

lncRNA TTN-AS1通过miR-138-5p/EGFR轴调控 胆囊癌细胞增殖、凋亡和迁移

王玲华^{1*} 陈艳² 李叶若³

(¹绵阳市人民医院肝胆外科, 绵阳 621000; ²绵阳市人民医院超声科, 绵阳 621000;

³绵阳市人民医院乳腺外科, 绵阳 621000)

摘要 胆囊癌(GBC)是胆道系统常见的肿瘤, 严重威胁人类的生命健康。该研究旨在探究长链非编码RNA(lncRNA)肌联蛋白反义RNA1(TTN-AS1)/微小RNA-138-5p(miR-138-5p)/表皮生长因子受体(EGFR)信号轴在GBC中的分子机制。qRT-PCR检测GBC组织和细胞系中TTN-AS1、miR-138-5p和EGFR mRNA相对表达水平, 并对它们在GBC组织中的相关性进行分析。培养GBC细胞系GBC-SD, 分为对照(Control)组、si-NC组、si-TTN-AS1组、si-TTN-AS1+in-miR-138-5p组和si-TTN-AS1+pc-EGFR组。qRT-PCR和Western blot检测细胞转染效率; CCK-8、EdU染色、流式细胞术以及划痕愈合实验检测细胞增殖、凋亡和迁移情况; Western blot检测细胞增殖(PCNA)、凋亡(Cleaved Caspase-3)和迁移(MMP-2、MMP-9)相关蛋白水平。利用体内异种移植肿瘤模型研究TTN-AS1对GBC肿瘤生长, Ki67、PCNA阳性表达以及miR-138-5p、EGFR mRNA表达的影响。结果显示, GBC组织和细胞系中TTN-AS1和EGFR mRNA表达均上调, miR-138-5p表达下调, 且GBC组织中TTN-AS1水平与miR-138-5p水平呈负相关, 与EGFR mRNA水平呈正相关; miR-138-5p水平与EGFR mRNA水平呈负相关($P<0.05$)。生物信息学分析和双荧光素酶证实了miR-138-5p与TTN-AS1或EGFR 3'UTR存在相互作用, 且RNA下拉实验证实了TTN-AS1与miR-138-5p结合; qRT-PCR和Western blot证明TTN-AS1可能通过miR-138-5p调控EGFR表达($P<0.05$)。敲低TTN-AS1可显著抑制GBC-SD细胞增殖和迁移, 诱导细胞凋亡($P<0.05$); 同时下调PCNA、MMP-2和MMP-9蛋白水平, 上调Cleaved Caspase-3蛋白水平($P<0.05$)。抑制miR-138-5p或过表达EGFR可部分逆转TTN-AS1敲低对GBC-SD细胞恶性行为的影响。体内实验证实, 敲低TTN-AS1可抑制肿瘤生长, 同时上调miR-138-5p水平, 下调EGFR mRNA和Ki67、PCNA阳性表达水平($P<0.05$)。总之, TTN-AS1可能在GBC的发生和发展中发挥促癌作用, 且其可能是通过调节miR-138-5p/EGFR信号轴实现的。

关键词 胆囊癌; 长链非编码RNA肌联蛋白反义RNA1; 微小RNA-138-5p; 表皮生长因子受体; 恶性行为

The lncRNA TTN-AS1 Regulates the Proliferation, Apoptosis, and Migration of Gallbladder Cancer Cells Through the miR-138-5p/EGFR Axis

WANG Linghua^{1*}, CHEN Yan², LI Yeruo³

(¹Department of Hepatobiliary Surgery, Mianyang People's Hospital, Mianyang 621000, China;

²Department of Ultrasound, Mianyang People's Hospital, Mianyang 621000, China;

³Department of Breast Surgery, Mianyang People's Hospital, Mianyang 621000, China)

收稿日期: 2022-10-21

接受日期: 2022-12-16

绵阳市卫生健康委医学科科研课题(批准号: 201619)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13408169096, E-mail: hwtupn@163.com

Received: October 21, 2022

Accepted: December 16, 2022

This work was supported by the Medical Research Project of Mianyang Health and Family Planning Commission (Grant No.201619)

*Corresponding author. Tel: +86-13408169096, E-mail: hwtupn@163.com

Abstract GBC (gallbladder carcinoma) is a common tumor of the biliary system, which seriously threatens human life and health. The aim of this study is to investigate the molecular mechanism of the lncRNA (long non-coding RNA) TTN-AS1 (titin antisense RNA1)/miR-138-5p (microRNA-138-5p)/EGFR (epidermal growth factor receptor) signaling axis in GBC. The relative expression levels of TTN-AS1, miR-138-5p and *EGFR* mRNA in GBC tissues and cell lines were detected by qRT-PCR, and their correlations in GBC tissues were analyzed. The GBC cell line GBC-SD was cultured and grouped into Control group, si-NC group, si-TTN-AS1 group, si-TTN-AS1+in-miR-138-5p group and si-TTN-AS1+pc-EGFR group. qRT-PCR and Western blot were performed to cell transfection efficiency; CCK-8, EdU staining, flow cytometry and scratch healing assay were performed to measure the cell proliferation, apoptosis and migration; Western blot was performed to detect the cell proliferation (PCNA), apoptosis (Cleaved Caspase-3) and migration (MMP-2, MMP-9) related protein levels. *In vivo* xenograft tumor model was performed to study the impacts of TTN-AS1 on GBC tumor growth, Ki67 and PCNA positive expression, and miR-138-5p, *EGFR* mRNA expression. The results showed that, the expressions of TTN-AS1 and *EGFR* mRNA were both up-regulated in GBC tissues and cell lines, the expression of miR-138-5p was down-regulated, the level of TTN-AS1 in GBC tissue was negatively correlated with the level of miR-138-5p, and positively correlated with the level of *EGFR* mRNA; the level of miR-138-5p was negatively correlated with the level of *EGFR* mRNA ($P<0.05$), and the changes were greatest in GBC-SD cells. Bioinformatics analysis and dual luciferase confirmed the interaction of miR-138-5p with TTN-AS1 or *EGFR* 3'UTR; and RNA pull-down confirmed the binding of TTN-AS1 to miR-138-5p; qRT-PCR and Western blot demonstrated that TTN-AS1 might regulate EGFR expression through miR-138-5p ($P<0.05$). Knockdown of TTN-AS1 could significantly inhibit the proliferation and migration of GBC-SD cells and induce cell apoptosis ($P<0.05$); meanwhile, down-regulate the protein levels of PCNA, MMP-2 and MMP-9, and up-regulate the protein level of Cleaved Caspase-3 ($P<0.05$). Inhibition of miR-138-5p or overexpression of EGFR partially reversed the impact of TTN-AS1 knockdown on the malignant behavior of GBC-SD cells. *In vivo* experiments confirmed that knockdown of TTN-AS1 could inhibit tumor growth, meantime up-regulate miR-138-5p level and down-regulate *EGFR* mRNA, Ki67 and PCNA positive expression level ($P<0.05$). In conclusion, TTN-AS1 may play a tumor-promoting role in the occurrence and development of GBC, and it may be achieved by regulating the miR-138-5p/EGFR signaling axis.

Keywords gallbladder cancer; long non-coding RNA titin antisense RNA1; microRNA-138-5p; epidermal growth factor receptor; malignant behavior

胆囊癌(gallbladder carcinoma, GBC)是胆道系统中最常见、最具侵袭性的肿瘤。GBC患者的5年内生存率低于5%^[1]。目前, GBC的完全手术切除是最有效的治疗方法^[2]。然而, 当大多数患者被诊断出患有GBC时, 最佳手术时间点已经过去。因此, 确定有效的GBC预后生物标志物和治疗靶点至关重要。

长链非编码RNA(lncRNA)在包括GBC在内的人类癌症发生和进展中发挥关键的作用^[3]。肌联蛋白反义RNA1(titin antisense RNA 1, TTN-AS1)转录自TTN的反义链, 位于染色体2q12.2上。据报道, TTN-AS1在多种癌症类型(包括肝癌、肺癌等)中上调和发挥致癌功能^[4-5]。另外, TTN-AS1在GBC

组织和细胞中表达增加, 促进GBC细胞活力和运动性, 可在GBC中充当肿瘤启动子^[6]。然而TTN-AS1在GBC中的作用和机制仍不清楚。既往研究表明, TTN-AS1通过与微小RNA(microRNA, miRNA)结合来调节肿瘤的发生^[4-6]。生物信息学预测显示, 微小RNA-138-5p(miRNA-138-5p, miR-138-5p)具有与TTN-AS1互补的结合位点, 是TTN-AS1的潜在靶基因。已有研究证明, miR-138在GBC组织中低表达, 过表达miR-138可抑制GBC细胞生长, 并诱导细胞凋亡^[7]。但在GBC中, TTN-AS1的高表达是否与miR-138-5p表达降低有关仍不清楚。此外, 生物信息学预测发现表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)是miR-138-5p的靶基因之一。近期

有研究证实, EGFR在GBC中呈高表达, 下调EGFR可抑制GBC进展^[8]。基于以上研究, 笔者推测, TTN-AS1、miR-138-5p和EGFR在GBC中的异常表达可能存在相关性。本研究旨在初步探究TTN-AS1在GBC中的功能及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织 38个GBC癌症组织和成对的正常组织均来自绵阳市人民医院肝胆外科, 这些GBC患者签署了知情同意书。本研究程序经绵阳市人民医院伦理委员会批准(批号: 201903-0206)。

1.1.2 细胞 GBC细胞系SGC-996(YS490C)、GBC-SD(YS1447C)、EH-GB1(YS3569C)和NOZ(YS2037C)均购自美国ATCC细胞库, 人胆囊上皮细胞系HGBEC(HTX3131)购自深圳OTWO细胞库。

1.1.3 主要试剂 TTN-AS1沉默(si-TTN-AS1, 5'-CCA GAG UGA GAC ACC UCU UTT-3')及其阴性对照(si-NC, 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3')、miR-138-5p抑制物(in-miR-138-5p, 5'-CGG CCU GAU UCA CAA CAC CAG CU-3')、miR-138-5p模拟物(miR-138-5p mimics, 5'-AGC UGG UGU UGU GAA UCA GGC CG-3')及其阴性对照(miR-NC mimics, 5'-ACU CUA UCU GCA CGC UGA CUU-3')均由上海GenePharma设计并合成。EGFR过表达载体质粒(pcDNA3.1-EGFP、pc-EGFR、LM2342、EGFP通过酶切位点BamH I和Not I插入到pcDNA3.1空载质粒中, 抗性为氨苄青霉素)由上海联迈生物工程有限公司提供; Lipofectamine 2000试剂(11668027)、TRIzol试剂(10296028)购自美国Invitrogen公司; QuantiTect Reverse Transcription(DXT-205314)、QuantiTect SYBR Green PCR Kit(DXT-204143)购自美国Qiagen公司; 一抗EGFR(ab52894)、PCNA(ab92552)、Cleaved Caspase-3(ab32042)、MMP-2(ab181286)、MMP-9(ab137867)和GAPDH(ab9485)均获自英国Abcam公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(KA3784)购自上海玉博生物科技有限公司; CCK-8细胞增殖检测试剂盒(BA00208)、Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit(BA00101)获自北京博奥森生物技术有限公司; 555 Click-iT EdU Imaging Kits(SB-C6016)获自上海圣尔生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 人GBC细胞系(SGC-996、GBC-SD、EH-GB1和NOZ)及HGBEC细胞均维持在添加了10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DEME培养基中, 置于5% CO₂、37 °C培养箱。培养48 h后收集细胞, 用于检测TTN-AS1相对表达水平。取对数增殖期生长的GBC-SD细胞, 依次分为对照(Control)组、si-NC组、si-TTN-AS1组、si-TTN-AS1+in-miR-138-5p组和si-TTN-AS1+pc-EGFR组。除Control组不作任何处理外, 其余组细胞均按照Lipofectamine 2000试剂说明书转染对应的si-NC、si-TTN-AS1、in-miR-138-5p和pc-EGFR。各组细胞培养48 h后用于之后的实验研究。

1.2.2 qRT-PCR检测 使用TRIzol试剂提取细胞总RNA, 使用QuantiTect Reverse Transcription合成cDNA。使用QuantiTect SYBR Green PCR Kit在ABI 7300-Fast qRT-PCR系统(美国Applied Biosystems)上进行定量检测(扩增条件: 95 °C初始变性10 min; 然后在92 °C变性15 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min条件下进行40个循环), 得到各基因表达的Ct值。以18S rRNA和U6为内参, 使用2^{-ΔΔCt}方法分析目的基因相对定量。引物序列, TTN-AS1: 上游5'-CGG GAA CAA GCC CTG TG-3'和下游5'-CCG GCC CAA AGA TGA TG-3'; miR-138-5p: 上游5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'和下游5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; EGFR: 上游5'-TTG CCG CAA AGT GTG TAA CG-3'和下游5'-GTC ACC CCT AAA TGC CAC CG-3'; 18S rRNA: 上游5'-AGA AAC GGC TAC CAC ATC CA-3'和下游5'-CAC CAG ACT TGC CCT CCA-3'; U6: 上游5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3'和下游5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTCA T-3'。

1.2.3 Western blot检测 用RIPA裂解缓冲液裂解细胞, 裂解物在4 °C下离心后, 将上清转移至新的试管中, 通过BCA对蛋白质含量进行测定。用12% SDS-PAGE进行电泳, 然后转移到PVDF膜上。用5%脱脂牛奶37 °C封闭1 h后, 将膜在4 °C下与一抗EGFR、PCNA、Cleaved Caspase-3、MMP-2、MMP-9和GAPDH(1:1 000稀释度)孵育24 h后, 应用HRP偶联的二抗(1:5 000稀释度)在37 °C下孵育2 h。在Tanon 5200化学发光凝胶成像系统(上海天能)上用化学发光法检测蛋白质条带。

1.2.4 荧光素酶报告基因检测 使用StarBase数据库和TragetScanHuman数据库预测miR-138-5p与TTN-AS1或EGFR之间的靶向关系。将野生型(WT)TTN-AS1/EGFR和突变型(MUT)TTN-AS1/EGFR经PCR扩增后插入到pmirGLO报告载体上,依次为WT-TTN-AS1/WT-EGFR和MUT-TTN-AS1/MUT-EGFR。随后使用Lipofectamine 2000分别将WT-TTN-AS1和miR-NC mimics、WT-TTN-AS1和miR-138-5p mimics、MUT-TTN-AS1和miR-NC mimics、MUT-TTN-AS1和miR-138-5p mimics、WT-EGFR和miR-NC mimics、WT-EGFR和miR-138-5p mimics、MUT-EGFR和miR-NC mimics、MUT-EGFR和miR-138-5p mimics共同转染到GBC-SD细胞中。培养48 h后收集细胞,使用Varioskan LUX多功能酶标仪(美国ThermoFisher)检测荧光素酶活性。

1.2.5 RNA下拉实验^[9] 分别用生物素标记的野生型miR-138-5p(WT-miR-138-5p)、突变型miR-138-5p(MUT-miR-138-5p)和阴性对照(NC)转染GBC-SD细胞。48 h后,将细胞裂解液与M-280链霉亲和素一起温育。然后通过qRT-PCR测量与珠子结合的RNA复合物中TTN-AS1的水平。

1.2.6 CCK-8检测 GBC-SD细胞(1×10^4 个/孔)接种在96孔板上,37℃孵育24 h。添加10 μ L CCK-8试剂孵育2 h后,酶标仪在450 nm处检测光密度(D)值,以D值表示细胞活力。

1.2.7 EdU染色 GBC-SD细胞(1×10^5 个/孔)接种在96孔板上,37℃培养24 h后,用4%多聚甲醛固定细胞并用0.5% Triton X-100渗透。用含3% BSA的PBS冲洗3次后,加入100 μ L EdU染色液,室温下均匀覆盖30 min。随后使用DAPI对细胞核进行复染,并用IX73荧光显微镜(日本OLYMPUS)以200倍的放大倍率观察细胞。EdU阳性细胞率=EdU阳性细胞/DAPI阳性细胞 $\times 100\%$ 。

1.2.8 流式细胞术 GBC-SD细胞(1×10^5 个/孔)接种在6孔板上,37℃培养24 h后收集细胞,并用PBS缓冲液洗涤2次。然后将重悬的细胞加入5 μ L Annexin V FITC和PI,并在室温下孵育15 min。通过FACSCalibur流式细胞仪(美国BD Bioscience)进行细胞凋亡分析,统计细胞凋亡率。

1.2.9 划痕愈合实验 GBC-SD细胞(1×10^5 个/孔)接种在6孔板上,一旦细胞达到90%融合,使用200 μ L移液器吸头进行线性划痕,并使用无血清培养基培养。

所有图像均在0 h和24 h以100倍的放大倍率在IX73显微镜下拍摄,并测量划痕间隙大小。划痕愈合率=(0 h划痕间隙大小-24 h划痕间隙大小)/0 h划痕间隙大小 $\times 100\%$ 。

1.2.10 肿瘤异种移植实验 15只雌性BALB/c裸鼠(4周龄)获自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号为SCXK(京)2021-0006。在特定的无病原体条件下饲养所有裸鼠,并维持在层流柜中。随后,将裸鼠分为Control组、si-NC组和si-TTN-AS1组(每组5只),si-NC组和si-TTN-AS1组将200 μ L稳定转染si-NC、si-TTN-AS1的GBC-SD细胞(1×10^7 个/只)皮下注射到BALB/c裸鼠中,Control组将未经转染的GBC-SD细胞(1×10^7 个/只)皮下注射到BALB/c裸鼠中。一周后测量肿瘤生长情况,肿瘤体积计算公式:体积(cm^3)=(长 $\times$ 宽 2)/2。4周后处理裸鼠,收集肿瘤组织,计算肿瘤体积并称重。所有程序均按照绵阳市人民医院伦理委员会批准的《实验动物护理和使用指南》进行。将肿瘤组织分为两部分,一部分用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋制备组织切片用于HE染色及Ki67、PCNA的免疫组化染色,并采用ImageJ软件分析Ki67、PCNA阳性表达的平均光密度(MOD)值;另一部分提取肿瘤组织RNA,通过qRT-PCR检测基因相对表达水平。

1.2.11 统计学分析 使用GraphPad Prism 5.0进行统计分析,数据使用Shapiro-Wilk进行正态检验,符合正态分布的数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组之间的差异使用单因素方差分析和Turkey事后检验比较。非配对t检验用于比较两个独立组之间的差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GBC中TTN-AS1、miR-138-5p和EGFR mRNA表达水平

图1结果显示,与正常组织比较,GBC癌症组织中TTN-AS1和EGFR mRNA表达水平升高,miR-138-5p表达水平降低($P < 0.05$)。相关性分析显示,GBC组织中TTN-AS1与miR-138-5p呈负相关,与EGFR mRNA呈正相关性;miR-138-5p与EGFR mRNA表达呈负相关($P < 0.05$)。此外,与HGBEC细胞比较,GBC细胞系中TTN-AS1和EGFR mRNA表达水平均显著升高,miR-138-5p表达水平显著降低($P < 0.05$),其中GBC-SD细胞中三个基因的表达趋势变化最大,故

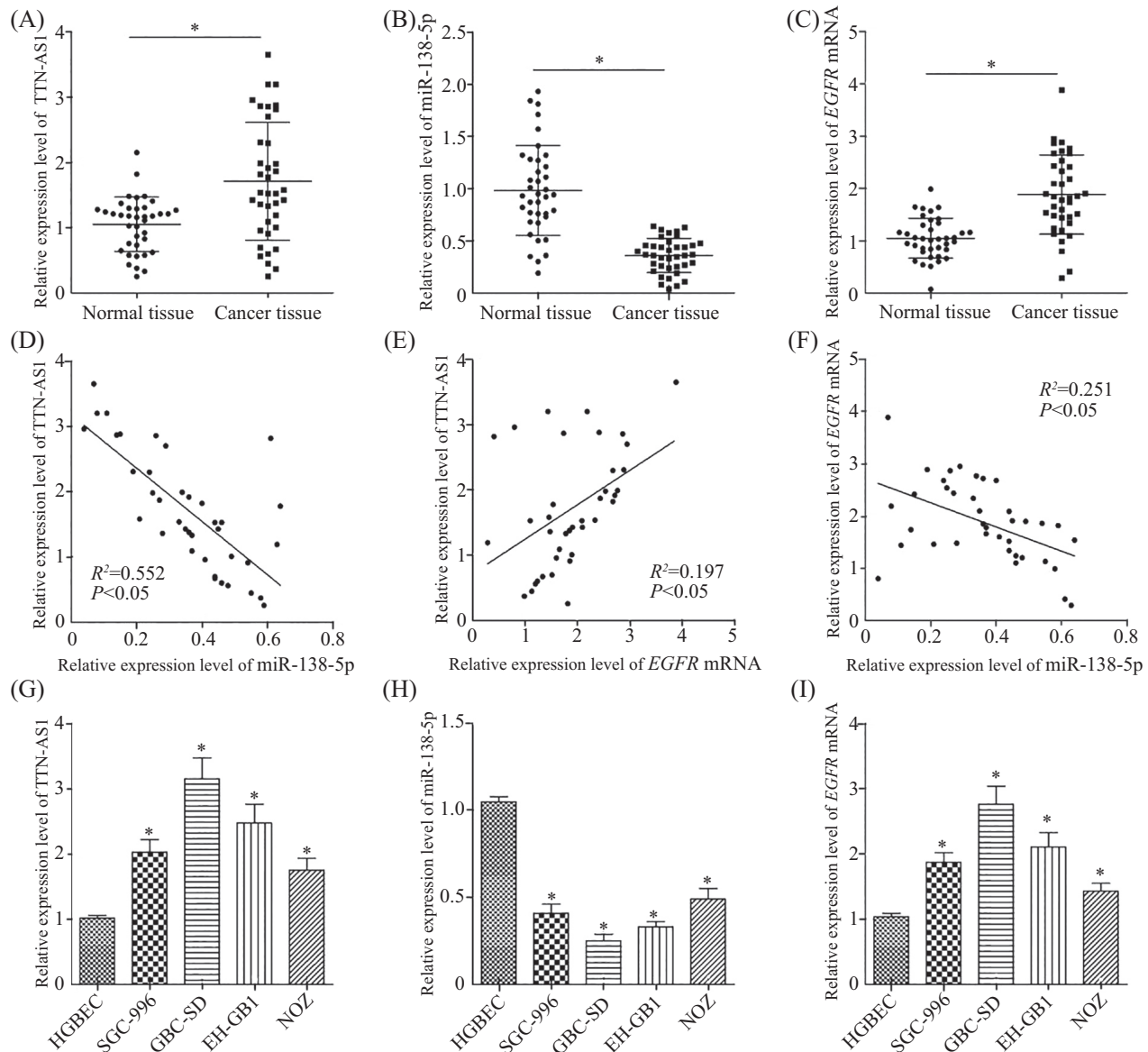
后续选择此细胞作为研究对象。

2.2 TTN-AS1、miR-138-5p和EGFR之间关系鉴定

图2显示, miR-138-5p与TTN-AS1或EGFR 3'UTR之间存在互补的结合位点。随后, 进行双荧光素酶报告基因测定以验证miR-138-5p与TTN-AS1或EGFR 3'UTR之间的关系。正如结果所示, 与转染miR-NC mimics比较, 转染miR-138-5p mimics可显著降低转染WT-TTN-AS1细胞的荧光素酶活性($P<0.05$), 而对转染MUT-TTN-AS1细胞的荧光素酶活性无影响

($P>0.05$), 表明TTN-AS1与miR-138-5p之间存在相互作用, 同样的方法也证实了miR-138-5p与EGFR之间存在相互作用。此外, RNA下拉实验验证了TTN-AS1与miR-138-5p结合。

另外, 图3和表1结果显示, 敲低TTN-AS1可显著升高miR-138-5p水平, 降低EGFR的mRNA和蛋白表达水平($P<0.05$), 而抑制miR-138-5p的表达可部分逆转敲低TTN-AS1对EGFR的抑制作用($P<0.05$), 表明TTN-AS1可能通过miR-138-5p调控EGFR表达。

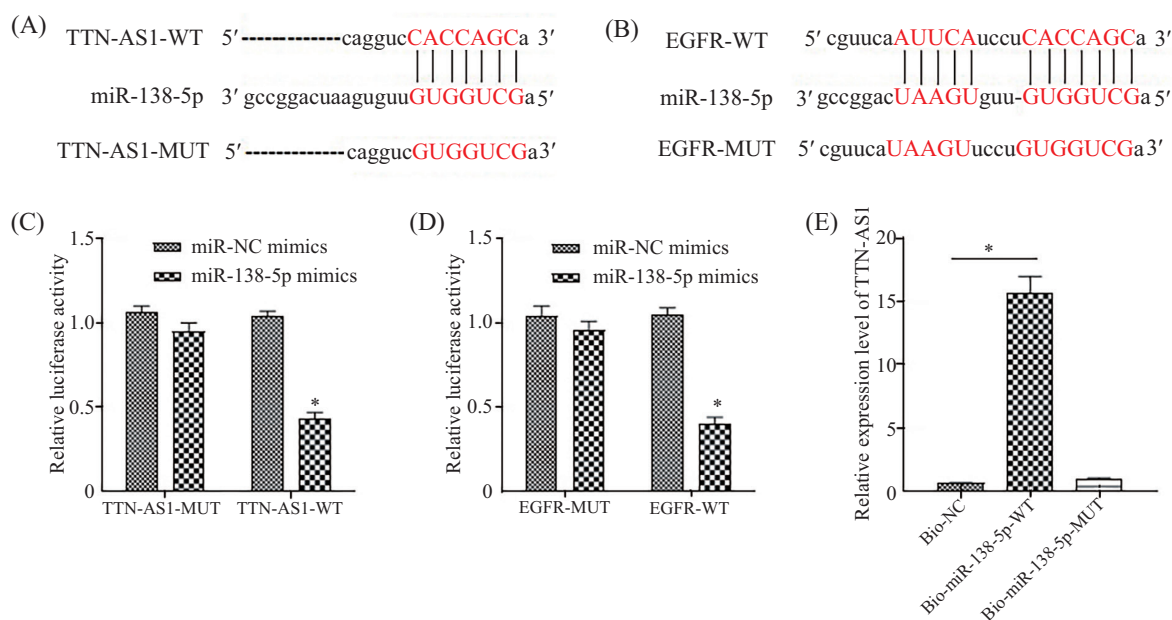


A~C: 组织中TTN-AS1、miR-138-5p和EGFR mRNA表达水平检测, * $P<0.05$, 与正常组织比较; D~F: TTN-AS1、miR-138-5p和EGFR mRNA相关性分析; G~I: 细胞中TTN-AS1、miR-138-5p和EGFR mRNA水平检测, * $P<0.05$, 与HGBEC细胞比较。

A~C: expression levels of TTN-AS1, miR-138-5p and EGFR mRNA in tissues were detected. * $P<0.05$ compared with those in normal tissues; D~F: correlation analysis of TTN-AS1, miR-138-5p and EGFR mRNA; G~I: expression levels of TTN-AS1, miR-138-5p and EGFR mRNA in cells were detected, * $P<0.05$ compared with HGBEC cells.

图1 TTN-AS1、miR-138-5p和EGFR mRNA水平与相关性分析

Fig.1 Correlation analysis of TTN-AS1, miR-138-5p and EGFR mRNA



A: TTN-AS1与miR-138-5p的靶向关系预测(标红处为配对的碱基序列或突变的结合位点); B: miR-138-5p与EGFR mRNA的靶向关系预测(标红处为配对的碱基序列或突变的结合位点); C: TTN-AS1与miR-138-5p的双荧光素酶结果。* $P<0.05$, 与miR-NC mimics比较; D: miR-138-5p与EGFR mRNA的双荧光素酶结果。* $P<0.05$, 与miR-NC mimics比较; E: RNA下拉实验验证TTN-AS1与miR-138-5p结合, * $P<0.05$, 与Bio-NC比较。

图2 TTN-AS1、miR-138-5p和EGFR之间关系鉴定

Fig.2 Relationship identification among TTN-AS1, miR-138-5p and EGFR

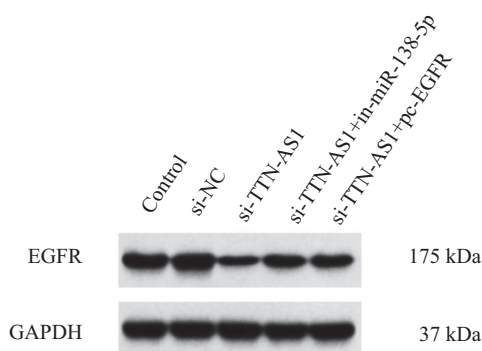


图3 Western blot检测GBC-SD细胞中EGFR蛋白水平

Fig.3 Western blot analysis of EGFR protein levels in GBC-SD cells

表1 各组GBC-SD细胞中TTN-AS1、miR-138-5p和EGFR表达情况

Table 1 Expression of TTN-AS1, miR-138-5p and EGFR in each group of GBC-SD cells

组别 Group	TTN-AS1	miR-138-5p	EGFR mRNA	EGFR蛋白 EGFR protein
Control	1.04±0.06	1.02±0.05	1.05±0.04	0.85±0.06
si-NC	1.02±0.05	1.00±0.07	1.03±0.06	0.80±0.07
si-TTN-AS1	0.25±0.03*	2.34±0.22*	0.41±0.03*	0.28±0.03*
si-TTN-AS1+in-miR-138-5p	0.27±0.04	1.52±0.14 [#]	0.66±0.05 [#]	0.49±0.05 [#]
si-TTN-AS1+pc-EGFR	0.29±0.03	2.19±0.21	0.78±0.07 [#]	0.62±0.06 [#]

* $P<0.05$, 与si-NC组比较; [#] $P<0.05$, 与si-TTN-AS1组比较。

* $P<0.05$ compared with si-NC group; [#] $P<0.05$ compared with si-TTN-AS1 group.

表2 各组GBC-SD细胞增殖、凋亡和迁移情况分析

Table 2 Analysis of the proliferation, apoptosis and migration of GBC-SD cells in each group

组别 Group	细胞活力(D值) Cell viability (D value)	EdU阳性细胞率/% EdU positive cell rate /%	细胞凋亡率/% Cell apoptosis rate /%	划痕愈合率/% Scratch healing rate /%
Control	0.82±0.07	60.25±5.87	8.36±0.86	75.36±7.19
si-NC	0.75±0.06	57.64±6.05	9.14±1.03	68.22±6.70
si-TTN-AS1	0.46±0.05*	28.33±2.12*	24.37±2.15*	34.65±3.58*
si-TTN-AS1+in-miR-138-5p	0.63±0.06 [#]	41.25±4.21 [#]	14.65±1.58 [#]	50.11±5.13 [#]
si-TTN-AS1+pc-EGFR	0.67±0.05 [#]	43.56±4.55 [#]	16.34±1.75 [#]	53.26±5.32 [#]

* $P<0.05$, 与si-NC组比较; [#] $P<0.05$, 与si-TTN-AS1组比较。* $P<0.05$ compared with si-NC group; [#] $P<0.05$ compared with si-TTN-AS1 group.

表3 各组GBC-SD细胞中PCNA、Cleaved Caspase-3、MMP-2和MMP-9蛋白表达情况

Table 3 Expression of PCNA, Cleaved Caspase-3, MMP-2 and MMP-9 proteins in GBC-SD cells of each group

组别 Group	PCNA	Cleaved Caspase-3	MMP-2	MMP-9
Control	0.72±0.06	0.18±0.04	0.77±0.08	0.89±0.09
si-NC	0.69±0.05	0.22±0.05	0.75±0.06	0.82±0.08
si-TTN-AS1	0.24±0.03*	0.69±0.07*	0.33±0.04*	0.44±0.05*
si-TTN-AS1+in-miR-138-5p	0.45±0.05 [#]	0.42±0.05 [#]	0.54±0.06 [#]	0.61±0.05 [#]
si-TTN-AS1+pc-EGFR	0.50±0.04 [#]	0.48±0.04 [#]	0.58±0.05 [#]	0.67±0.06 [#]

* $P<0.05$, 与si-NC组比较; [#] $P<0.05$, 与si-TTN-AS1组比较。* $P<0.05$ compared with si-NC group; [#] $P<0.05$ compared with si-TTN-AS1 group.

2.3 敲低 TTN-AS1 通过 miR-138-5p/EGFR 信号轴抑制 GBC 细胞增殖、凋亡和迁移

表2、表3和图4结果显示, 与si-NC组相比, si-TTN-AS1组 GBC-SD 细胞活力、EdU 阳性细胞率及划痕愈合率均显著降低, 而细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$); 同时, 细胞中 PCNA、MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平均明显下调, Cleaved Caspase-3 蛋白水平明显上调 ($P<0.05$)。与 si-TTN-AS1 组相比, si-TTN-AS1+in-miR-138-5p 或 si-TTN-AS1+pc-EGFR 组 GBC-SD 细胞活力、EdU 阳性细胞率及划痕愈合率均显著升高, 而细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$); 同时, 细胞中 PCNA、MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平均明显上调, Cleaved Caspase-3 蛋白水平明显下调 ($P<0.05$)。而 si-NC 组与 Control 组相比, 以上各指标变化均无统计学意义 ($P>0.05$)。

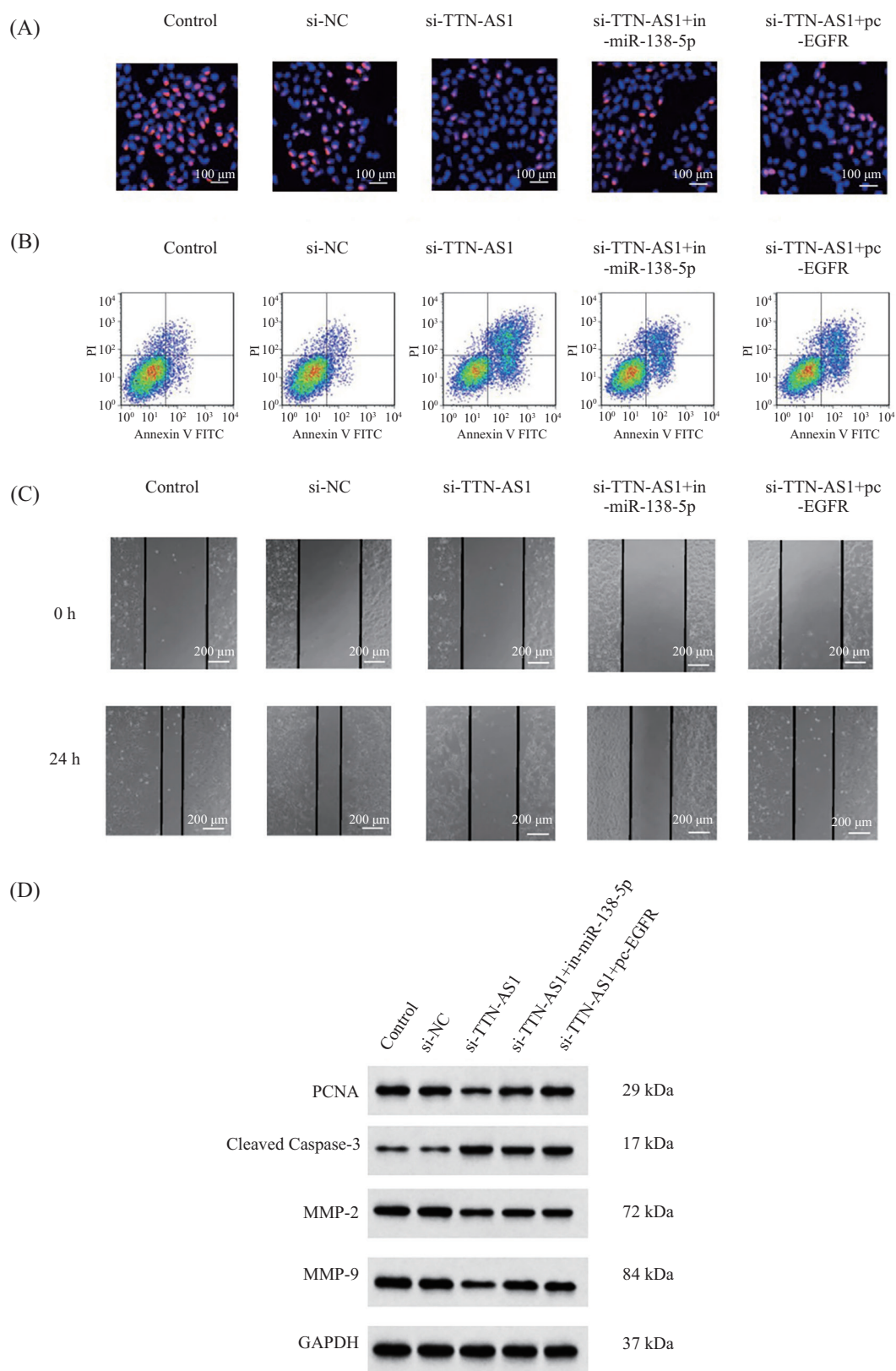
2.4 敲低 TTN-AS1 通过 miR-138-5p/EGFR 信号轴抑制体内肿瘤生长

图5、图6和表4结果显示, TTN-AS1 敲低后, 形成的裸鼠肿瘤组织重量和体积均明显下调, 且肿瘤组织中 EGFR mRNA 表达和 Ki67、PCNA 阳性表达降低, miR-138-5p 表达升高 ($P<0.05$)。病理切片可见 TTN-AS1 敲低后, 肿瘤细胞中出现核固缩、裂解现

象, 肿瘤组织内有较多坏死组织, 血管数量减少。

3 讨论

由于 GBC 早期并没有典型的症状, 晚期手术治疗效果不佳, 一般预后效果较差。因此, GBC 的靶向治疗已经成为调查研究的重点^[1-2]。据报道, lncRNA 在 GBC 组织中异常表达, 可通过与 miRNA 直接结合调控下游蛋白, 进一步促进或抑制 GBC 的发生、发展。因此, 对 lncRNA 的深入研究可能为未来 GBC 的早期诊断和靶向治疗提供新的研究方向。近年来, lncRNA 被证实在 GBC 进展中发挥重要作用。例如: MEG3 在三种 GBC 细胞系中表达降低, 而 MEG3 过表达可显著降低 GBC-SD 细胞增殖, 诱导细胞凋亡^[3]。在目前的研究中, TTN-AS1 在 GBC 组织和细胞中的表达增加, 且敲低其表达可抑制 GBC 细胞系 GBC-SD 细胞增殖和迁移, 诱导细胞凋亡; 同时下调 PCNA、MMP-2 和 MMP-9 水平, 上调 Cleaved Caspase-3 水平。先前的研究表明, TTN-AS1 在肝癌、肺癌等癌症中表达上调^[4-5]。此外, TTN-AS1 还被发现可以驱动乳腺癌细胞的转移^[10]。且已发现 TTN-AS1 促使骨肉瘤细胞的恶性行为^[11]。与这些研究相一致, 且本研究在体内已经证实, 敲低 TTN-AS1 可显著抑



A: EdU染色检测细胞增殖; B: 流式细胞术检测细胞凋亡; C: 划痕愈合实验检测细胞迁移; D: Western blot检测PCNA、Cleaved Caspase-3、MMP-2和MMP-9蛋白水平。

A: cell proliferation was detected by EdU staining; B: apoptosis was detected by flow cytometry; C: cell migration was detected by scratch healing assay; D: protein levels of PCNA, Cleaved Caspase-3, MMP-2, and MMP-9 were detected by Western blot.

图4 各组GBC-SD细胞增殖、凋亡和迁移情况分析

Fig.4 Analysis of the proliferation, apoptosis and migration of GBC-SD cells in each group

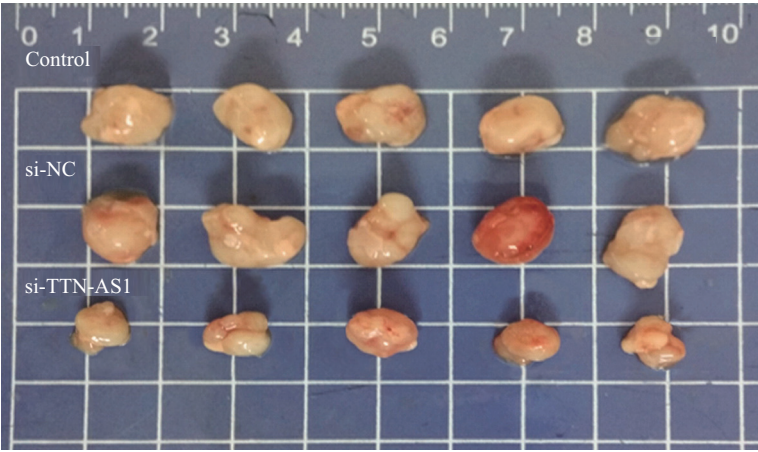


图5 各组裸鼠中形成的肿瘤组织代表性图片
Fig.5 Representative images of tumor tissue in each group

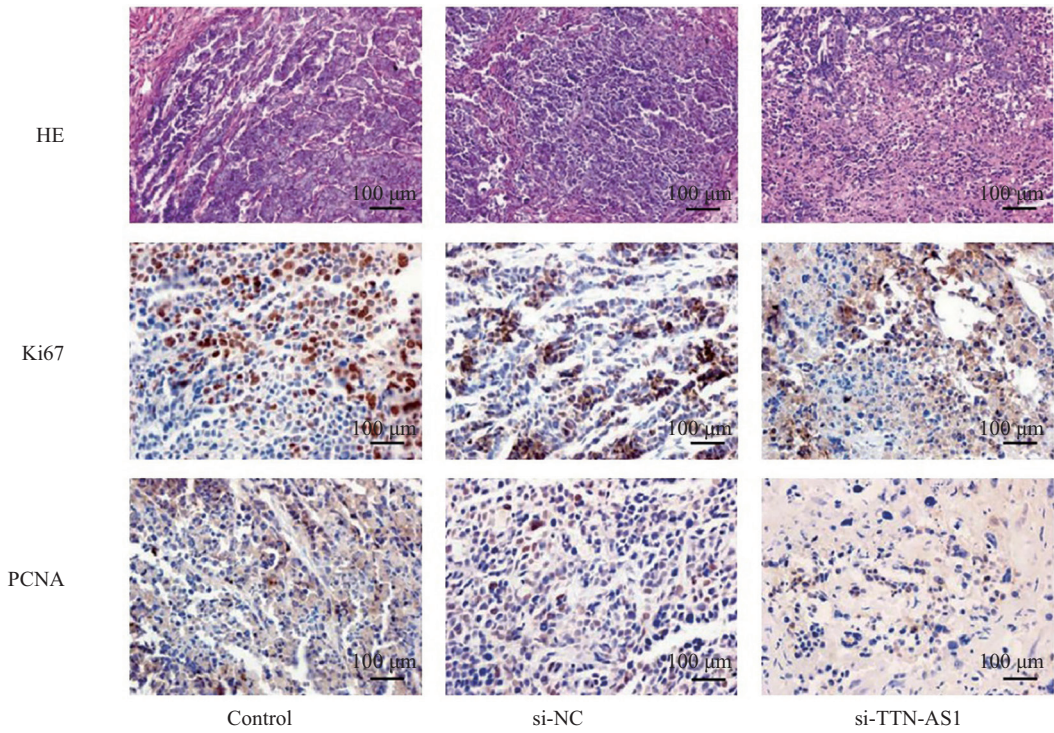


图6 各组裸鼠肿瘤组织HE染色和Ki67、PCNA免疫组化染色代表图
Fig.6 HE staining and Ki67 and PCNA immunohistochemical staining of tumor tissue of nude mice in each group

表4 各组裸鼠肿瘤组织生长, Ki67、PCNA阳性表达及TTN-AS1、miR-138-5p、EGFR mRNA相对表达情况

Table 4 Tumor tissue growth, positive expression of Ki67 and PCNA, and relative expression of TTN-AS1, miR-138-5p and EGFR mRNA in nude mice in each group

组别 Group	肿瘤重量/g Tumor weight /g	肿瘤体积/cm ³ Tumor volume /cm ³	Ki67 (MOD)	PCNA (MOD)	TTN-AS1	miR-138-5p	EGFR mRNA
Control	0.62±0.05	1.21±0.11	0.71±0.08	0.63±0.06	1.05±0.04	1.04±0.06	1.02±0.05
si-NC	0.59±0.04	1.15±0.13	0.75±0.09	0.66±0.07	1.02±0.06	1.01±0.05	0.99±0.06
si-TTN-AS1	0.24±0.03*	0.57±0.06*	0.36±0.05*	0.32±0.04*	0.45±0.05*	1.59±0.14*	0.59±0.05*

**P*<0.05, 与si-NC组比较。
**P*<0.05 compared with si-NC group.

制肿瘤生长。以上数据表明, TTN-AS1在GBC中起促癌基因的作用。

越来越多的证据表明, lncRNA可以作为miRNA天然海绵并介导其mRNA参与癌症的调控。据报道, TTN-AS1作为一种促癌基因, 通过调节miRNA发挥其功能。例如, TTN-AS1靶向miR-376a-3p/PUM2轴增强了子宫内膜癌细胞增殖和转移^[12]。此外, TTN-AS1敲低通过海绵化miR-27b-3p靶向调控转录因子RUNX1的表达, 进而抑制胶质瘤细胞的发展^[13]。于是, 本研究经生物信息学检索与TTN-AS1相互作用的miRNA, 在众多的miRNA候选者中, miR-138-5p因在不同类型肿瘤发挥抑癌因子的作用而被选中。据报道, miR-138-5p在胃癌组织和细胞中表达减少, 并且其表达降低与胃癌患者淋巴结转移显著相关; 上调其表达可显著抑制体外肿瘤细胞的增殖、迁移, 增加细胞凋亡以及抑制体内肿瘤生长^[14]。此外, 在前列腺癌中, miR-138-5p可通过靶向FOXC1在前列腺癌中发挥肿瘤抑制基因的作用^[15]。本研究结果与以上研究相似, 证实了miR-138-5p在GBC组织和细胞中表达下调。另外, GBC组织miR-138-5p与TTN-AS1表达呈现负相关, 因此推测miR-138-5p可能受到TTN-AS1的负转录后调节。进一步通过双荧光素酶和RNA下拉实验证实, TTN-AS1与miR-138-5p存在直接相互作用。以上数据表明TTN-AS1负靶向调控miR-138-5p表达。另外, miR-138在GBC样本中的表达低于正常胆囊样本, miR-138过表达可通过直接抑制其靶基因的表达来抑制GBC细胞增殖, 进而抑制GBC的生长^[7]。本研究结果显示, 敲低TTN-AS1可通过直接上调miR-138-5p的表达发挥抑癌作用, 且抑制miR-138-5p可部分逆转TTN-AS1敲低发挥的抑癌作用。以上数据表明TTN-AS1敲低可能通过调节miR-138-5p在GBC中发挥抑癌功能。随后, 在预测miR-138-5p靶基因的同时发现EGFR的3'UTR含有miR-138-5p的互补位点, 提示EGFR可能是miR-138-5p的靶基因。据报道, EGFR存在于上皮细胞膜中, 属于酪氨酸激酶受体家族, 在不同形式的癌症中经常以较高的水平表达, 并且通常与癌症进展和预后不良呈正相关^[16]。在正常情况下, EGFR参与组织和细胞的发育和维持, 但EGFR过表达时, 会通过影响多个级联反应刺激肿瘤的生长和进展, 从而导致血管生成、迁移和侵袭^[17]。目前EGFR是多种肿瘤治疗中的一个很有价值的靶点, 例如: MAR-

TINELLI等^[18]研究证实, EGFR抑制剂是转移性结直肠癌很有潜力的治疗药物^[18]。此外, EGFR参与由lncRNA/miRNA轴介导的癌症的发生和进展。例如LINC00240敲低通过调节miR-7-5p/EGFR抑制非小细胞肺癌细胞的迁移和侵袭^[19]。在本研究中, EGFR在GBC组织和细胞中表达上调, 与miR-138-5p表达呈负相关, 且是miR-138-5p的靶标基因。另外, GBC组织中TTN-AS1和EGFR呈正相关, 且过表达EGFR部分恢复了TTN-AS1敲低对GBC细胞行为的影响。以上数据说明, TTN-AS1可能通过调控miR-138-5p/EGFR轴参与GBC生物学行为。

总之, 本研究结果表明, TTN-AS1在GBC组织中高表达, TTN-AS1敲低通过调节miR-138-5p/EGFR轴抑制GBC的恶性行为, 提示TTN-AS1可作为GBC患者治疗的有效靶点。然而, 这项研究仍然存在许多不足之处, 因此, 未来仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] ZHENG Q, WU C, YE H, et al. Analysis of the efficacy and prognostic factors of PD-1 inhibitors in advanced gallbladder cancer [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(20): 1568-72.
- [2] GOETZE T O, BECHSTEIN W O, BANKSTAHL U S, et al. Neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine plus cisplatin followed by radical liver resection versus immediate radical liver resection alone with or without adjuvant chemotherapy in incidentally detected gallbladder carcinoma after simple cholecystectomy or in front of radical resection of BTC (ICC/ECC)-a phase III study of the German registry of incidental gallbladder carcinoma platform (GR)-the AIO/CALGP/ACO- GAIN-trial [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 122-8.
- [3] BAO D, YUAN R X, ZHANG Y. Effects of lncRNA MEG3 on proliferation and apoptosis of gallbladder cancer cells through regulating NF- κ B signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(12): 6632-8.
- [4] QI G, LI L. LncRNA TTN-AS1 promotes progression of non-small cell lung cancer via regulating miR-491-5p/ZNF503 axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13(5): 6361-71.
- [5] ZHU X, JIANG S, WU Z, et al. Long non-coding RNA TTN antisense RNA 1 facilitates hepatocellular carcinoma progression via regulating miR-139-5p/SPOCK1 axis [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 578-88.
- [6] LIN Z, LI Y, SHAO R, et al. LncRNA TTN-AS1 acts as a tumor promoter in gallbladder carcinoma by regulating miR-107/HMGAI axis [J]. *World J Surg Oncol*, 2021, 19(1): 163-71.
- [7] MA F, ZHANG M, GONG W, et al. MiR-138 suppresses cell proliferation by targeting Bag-1 in gallbladder carcinoma [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126499-505.
- [8] YAN X, YANG P, LIU H, et al. miR-4461 inhibits the progression of Gallbladder carcinoma via regulating EGFR/AKT signaling [J]. *Cell Cycle*, 2022, 23(5): 1-12.
- [9] 曹军营, 崔素娟, 刘高峰, 等. lncRNA MNX1-AS1通过调控

- miR-218-5p影响非小细胞肺癌细胞的增殖、凋亡及迁移[J]. 中南医学科学杂志(CAO J Y, CUI S J, LIU G F, et al. LncRNA MNX1-AS1 affects the proliferation, apoptosis and migration of non-small cell lung cancer cells by regulating miR-218-5p [J]. Journal of Medical Science in Central South China, 2022, 50(3): 336-40.
- [10] FENG H, WANG Q, XIAO W, et al. LncRNA TTN-AS1 regulates miR-524-5p and RRM2 to promote breast cancer progression [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13(5): 4799-811.
- [11] MENG X, ZHANG Z, CHEN L, et al. Silencing of the long non-coding RNA TTN-AS1 attenuates the malignant progression of osteosarcoma cells by regulating the miR-16-1-3p/TFAP4 axis [J]. Front Oncol, 2021, 11(4): 652835-42.
- [12] SHEN L, WU Y, LI A, et al. LncRNA TTN-AS1 promotes endometrial cancer by sponging miR-376a-3p [J]. Oncol Rep, 2020, 44(4): 1343-54.
- [13] CHANG K, WANG G, LOU J, et al. LncRNA TTN-AS1 up-regulates RUNX1 to enhance glioma progression via sponging miR-27b-3p [J]. Oncol Rep, 2020, 44(3): 1064-74.
- [14] ZHANG W, LIAO K, LIU D. MiR-138-5p inhibits the proliferation of gastric cancer cells by targeting DEK [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12(4): 8137-47.
- [15] HUANG H, XIONG Y, WU Z, et al. MIR-138-5P inhibits the progression of prostate cancer by targeting FOXC1 [J]. Mol Genet Genomic Med, 2020, 8(4): e1193-8.
- [16] TALUKDAR S, EMDAD L, DAS S K, et al. EGFR: an essential receptor tyrosine kinase-regulator of cancer stem cells [J]. Adv Cancer Res, 2020, 147(5): 161-88.
- [17] SANTOS E D S, NOGUEIRA K A B, FERNANDES L C C, et al. EGFR targeting for cancer therapy: pharmacology and immunoconjugates with drugs and nanoparticles [J]. Int J Pharm, 2021, 592(6): 120082-8.
- [18] MARTINELLI E, CIARDIELLO D, MARTINI G, et al. Implementing anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy in metastatic colorectal cancer: challenges and future perspectives [J]. Ann Oncol, 2020, 31(1): 30-40.
- [19] KU G W, KANG Y, YU S L, et al. LncRNA LINC00240 suppresses invasion and migration in non-small cell lung cancer by sponging miR-7-5p [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 44-9.