

长链非编码 RNA DNM3OS 在胃癌中的研究

刘莹 陈兴银 谭婷 刘长青 汤顺玉 李响

摘要 目的 本研究旨在探讨 DNM3OS 对胃癌细胞的作用及其对胃癌患者预后预测的作用。方法 选取 2012 年 1 月 ~ 2016 年 1 月在笔者医院接受手术的胃癌患者,提取总 RNA,检测 DNM3OS 的水平,随访患者预后。同时培养胃癌细胞 AGS 和 MKN45 细胞系,采用 DNM3OS 干扰 RNA 沉默 DNM3OS,通过 Tunel 方法检测胃癌细胞的凋亡水平,通过 MTT 实验检测细胞活性;采用免疫印迹法检测信号通路。**结果** 与癌旁组织比较,DNM3OS 在胃癌组织中的表达显著上调 ($P < 0.05$),且 DNM3OS 高表达患者肿瘤浸润深度,淋巴结转移和 TNM 分级与 DNM3OS 低表达患者比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);DNM3OS 高表达患者病死率明显高于 DNM3OS 低表达患者 ($P < 0.05$)。在胃癌细胞 AGS 和 MKN45 细胞系中沉默 DNM3OS 后,DNM3OS 沉默组细胞活性较对照组明显降低 ($P < 0.05$),细胞凋亡较对照组明显增加 ($P < 0.05$);免疫印迹法结果显示,DNM3OS 沉默组细胞 Akt 的活化较对照组明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** DNM3OS 的表达与胃癌患者预后明显相关,其通过增加 Akt 的活化促进胃癌细胞的生存。

关键词 长链非编码 RNA DNM3OS 胃癌 预后 Akt

中图分类号 R573.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.11.033

Experimental Study on the Role of Long-chain Non-coding RNA DNM3OS in Gastric Cancer. Liu Ying, Chen Xingyin, Tan Ting, et al. Department of Gastroenterology, Jingmen No. 1 People's Hospital, Hubei 448000, China

Abstract Objective To investigate the effect of DNM3OS on gastric cancer cells and its prognostic value in patients with gastric cancer. **Methods** Total RNA was extracted from gastric cancer patients who underwent surgery in our hospital from January 2012 to January 2016. DNM3OS levels were detected and the prognosis was followed up. At the same time, AGS and MKN45 cell lines were cultured. DNM3OS interfering RNA was used to silence DNM3OS. The apoptotic level of gastric cancer cells was detected by Tunel staining, the cell activity was detected by MTT test, and the signal pathway was detected by Western blotting. **Results** Compared with the normal adjacent tissues, the expression of DNM3OS in gastric cancer tissues was significantly increased ($P < 0.05$). And the depth of invasion, lymph node metastasis and TNM grade in patient with high expression of DNM3OS was significantly difference with that in patient with low expression of DNM3OS ($P < 0.05$). Patient with high expression level of DNM3OS was correlated with higher death rate compared with patient with low level of DNM3OS ($P < 0.05$). After silencing DNM3OS in gastric cancer cell lines in AGS and MKN45, the viability of cells in DNM3OS silencing group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$), and the apoptosis was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). Western blotting results showed that the activation of Akt in DNM3OS silencing group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of DNM3OS is significantly correlated with the prognosis of gastric cancer patients. DNM3OS promotes the survival of gastric cancer cells by increasing the activation of Akt.

Key words Long-chain non-coding RNA; DNM3OS; Gastric cancer; Prognosis; Akt

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,是全球三大癌症死亡原因。胃癌在全球的发生率因地区而异,在东亚其发生率最高^[1,2]。大多数患者首诊时即发现在癌症晚期,已经出现了转移。尽管近年来在外科技术和放、化疗方面取得了较大进展,然而晚期胃癌患者预后仍不理想^[3]。因此,充分了解胃癌发展的潜在分子机制,寻找新的诊断标志物和发掘新的肿瘤侵袭转

移的治疗靶点迫在眉睫。

长链非编码 RNA (LncRNA) 是一类超过 200 个核苷酸的转录物质,其没有编码蛋白的潜能,但是多数研究表明 LncRNA 在肿瘤的发生、发展中发挥关键作用。LncRNA 参与多种肿瘤生物学作用,包括肿瘤增殖、侵袭、转移、凋亡和化疗药物的抵抗^[4]。研究表明 LncRNA 的失调在诱导胃癌的发生和转移中发挥重要作用^[5]。DNM3OS 是一种新发现的 LncRNA,前期研究报道其在卵巢癌中通过诱导上皮向间质转化促进卵巢癌的侵袭,降低其生存率。然而其在胃癌

作者单位:448000 荆门市第一人民医院消化内科(刘莹、谭婷、刘长青、汤顺玉、李响),脊柱外科(陈兴银)

中的作用尚无报道。本研究旨在探讨 DN3OS 在胃癌患者中的表达及其与胃癌患者预后的关系,探讨 DN3OS 对胃癌细胞系的作用和机制,为胃癌的防治提供新的理论基础。

材料与方 法

1. 患者样本:肿瘤及其癌旁组织来源于 2012 年 1 月~2016 年 1 月在笔者医院接受手术的胃癌患者。研究方案经笔者医院伦理学委员会批准。所有参与者均知情同意。所有患者在手术前均未接受放疗或化疗。所有胃癌组织标本均取后立即快速冷冻在 -80℃ 下储存。采用电话随访的方式进行随访,每半年 1 次,询问患者再入院情况和死亡情况。

2. 细胞培养和转染:人胃上皮细胞系 AGS 和 MKN45(上海中国科学院细胞库)在含有 10% 胎牛血清(美国 Sigma 公司)的 RPMI-1640 培养基中培养。细胞转染:将 2×10^5 个细胞接种到 6 孔板中,用脂质体 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)进行细胞转染。siRNA 序列如下:si-DN3OS: 5'-CAAC-TAGTGTTC AACTATA-3'。

3. RT-PCR 检测:提取胃癌组织和细胞的总 RNA,用反转录酶 XL(日本 TaKaRa 公司)、寡核苷酸和随机引物将 1μg 总 RNA 反转录为 cDNA。采用 QuantStudio 5 real-time PCR 系统(美国 Thermo fisher 公司)以及 SYBR green 反应试剂盒(美国 Biosystems 公司)进行 PCR 扩增反应,以肌动蛋白 β(β-actin)作为内参。

4. 免疫印迹法:提取胃癌组织和细胞的总蛋白,采用裂解液裂解蛋白后离心取上清总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量,采用 10% 是 SDS-page 进行凝胶电泳,将蛋白转移到 PVGF 膜上,采用 5% 脱脂牛奶封闭 30min,采用相应的一抗孵育过夜,采用荧光二抗孵育 1h,采用 Odessey 红外系统进行显色,所有蛋白与内参 β-actin 进行比较。

5. MTT 试剂盒检测细胞增殖:细胞接种于 96 孔板中,处理完毕后每孔加入 10μl MTT 溶液(5mg/ml,即 0.5% MTT),继续培养 4h。用 PBS 冲 2~3 遍后,每孔加入 150μl 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡 10min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 A_{490nm} 处测量各孔的吸光度值。

6. 凋亡染色检测:采用 TUNEL 染色检测凋亡阳性细胞数量,处理好的细胞采用 4% 多聚甲醛固定 15min,用预冷的乙醇和冰醋酸 1:1 溶液后固定,采用 0.2% TritonX 200 通透细胞 5min,孵育 TUNEL 反应

混合液 1h,采用 DAPI 染色细胞核。以每个视野下绿色和蓝色细胞核重叠百分数作为细胞凋亡百分数。

7. 统计学方法:每个实验至少重复 3 次。采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析。所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用非配对 t 检验(两组之间的比较)或单因素方差分析进行比较。计数资料两者之间的比较采用 χ^2 检验。生存曲线采用 Kaplan-Meier 曲线评估;生存率采用对数秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. DN3OS 在胃癌组织和细胞中表达升高:RT-PCR 结果显示,与癌旁组织比较,DN3OS 在胃癌组织中的表达显著升高($P < 0.05$);与正常细胞比较,AGS 细胞系中 DN3OS 的表达显著增高($P < 0.05$);与正常细胞比较,MKN45 细胞系中 DN3OS 的表达显著增高($P < 0.05$),详见图 1。

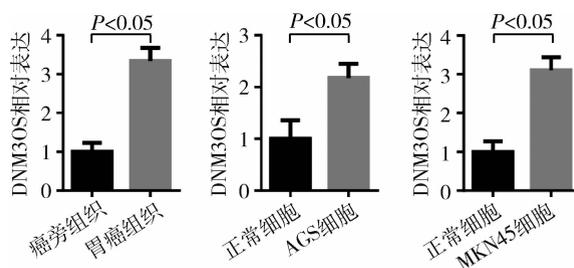


图 1 DN3OS 在胃癌组织和细胞中表达升高

2. DN3OS 表达与胃癌患者肿瘤浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分级相关性:纳入的 50 例患者,以 DN3OS 表达的中位数为界限,将其分为 DN3OS 高表达组, DN3OS 低表达组,两组患者的肿瘤组织分化程度、Bormann 分型、肿瘤直径和神经侵犯率、血管侵犯率比较,差异无统计学意义,而 T 分级、N 分级和 TNM 分级差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

3. DN3OS 表达与胃癌患者生存率的关系:随访患者 36 个月,统计患者病死率, DN3OS 高表达组患者死亡 15 例,病死率高达 50%,而 DN3OS 低表达组患者死亡 4 例,病死率为 20%,两组存活率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),生存率曲线详见图 2。

4. DN3OS 沉默减少胃癌 AGS 细胞系的增殖,增加其凋亡:培养胃癌 AGS 细胞系,采用 siRNA 沉默 DN3OS 的表达后其表达明显低于对照组($P < 0.05$),证明 siRNA 的转染是成功的。MTT 试验结果显示,在培养 12、24、48 和 72h,对照组 AGS 细胞不断

表 1 DNM3OS 的表达与胃癌患者肿瘤浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分级的关系

项目	DNM3OS 低表达组 (n = 20)	DNM3OS 高表达组 (n = 30)	P
组织分化程度			0.321
低	13	23	
中	4	3	
高	3	4	
Bormann 分型			0.442
I ~ II	5	4	
III ~ IV	15	26	
肿瘤直径 (cm)			0.126
≤5	10	9	
>5	10	21	
神经侵犯	13	18	0.724
血管侵犯	15	14	0.724
T 分级			0.012
T ₁₋₃	13	3	
T ₄	7	27	
N 分级			0.027
N ₀	13	27	
N ₁₋₃	7	4	
M 分级			0.254
M ₀	17	26	
M ₁	3	4	
TNM 分级			0.015
I ~ II	10	5	
III ~ IV	10	25	

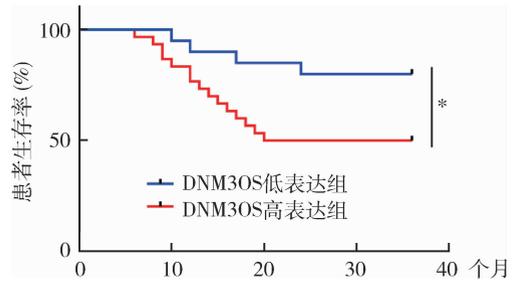


图 2 DNM3OS 表达与胃癌患者生存率的关系
两组比较, * P < 0.05

增殖,而 DNM3OS 沉默组 (si - DNM3OS) 细胞增殖明显低于对照组 ($P < 0.05$), 详见图 3B。采用 TUNEL 染色检测细胞凋亡水平, 对照组细胞凋亡率为 $5.6\% \pm 1.2\%$, DNM3OS 沉默组细胞凋亡率为 $29.7\% \pm 4.5\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见图 3C。

5. DNM3OS 沉默减少胃癌 MKN45 细胞系的增殖, 增加其凋亡: 培养胃癌 MKN45 细胞系, 采用 siRNA 沉默 DNM3OS 的表达后其表达明显低于对照组 ($P < 0.05$), 证明 siRNA 的转染是成功的 (图 4A)。MTT 试验结果显示, 在培养 12、24、48 和 72h, 对照组 MKN45 细胞不断增殖, 而 DNM3OS 沉默组 (si - DNM3OS) 细胞增殖明显低于对照组 ($P < 0.05$, 图 4B)。采用 TUNEL 染色检测细胞凋亡水平, 结果显示,

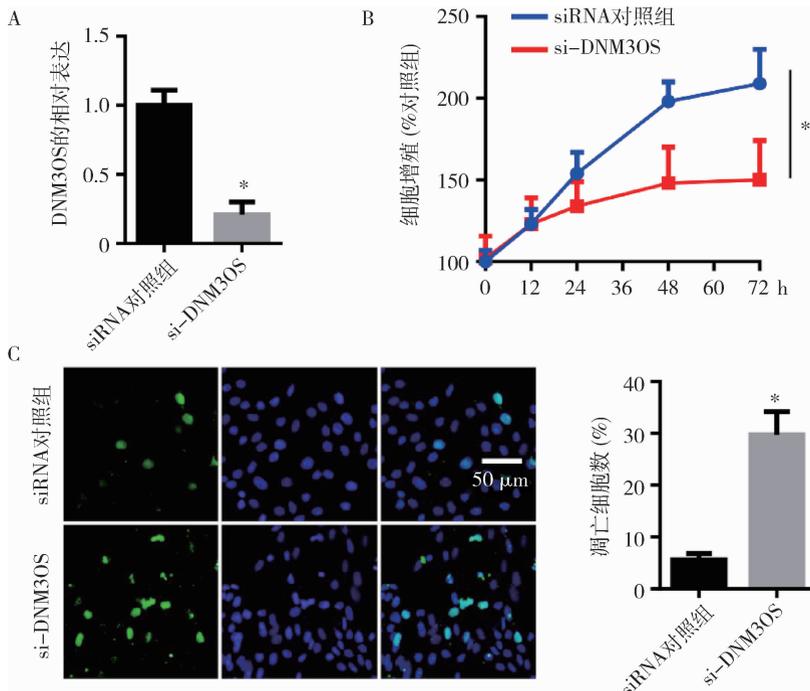


图 3 DNM3OS 沉默减少胃癌 AGS 细胞系的增殖, 增加其凋亡

C. 绿色为凋亡细胞, 蓝色为细胞核 ($\times 400$); 与 siRNA 对照组比较, * $P < 0.05$

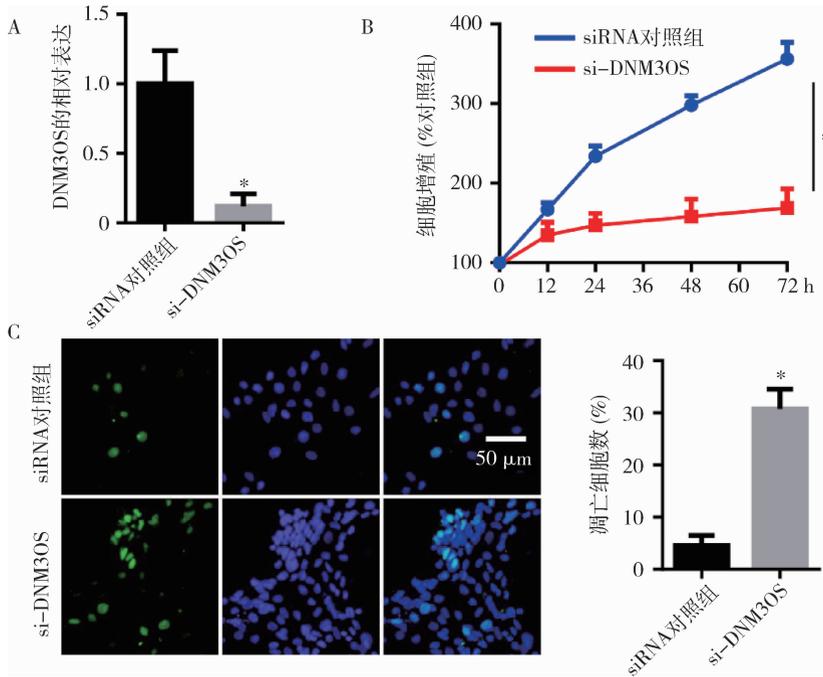


图4 DNM3OS 沉默减少胃癌 MKN45 细胞系的增殖,增加其凋亡
C. 绿色为凋亡细胞,蓝色为细胞核(×400);与 siRNA 对照组比较,* $P < 0.05$

对照组细胞凋亡率为 $54.6\% \pm 1.9\%$, DNM3OS 沉默组细胞凋亡率为 $30.7\% \pm 3.8\%$, 两组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4C)。

6. DNM3OS 调控 Akt 信号分子: 免疫印迹法检测结果显示, 在 AGS 细胞系中, DNM3OS 沉默组 Akt 的磷酸化水平明显低于对照组 ($P < 0.05$, 图 5A); 在 MKN45 细胞系, DNM3OS 沉默组 Akt 的磷酸化水平同样明显低于对照组 ($P < 0.05$, 图 5B)。

讨 论

研究表明 LncRNAs 在肿瘤的各种生命过程中发挥关键作用, 这表明其可以作为判断肿瘤预后的分子标志物和治疗靶点^[6,7]。目前为止, 多数研究发现在胃癌组织中多种 LncRNA 表达失调, 包括 GCLNC1、PANDAR、MALAT1、GCRL1^[8-10]。本研究发现与相邻正常组织比较, LncRNA DNM3OS 在胃癌组织中显著上调。且 DNM3OS 高表达的患者肿瘤侵袭、淋巴结转移、TNM 分期明显差于 DNM3OS 低表达患者。DNM3OS 高表达患者的生存率也低于预后 DNM3OS 低表达患者。这些结果表明, DNM3OS 可能是作为潜在的胃癌预后判断的生物学标志物。为了进一步评估 DNM3OS 在胃癌细胞发展中的作用, 笔者采用 DNM3OS siRNA 对两种胃癌细胞增殖和凋亡的影响。结果表明, DNM3OS 沉默抑制了胃癌细胞增殖, 促进胃癌细胞的凋亡。这些结果表明 DNM3OS 在胃癌细

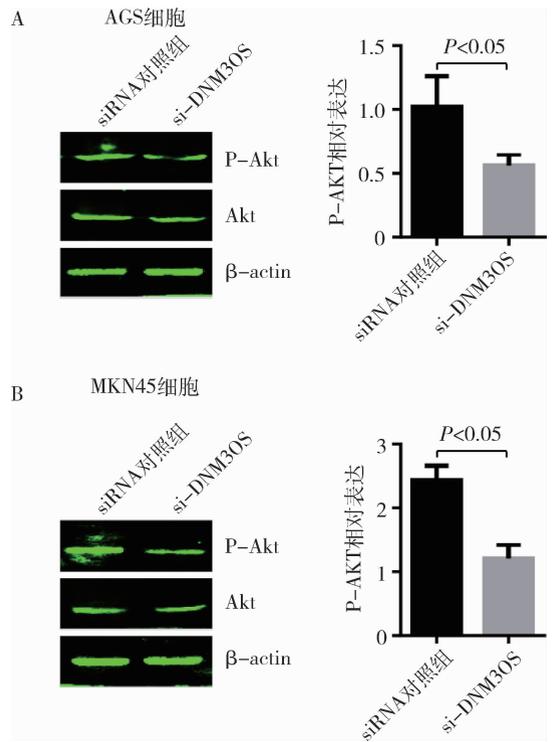


图5 DNM3OS 调控 Akt 信号分子

胞中发挥肿瘤促进作用。

Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[11]。Akt 是 Akt/PI₃K/PTEN 信号通路中的关键蛋白。Akt 一旦被磷酸化激活, 在恶性转化过程中起着重要作

用^[11,12]。磷酸化 Akt(P - Akt)通过激活下游的哺乳动物雷帕霉素干扰细胞凋亡、促进细胞增殖和运动^[13]。过度表达的 P - Akt 被认为是许多恶性肿瘤预后不良的重要指标^[14-16]。一项 Meta 分析表明, P - Akt 高表达与乳腺癌患者的总体生存率差显著相关^[17]。P - Akt 表达升高与非小细胞肺癌患者生存率低显著相关^[18]。此外, P - Akt 表达升高与胃癌患者预后差明显相关^[19]。而本研究发现,在 DN3OS 沉默后 AGS 胃癌细胞系和 MKN45 胃癌细胞系中 Akt 的激活明显下调,提示 DN3OS 可能通过上调 Akt 促进胃癌细胞的增殖,抑制其凋亡发挥促胃癌发生、发展的作用。

综上所述, DN3OS 在胃癌中高表达,其可能作为新的生物学标志物用于判断胃癌患者的预后; DN3OS 可能通过促进 Akt 的活化促进胃癌细胞的生存和进展。本研究为胃癌治疗提供了新思路,未来基于 DN3OS 为靶点的新药物可能成为治疗胃癌的新策略。

参考文献

- Song Z, Wu Y, Yang J, *et al.* Progress in the treatment of advanced gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317714626
- Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, *et al.* Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(5): 700 - 713
- Song YY. Progression on citrullination of proteins in gastrointestinal cancers [J]. *Front Oncol*, 2019, 9(1): 15 - 23
- Li JF, Li WH, Xue LL, *et al.* Long non - coding RNA PICART1 inhibits cell proliferation by regulating the PI₃K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways in gastric cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(2): 588 - 597
- Lin Z, Zhou Z, Guo H, *et al.* Long noncoding RNA gastric cancer - related lncRNA1 mediates gastric malignancy through miRNA - 885 - 3p and cyclin - dependent kinase 4 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 607
- Wang X, Zhang L, Zhao F, *et al.* Long non - coding RNA taurine - upregulated gene 1 correlates with poor prognosis, induces cell proliferation, and represses cell apoptosis via targeting aurora kinase A in adult acute myeloid leukemia [J]. *Ann Hematol*, 2018, 97(8): 1375 - 1389
- Xing CY, Hu XQ, Xie FY, *et al.* Long non - coding RNA HOTAIR modulates c - KIT expression through sponging miR - 193a in acute myeloid leukemia [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(15): 1981 - 1987
- Sun HJ, Liang Q, Ren LL, *et al.* LncRNA GClnc1 promotes gastric carcinogenesis and may act as a modular scaffold of WDR5 and KAT2A complexes to specify the histone modification pattern [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(7): 784 - 801
- Liu J, Ben Q, Lu E, *et al.* Long noncoding RNA PANDAR blocks CDKN1A gene transcription by competitive interaction with p53 protein in gastric cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 168
- Hu YR, Yu YC, You S, *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 regulates autophagy associated chemoresistance via miR - 23b - 3p sequestration in gastric cancer [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 174
- Singh SS, Yap WN, Arfuso F, *et al.* Targeting the PI₃K/Akt signaling pathway in gastric carcinoma: a reality for personalized medicine? [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(43): 12261 - 12273
- Sasaki T, Kuniyasu H. Significance of AKT in gastric cancer (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(6): 2187 - 2192
- Ye Y, Ge YM, Xiao MM, *et al.* Suppression of SHIP2 contributes to tumorigenesis and proliferation of gastric cancer cells via activation of Akt [J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(3): 230 - 240
- Mundi PS, Sachdev J, McCourt C, *et al.* AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 82(4): 943 - 956
- Zhu Y, Tang H, Zhang L, *et al.* Suppression of miR - 21 - 3p enhances TRAIL - mediated apoptosis in liver cancer stem cells by suppressing the PI₃K/Akt/Bad cascade via regulating PTEN [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 955 - 968
- Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI₃K signaling in cancer: beyond AKT [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 62 - 71
- Yang Y, Luo J, Zhai X, *et al.* Prognostic value of phospho - Akt in patients with non - small cell lung carcinoma: a Meta - analysis [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(6): 1417 - 1424
- Qiu ZX, Zhang K, Qiu XS, *et al.* The prognostic value of phosphorylated AKT expression in non - small cell lung cancer: a Meta - analysis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81451
- Cao ZC, Han W, Gao XJ, *et al.* p - Akt as a potential poor prognostic factor for gastric cancer: a systematic review and Meta - analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 59878 - 59888
(收稿日期:2019 - 02 - 24)
(修回日期:2019 - 03 - 02)

(上接第 147 页)

- El - Hamid AMA, Yassin HM. Effect of intranasal dexmedetomidine on emergence agitation after sevoflurane anesthesia in children undergoing tonsillectomy and/or adenoidectomy [J]. *Saudi J Anaesth*, 2017, 11(2): 137 - 143
- Prabhu MK, Mehandale SG. Comparison of oral dexmedetomidine versus oral midazolam as premedication to prevent emergence agitation after sevoflurane anaesthesia in paediatric patients [J]. *Indian J Anaesth*, 2017, 61(2): 131 - 136

- 纪存良,张炳熙. 控制心率对鼻内镜手术患者硝酸甘油控制性降压时粘膜血流的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(4): 385 - 388
- 杨颖聪,夏中元. 右美托咪定对神经病理性疼痛作用及其机制 [J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(7): 78 - 83
- 祝瑜,田磊. 右美托咪定致家兔窦性心动过缓模型中心脏窦房结 Cx45/Cx31.9 基因表达的变化 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(8): 801 - 804
(收稿日期:2019 - 03 - 01)
(修回日期:2019 - 03 - 06)