

LINC01296调控Wnt/ β -catenin信号通路影响SK-N-SH细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭

王青松 夏鹰* 陈焕雄

(海口市人民医院, 神经外科, 海口 570000)

摘要 该研究探讨长链非编码RNA LINC01296(lncRNA LINC01296)是否通过调控Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路而调节人神经母细胞瘤细胞SK-N-SH增殖、凋亡、迁移及侵袭。采用qRT-PCR法检测神经母细胞瘤组织与瘤旁组织中LINC01296的表达水平;体外培养SK-N-SH细胞,随机分为Control组(正常培养SK-N-SH细胞)、si-NC组(si-NC转染至SK-N-SH细胞)、si-LINC01296组(si-LINC01296转染至SK-N-SH细胞)、LiCl组(Wnt/ β -catenin信号通路激活剂处理SK-N-SH细胞)、si-LINC01296+LiCl组(si-LINC01296与LiCl共同处理SK-N-SH细胞);采用甲基噻唑基四唑(MTT)与克隆形成实验检测细胞增殖能力;Transwell小室实验检测细胞迁移及侵袭能力;流式细胞术检测细胞凋亡率;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测增殖标记蛋白细胞增殖核抗原-67(Ki67)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cleaved-caspase3)、Wnt1、 β -catenin蛋白表达量。结果显示与瘤旁组织比较,神经母细胞瘤组织中LINC01296的表达水平降低($P<0.05$);与si-NC组比较,si-LINC01296组细胞活力显著降低($P<0.05$),克隆形成数、迁移细胞数、侵袭细胞数显著减少($P<0.05$),凋亡率显著升高($P<0.05$),Wnt1、 β -catenin、Ki67、N-cadherin蛋白水平显著降低($P<0.05$),E-cadherin、cleaved-caspase3蛋白水平显著升高($P<0.05$);激活Wnt/ β -catenin信号通路可部分逆转干扰LINC01296表达对SK-N-SH细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响($P<0.05$);与LiCl组比较,si-LINC01296+LiCl组细胞活力显著降低($P<0.05$),克隆形成数、迁移细胞数、侵袭细胞数显著减少($P<0.05$),凋亡率显著升高($P<0.05$),Wnt1、 β -catenin、Ki67、N-cadherin蛋白水平显著降低($P<0.05$),E-cadherin、cleaved-caspase3蛋白水平显著升高($P<0.05$)。该研究得出,干扰LINC01296表达可抑制SK-N-SH细胞增殖、迁移、侵袭及诱导细胞凋亡,其作用机制可能与抑制Wnt/ β -catenin信号通路的激活有关。

关键词 lncRNA LINC01296; Wnt/ β -catenin信号通路; SK-N-SH细胞; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡

LINC01296 Regulates Wnt/ β -catenin Signaling Pathway and Affects SK-N-SH Cell Proliferation, Apoptosis, Migration and Invasion

WANG Qingsong, XIA Ying*, CHEN Huanxiong

(Department of Neurosurgery, Haikou People's Hospital, Haikou 570000, China)

Abstract This study was to investigate whether lncRNA LINC01296 could regulate the proliferation, apoptosis, migration and invasion of human neuroblastoma cell SK-N-SH by regulating Wnt/ β -catenin signaling

收稿日期: 2020-07-17

接受日期: 2020-10-09

国家自然科学基金(批准号: 8176050443)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13687581177, E-mail: xiaying008@163.com

Received: July 17, 2020

Accepted: October 9, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.8176050443)

*Corresponding author. Tel: +86-13687581177, E-mail: xiaying008@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5400>

pathway. The qRT-PCR method was used to detect the expression level of LINC01296 in neuroblastoma tissues and adjacent tissues. SK-N-SH cells were cultured *in vitro* and randomly divided into Control group (normally cultured SK-N-SH cells), si-NC group (si-NC transfected to SK-N-SH cells), si-LINC01296 group (si-LINC01296 transfected into SK-N-SH cells), LiCl group (Wnt/ β -catenin signaling pathway activator treated SK-N-SH cells), si-LINC01296+LiCl group (si-LINC01296 and LiCl co-treated SK-N-SH cells). MTT and clone formation experiments were used to detect the cell proliferation ability. Transwell cell test was used to detect cell migration and invasion abilities. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. Western blot was used to detect the expression of Ki67, N-cadherin, E-cadherin, cleaved-caspase3, Wnt1, β -catenin protein. Compared with adjacent tissues, the expression level of LINC01296 in neuroblastoma tissues was reduced ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the cell viability of the si-LINC01296 group was significantly reduced ($P<0.05$); the number of clone formation, the number of migrated cells, and the number of invasive cells were significantly reduced ($P<0.05$), and the apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$); the levels of Wnt1, β -catenin, Ki67, N-cadherin proteins were significantly reduced ($P<0.05$); the levels of E-cadherin, cleaved-caspase3 proteins were significantly increased ($P<0.05$). Activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway could partially reverse the effect of interfering with the expression of LINC01296 on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of SK-N-SH cells ($P<0.05$). Compared with the LiCl group, the cell viability of the si-LINC01296+LiCl group was significantly reduced ($P<0.05$); the number of clone formation, migrated cells, and invasion cells were significantly reduced ($P<0.05$), and the apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$); the levels of Wnt1, β -catenin, Ki67, N-cadherin proteins were significantly reduced ($P<0.05$); the levels of E-cadherin and cleaved-caspase3 proteins were significantly increased ($P<0.05$). Interference with the expression of LINC01296 could inhibit the proliferation, migration, invasion and apoptosis of SK-N-SH cells, and its mechanism might be related to inhibiting the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords lncRNA LINC01296; Wnt/ β -catenin signaling pathway; SK-N-SH cells; proliferation; migration; invasion; apoptosis

神经母细胞瘤是临床常见的一种神经系统恶性肿瘤,近年来,我国神经母细胞瘤发病率逐年上升,常发生于儿童时期,已严重影响患儿的健康,由于神经母细胞瘤细胞增殖异常导致患儿预后很差,关于神经母细胞瘤发病机制尚未完全阐明^[1-2]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)属于内源性非编码RNA分子,其在肿瘤中表达异常并可能调控细胞增殖及分化等过程从而参与神经母细胞瘤等多种肿瘤发生及发展过程^[3-4]。lncRNA LINC01296在结直肠癌细胞中表达上调,并可促进结直肠癌的进展^[5]。但LINC01296在神经母细胞瘤中的表达情况及其作用机制尚未阐明。Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路可参与细胞增殖、凋亡等生物学过程, Wnt/ β -catenin信号通路被激活后可通过上调 β -catenin表达而促进细胞增殖相关蛋白表达从而促进细胞增殖^[6]。但LINC01296是否可通过调控Wnt/ β -catenin信号通路从而影响人神经母细胞瘤细胞SK-N-SH增殖、凋亡、迁移及侵袭尚未可知。因此,

本研究主要探讨LINC01296对SK-N-SH细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响,探究其对Wnt/ β -catenin信号通路的调控作用,为神经母细胞瘤的靶向治疗提供新方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 一般资料 神经母细胞瘤组织及癌旁组织:选取本院2017年1月至2018年10月收治的27例神经母细胞瘤患者为研究对象,其中男17例,女10例,年龄1~13岁,平均年龄(5.63 \pm 2.25)岁,所有患者均经病理证实为神经母细胞瘤,术中切除神经母细胞瘤组织及癌旁组织。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者及家属知情且签署同意书。

1.1.2 细胞与试剂 人神经母细胞瘤细胞SK-N-SH购自美国ATCC公司; Wnt/ β -catenin信号通路激活剂LiCl购自美国Amresco公司; DMEM、胎牛血清购自美国Gibco公司; Lipofectamine 2000、胰蛋白酶

购自美国 Thermo Fisher 公司; LINC01296 小分子干扰 RNA (si-LINC01296) (ACG UAG CAG CAU GUC G)、乱序无意义阴性序列 (si-NC) (UAG UGU CUA UCU AGU AGU) 购自广州锐博生物科技有限公司; Trizol 试剂、甲基噻唑基四唑 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 购自北京索莱宝科技有限公司; 反转录与荧光定量检测试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司; RIPA 裂解液购自北京全式金生物技术有限公司; 兔抗人增殖标记蛋白细胞增殖核抗原 67 (Ki67) (货号: sc-23900)、神经型钙黏蛋白 (N-cadherin) (货号: sc-8424)、上皮型钙黏蛋白 (E-cadherin) (货号: sc-8426)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cleaved-caspase3) (货号: sc-7272) 购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗人 Wnt1 (货号: ab15251) 购自美国 Abcam 公司; 兔抗人 β -连环蛋白 (β -catenin) (货号: AC106) 购自碧云天生物技术有限公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗 (货号: 3310-1) 购自武汉艾美捷科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 SK-N-SH 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素与 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱培养, 取对数生长期细胞接种于 6 孔板 (3×10^4 个/孔), 随机分为 Control 组 (正常培养的细胞 48 h)、si-NC 组 (si-NC 转染至 SK-N-SH 细胞 48 h)、si-LINC01296 组 (si-LINC01296 转染至 SK-N-SH 细胞 48 h)、LiCl 组 (添加浓度为 10 mmol/L LiCl 的培养基培养 SK-N-SH 细胞 48 h)^[7]、si-LINC01296+LiCl 组 (si-LINC01296 转染至 SK-N-SH 细胞 6 h 后将培养基更换为含有浓度为 10 mmol/L LiCl 的培养基培养 SK-N-SH 细胞 48 h)。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测细胞中 LINC01296 的表达水平 收集 Control 组、si-NC 组、si-LINC01296 组 SK-N-SH 细胞, 采用 Trizol 法提取细胞中总 RNA, 应用 Nanodrop 2000c 超微量分光光度计检测 RNA 浓度。LINC01296 正向引物 5'-ACA TAG GAG ATC GAG GCT GC-3', 反向引物 5'-AGC ATT CCT GAG TCA GCC T-3'; GAPDH 正向引物 5'-AAC GGA TTT GGT CGT ATT G-3', 反向引物 5'-GGA AGA TGG TGA TGG GAT T-3', 引物由上海

生工生物工程股份有限公司设计合成。反转录得到 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增, 反应体系: 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, MgSO₄ 2.5 μ L, dNTPs 2.5 μ L, 正反向引物各 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, RNase-Free ddH₂O 补足体系至 25 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 60 s; 95 $^{\circ}$ C 60 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 36 次循环。LINC01296 以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 LINC01296 相对表达量。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖 收集各组 SK-N-SH 细胞接种于 96 孔板 (1×10^4 个/孔), 每孔加入 20 μ L 质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μ L DMSO, 室温避光孵育 5 min, 应用酶标仪检测各孔吸光度 (D) 值。

1.2.4 平板克隆形成实验 取各组 SK-N-SH 细胞, 按照每孔 1 000 个的密度接种于 6 孔板, 置于培养箱内培养, 每 2 天更换 1 次培养基, 继续培养 14 天, 弃培养基, 采用预冷 PBS 洗涤细胞, 加入甲醇 (500 μ L/孔), 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育 20 min, 弃甲醇, 加入 1% 结晶紫染色液 (400 μ L/孔) 染色 15 min, 回收结晶紫染液, 蒸馏水洗涤 3 min, 晾干、拍照。

1.2.5 Transwell 实验检测细胞迁移与侵袭 Transwell 小室实验检测细胞迁移及侵袭。细胞迁移实验: 取对数生长期 SK-N-SH 细胞, 加入培养基制备细胞悬液 (5×10^4 个/mL), 按照每孔 200 μ L 的密度加入 Transwell 小室的上室, Transwell 小室的下室加入含有 10% 胎牛血清的培养液, 置于培养箱内继续孵育 24 h, 取出小室, 采用 PBS 洗涤, 依次分别使用多聚甲醛固定 20 min 与 0.1% 结晶紫染色 10 min, 观察迁移细胞数。细胞侵袭实验: 实验前需使用培养基稀释 Matrigel 基质胶, 将 Matrigel 基质胶稀释液加入 Transwell 小室的上室 (40 μ L/孔), 置于培养箱内孵育 5 h, 后续实验步骤同细胞迁移实验, 置于显微镜下观察侵袭细胞数。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率 取各组 SK-N-SH 细胞, 预冷 PBS 洗涤, 弃上清, 收集细胞沉淀, 加入 500 μ L 结合缓冲液重悬细胞, 分别加入 5 μ L Annexin V-FITC 与 5 μ L PI, 室温振荡孵育 10 min, 应用 FACS Calibur 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.7 蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测 Wnt1、 β -catenin、Ki67、N-cadherin、E-cadherin、cleaved-caspase3 蛋白表达 取各组 SK-N-SH 细胞, 加入 500 μ L RIPA 裂解液, 冰上孵育 30 min, 4 $^{\circ}$ C 条件下 3 000 r/min 离心

6 min, 提取细胞总蛋白。采用BCA法检测蛋白浓度, 蛋白样品中加入 $5\times$ SDS上样缓冲液, 沸水煮10 min, 蛋白变性, 采用SDS-PAGE分离蛋白, 转移至PVDF膜, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 分别加入一抗稀释液(1:1 000), 4 °C孵育过夜, TBST洗涤, 分别加入二抗稀释液(1:2 000), 室温孵育1 h, TBST洗涤, 滴加ECL, 暗室内曝光显影, 应用Image J软件分析各条带灰度值。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析数据, 计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示且均符合正态分布, 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, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR检测LINC01296在各个分组处理的SK-N-SH中的表达

与瘤旁组织比较, 神经母细胞瘤组织中LINC01296的表达水平降低($P<0.05$); 与Control组、si-NC组比较, si-LINC01296组LINC01296的表达水平显著降低($P<0.05$)(表1和表2)。

2.2 MTT法检测各个分组处理的SK-N-SH细胞活性

与si-NC组比较, si-LINC01296组细胞活力显著降低($P<0.05$); 与si-LINC01296组比较, si-LINC01296+LiCl组细胞活力显著升高($P<0.05$); 与LiCl组比较, si-LINC01296+LiCl组细胞活力显著降低($P<0.05$)(表3)。

表1 LINC01296在神经母细胞瘤中的表达

Table 1 Expression of LINC01296 in neuroblastoma

组别 Groups	n	LINC01296
Peritumoral tissue	27	1.01 \pm 0.13
Neuroblastoma tissue	27	0.28 \pm 0.03*
t		28.431
P		0

* $P<0.05$, 与瘤旁组织组相比。

* $P<0.05$ compared with the peritumoral tissue group.

表2 LINC01296的表达

Table 2 Expression of LINC01296

组别 Groups	LINC01296
Control	0.99 \pm 0.07
si-NC	1.00 \pm 0.10
si-LINC01296	0.22 \pm 0.03*#
F	342.171
P	0

$n=9$, * $P<0.05$, 与Control组相比; # $P<0.05$, 与si-NC组相比。

$n=9$, * $P<0.05$ compared with Control group; # $P<0.05$ compared with si-NC group.

表3 各个分组处理的SK-N-SH细胞活性

Table 3 Activity of SK-N-SH cells treated by each group

组别 Groups	D 值 D value
Control	0.81 \pm 0.06
si-NC	0.81 \pm 0.07
si-LINC01296	0.38 \pm 0.04*#
LiCl	1.31 \pm 0.07*#&
si-LINC01296+LiCl	0.68 \pm 0.05*#&@
F	289.980
P	0

$n=9$, * $P<0.05$, 与Control组相比; # $P<0.05$, 与si-NC组相比; & $P<0.05$, 与si-LINC01296组相比; @ $P<0.05$, 与LiCl组相比。

$n=9$, * $P<0.05$ compared with Control group; # $P<0.05$ compared with si-NC group; & $P<0.05$ compared with si-LINC01296 group; @ $P<0.05$ compared with LiCl group.

2.3 克隆形成实验检测各个分组处理的SK-N-SH克隆形成数

与 si-NC 组比较, si-LINC01296 组克隆形成数显著减少 ($P < 0.05$); 与 si-LINC01296 组比较, si-LINC01296+LiCl 组克隆形成数显著增多 ($P < 0.05$); 与 LiCl 组比较, si-LINC01296+LiCl 组克隆形成数显著减少 ($P < 0.05$) (图1和表4)。

2.4 Tranwell检测各个分组处理的SK-N-SH迁移侵袭数

与 si-NC 组比较, si-LINC01296 组迁移细胞数、侵袭细胞数显著减少 ($P < 0.05$); 与 si-LINC01296 组比较, si-LINC01296+LiCl 组迁移细胞数、侵

袭细胞数显著增多 ($P < 0.05$); 与 LiCl 组比较, si-LINC01296+LiCl 组迁移细胞数、侵袭细胞数显著减少 ($P < 0.05$) (图2和表5)。

2.5 流式细胞检测各个分组处理的SK-N-SH凋亡率

与 si-NC 组比较, si-LINC01296 组凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与 si-LINC01296 组比较, si-LINC01296+LiCl 组凋亡率显著降低 ($P < 0.05$); 与 LiCl 组比较, si-LINC01296+LiCl 组凋亡率显著升高 ($P < 0.05$) (图3和表6)。

2.6 各个分组处理的SK-N-SH中Wnt/ β -catenin信号通路的表达

与 si-NC 组比较, si-LINC01296 组 Wnt1、 β -catenin

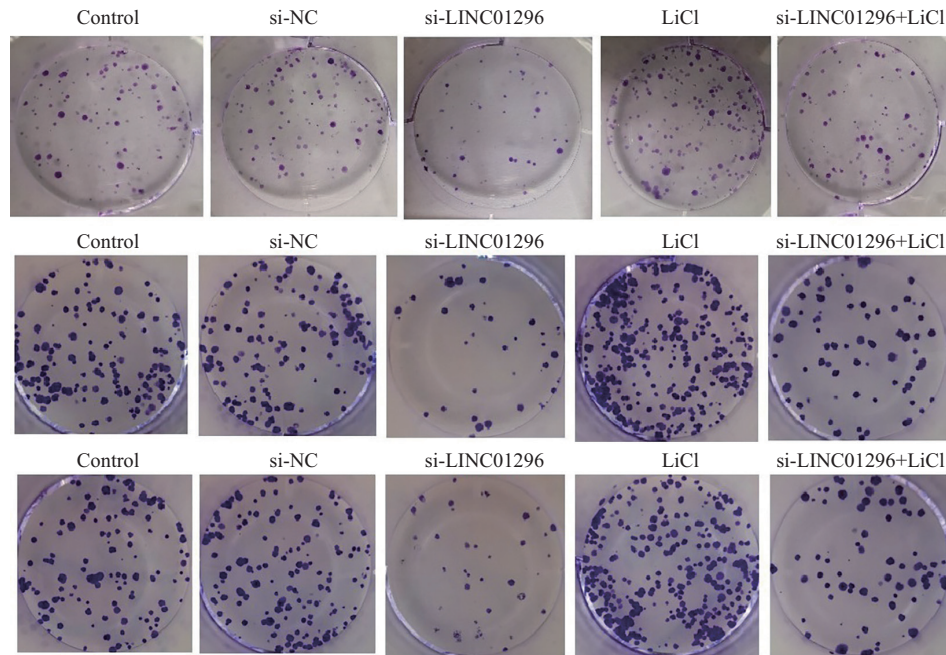


图1 克隆形成数的检测

Fig.1 Detection of clone formation number

表4 各个分组处理的SK-N-SH克隆形成数的检测

Table 4 Detection of SK-N-SH clone formation number in each group

组别 Groups	克隆形成数 Clone formation number
Control	97.44±5.23
si-NC	97.00±6.90
si-LINC01296	41.22±3.71* [#]
LiCl	151.11±5.82* ^{#&}
si-LINC01296+LiCl	79.11±4.58* ^{#&@}
<i>F</i>	492.579
<i>P</i>	0

$n=9$, * $P < 0.05$, 与Control组相比; [#] $P < 0.05$, 与si-NC组相比; [&] $P < 0.05$, 与si-LINC01296组相比; [@] $P < 0.05$, 与LiCl组相比。

$n=9$, * $P < 0.05$ compared with Control group; [#] $P < 0.05$ compared with si-NC group; [&] $P < 0.05$ compared with si-LINC01296 group; [@] $P < 0.05$ compared with LiCl group.

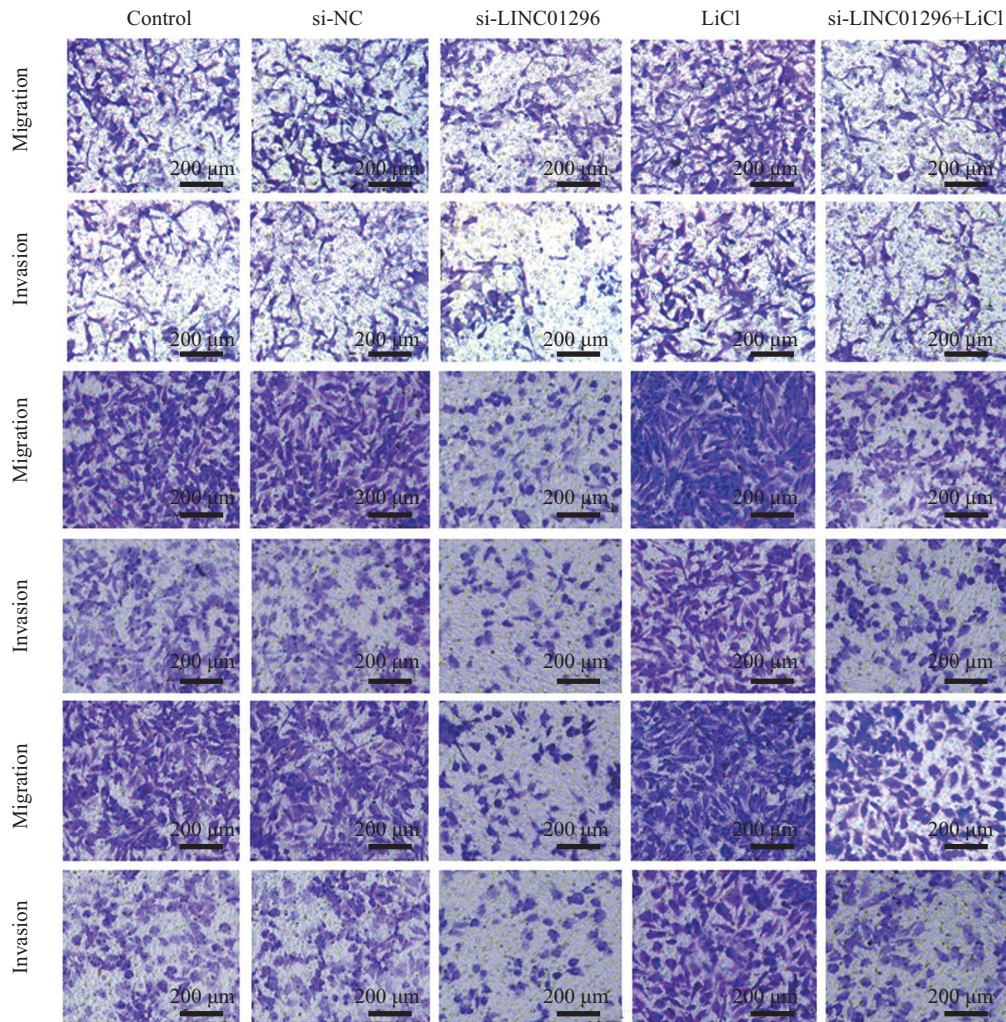


图2 迁移侵袭数的检测

Fig.2 Detection of the number of migration and invasion

表5 各个分组处理的SK-N-SH迁移侵袭数的检测

Table 5 Detection of the number of SK-N-SH migration and invasion of each group

组别 Groups	迁移细胞数 Number of migrating cells	侵袭细胞数 Number of invasion cells
Control	185.56±7.07	128.22±6.12
si-NC	184.44±5.96	127.44±8.58
si-LINC01296	90.11±4.65 [#]	61.67±4.92 [#]
LiCl	256.44±7.59 ^{*#&}	183.33±5.03 ^{*#&}
si-LINC01296+LiCl	156.78±5.43 ^{*#&@}	104.00±3.94 ^{*#&@}
<i>F</i>	832.407	497.503
<i>P</i>	0	0

$n=9$, $*P<0.05$, 与Control组相比; $^{\#}P<0.05$, 与si-NC组相比; $^{\&}P<0.05$, 与si-LINC01296组相比; $^{\textcircled{a}}P<0.05$, 与LiCl组相比。

$n=9$, $*P<0.05$ compared with Control group; $^{\#}P<0.05$ compared with si-NC group; $^{\&}P<0.05$ compared with si-LINC01296 group; $^{\textcircled{a}}P<0.05$ compared with LiCl group.

蛋白水平显著降低($P<0.05$); 与si-LINC01296组比较, si-LINC01296+LiCl组Wnt1、 β -catenin蛋白水平显著升高($P<0.05$); 与LiCl组比较, si-LINC01296+LiCl组Wnt1、 β -catenin蛋白水平显著降低($P<0.05$)(图4和表7)。

2.7 Western检测各个分组处理的SK-N-SH中Ki67、E-cadherin、N-cadherin、cleaved-caspase3蛋白的表达

与si-NC组比较, si-LINC01296组Ki67、N-cadherin

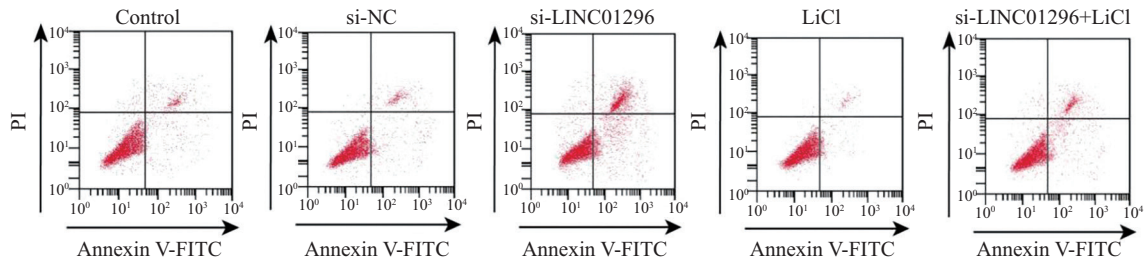


图3 凋亡率的检测

Fig.3 Detection of apoptosis rate

表6 各个分组处理的SK-N-SH细胞凋亡率的检测

Table 6 Detection of apoptosis rate of SK-N-SH cell in each group

组别 Groups	凋亡率/% Apoptosis rate /%
Control	8.00±0.40
si-NC	7.90±0.49
si-LINC01296	20.67±0.66 [#]
LiCl	2.76±0.40 ^{*#&}
si-LINC01296+LiCl	12.57±0.58 ^{*#&@}
<i>F</i>	1524.881
<i>P</i>	0

$n=9$, * $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与si-NC组相比; [&] $P<0.05$, 与si-LINC01296组相比; [@] $P<0.05$, 与LiCl组相比。

$n=9$, * $P<0.05$, compared with Control group; [#] $P<0.05$, compared with si-NC group; [&] $P<0.05$ compared with si-LINC01296 group; [@] $P<0.05$, compared with LiCl group.

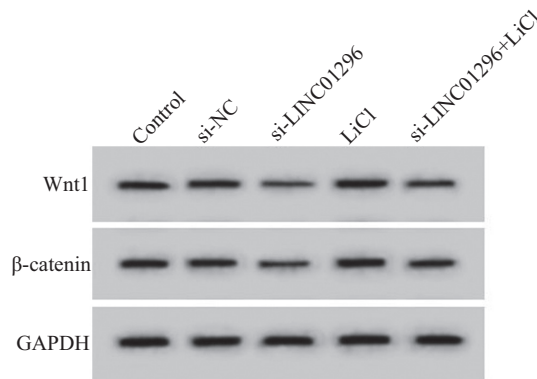


图4 Wnt/β-catenin信号通路的表达

Fig.4 The expression of Wnt/β-catenin signaling pathway

表7 各个分组处理的SK-N-SH中Wnt/β-catenin信号通路的表达

Table 7 Expression of Wnt/β-catenin signaling pathway in SK-N-SH treated by each group

组别 Groups	Wnt1	β-catenin
Control	0.67±0.05	0.77±0.05
si-NC	0.66±0.07	0.79±0.05
si-LINC01296	0.24±0.02 ^{*#}	0.27±0.02 ^{*#}
LiCl	0.87±0.06 ^{*#&}	1.17±0.06 ^{*#&}
si-LINC01296+LiCl	0.53±0.03 ^{*#&@}	0.62±0.04 ^{*#&@}
<i>F</i>	197.305	448.217
<i>P</i>	0	0

$n=9$, * $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与si-NC组相比; [&] $P<0.05$, 与si-LINC01296组相比; [@] $P<0.05$, 与LiCl组相比。

$n=9$, * $P<0.05$, compared with Control group; [#] $P<0.05$, compared with si-NC group; [&] $P<0.05$ compared with si-LINC01296 group; [@] $P<0.05$, compared with LiCl group.

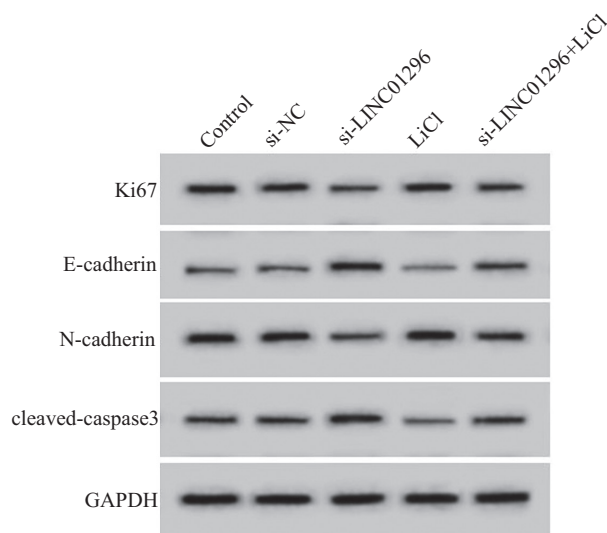


图5 Ki67、E-cadherin、N-cadherin、cleaved-caspase3蛋白的表达
Fig.5 Expression of Ki67, E-cadherin, N-cadherin and cleaved-caspase3 proteins

表8 Ki67、E-cadherin、N-cadherin、cleaved-caspase3蛋白的表达
Table 8 Expression of Ki67, E-cadherin, N-cadherin and cleaved-caspase3 proteins

组别 Groups	Ki67	E-cadherin	N-cadherin	cleaved-caspase3
Control	0.60±0.04	0.13±0.02	0.69±0.06	0.19±0.02
si-NC	0.61±0.05	0.13±0.01	0.68±0.05	0.20±0.02
si-LINC01296	0.19±0.02* [#]	0.56±0.04* [#]	0.22±0.02* [#]	0.62±0.05* [#]
LiCl	0.90±0.05* ^{#&}	0.05±0.01* ^{#&}	0.94±0.05* ^{#&}	0.07±0.01* ^{#&}
si-LINC01296+LiCl	0.47±0.03* ^{#&@}	0.25±0.02* ^{#&@}	0.55±0.04* ^{#&@}	0.28±0.03* ^{#&@}
F	376.690	698.885	292.627	454.919
P	0	0	0	0

$n=9$, * $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与si-NC组相比; [&] $P<0.05$, 与si-LINC01296组相比; [@] $P<0.05$, 与LiCl组相比。

$n=9$, * $P<0.05$, compared with Control group; [#] $P<0.05$, compared with si-NC group; [&] $P<0.05$ compared with si-LINC01296 group; [@] $P<0.05$, compared with LiCl group.

蛋白水平显著降低($P<0.05$), E-cadherin、cleaved-caspase3蛋白水平显著升高($P<0.05$); 与si-LINC01296组比较, si-LINC01296+LiCl组Ki67、N-cadherin蛋白水平显著升高($P<0.05$), E-cadherin、cleaved-caspase3蛋白水平显著降低($P<0.05$); 与LiCl组比较, si-LINC01296+LiCl组Ki67、N-cadherin蛋白水平显著降低($P<0.05$), E-cadherin、cleaved-caspase3蛋白水平显著升高($P<0.05$)(图5和表8)。

3 讨论

神经母细胞瘤发病率在全世界范围内增加, 目前临床主要采用手术与化疗等方法进行治疗, 但患者预后仍然很差, 神经母细胞瘤发生及发展过程涉及多种基因或信号通路的异常表达, 并可影响细胞增殖、凋亡等生物学行为, 既往研究显示, lncRNA

表达上调或下调可能通过影响神经母细胞瘤细胞增殖及凋亡等生物学过程从而参与肿瘤发生及发展过程^[8-10]。但lncRNA在神经母细胞瘤发生及发展过程中的作用机制尚未完全阐明, 因而本研究积极探寻新型lncRNA分子并探究其在神经母细胞瘤发生及发展过程中的可能作用机制。

LINC01296在膀胱尿路上皮癌中表达上调并可能促进癌细胞增殖及转移^[11]。LINC01296在前列腺癌中表达上调, 其表达量升高与前列腺癌患者不良预后相关, 并可促进癌细胞增殖及转移^[12]。LINC01296表达上调可促进胃癌细胞增殖^[13]。与上述研究结果相似, 本研究结果显示LINC01296在神经母细胞瘤细胞中表达上调, 因而采用小RNA干扰技术降低神经母细胞瘤细胞中LINC01296的表达, 结果显示, 干扰LINC01296表达后神经母细胞瘤细

胞增殖能力显著减弱,并可抑制Ki67的表达。研究表明, Ki67在肿瘤细胞中表达水平升高可促进细胞增殖^[14]。肿瘤细胞转移的分子机制与上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)密切相关,上皮细胞标志物E-cadherin表达下调可促进EMT从而促进肿瘤细胞迁移及侵袭,而间充质细胞标志物N-cadherin表达下调可抑制EMT从而抑制肿瘤细胞迁移及侵袭^[15]。本研究结果显示,干扰LINC01296表达后神经母细胞瘤细胞迁移及侵袭能力明显减弱, E-cadherin表达上调,而N-cadherin表达下调,提示干扰LINC01296表达可抑制神经母细胞瘤细胞迁移及侵袭。细胞增殖与凋亡失衡是神经母细胞瘤发生的重要原因之一, caspase3是细胞凋亡执行因子,线粒体释放细胞色素C后可激活caspase级联反应从而促进caspase3活化形成cleaved-caspase3进而诱导细胞凋亡^[16]。本研究结果显示,干扰LINC01296表达后神经母细胞瘤细胞凋亡率显著升高,并可促进cleaved-caspase3表达,提示干扰LINC01296表达可促进神经母细胞瘤细胞凋亡。

Wnt/ β -catenin信号通路可调控细胞增殖、迁移及侵袭等生物学过程,信号通路被激活后可促进 β -catenin表达从而促进Cyclin D1等细胞增殖及凋亡相关蛋白表达进而影响肿瘤发生及发展过程,抑制Wnt/ β -catenin信号通路活化可抑制胃癌细胞增殖、迁移及侵袭,并可诱导细胞凋亡^[17-18]。 β -catenin是Wnt/ β -catenin信号通路中关键蛋白,其在肿瘤发展过程中发挥癌基因作用, Wnt属于细胞生长信号因子,并可促进GSK-3 β 发生磷酸化而抑制 β -catenin降解, β -catenin由细胞质转移至细胞核中可激活下游E-cadherin等蛋白的转录从而调控细胞增殖、迁移及侵袭等生物学过程^[19]。本研究结果显示,干扰LINC01296表达后神经母细胞瘤细胞中Wnt1、 β -catenin蛋白水平显著降低,提示干扰LINC01296表达可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路的激活从而影响了神经母细胞瘤细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡。为进一步探究LINC01296通过调控Wnt/ β -catenin信号通路发挥作用,本研究在干扰LINC01296表达的神经母细胞瘤细胞中添加Wnt/ β -catenin信号通路的激活剂LiCl,结果显示单独添加LiCl可激活Wnt/ β -catenin信号通路从而促进神经母细胞瘤细胞增殖、迁移及侵袭,并可抑制细胞凋亡,而干扰LINC01296表达与LiCl共同处理可明显降低干扰

LINC01296表达对神经母细胞瘤细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响。提示干扰LINC01296表达可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路的活化从而抑制神经母细胞瘤细胞增殖、迁移及侵袭,诱导细胞凋亡。

综上所述,干扰LINC01296表达可抑制神经母细胞瘤细胞SK-N-SH增殖、迁移及侵袭,并可促进细胞凋亡,其作用机制可能与抑制Wnt/ β -catenin信号通路的活化有关, LINC01296可能作为神经母细胞瘤靶向治疗的潜在靶点,但关于其具体作用机制仍需进一步探究。

参考文献 (References)

- [1] 杨深, 蔡思雨, 马晓莉, 等. 年龄及血清神经元烯醇化酶在中、高危神经母细胞瘤病理预后分型中的预测价值[J]. 中华实用儿科临床杂志(YANG S, CAI S Y, MA X L, et al. Predictive value of age and serum neuron enolase analysis in the pathological prognosis of histopathology sub-group in intermediate and high-risk neuroblastoma [J]. Chin J Applied Clin Pediat), 2018, 33(15): 1156-60.
- [2] 杨燕, 何晓燕, 王珊, 等. β -榄香烯诱导神经母细胞瘤细胞凋亡及其机制[J]. 免疫学杂志(YANG Y, HE X Y, WANG S, et al. β -elemene induces neuroblastoma cell apoptosis [J]. Immun J), 2018, 34(6): 469-75.
- [3] DOU J, NI Y, HE X, et al. Decreasing lncRNA HOTAIR expression inhibits human colorectal cancer stem cells [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(1): 98-108.
- [4] 黄垂名, 张小波, 彭小旅. lncRNA MAGI2-AS3调控Fas/FasL通路抑制神经母细胞瘤的生长[J]. 中国免疫学杂志(HUANG C M, ZHANG X B, PENG X L. lncRNA MAGI2-AS3 inhibits growth of neuroblastoma by regulating Fas/FasL pathway [J]. Chin J Immun), 2019, 35(16): 1981-6.
- [5] LIU B, PAN S, XIAO Y, et al. LINC01296/miR-26a/GALNT3 axis contributes to colorectal cancer progression by regulating O-glycosylated MUC1 via PI3K/AKT pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 316-26.
- [6] 钟丽颖, 李顺东, 孙叶海. 长链非编码RNA PTV1通过调控Wnt/ β -catenin信号通路抑制甲状腺癌细胞的增殖、侵袭及诱导凋亡[J]. 成都医学院学报(ZHONG L Y, LI S D, SUN Y H. Long-chain non-coding RNA PTV1 inhibits the proliferation and invasion of thyroid cancer cells and induces their apoptosis by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. J Chengdu Med College), 2019, 14(4): 426-30.
- [7] 默娟. 激活Notch1和Wnt/ β -catenin信号通路对人胃癌细胞BGC-823增殖的影响[D]. 锦州: 辽宁医学院, 2012: 1-56.
- [8] CHEN Y, LIAN Y J, MA Y Q, et al. lncRNA SNHG1 promotes α -synuclein aggregation and toxicity by targeting miR-15b-5p to activate SIAH1 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. Neurotoxicology, 2018, 68(1): 212-21.
- [9] O'BRIEN E M, SELFE J L, MARTINS A S, et al. The long non-coding RNA MYCNOS-01 regulates MYCN protein levels and affects growth of MYCN-amplified rhabdomyosarcoma and neuroblastoma cells [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 217-27.
- [10] ZHANG J, LI W Y, YANG Y, et al. lncRNA XIST facilitates

- cell growth, migration and invasion via modulating H3 histone methylation of DKK1 in neuroblastoma [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(16): 1882-92.
- [11] WANG X, WANG L, GONG Y, et al. Long noncoding RNA LINC01296 promotes cancer-cell proliferation and metastasis in urothelial carcinoma of the bladder [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 12(1): 75-85.
- [12] WU J, CHENG G, ZHANG C, et al. Long noncoding RNA LINC01296 is associated with poor prognosis in prostate cancer and promotes cancer-cell proliferation and metastasis [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10(1): 1843-52.
- [13] QIN Q H, YIN Z Q, LI Y, et al. Long intergenic noncoding RNA 01296 aggravates gastric cancer cells progress through miR-122/MMP-9 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97(1): 450-7.
- [14] CLASSE M, BURGESS A, EL ZEIN S, et al. Evaluating the prognostic potential of the Ki67 proliferation index and tumour-infiltrating lymphocytes in olfactory neuroblastoma [J]. *Histopathology*, 2019, 75(6): 853-64.
- [15] BRUNER H C, DERKSEN P W B. Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion and the development and progression of cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(3): e029330-40.
- [16] FANG Y, LI J, WU Y, et al. Costunolide inhibits the growth of OAW42-A multidrug-resistant human ovarian cancer cells by activating apoptotic and autophagic pathways, production of reactive oxygen species (ROS), cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(1): 3231-7.
- [17] 汪晓辉, 卫莹芳, 程红. 汉黄芩素对胃癌细胞SGC7901凋亡、侵袭迁移及Wnt/ β -catenin信号通路的影响研究[J]. *中药材* (WANG X H, WEI Y F, CHENG H. Effects of wogonin on apoptosis, invasion, migration and Wnt/ β -Catenin signaling pathway of gastric cancer cells SGC7901 [J]. *J Chin Med Mater*), 2016, 39(6): 1372-6.
- [18] 张希成, 沈金根, 贾正我, 等. miR-183调控Wnt/ β -catenin信号通路影响胃癌SGC-7901细胞生物学特性的研究[J]. *世界华人消化杂志* (ZHANG X C, SHEN J G, JIA Z W, et al. MiR-183 affects biological behaviors of gastric cancer SGC-7901 cells by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *World Chin J Digest*), 2019, 27(13): 798-806.
- [19] 黄茂莘, 陈玲, 韩鹏定, 等. 山柰酚通过Wnt/ β -catenin信号通路抑制HBx-HepG2细胞增殖、侵袭及迁移[J]. *中国病理生理杂志* (HUANG M S, CHEN L, HAN P D, et al. Kaempferi inhibits the proliferation, invasion and migration of HBx-HepG2 cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Chin J Pathophys*), 2017, 33(8): 1417-22.