显著低于 si-LINC00691+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$) (图 6、表 4)。

2.8 各组 A549 细胞中 Ki67、Cleaved caspase-3、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达 si-LINC00691 组 A549 细胞中 Ki67 和 N-cadherin 蛋白表达水平显著低于 si-NC 组 ($P<0.05$), Cleaved caspase-3 和 E-cad-



注: 与 si-NC 组相比, $^{\#}P<0.05$; 与 miR-NC 组相比, $^{\&}P<0.05$; 与 si-LINC00691+anti-miR-NC 组相比, $^{\textcircled{a}}P<0.05$ 。

Note: Compared with the si-NC group, $^{\#}P<0.05$; Compared with the miR-NC group, $^{\&}P<0.05$; Compared with the si-LINC00691+anti-miR-NC group, $^{\textcircled{a}}P<0.05$.

图 3 各组 A549 细胞中 LINC00691 和 miR-512-5p 表达

Fig. 3 Expressions of LINC00691 and miR-512-5p in A549 cells of each group

表 1 各组 A549 细胞存活率

Tab. 1 The survival rate of A549 cells in each group

组别	细胞存活率/%
si-NC	98.72±4.77
si-LINC00691	56.07±1.80 [#]
miR-NC	98.58±5.65
miR-512-5p	48.93±1.52 ^{&}
si-LINC00691+anti-miR-NC	56.03±2.52
si-LINC00691+anti-miR-512-5p	87.70±2.94 [Ⓐ]
<i>F</i>	384.099
<i>P</i>	<0.001

注: 与 si-NC 组相比, $^{\#}P<0.05$; 与 miR-NC 组相比, $^{\&}P<0.05$; 与 si-LINC00691+anti-miR-NC 组相比, $^{\textcircled{a}}P<0.05$ 。

Note: Compared with the si-NC group, $^{\#}P<0.05$; Compared with the miR-NC group, $^{\&}P<0.05$; Compared with the si-LINC00691+anti-miR-NC group, $^{\textcircled{a}}P<0.05$.

表 2 各组 A549 细胞克隆形成数

Tab. 2 The number of A549 cell clones in each group

组别	克隆形成数
si-NC	113.56±7.14
si-LINC00691	64.78±3.64 [#]
miR-NC	112.67±5.29
miR-512-5p	54.22±2.94 ^{&}
si-LINC00691+anti-miR-NC	64.44±4.74
si-LINC00691+anti-miR-512-5p	103.11±3.70 [Ⓐ]
<i>F</i>	290.620
<i>P</i>	<0.001

注: 与 si-NC 组相比, $^{\#}P<0.05$; 与 miR-NC 组相比, $^{\&}P<0.05$; 与 si-LINC00691+anti-miR-NC 组相比, $^{\textcircled{a}}P<0.05$ 。

Note: Compared with the si-NC group, $^{\#}P<0.05$; Compared with the miR-NC group, $^{\&}P<0.05$; Compared with the si-LINC00691+anti-miR-NC group, $^{\textcircled{a}}P<0.05$.

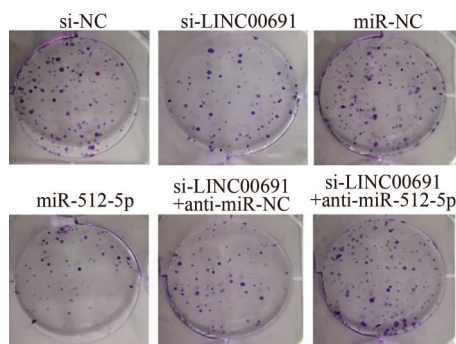


图 4 A549 细胞克隆形成检测

Fig. 4 Detection of clone formation of A549 cells

herin 蛋白表达水平显著高于 si-NC 组 ($P<0.05$)。miR-512-5p 组 A549 细胞中 Ki67 和 N-cadherin 蛋白

表达水平显著低于 miR-NC 组 ($P<0.05$), Cleaved caspase-3 和 E-cadherin 蛋白表达水平显著高于 miR-NC 组 ($P<0.05$)。si-LINC00691+anti-miR-512-5p 组 A549 细胞中 Ki67 和 N-cadherin 蛋白表达水平显著高于 si-LINC00691+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$), Cleaved caspase-3 和 E-cadherin 蛋白表达水平显著低于 si-LINC00691+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$)(图 7)。

3 讨论

lncRNA 是长度超过 200 个核苷酸的小分子非编码 RNA, 在真核生物中广泛存在。LINC00691 是

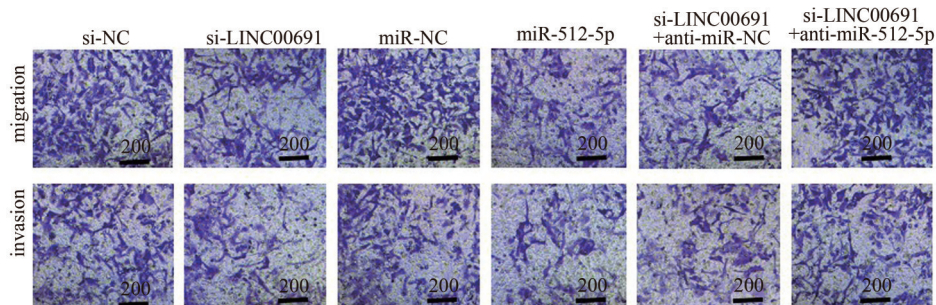


图5 A549细胞迁移和侵袭检测

Fig. 5 Detection of migration and invasion of A549 cells

表3 各组A549细胞迁移和侵袭数

Tab. 3 The number of migrated and invaded A549 cells in each group

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
si-NC	165.22±7.52	118.00±4.59
si-LINC00691	88.78±5.57 [#]	67.78±3.08 [#]
miR-NC	166.89±7.29	118.33±5.16
miR-512-5p	65.78±4.87 ^{&}	56.00±2.91 ^{&}
si-LINC00691+anti-miR-NC	87.00±5.40	67.22±4.52
si-LINC00691+anti-miR-512-5p	145.44±5.60 [@]	104.89±3.66 [@]
<i>F</i>	475.008	430.687
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与 si-NC 组相比,[#]*P*<0.05;与 miR-NC 组相比,[&]*P*<0.05;与 si-LINC00691+anti-miR-NC 组相比,[@]*P*<0.05。

Note: Compared with the si-NC group, [#]*P*<0.05; Compared with the miR-NC group, [&]*P*<0.05; Compared with the si-LINC00691+anti-miR-NC group, [@]*P*<0.05.

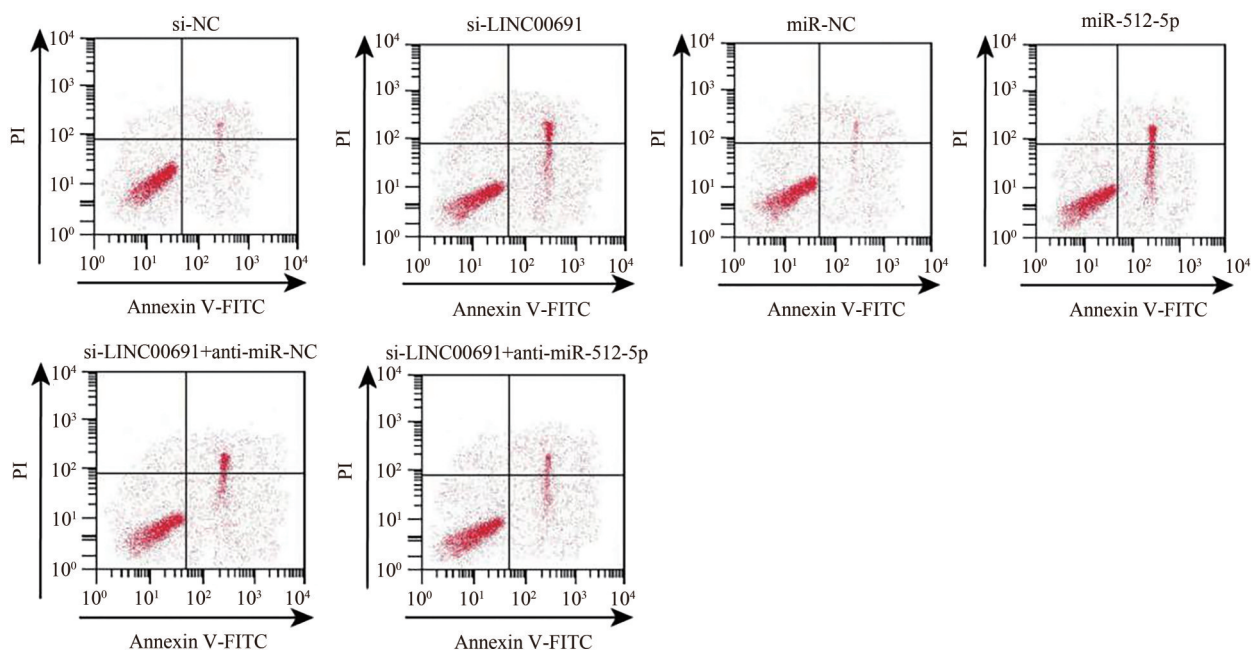


图6 A549细胞凋亡率的检测

Fig. 6 Detection of apoptosis rate of A549 cells

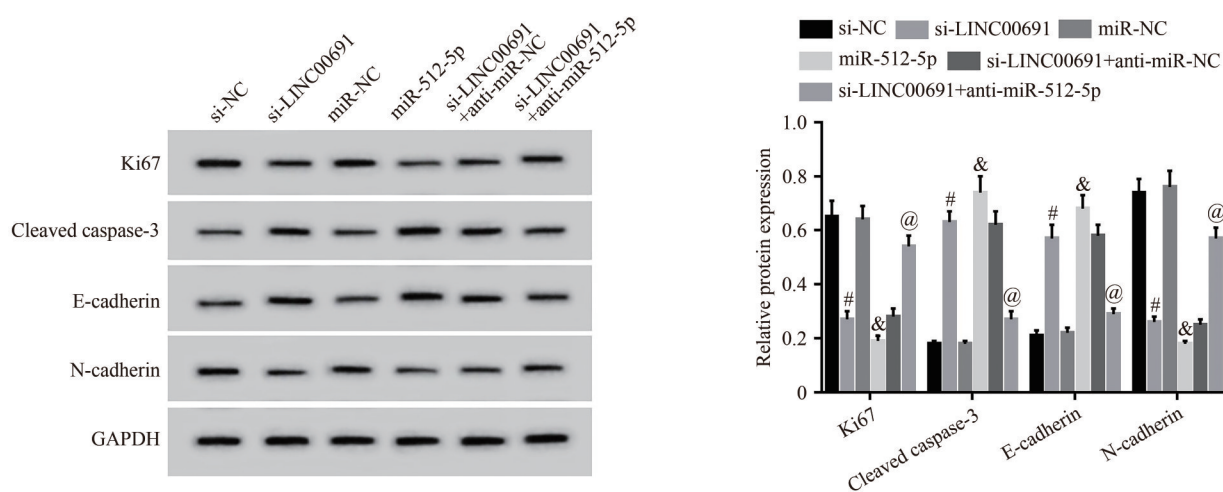
表 4 各组 A549 细胞凋亡率比较

Tab. 4 Comparison of the apoptosis rate of A549 cells between groups

组别	凋亡率/%
si-NC	7.34±0.54
si-LINC00691	21.54±0.70 [#]
miR-NC	7.35±0.53
miR-512-5p	25.62±0.63 ^{&}
si-LINC00691+anti-miR-NC	21.55±0.74
si-LINC00691+anti-miR-512-5p	10.78±0.60 [@]
<i>F</i>	1508.226
<i>P</i>	<0.001

注:与 si-NC 组相比,[#]*P*<0.05;与 miR-NC 组相比,[&]*P*<0.05;与 si-LINC00691+anti-miR-NC 组相比,[@]*P*<0.05。

Note: Compared with the si-NC group, [#]*P*<0.05; Compared with the miR-NC group, [&]*P*<0.05; Compared with the si-LINC00691+anti-miR-NC group, [@]*P*<0.05.



注:与 si-NC 组相比,[#]*P*<0.05;与 miR-NC 组相比,[&]*P*<0.05;与 si-LINC00691+anti-miR-NC 组相比,[@]*P*<0.05。

Note: Compared with the si-NC group, [#]*P*<0.05; Compared with the miR-NC group, [&]*P*<0.05; Compared with the si-LINC00691+anti-miR-NC group, [@]*P*<0.05.

图 7 Ki67、Cleaved caspase-3、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达

Fig. 7 The protein expressions of Ki67, cleaved caspase-3, E-cadherin and N-cadherin

近年来新发现的一种 lncRNA。研究显示,LINC00691 在胃癌中的表达水平明显升高,沉默 LINC00691 表达可抑制胃癌细胞 MKN-45 和 HGC-27 的增殖、集落形成、迁移和侵袭,其作用机制与激活 Lin28 转录并通过 JAK/STAT 信号通路促进表皮生长因子表达有关^[7]。有报道称,LINC00691 在 NSCLC 组织标本中表达水平升高,与患者淋巴结转移和 TNM 分期晚期密切相关,其高表达患者总生存期比低表达患者短,是 NSCLC 预后潜在标志物^[8]。但目前,LINC00691 对 NSCLC 细胞恶性生物学行为的影响和作用机制还未知。

本研究显示,LINC00691 在 NSCLC 患者癌组织中表达水平升高,与相关报道结果一致^[8],提示

LINC00691 可促进 NSCLC 的发展。沉默 LINC00691 后,A549 细胞存活率降低,克隆形成数减少,表明沉默 LINC00691 可抑制 A549 细胞增殖。Ki67 参与细胞有丝分裂过程,促进细胞增殖,其表达水平可反映细胞的增殖活性^[9]。本研究结果显示,沉默 LINC00691 可降低 A549 细胞中 Ki67 蛋白表达水平,提示沉默 LINC00691 可能通过调控 Ki67 蛋白表达来抑制 A549 细胞增殖。细胞凋亡是一种受多种基因调控的程序性死亡过程,通过激活肿瘤细胞凋亡途径诱导其凋亡是治疗肿瘤的一种方式。caspase-3 是 caspase 家族调控细胞凋亡的关键分子,活化 caspase-3 可诱导细胞凋亡^[10]。本研究显示,沉默 LINC00691 后,A549 细胞中 Cleaved caspase-3 蛋白

表达水平升高,细胞凋亡率升高,表明沉默 LINC00691 可诱导 A549 细胞凋亡。肿瘤细胞迁移、侵袭可影响肿瘤的复发和转移,因此,抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭可降低肿瘤复发和转移的风险。E-cadherin 和 N-cadherin 同属于钙黏蛋白。E-cadherin 参与维持细胞上皮表型,其表达下调时细胞骨架改变,基底膜降解,细胞连接松散,易导致细胞迁移^[11-12]。而 N-cadherin 与 E-cadherin 相反,其表达上调可促进细胞迁移。本研究结果显示,沉默 LINC00691 后, A549 细胞迁移和侵袭数减少, N-cadherin 蛋白表达水平降低,而 E-cadherin 蛋白表达水平升高,表明沉默 LINC00691 可有效抑制 A549 细胞的迁移和侵袭。

本研究通过生物信息学软件预测发现, LINC00691 可与 miR-512-5p 靶向结合,并通过双荧光素酶报告基因实验证实了这一结果。此外,沉默 LINC00691 促进了 A549 细胞中 miR-512-5p 的表达,而过表达 LINC00691 则抑制了 miR-512-5p 的表达,进一步说明 LINC00691 可靶向负调控 miR-512-5p 的表达,这与癌组织中 LINC00691 表达水平升高而 miR-512-5p 表达水平降低的结果一致。研究显示, miR-512-5p 在头颈部鳞状细胞癌^[13]、宫颈癌^[14]和结肠癌^[15]等肿瘤中表达水平降低,其过表达可抑制肿瘤细胞的恶性表型,是肿瘤治疗的潜在分子靶点。本研究结果显示,过表达 miR-512-5p 可抑制 A549 细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡,与 Wang 等^[16]报道的过表达 miR-512-5p 抑制 NSCLC 细胞侵袭并促进细胞凋亡的结果一致,提示 miR-512-5p 可能也是 NSCLC 治疗的分子靶点。本研究还显示,沉默 miR-512-5p 表达逆转了沉默 LINC00691 对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的作用,提示沉默 LINC00691 可能通过靶向 miR-512-5p 抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭并促进细胞凋亡。

综上所述, LINC00691 在 NSCLC 患者癌组织中表达水平升高,沉默其表达可有效抑制 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡。LINC00691 可能通过靶向上调 miR-512-5p 的表达发挥作用, LINC00691/miR-512-5p 轴可能为 NSCLC 的分子治疗提供新的靶点。但本研究仅通过体外细胞实验初步探讨了 LINC00691/miR-512-5p 对 NSCLC 细胞恶性表型的影响,接下来将进一步通过裸鼠移植瘤实验验证 LINC00691/miR-512-5p 轴对 NSCLC 发生发展的影响及其下游通路在 NSCLC 发生发展中的作用。

参考文献

- [1] 熊焕文,夏国际,吕健峰,等. microRNA-150 对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡、侵袭转移能力的影响[J]. 南昌大学学报(医学版), 2019, 59(4): 7-11. DOI: 10.13764/j.cnki.ncdm.2019.04.002.
- [2] 曲宝亮,穆怀博,勾建强,等. lncRNA HCG18/miR-17-5p/HMGA2 分子轴调控非小细胞肺癌细胞增殖及迁移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(4): 409-416. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.04.007.
- [3] WU H Z, QIN W Y, LU S X, et al. Long noncoding RNA ZFAS1 promoting small nucleolar RNA-mediated 2'-O-methylation via NOP58 recruitment in colorectal cancer [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 95. DOI: 10.1186/s12943-020-01201-w.
- [4] ZHAO B, XU H, AI X Y, et al. Expression profiles of long non-coding RNAs in lung adenocarcinoma [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 5383-5390. DOI: 10.2147/OTT.S167633.
- [5] HE C, LU X W, YANG F, et al. lncRNA UCA1 acts as a sponge of miR-204 to up-regulate CXCR4 expression and promote prostate cancer progression [J]. Biosci Rep, 2019, 39(5): 1-22. DOI: 10.1042/BSR20181465.
- [6] CHU K L, GAO G H, YANG X F, et al. miR-512-5p induces apoptosis and inhibits glycolysis by targeting p21 in non-small cell lung cancer cells [J]. Int J Oncol, 2016, 48(2): 577-586. DOI: 10.3892/ijo.2015.3279.
- [7] LIANG W, XIA B, HE C, et al. Overexpression of LINC00691 promotes the proliferation and invasion of gastric cancer cells via the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signalling pathway [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2020, 123: 105751. DOI: 10.1016/j.biocel.2020.105751.
- [8] XIE Y, HU X H. Increased levels of long noncoding RNA LINC00691 correlate with poor prognosis in non-small-cell lung cancer patients [J]. J Clin Lab Anal, 2020, 34(8): e23357. DOI: 10.1002/jcla.23357.
- [9] HOU L L, FU W B, LIU Y, et al. Agrin promotes limbal stem cell proliferation and corneal wound healing through Hippo-Yap signaling pathway [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(5): 7. DOI: 10.1167/iovs.61.5.7.
- [10] LIANG Z Z, PAN Q W, ZHANG Z, et al. MicroRNA-125a-5p controls the proliferation, apoptosis, migration and PTEN/MEK1/2/ERK1/2 signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(5): 4507-4514. DOI: 10.3892/mmr.2019.10704.
- [11] WANG J, YAO X, WU D L, et al. Kallikrein-related peptidase 4 promotes migration and invasion of endometrial stromal cells in endometriosis by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2020, 34(1): 93-100. DOI: 10.23812/18-403-A.
- [12] PENG Q, CHEN Y, LI C N. Long noncoding RNA Linc00210 promotes non-small cell lung cancer progression via sponging miR-16-5p/PTK2 axis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(18): 9438-9452. DOI: 10.26355/eurrev_202009_23029.
- [13] LI J, LEI H, XU Y, et al. miR-512-5p suppresses tumor growth by targeting hTERT in telomerase positive head and neck squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135265. DOI: 10.1371/journal.pone.0135265.
- [14] ZHANG J R, WANG L, JIANG J, et al. Elevation of microR-

- NA-512-5p inhibits MUC1 to reduce radioresistance in cervical cancer [J]. Cell Cycle, 2020, 19(6): 652-665. DOI: 10.1080/15384101.2019.1711314.
- [15] YANG L, SUN H W, LIU X, et al. Circular RNA hsa_circ_0004277 contributes to malignant phenotype of colorectal cancer by sponging miR-512-5p to upregulate the expression of PTMA [J]. J Cell Physiol, 2020, 1(2): 1-12. DOI: 10.1002/jcp.29484.
- [16] WANG Z X, ZHU X L, ZHANG T, et al. miR-512-5p suppresses the progression of non-small cell lung cancer by targeting β -catenin [J]. Oncol Lett, 2020, 19(1): 415-423. DOI:

10.3892/ol.2019.11102.

收稿日期: 2020-10-15 校稿:王娟 李征

本文引用格式: 曹姝, 晏军, 陈晓梅. LINC00691 负调控 miR-512-5p 对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响[J]. 肿瘤药学, 2022, 12(5): 599-607. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.05.07.

Cite this article as: CAO Shu, YAN Jun, CHEN Xiaomei. Effects of the negative regulation of miR-512-5p by LINC00691 on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of NSCLC cells[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2022, 12(5): 599-607. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.05.07.

《肿瘤药学》杂志审稿专家

(按姓名拼音排序)

白 勇	蔡净亭*	曹 伟	陈 刚	陈金洋	陈 力	陈临溪	陈 攀*
陈 坡	陈珊珊	陈 帅	陈 翔*	陈兴贵	陈 雪	谌 赞	成舒乔
程 凯*	程 岩	戴 森	戴 助	邓 敏	邓 坦*	邓锡云	邓银华
邓玉屏	丁 一	杜灵彬	范 刚	范洁琳	范 磊	方 堃	方唯意
冯剑波	冯智军*	符一岚*	付滢舟	高水超	郭丽娜	韩正祥	郝志英
何 枫*	何 欣	何 奕	贺怡子*	衡建福	洪 婷	侯 静	胡 蕾
胡英斌	胡哲煜*	黄 赛	黄闻欢	黄 奕	贾馨竹	蒋 倩*	蒋 涛
蒋文娟	蒋小剑*	金 一	雷 光	雷 坚	李贵玲	李国文	李海涛
李 贺*	李金兰*	李 凌	李明君	李 宁	李奇灵	李清林	李秋华
李 威(湖南)	李 威(上海)	李 武	李湘平	李心亮	李亚军	李 妍	李 洋
李跃军	李 芸	李 政	李志铭	李子明	廖德华	廖乙媚	林 琴
刘 芬	刘 峰	刘高明	刘 红*	刘 洪	刘 怀	刘继勇	刘 珈
刘 俊	刘 科	刘 黎*	刘 利	刘 路	刘 森	刘 妮*	刘 念
刘 鹏(北京)	刘 鹏(湖南)	刘 韶	刘天舒	刘 文	刘文辉	刘香丽	刘晓慧
刘新福	刘学文*	刘 耀	刘艺平	刘 颖(北京)	刘 颖*(湖南)	刘兆喆	刘志刚
刘志中	刘治国	龙红萍	龙 瀛*	鲁智豪	罗 嘉	罗 茜	罗尧岳*
毛超安	毛 婷	梅 恒	蒙光义	倪士峰	宁贻崇*	欧阳磊	欧阳琳达
潘常愜	彭文颖	彭向东	彭 杨	蒲兴祥	全香花	任 欢	戎佩佩
申 竑	申莹莹	沈 波	石 峰	石 卉	石泽亚	史 琛	宋 程
宋香清*	宋永喜	宋正波	苏 晨	苏 婧	苏 敏*	孙 鹏	孙 涛
孙 未	覃 丽	汤梦婕	唐海林	唐 洁	唐静怡*	唐 田	唐艳艳*
佟仲生	涂 剑	万小敏	王碧芸	王贺冉	王 俊	王 念	王胜峰*
王树森	王 涛	王晓稼	王 璵	王志远	王子毅	魏永长	温 灏
吴宏伟	吴 晖	吴辉菁	吴俚蓉	吴娜怡园	吴文一	吴 峥	席加喜
夏隆政*	夏月峰	夏铮铮	向 波	向 往	向左娟	肖海帆*	肖洪涛
肖 华	肖 坚*	肖 凯	肖 玲	肖 帅	谢建飞	谢明颢	谢 宁
谢伟彬	谢阳春	谢 宇	熊 炜	徐崇锐	徐建国	徐康平	徐芹芹
许湘华	颜 苗*	颜仕鹏	阳 帆	杨海燕*	杨 蕙	杨 娟	杨 烁
杨云鹏	叶子奇	易 斌*	尹 月	于鲁海	于芝颖	袁 芃	袁 霞
曾宏亮	曾 理	曾 亮	曾媚姿	曾 珊	曾卫强	张春波*	张家兴
张乐蒙*	张瑞光	张师前	张英丽	张永昌	赵德华	赵东陆	郑 虹
钟 警	钟外生	钟 喆	周春花	周殿友	周芙玲	周文虎	周于禄*
周钰娟	周泽平	邹冬玲	邹双发	左笑丛			

标*的为本期审稿专家