

lncRNA CASC11靶向调节miR-498对胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

赵维波* 孔令甲 岳宗柱 朱玉森
(聊城市第二人民医院, 消化内科, 聊城 252600)

摘要 该文探讨长链非编码RNA(lncRNA)癌症易感性候选物11(CASC11)对胃癌(GC)细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响及分子机制。体外培养正常人胃黏膜细胞系(GES-1)和人GC细胞系(MKN-45、KATOIII、MKN7和HGC-27), 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)检测细胞中CASC11、miR-498(microRNA-498)和LIN28B mRNA的表达情况。将MKN7细胞分为对照组(NC组)、si-NC组、si-CASC11组、si-CASC11+anti-NC组、si-CASC11+anti-miR-498组, 使用Lipofectamine 3000转染试剂将si-CASC11、si-NC、miR-498 inhibitor、inhibitor-NC转染到细胞中。转染后, RT-qPCR检测细胞中CASC11、miR-498、LIN28B mRNA的表达情况, Western blot检测细胞中LIN28B蛋白的表达情况, CCK-8法检测细胞增殖活性, 流式细胞术检测细胞凋亡, Transwell实验检测细胞迁移、侵袭能力。双荧光素酶和RNA免疫沉淀(RIP)实验验证CASC11和miR-498的相互关系。BALB/c裸鼠移植瘤实验检测沉默CASC11在体内的抑瘤作用。结果显示, CASC11和LIN28B在GC细胞中过表达, miR-498在GC细胞中低表达($P<0.05$)。敲低CASC11可显著上调miR-498表达, 抑制LIN28B的mRNA和蛋白表达, 抑制GC细胞的增殖、迁移和侵袭, 诱导GC细胞凋亡($P<0.05$); 体内实验证实, 敲低CASC11可抑制体内裸鼠移植瘤的生长($P<0.05$)。下调miR-498, 可增加LIN28B表达水平, 减弱CASC11沉默对GC细胞恶性生物学行为和体内移植瘤生长的抑制作用($P<0.05$)。双荧光素酶和RIP实验证实miR-498是CASC11的潜在靶标。该研究得出, CASC11可能通过充当miR-498的海绵来促进LIN28B表达, 从而影响GC细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭。

关键词 胃癌; 长链非编码RNA癌症易感性候选物11; microRNA-498; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

Influences of lncRNA CASC11 on Proliferation, Apoptosis, Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells by Targeting miR-498

ZHAO Weibo*, KONG Lingjia, YUE Zongzhu, ZHU Yusen

(Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Liaocheng, Liaocheng 252600, China)

Abstract This paper discusses the effect of lncRNA (long non-coding RNA) CASC11 (cancer susceptibility candidate 11) on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of GC (gastric cancer) cells and the molecular mechanism. Normal human gastric mucosal cell lines (GES-1) and human GC cell lines (MKN-45, KATOIII, MKN7 and HGC-27) were cultured *in vitro*. The expressions of CASC11, miR-498 (microRNA-498) and LIN28B mRNA in the cells were detected by RT-qPCR (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction). MKN7 cells were divided into control group (NC group), si-NC group, si-CASC11 group, si-CASC11+anti-NC group, and si-CASC11+anti-miR-498 group. si-CASC11, si-NC, miR-498 inhibitor, and inhibitor-NC were

收稿日期: 2022-11-29

接受日期: 2023-02-09

*通讯作者。Tel: 15865750390, E-mail: bvfkom@163.com

Received: November 29, 2022

Accepted: February 9, 2023

*Corresponding author. Tel: +86-15865750390, E-mail: bvfkom@163.com

transfected into cells using Lipofectamine 3000 transfection reagent. After transfection, RT-qPCR were used to detect the expressions of CASC11, miR-498 and *LIN28B* mRNA in cells. Western blot was used to detect the protein expressions of LIN28B in cells. Cell proliferation activity was detected by CCK-8 assay. Apoptosis was detected by flow cytometry. Transwell assay was used to detect cell migration and invasion abilities. Dual-luciferase and RIP (RNA immunoprecipitation) experiments were used to verify the relationship between CASC11 and miR-498. The effect of CASC11 silence on the growth of MKN7 cells *in vivo* was detected in BALB/c nude mouse transplantation experiment. The results show that, CASC11 and LIN28B were overexpressed in GC cells, and miR-498 was underexpressed in GC cells ($P<0.05$). Knockdown of CASC11 could significantly up-regulate miR-498, inhibiting the mRNA and protein expression of LIN28B, inhibiting the proliferation, migration and invasion of GC cells, and inducing GC cell apoptosis ($P<0.05$); *in vivo* experiments confirmed that knockdown of CASC11 could inhibit the growth of transplanted tumors in nude mice ($P<0.05$). Down-regulating the expression of miR-498 could reduce the inhibitory effect of CASC11 silence on proliferation, migration and invasion of GC cells and the growth of transplanted tumors *in vivo* by increasing the expression of LIN28B ($P<0.05$). Dual-luciferase and RIP experiments confirmed that miR-498 was a potential target of CASC11. The study concluded that, CASC11 might promote LIN28B expression by acting as a sponge for miR-498, thereby affecting the proliferation, apoptosis, migration and invasion of GC cells.

Keywords gastric cancer; long non-coding RNA cancer susceptibility candidate 11; microRNA-498; proliferation; apoptosis; migration; invasion

胃癌(gastric cancer, GC)是消化系统常见的恶性肿瘤,也是癌症相关死亡的主要原因之一^[1]。尽管免疫治疗和靶向治疗等GC新兴疗法的出现使GC治疗取得了显著进展,但大多数GC患者通常在治疗有限的晚期才被诊断出来,患者的五年总生存率仍不理想^[2]。因此,深入了解GC发展的分子机制可能有助于发现潜在的诊断及治疗靶点。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)可被视为一种生物标志物,对GC早期筛查和诊断具有重要意义^[3]。癌症易感性候选物11(cancer susceptibility candidate 11, CASC11)作为一种lncRNA,在各种肿瘤中过表达,可调节肿瘤生物学过程^[4]。据报道,CASC11在GC组织和细胞系中高度表达,其过表达可促进GC细胞的侵袭和迁移,且CASC11的高表达与较大的肿瘤直径、淋巴结转移显著相关,而敲除CASC11可抑制GC细胞增殖,促进细胞凋亡^[5-6]。这表明CASC11可作为GC的重要诊断因子和治疗靶点。然而,关于CASC11在GC中作用的研究仍很少,其作用机制尚不明确。

CASC11可作为内源性海绵调节miRNA(microRNA)的表达和功能,进而调控靶基因表达。通过生物信息学数据库对CASC11的潜在靶标进行预测发现,miR-498(microRNA-498)与CASC11之间存在结合

位点。miR-498已被报道在GC组织和细胞系中呈低表达,在GC中起肿瘤抑制作用,与患者的预后相关^[7-8]; *LIN28B*是近年新发现的一个与肿瘤发生发展相关的新基因,其异常表达可促进肿瘤发生发展。*LIN28B*为miR-498的下游基因,miR-498的过表达可下调*LIN28B*,抑制GC细胞的增殖、迁移与侵袭^[8]。基于以上研究,笔者推测CASC11可能通过海绵化miR-498发挥其致癌活性,并对此展开了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 正常人胃黏膜细胞系GES-1(货号为EC-H285)和人GC细胞系MKN-45(货号为CL-0292)、KATOIII(货号为CL-0372)、MKN7(货号为CL-0574)和HGC-27(货号为CL-0107)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。GES-1和MKN7细胞在含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的RPMI-1640中培养, KATOIII细胞在含10% FBS+1%青霉素/链霉素的IMDM中培养, MKN-45和HGC-27细胞在含有10% FBS、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的DMEM中,均于37℃、5% CO₂条件下培养。

1.1.2 主要试剂与仪器 靶向CASC11的小分子

干扰RNA(siRNA) si-CASC11、miR-498 mimic、miR-498 inhibitor及其阴性对照(si-NC、miR-NC、inhibitor-NC)购自广州锐博生物科技有限公司。CCK-8细胞增殖检测试剂盒(货号CA1210)、膜联蛋白V(Annexin-V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒(货号CA1020)购自北京索莱宝生物科技有限公司;兔源一抗LIN28B(货号ab262859)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号ab5694)购自英国Abcam公司;双荧光素酶测定试剂盒(货号E1910)购自美国Promega公司;Magna RIP试剂盒(货号17-700)购自美国Millipore公司。ABI Prism[®] 7500型实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪购自美国Applied Biosystems公司;FACS Calibur流式细胞仪购自美国BD公司;Nikon Eclipse Ti-S倒置显微镜购自日本Nikon公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-qPCR检测细胞中CASC11、miR-498和LIN28B mRNA的表达水平 通过使用Trizol试剂从细胞中提取总RNA,使用PrimeScript[™] RT Reagent Kit从总RNA中获得cDNA,以检测CASC11和LIN28B mRNA表达水平,结果被标准化为GAPDH表达。为了检查miR-498的表达,使用TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit进行逆转录,并将结果标准化为U6表达。RT-qPCR和数据收集通过ABI Prism[®] 7500型RT-qPCR仪进行。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达水平。引物序列见表1。

1.2.2 细胞转染 将MKN7细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种在6孔板中并在37℃、5% CO₂条件下培养过夜。在无血清培养基中使用Lipofectamine 3000转染试剂将si-CASC11、si-NC、miR-498 inhibitor、inhibitor-NC转染到细胞中。实验分为:对照组(NC组,无转

染)、si-NC组(转染si-CASC11阴性对照si-NC)、si-CASC11组(转染si-CASC11)、si-CASC11+anti-NC组(si-CASC11和miR-498 inhibitor阴性对照inhibitor-NC共转染至MKN7细胞)、si-CASC11+anti-miR-498组(si-CASC11和miR-498 inhibitor共转染至MKN7细胞)。转染后6 h向细胞中加入完全培养基,继续培养48 h。收集各组细胞,RT-qPCR检测细胞中CASC11、miR-498和LIN28B mRNA的表达水平,检测步骤同1.2.1。

1.2.3 Western blot检测细胞中LIN28B蛋白表达情况 使用RIPA裂解液从培养的细胞中提取蛋白质,然后通过二辛可宁酸测定试剂盒检测蛋白质浓度。用SDS-PAGE凝胶电泳分离等量的蛋白质,然后将蛋白质转移到PVDF膜上。使用脱脂奶粉(5%)在37℃下封闭膜1 h。用LIN28B(1:1 000)和 β -actin(1:1 000)一抗在4℃下对膜进行过夜孵育,然后将膜与HRP偶联的二抗(1:5 000)室温孵育2 h。增强型化学发光试剂盒显影,ImageJ软件测定蛋白条带的灰度值,通过与内参(β -actin)的灰度值比,计算目的蛋白的相对表达量。

1.2.4 CCK-8法检测细胞增殖活性 将MKN7细胞(2×10^3 个/孔)接种到96孔板中并在37℃条件下培养。转染24、48和72 h后,将CCK-8试剂(10 μ L/孔)添加到96孔板中,并与细胞在37℃下孵育2 h。孵育后,使用酶标仪测量每个孔在波长为450 nm处的吸光度(D)值。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 按照1.2.2的方式处理后收集细胞,PBS洗涤后将细胞重悬于1 $\times$ 结合缓冲液中。然后,将细胞(5×10^5 个细胞)在37℃、黑暗中用5 μ L Annexin-V-FITC和5 μ L PI染色15 min。通过流式细胞术检测细胞凋亡率。早期和晚期细胞凋亡百分比之和(“右下象限+右上象限”)为细胞凋亡率。

1.2.6 Transwell实验检测细胞迁移、侵袭能力

表1 RT-qPCR引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequences

基因 Gene	正向引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
CASC11	GCT GCA GAA GGT CCG AAG AA	TTC ACC ACG TCC AGT TGC TT
LIN28B	AGC AAA GGT GGT GGA GAA GA	TCT CGG TTT ATC ATG GAG ATG
GAPDH	GGAA AAG CTG TGG CGT GAT	AAG GTG GAA GAA TGG GAG TT
miR-498	GGT TTG AAG CCA GGC GGT TTC	CAG TGC AGG GTC CGA GGT AT
U6	CTC GCT TCG GCA GCA CA	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT

Transwell迁移实验,收集转染的细胞重悬于无血清培养基中,并以 1×10^5 个/孔的密度接种到Transwell小室(8 μm)上层中,200 μL /孔。下室加入600 μL 含10% FBS的培养基。将细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养24 h。然后,用棉签去除膜上表面的细胞,用4%多聚甲醛固定下层细胞,室温固定30 min,并在室温下用1%结晶紫染色30 min。在倒置显微镜下计数迁移的细胞数。细胞侵袭实验,将稀释的基质胶添加到Transwell小室上室中,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下聚合30 min。将转染的细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种到上室中,下室加入600 μL 完全培养基。其余步骤同Transwell迁移实验,在倒置显微镜下计数侵袭的细胞数。每孔随机选择五个视野,计算迁移/侵袭的细胞数量,取平均值。

1.2.7 双荧光素酶报告基因测定 使用StarBase v2.0数据库(<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)预测CASC11和miR-498的结合位点。GenePharma开发并生产了具有野生型(WT)和突变型(MUT) miR-498相互作用位点的CASC11片段,将CASC11的WT或MUT片段插入包含海肾荧光素酶的pmirGLO载体中以构建WT-CASC11和MUT-CASC11报告质粒。将MKN7细胞(1×10^5 个/孔)接种在24孔板中培养至80%融合,再将其分为miR-NC组和miR-498 mimic组,使用Lipofectamine 3000将WT-CASC11、MUT-CASC11分别与miR-NC、miR-498 mimic共转染MKN7细胞。转染后48 h收集处理的细胞,使用双荧光素酶测定试剂盒检测荧光素酶活性。使用海肾荧光素酶活性对数据进行标准化。

1.2.8 RNA免疫沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)测定 使用Magna RIP试剂盒进行RIP测定。用RIP裂解缓冲液收集和裂解细胞。然后,将全细胞裂解物与含有磁珠的RIP缓冲液一起在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育24 h,该磁珠已与人抗Ago2抗体或作为阴性对照的正常小鼠IgG结合。随后,进行磁珠的收集,然后分离免疫沉淀的RNA。最后,进行RT-qPCR对免疫沉淀的RNA进行提取、纯化和分析,以评估CASC11和miR-498的富集情况。

1.2.9 体内动物研究 4~6周龄雄性BALB/c裸鼠(体质量为21 g~25 g)购自Slac实验动物有限公司(中国上海),生产许可证号为SCXK(沪)2022-0004,动物质量合格证号为1107252011001145。本研究经聊城市第二人民医院动物伦理委员会批准(批准文号IA-CUC-202201003)。将裸鼠分为si-NC组、si-CASC11

组、si-CASC11+anti-NC组和si-CASC11+anti-miR-498组,每组5只。将稳定转染si-CASC11、miR-498 inhibitor及其阴性对照(si-NC、inhibitor-NC)的MKN7细胞皮下注射到裸鼠体内(2×10^6 个/只)。每周评估一次肿瘤大小,并使用以下公式计算肿瘤体积, $V=0.5 \times L \times S^2$, V 为肿瘤体积、 L 为长径、 S 为短径。4周后,收集肿瘤组织并称重。

1.2.10 免疫组织化学(IHC)法检测肿瘤内Ki-67的表达情况 将肿瘤组织用4%多聚甲醛固定后包埋在石蜡中,并切成4 μm 厚的切片。经脱蜡、水化后,将切片与0.3% H_2O_2 一起在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min以消除内源性过氧化物酶活性。用0.1% Triton X-100处理30 min并用5%正常山羊血清在37 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭30 min后,与Ki-67(1:200)抗体一起在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,然后将切片与二抗(1:200)在室温下孵育30 min。DAB室温孵育5 min后,切片用苏木精复染30 s。最后,在显微镜下拍照,并用Image-Pro Plus 6.0软件计数Ki-67阳性细胞。

1.2.11 统计学方法 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析使用GraphPad Prism 8.0软件。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人GC细胞系中CASC11、miR-498和LIN28B mRNA水平比较

与GES-1细胞相比,人GC细胞系(MKN-45、KATOIII、MKN7和HGC-27)中CASC11、LIN28B mRNA水平显著升高,miR-498 mRNA水平显著降低($P < 0.05$);其中,MKN7细胞中CASC11、LIN28B mRNA水平明显高于其他细胞系,miR-498 mRNA水平明显低于其他细胞系,因此选择MKN7细胞进行后续实验(表2)。

2.2 各组MKN7细胞中CASC11、miR-498和LIN28B水平比较

与NC组相比,si-NC组CASC11、miR-498、LIN28B mRNA和LIN28B蛋白水平差异无统计学意义($P > 0.05$),si-CASC11组CASC11、LIN28B mRNA和LIN28B蛋白水平显著降低,miR-498水平显著升高($P < 0.05$);与si-CASC11组相比,si-CASC11+anti-NC组上述指标表达差异无统计学意义($P > 0.05$),si-CASC11+anti-miR-498组LIN28B mRNA和LIN28B蛋白水平显著升高,miR-498水平显著降低($P < 0.05$)(图1和表3)。

2.3 各组MKN7细胞增殖活性比较

转染48、72 h时,与NC组相比, si-NC组细胞增殖活性差异无统计学意义($P>0.05$), si-CASC11组细胞增殖活性显著降低($P<0.05$);与si-CASC11组相比, si-CASC11+anti-NC组细胞增殖活性差异无统计学意义($P>0.05$), si-CASC11+anti-miR-498组细胞增殖活性显著升高($P<0.05$)(表4)。

2.4 各组MKN7细胞凋亡率比较

与NC组相比, si-NC组细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$), si-CASC11组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与si-CASC11组相比, si-CASC11+anti-NC组细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$), si-

CASC11+anti-miR-498组细胞凋亡率显著降低($P<0.05$)(图2和表5)。

2.5 各组MKN7细胞迁移、侵袭能力比较

与NC组相比, si-NC组迁移、侵袭的细胞数量差异无统计学意义($P>0.05$), si-CASC11组迁移、侵袭的细胞数量显著降低($P<0.05$);与si-CASC11组相比, si-CASC11+anti-NC组迁移、侵袭的细胞数量差异无统计学意义($P>0.05$), si-CASC11+anti-miR-498组迁移、侵袭的细胞数量显著增加($P<0.05$)(图3和表6)。

2.6 miR-498是GC细胞中CASC11的直接靶标

StarBase数据库预测显示, miR-498包含CASC11的结合序列(图4)。双荧光素酶结果显示,

表2 不同GC细胞中CASC11、miR-498和LIN28B mRNA水平比较			
Table 2 Comparison of CASC11, miR-498 and LIN28B mRNA levels in different GC cells			
细胞 Cells	CASC11 mRNA	miR-498 mRNA	LIN28B mRNA
GES-1	1.00±0.09	1.01±0.12	0.98±0.10
MKN-7	4.71±0.52*	0.23±0.04*	3.65±0.41*
MKN-45	2.62±0.34*#	0.44±0.05*#	2.30±0.27*#
KATOIII	1.59±0.27*#	0.75±0.08*#	1.49±0.23*#
HGC-27	2.18±0.29*#	0.62±0.07*#	1.81±0.25*#

$n=6$; * $P<0.05$, 与GES-1细胞相比; # $P<0.05$, 与MKN-7细胞相比。
 $n=6$; * $P<0.05$ compared with GES-1 cells; # $P<0.05$ compared with MKN-7 cells.

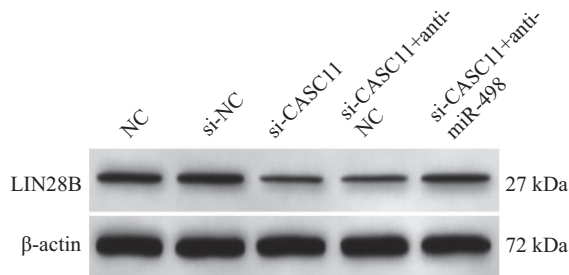


图1 各组MKN7细胞中LIN28B蛋白表达
Fig.1 LIN28B protein expression in MKN7 cells in each group

表3 各组MKN7细胞中CASC11、miR-498、LIN28B mRNA和LIN28B蛋白水平比较				
Table 3 Comparison of CASC11, miR-498, LIN28B mRNA and LIN28B protein levels in MKN7 cells in each group				
组别 Group	CASC11	miR-498	LIN28B mRNA	LIN28B蛋白 LIN28B protein
NC	1.02±0.09	0.99±0.10	1.00±0.12	0.54±0.07
si-NC	1.01±0.10	1.03±0.14	1.04±0.11	0.57±0.06
si-CASC11	0.36±0.06*#	3.25±0.35*#	0.41±0.06*#	0.23±0.04*#
si-CASC11+anti-NC	0.35±0.05*#	3.30±0.37*#	0.38±0.05*#	0.21±0.03*#
si-CASC11+anti-miR-498	0.39±0.06*#	1.29±0.18*&Δ	0.75±0.09*#&Δ	0.42±0.06*#&Δ

$n=6$; * $P<0.05$, 与NC组相比; # $P<0.05$, 与si-NC组相比; & $P<0.05$, 与si-CASC11组相比; Δ $P<0.05$, 与si-CASC11+anti-NC组相比。
 $n=6$; * $P<0.05$ compared with NC group; # $P<0.05$ compared with si-NC group; & $P<0.05$ compared with si-CASC11 group; Δ $P<0.05$ compared with si-CASC11+anti-NC group.

表4 各组MKN7细胞增殖活性比较

Table 4 Comparison of MKN7 cell proliferation activity in each group

组别 Group	细胞增殖活性 D_{450} Cell proliferation activity D_{450}		
	24 h	48 h	72 h
NC	0.24±0.04	0.53±0.05	0.76±0.07
si-NC	0.26±0.05	0.57±0.06	0.79±0.09
si-CASC11	0.20±0.03	0.32±0.05 ^{*#}	0.44±0.05 ^{*#}
si-CASC11+anti-NC	0.21±0.03	0.35±0.04 ^{*#}	0.46±0.06 ^{*#}
si-CASC11+anti-miR-498	0.23±0.04	0.47±0.05 ^{*#&Δ}	0.68±0.07 ^{&Δ}

$n=6$; ^{*} $P<0.05$, 与NC组相比; [#] $P<0.05$, 与si-NC组相比; [&] $P<0.05$, 与si-CASC11组相比; ^Δ $P<0.05$, 与si-CASC11+anti-NC组相比。
 $n=6$; ^{*} $P<0.05$ compared with NC group; [#] $P<0.05$ compared with si-NC group; [&] $P<0.05$ compared with si-CASC11 group; ^Δ $P<0.05$ compared with si-CASC11+anti-NC group.

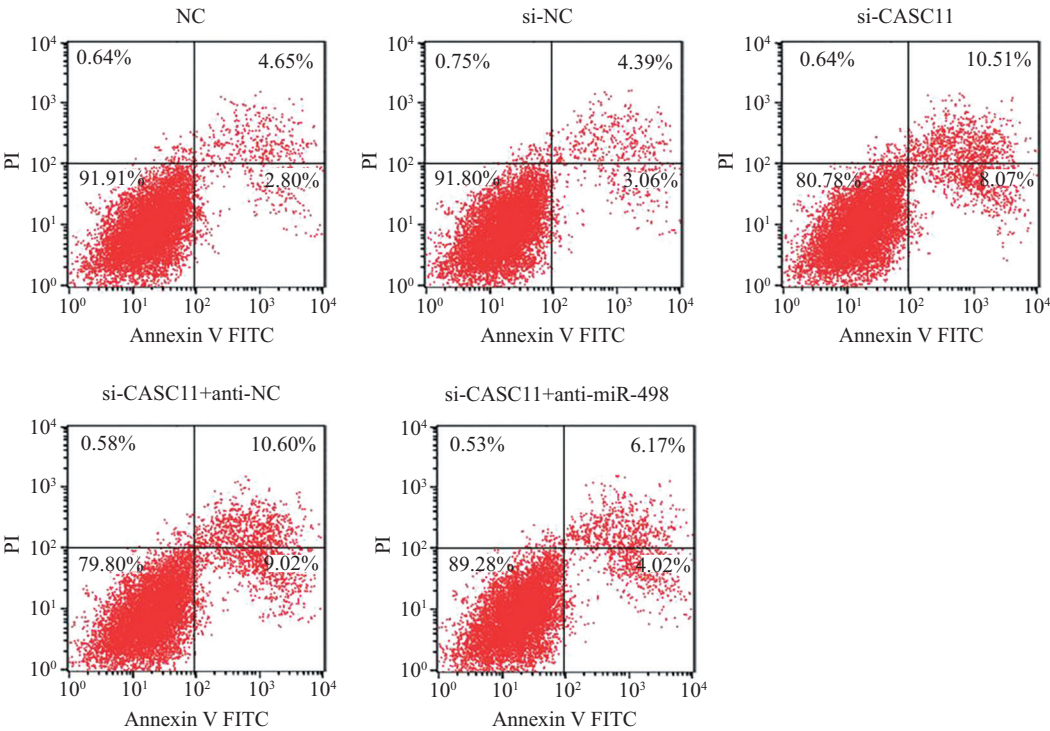


图2 各组MKN7细胞凋亡水平
Fig.2 MKN7 cell apoptosis level in each group

表5 各组MKN7细胞凋亡水平比较

Table 5 Comparison of MKN7 cell apoptosis levels in each group

组别 Group	细胞凋亡率/% Cell apoptosis rate /%
NC	7.41±0.86
si-NC	7.35±0.82
si-CASC11	18.56±2.07 ^{*#}
si-CASC11+anti-NC	19.12±2.23 ^{*#}
si-CASC11+anti-miR-498	10.08±1.61 ^{&Δ}

$n=6$; ^{*} $P<0.05$, 与NC组相比; [#] $P<0.05$, 与si-NC组相比; [&] $P<0.05$, 与si-CASC11组相比; ^Δ $P<0.05$, 与si-CASC11+anti-NC组相比。
 $n=6$; ^{*} $P<0.05$ compared with NC group; [#] $P<0.05$ compared with si-NC group; [&] $P<0.05$ compared with si-CASC11 group; ^Δ $P<0.05$ compared with si-CASC11+anti-NC group.

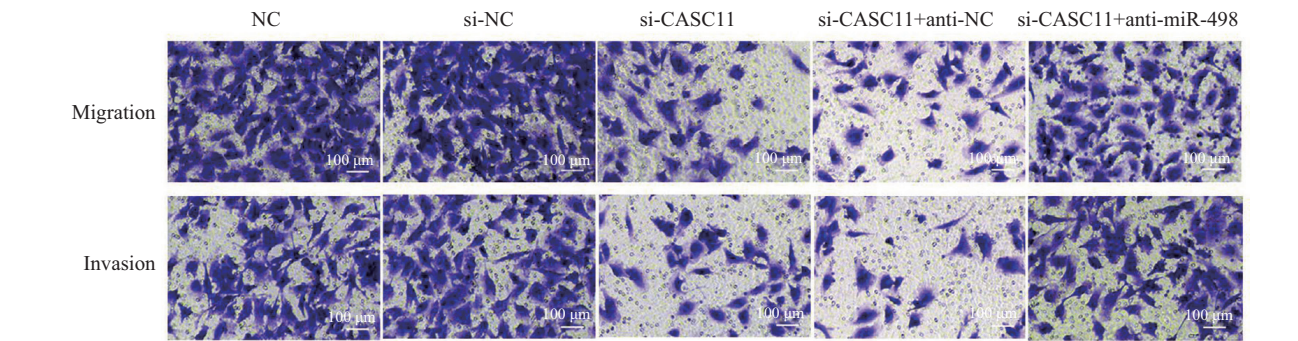


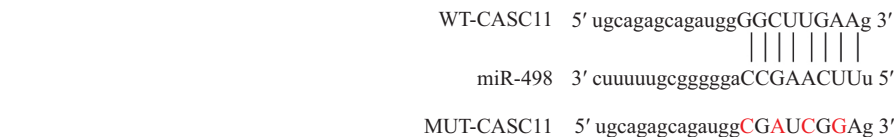
图3 各组MKN7细胞迁移、侵袭能力

Fig.3 Migration and invasion abilities of MKN7 cells in each group

表6 各组MKN7细胞迁移、侵袭细胞数量比较

Table 6 Comparison of the number of MKN7 cells migration and invasion in each group		
组别 Group	迁移细胞数量(个/视野) Number of migration cells (number/visual field)	侵袭细胞数量(个/视野) Number of invasion cells (number/visual field)
NC	136.25±18.60	109.02±13.47
si-NC	141.34±20.12	115.69±16.82
si-CASC11	49.70±6.58 [#]	36.74±5.20 [#]
si-CASC11+anti-NC	45.91±7.03 [#]	32.38±5.16 [#]
si-CASC11+anti-miR-498	101.52±15.86 ^{#&Δ}	84.10±12.79 ^{#&Δ}

$n=6$; ^{*} $P<0.05$, 与NC组相比; [#] $P<0.05$, 与si-NC组相比; [&] $P<0.05$, 与si-CASC11组相比; ^Δ $P<0.05$, 与si-CASC11+anti-NC组相比。
 $n=6$; ^{*} $P<0.05$ compared with NC group; [#] $P<0.05$ compared with si-NC group; [&] $P<0.05$ compared with si-CASC11 group; ^Δ $P<0.05$ compared with si-CASC11+anti-NC group.



红色表示突变位点。
Red represents mutation site.

图4 CASC11与miR-498的结合位点预测

Fig.4 Prediction of binding sites of CASC11 and miR-498

表7 双荧光素酶报告基因测定法测定荧光素酶活性

组别 Group	荧光素酶活性 Luciferase activity	
	WT-CASC11	MUT-CASC11
miR-NC	1.01±0.12	1.03±0.10
miR-498 mimic	0.34±0.05	1.01±0.11
<i>t</i>	12.624	0.330
<i>P</i>	0.000	0.749

$n=6$.

与miR-NC相比, 转染miR-498 mimic可显著降低含WT-CASC11质粒细胞的荧光素酶活性($P<0.05$), 对含MUT-CASC11质粒细胞的荧光素酶活性无明显影响($P>0.05$)(表7); RIP检测结果显示, 与IgG抗体相

比, CASC11和miR-498可被Ago2抗体富集(表8)。

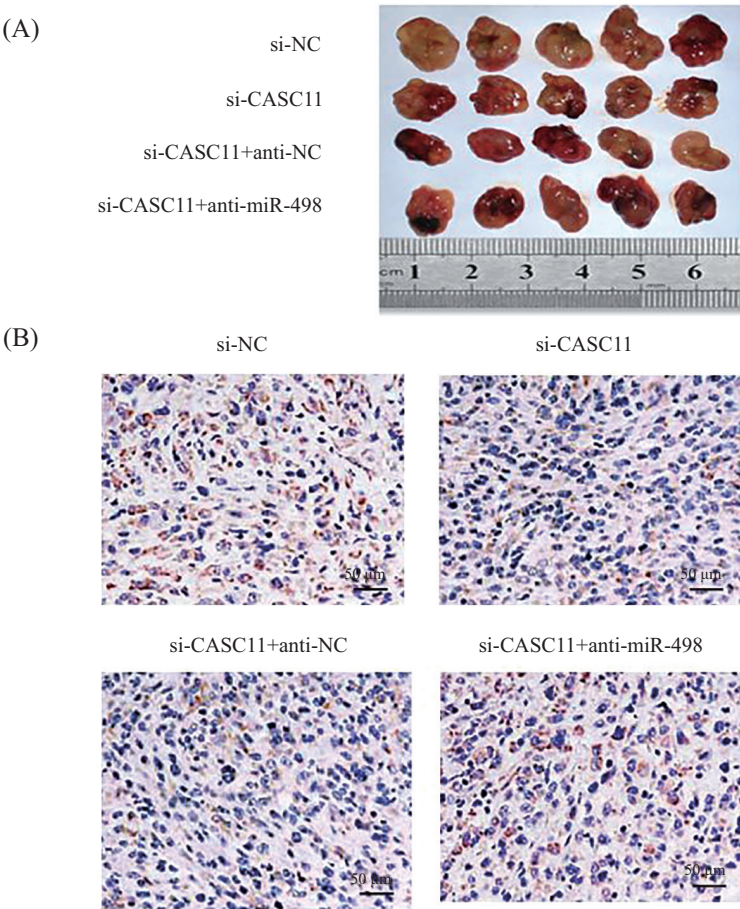
2.7 敲低CASC11通过调节miR-498/LIN28B轴在体内抑制GC的肿瘤发生

与si-NC组相比, si-CASC11组肿瘤体积和肿瘤质

表8 RIP测定CASC11和miR-498与Ago2蛋白的结合
Table 8 RIP determination of CASC11 and miR-498 binding with Ago2 protein

抗体 Antibody	抗体富集 Antibody enrichment	
	CASC11	miR-498
IgG	1.00±0.12	1.03±0.11
Ago2	5.16±0.55	12.74±1.02
<i>t</i>	18.101	27.959
<i>P</i>	0.000	0.000

n=6.



A: 肿瘤大小; B: Ki-67阳性表达(IHC)。
A: tumor size; B: Ki-67 positive expression (IHC).

图5 敲低CASC11对裸鼠移植瘤生长的影响
Fig.5 Effect of knocking down CASC11 on the growth of transplanted tumor in nude mice

量以及肿瘤组织中 Ki-67阳性表达显著降低 ($P<0.05$); 与 si-CASC11组相比, si-CASC11+anti-NC组肿瘤体积、肿瘤质量和Ki-67表达差异无统计学意义($P>0.05$), si-CASC11+anti-miR-498组肿瘤体积、肿瘤质量、Ki-67阳性表达显著增加($P<0.05$)(图5和表9)。

3 讨论

既往研究表明, lncRNA与GC发展密切相关。

许多 lncRNA在GC组织或血浆中差异表达, 并与GC的临床病理特征有关, 可作为GC早期诊断、进展和预后监测的分子标志物^[9]。CASC11位于人类染色体8q24.21, 是GC^[5-6]、膀胱癌^[10]、结直肠癌^[11]、前列腺癌^[12]等癌症中的一种致癌 lncRNA。本研究探讨了CASC11在GC中的潜在作用, 并证实CASC11通过海绵化 miR-498靶向 LIN28B表达来调节GC细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭。

表9 敲低CASC11对裸鼠移植瘤生长的影响

Table 9 Effect of knocking down CASC11 on the growth of transplanted tumor in nude mice

组别 Group	肿瘤体积/mm ³ Tumor volume /mm ³				肿瘤质量/g Tumor weight /g	Ki-67阳性细胞/% Ki-67 positive cells /%
	1周 1 week	2周 2 week	3周 3 week	4周 4 week		
si-NC	95.42±14.60	130.16±17.34	247.29±30.15	329.35±36.07	1.39±0.18	40.52±6.13
si-CASC11	90.38±13.14	125.59±14.26	161.78±21.34 [#]	214.83±27.45 [#]	0.51±0.07 [#]	17.86±3.09 [#]
si-CASC11+anti-NC	88.75±10.53	124.80±16.31	149.05±23.18 [#]	205.62±29.32 [#]	0.48±0.06 [#]	16.45±2.81 [#]
si-CASC11+anti-miR-498	93.06±12.47	127.45±18.02	208.56±27.45 ^{#&Δ}	287.13±32.64 ^{#&Δ}	1.05±0.13 ^{#&Δ}	32.12±4.15 ^{#&Δ}

n=5; [#]*P*<0.05, 与si-NC组相比; [&]*P*<0.05, 与si-CASC11组相比; ^Δ*P*<0.05, 与si-CASC11+anti-NC组相比。

n=5; [#]*P*<0.05 compared with si-NC group; [&]*P*<0.05 compared with si-CASC11 group; ^Δ*P*<0.05 compared with si-CASC11+anti-NC group.

已经证实, CASC11在GC组织中上调, 且上调的CASC11可促进GC的进展^[5-6]。然而, CASC11在GC进展中的功能机制尚未被完全阐明。与上述研究一致, 本研究发现CASC11在GC细胞系中显著过表达。功能研究表明, CASC11敲低可抑制GC细胞增殖, 裸鼠异种移植瘤模型也验证了敲低CASC11抑制了GC移植瘤体内生长。此外, CASC11的下调抑制了GC细胞的迁移与侵袭, 促进了细胞凋亡。

lncRNA可以充当miRNA的海绵, 通过抑制miRNA对目标转录本的调控来影响miRNA的功能^[13-14]。因此, 本研究进行了生物信息学分析以预测CASC11上的miRNA结合位点, 并证明miR-498是CASC11的潜在靶标。先前的研究表明, CASC11通过靶向miR-498调节非小细胞肺癌发生^[15]。此外, CASC11通过海绵miR-498促进胶质瘤细胞的增殖、迁移和肿瘤生长^[16]。然而, 目前尚未有研究报道CASC11和miR-498之间的相互作用对GC进展的影响。已经证实miR-498在GC组织中的表达水平降低, 与患者预后不良相关, 而miR-498的过表达抑制了GC的进展^[7]。本研究发现, CASC11和miR-498在GC中的表达趋势相反, 且双荧光素酶和RIP分析表明miR-498可以直接与GC细胞中的CASC11结合; 此外, 在GC细胞中敲低CASC11可以增加miR-498的表达量, 且下调miR-498可阻断CASC11敲低对肿瘤的抑制活性。这些结果表明, CASC11可以作为miR-498的海绵来抑制其在GC细胞中的功能。

与靶mRNA 3'-UTR结合的miRNA可以通过转录后机制抑制靶基因的表达。已证明miR-498通过靶向LIN28B^[8]在GC进展中发挥重要作用。LIN28B已被证实在GC细胞中过表达, 并且LIN28B上调与预

后不良和肿瘤复发有关^[17-18]。因此, 本研究主要关注GC中miR-498/LIN28B轴的细胞功能。与之前的研究一致, 本研究观察到在GC细胞系中miR-498表达量降低而LIN28B表达量增加, 并且敲低CASC11上调miR-498表达量的同时可抑制LIN28B表达水平, 而下调miR-498可增加LIN28B表达量, 阻断CASC11对GC细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。

综上所述, CASC11通过充当miR-498的海绵来促进LIN28B表达, 从而影响GC细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭。本研究首次证明了CASC11/miR-498/LIN28B轴在GC中的调节功能, 为GC进展的潜在机制研究提供了见解, 再次证实了CASC11可能作为GC发展的潜在治疗靶点。然而, CASC11和miR-498对GC患者预后的影响有待进一步研究。此外, 在未来可能会进行进一步的研究以确定CASC11/miR-498/LIN28B轴是否在GC对化疗试剂的抗性中起作用。

参考文献 (References)

- [1] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-48.
- [2] EUSEBI L H, TELESE A, MARASCO G, et al. Gastric cancer prevention strategies: a global perspective [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 35(9): 1495-502.
- [3] LI X, DU Y, WANG Y. The value of lncRNA SNHG5 as a marker for the diagnosis and prognosis of gastric cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(5): 5420-7.
- [4] WANG B, XU W, HU C, et al. Critical roles of the lncRNA CASC11 in tumor progression and cancer metastasis: the biomarker and therapeutic target potential [J]. *Genes Dis*, 2020, 9(2): 325-33.
- [5] SU X, ZHANG J, LUO X, et al. lncRNA LINC01116 promotes cancer cell proliferation, migration and invasion in gastric cancer by positively interacting with lncRNA CASC11 [J]. *Onco Targets*

- Ther, 2019, 12(1): 8117-23.
- [6] ZHANG L, KANG W, LU X, et al. LncRNA CASC11 promoted gastric cancer cell proliferation, migration and invasion *in vitro* by regulating cell cycle pathway [J]. Cell Cycle, 2018, 17(15): 1886-900.
 - [7] YOU D, WANG D, LIU P, et al. MicroRNA-498 inhibits the proliferation, migration and invasion of gastric cancer through targeting BMI-1 and suppressing AKT pathway [J]. Hum Cell, 2020, 33(2): 366-76.
 - [8] ZHANG X, LIANG W, LIU J, et al. Long non-coding RNA UFC1 promotes gastric cancer progression by regulating miR-498/Lin28b [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 134-46.
 - [9] XIE Y, RONG L, HE M, et al. LncRNA SNHG3 promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis by regulating the miR-139-5p/MYB axis [J]. Aging, 2021, 13(23): 25138-52.
 - [10] LUO H, XU C, LE W, et al. LncRNA CASC11 promotes cancer cell proliferation in bladder cancer through miRNA-150 [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 13487-93.
 - [11] ZHANG Z, ZHOU C, CHANG Y, et al. Long non-coding RNA CASC11 interacts with hnRNP-K and activates the WNT/ β -catenin pathway to promote growth and metastasis in colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2016, 376(1): 62-73.
 - [12] CAPIK O, SANLI F, KURT A, et al. CASC11 promotes aggressiveness of prostate cancer cells through miR-145/IGF1R axis [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2021, 24(3): 891-902.
 - [13] GOODALL G J, WICKRAMASINGHE V O. RNA in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(1): 22-36.
 - [14] WANG J, DING Y, WU Y, et al. Identification of the complex regulatory relationships related to gastric cancer from lncRNA-miRNA-mRNA network [J]. J Cell Biochem, 2020, 121(1): 876-87.
 - [15] YAN R, JIANG Y, LAI B, et al. The positive feedback loop FOXO3/CASC11/miR-498 promotes the tumorigenesis of non-small cell lung cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519(3): 518-24.
 - [16] JIN J, ZHANG S, HU Y, et al. SP1 induced lncRNA CASC11 accelerates the glioma tumorigenesis through targeting FOXK1 via sponging miR-498 [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 116(1): 108968.
 - [17] WANG X, HU H, LIU H. RNA binding protein Lin28B confers gastric cancer cells stemness via directly binding to NRP-1 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104(1): 383-9.
 - [18] XU J, ZHOU Y, YANG J, et al. Hypomethylation-activated cancer-testis gene LIN28B promotes cell proliferation and metastasis in gastric cancer [J]. Gene, 2022, 813(1): 146115.