

• 论 著 •

LINC_00355 通过 miR-15a-5p 调节 PHF19 在
肺癌侵袭转移中的作用机制研究*

徐柯楠, 刘 静, 夏 丽, 周 平, 杨海龙

衡水市人民医院胸外科, 河北衡水 053000

摘 要:目的 探讨 LINC_00355 通过 miR-15a-5p 调节 PHF19 在肺癌侵袭转移中的作用机制。方法 采用 A549 肺癌细胞作为实验细胞。将细胞分为 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组、LINC_00355 mimics 组、LINC_00355 inhibitor 组, 进行不同处理。A549 肺癌细胞组: 不进行任何处理; lncRNA-NC 组: 加入空白载体; LINC_00355 mimics 组: 加入 LINC_00355 过表达载体; LINC_00355 inhibitor 组: 加入 LINC_00355 低表达载体。培养结束后, MTT 法测定细胞活力, 检测单克隆形成数、迁移和侵袭水平。采用萤光素酶报告基因实验分析 LINC_00355 对 miR-15a-5p 的靶向作用; 实时荧光定量 PCR(qPCR) 法检测细胞 LINC_00355、miR-15a-5p、PHF19, Western blot 检测 PHF19 蛋白表达水平。结果 与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较, LINC_00355 mimics 组吸光度(A)值、细胞活力、单克隆形成数、穿膜数、迁移距离升高($P < 0.05$), 凋亡率降低($P < 0.05$); LINC_00355 inhibitor 组 A 值、细胞活力、单克隆形成数、穿膜数、迁移距离降低, 凋亡率升高($P < 0.05$); 与 LINC_00355 mimics 组比较, LINC_00355 inhibitor 组 A 值、细胞活力、单克隆形成数、穿膜数、迁移距离降低, 凋亡率升高($P < 0.05$)。LINC_00355 过表达可明显降低 miR-15a-5p-wt 的萤光素酶活性($P < 0.05$); 与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较, LINC_00355 mimics 组细胞 LINC_00355、PHF19 mRNA 表达上调, miR-15a-5p 表达降低($P < 0.05$), LINC_00355 inhibitor 组细胞 LINC_00355 及 PHF19 mRNA 和蛋白表达降低, miR-15a-5p 表达升高($P < 0.05$); 与 LINC_00355 mimics 组比较, LINC_00355 inhibitor 组细胞 LINC_00355 mRNA、PHF19 mRNA 和蛋白表达降低, miR-15a-5p 表达升高($P < 0.05$)。结论 LINC_00355 过表达促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭并诱导细胞凋亡, 敲低 LINC_00355 则产生相反的效果; 其机制可能与 LINC_00355 负调控 miR-15a-5p 进而上调肺癌细胞中 PHF19 的表达有关。

关键词: LINC_00355; miR-15a-5p; PHF19; 肺癌; 细胞侵袭; 细胞转移

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.05.024

中图法分类号: R73-37

文章编号: 1673-4130(2024)05-0629-07

文献标志码: A

The effect of LINC_00355 on lung cancer invasion and metastasis
by regulating PHF19 through miR-15a-5p*

XU Kenan, LIU Jing, XIA Li, ZHOU Ping, YANG Hailong
Department of Thoracic Surgery, Hengshui People's Hospital,
Hengshui, Hebei 053000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of LINC_00355 on lung cancer invasion and metastasis by regulating PHF19 through miR-15a-5p. **Methods** A549 lung cancer cells were used as experimental cells. The cells were divided into A549 lung cancer cell group, lncRNA-NC group, LINC_00355 mimics group and LINC_00355 inhibitor group, and treated differently. A549 lung cancer cell group, no treatment; lncRNA-NC group, added with blank vector; LINC_00355 mimics group, added with LINC_00355 overexpression vector; LINC_00355 inhibitor group, added with LINC_00355 low expression vector. At the end of the culture, the cell viability was measured by MTT assay, and the number of monoclonal clones formed, migration and invasion levels were detected. Luciferase reporter gene assay was used to analyze the targeting effect of LINC_00355 on miR-15a-5p. Real-time fluorescent quantitative PCR(qPCR) was used to detect LINC_00355, miR-15a-5p, and PHF19, and Western blot was used to detect PHF19 protein expression level. **Results** Compared with the A549 lung cancer cell group and the lncRNA-NC group, the absorbance (A) value, cell viability, the number of monoclonal clones, the number of transmembrane cells and the migration distance were increased ($P < 0.05$), and the apoptosis rate was decreased ($P < 0.05$) in the LINC_00355 mimics group. In the LINC_00355 inhibi-

* 基金项目: 衡水市市级科技计划项目(2020014054Z)。

作者简介: 徐柯楠, 女, 医师, 主要从事心胸外科的相关研究。

tor group, the A value, cell viability, the number of clones formed, the number of transmembrane cells, and the migration distance were decreased, and the apoptosis rate was increased ($P < 0.05$). Compared with the LINC_00355 mimics group, the A value, cell viability, number of clones formed, number of transmembrane cells and migration distance were significantly decreased, and the apoptosis rate was increased in the LINC_00355 inhibitor group ($P < 0.05$). Overexpression of LINC_00355 significantly reduced the luciferase activity of miR-15a-5p-wt ($P < 0.05$). Compared with the A549 lung cancer cell group and the lncRNA-NC group, the expression of LINC_00355 and PHF19 mRNA in the LINC_00355 mimics group was up-regulated, and the expression of miR-15a-5p was decreased ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of LINC_00355 and PHF19 were decreased, and the expression of miR-15a-5p was increased in the LINC_00355 inhibitor group ($P < 0.05$). Compared with the LINC_00355 mimics group, the expressions of LINC_00355 mRNA and PHF19 mRNA and protein were decreased, and the expression of miR-15a-5p was increased in the LINC_00355 inhibitor group ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of LINC_00355 promoted the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells and induced apoptosis, while knockdown of LINC_00355 had the opposite effect. The mechanism may be related to the negative regulation of LINC_00355 on miR-15a-5p and the up-regulation of PHF19 expression in lung cancer cells.

Key words: LINC_00355; miR-15a-5p; PHF19; lung cancer; cell invasion; cell metastasis

非小细胞肺癌(NSCLC)是导致肺癌的主要危险因素,数据显示其发病率为 80%至 85%,是全球癌症相关死亡的主要原因之一^[1]。手术、化疗、放疗是 NSCLC 治疗的常规方式。由于耐药和肿瘤转移, NSCLC 患者的 5 年生存率仍然很低,尤其是晚期患者^[2-3]。虽然 NSCLC 的诊断和治疗取得了很大进展,但预后仍然较差。因此,需要确定有效的生物标志物来预测 NSCLC 的进展和预后,从而推动其他靶向治疗的进展。长链非编码 RNA(lncRNA)是一种长度超过 200 nt 的非编码 RNA。lncRNA 在癌症的发展过程中充当肿瘤诱导剂或抑制剂,已发现 LINC_00355 在膀胱移行细胞癌中高表达^[4], LINC_00355 参与竞争性内源性 RNA(ceRNA)网络的调控,并在结直肠癌的多个病理阶段差异表达,先前的研究表明 LINC_00355 在癌症发展中起着至关重要的作用^[5]。然而, LINC_00355 是否在肺癌的发展中发挥作用仍然未知。lncRNA 可以通过竞争性结合 miRNA(miRNA)来调控靶基因的表达,研究发现发现 LINC_00355 在肝癌中高表达, LINC_00355 通过与 miR-195 竞争性结合促进肝癌细胞增殖和集落形成,抑制细胞周期停滞和凋亡^[6-7]; LINC_00355 作为 miR-195 海绵通过增加同源框 A10 表达来增强头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)细胞的活力、侵袭、迁移和抑制细胞凋亡^[8]。本研究拟探讨 lncRNALINC_00355 在肺癌中的作用,探索 LINC_00355 通过调节 miRNA/mRNA 轴参与肺癌的发展的机制,以期为肺癌的发病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人 NSCLC 细胞系 A549 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

1.2 仪器与试剂 MTT 溶液(默克公司),Annexin V-FITC,碘化丙啶(BioLegend 公司),PYr-MirTarget 萤光素酶载体(Ambion 公司),小鼠单克隆抗人

PHF19(1 : 1 000, Santa Cruz 公司),小鼠单克隆抗人 GAPDH(1 : 5 000, Santa Cruz 公司),HRP 缀合的山羊抗小鼠 IgG(1 : 5 000, Santa Cruz 公司),转染试剂 HiPerFect Transfection Reagent(Qiagen 公司),实时荧光定量 PCR(qPCR)检测试剂购自 BioRad 公司。由上海吉玛制药技术有限公司设计和合成引物。FACScan 流式细胞仪(美国 BD 公司),Eclipse Ti-U 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),NanoDrop 紫外分光光度计(Thermo Scientific 公司),Realplex4 Mastercycler PCR 仪(Eppendorf 公司),BioRad 成像系统(BioRad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 所有细胞均在添加了 10%胎牛血清(FBS)的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中培养,培养环境为 37℃、5%CO₂,根据细胞的生长速度,使用胰蛋白酶-EDTA 进行细胞消化后传代。

1.3.2 细胞分组及处理 将细胞分为 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组、LINC_00355 mimics 组、LINC_00355 inhibitor 组,进行不同处理后用于后续实验。A549 肺癌细胞组:不进行任何处理;lncRNA-NC 组:加入空白载体;LINC_00355 mimics 组:加入 LINC_00355 过表达载体;LINC_00355 inhibitor 组:加入 LINC_00355 低表达载体。A549 细胞用于转染时,按照试剂说明书使用转染试剂进行瞬时转染。使用 qPCR 评估转染效率,转染 72 h 后采用 qPCR 检测 LINC_00355 表达,各组设 6 个平行检测标本,培养 72 h。

1.3.3 肺癌细胞 A549 细胞活力的 MTT 法检测及癌细胞单克隆形成数检测 转染 72 h 后使用 MTT 分析细胞细胞活力。将细胞以每孔 3 000 个细胞的密度接种在 96 孔板中。维持 72 h 后,每孔加入 20 μL MTT,37℃ 孵育 4 h。然后,去除培养基,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO),摇匀后,使用多孔板读数器在 490 nm 处测量吸光度(A)值。每个实验一式

3 份进行 5 次重复,并计算平均值作为最终结果。测量每个孔的 A 值。将各组肺癌细胞 A549 用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞,并以 4×10^5 细胞/孔的密度接种到 6 孔培养板中,24 h 后,将 50 个细胞接种于 6 孔组织培养板中,继续培养 2 周。然后将细胞用结晶紫-福尔马林溶液染色 10 min 并计数。

1.3.4 肺癌细胞 A549 凋亡率测定 转染 72 h 后收获细胞,将细胞置于 6 孔板中,密度为 4×10^5 个细胞/孔,AnnexinV-FITC(5 μ L)和碘化丙啶(PI,10 μ L)处理,采用流式细胞仪进行检测,计算凋亡细胞的百分率。

1.3.5 肺癌细胞 A549 侵袭迁移水平测定 使用包含聚碳酸酯膜的 Boyden 室进行侵袭测定。培养结束细胞重悬于无血清培养基中,在 6 孔板(5×10^4)中孵育 24 h(孵育后细胞第 2 天用一层培养板覆盖)。在室温下孵育 24 h 后,用 200 μ L 无菌移液器吸头刮擦细胞并用 PBS 洗涤 3 次。观察细胞迁移,并使用光学显微镜拍摄图像。

1.3.6 萤光素酶报告基因检测 通过生物信息学网站(www.Targetscan.org)检索,初步确定 LINC_00355 与 miR-15a-5p,miR-15a-5p 与 PHF19 是否有潜在的结合位点。为了构建萤光素酶报告载体,通过 PCR 扩增含有预测的潜在 LINC_00355 结合位点的 miR-15a-5p cDNA 片段的 3'-UTR,并亚克隆到 PYP-MirTarget 萤光素酶载体中的萤光素酶基因的下游。萤光素酶活性测定:A549 细胞在 24 孔板中培养,与 50 ng 含有萤火虫萤光素酶的相应载体以及 25 ng LINC_00355 或对照共转染。使用 Lipofectamine® 2000 试剂进行转染。在转染后 48 h,使用双萤光素酶报告分析系统计算萤光素酶相对活性。

1.3.7 双萤光素酶报告基因系统验证靶向调节作用 使用在线 StarBase 软件(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)预测 PHF19 的 miR-15a-5p 3'UTR 区域的结合位点。使用 Lipofectamine 2000 试剂将上述载体共转染到细胞中。转染 24 h 后,使用双萤光素酶报告基因系统检测萤光素酶活性,以验证 PHF19 和 miR-15a-5p 3'UTR 区域的结合位点。

1.3.8 肺癌细胞 A549 LINC_00355、miR-15a-5p、PHF19 mRNA 表达水平检测 使用 TRIzol 试剂分离总 RNA,进行反转录。使用 SYBR® Green I Supermix 在 20 μ L 的最终反应体积中进行 qPCR。所有检测均在 iCycler IQ 多色检测系统上运行 3 次,循环参数如下:95 $^{\circ}$ C 10 s,然后 94 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,最后 70 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环。PCR 反应体系:5 μ L SsoFast EvaGreen Supermix、0.5 μ L 正向引物(10 μ mol/L)、0.5 μ L 反向引物(10 μ mol/L)和 4 μ L cDNA。所有定量都以人 GAPDH 为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达水平。

1.3.9 肺癌细胞 A549 PHF19 蛋白表达水平检测 使用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液从细胞中提取蛋白质,使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋

白质浓度,使用 10% SDS-PAGE 凝胶分离等量的蛋白质裂解物(每条泳道 20 μ g),然后电印迹转移到硝酸纤维素膜上,用含有 0.1% Tween-20 的 Tris 缓冲盐水中的 5%脱脂奶粉封闭膜 2 h,并与以下一抗在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜:小鼠单克隆抗人 PHF19 抗体(1:1 000)、小鼠单克隆抗人 GAPDH 抗体(1:5 000)。GAPDH 用作蛋白质上样的内部对照,将膜与 HRP 结合的山羊抗小鼠 IgG(1:5 000)在室温下进一步孵育 1 h,通过 ECL 试剂盒检测免疫复合物,条带的整合密度由 Quantity One 软件(Bio-Rad)量化。

1.4 统计学处理 使用 SPSS22.0 软件进行统计分析。符合正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较使用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 A 值、存活率比较 与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较,LINC_00355 mimics 组 A 值、存活率升高($P < 0.05$),LINC_00355 inhibitor 组 A 值、存活率降低($P < 0.05$);与 LINC_00355 mimics 组比较,LINC_00355 inhibitor 组 A 值、存活率降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组细胞 A 值、存活率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	复孔数 (<i>n</i>)	A 值	存活率(%)
A549 肺癌细胞组	6	0.64±0.12	68.85±6.33
lncRNA-NC 组	6	0.63±0.12	66.34±7.74
LINC_00355 mimics 组	6	0.83±0.11 ^a	82.27±6.25 ^a
LINC_00355 inhibitor 组	6	0.37±0.08 ^b	39.56±5.28 ^{ab}

注:与 A549 肺癌细胞组比较,^a $P < 0.05$;与 LINC_00355 mimics 组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 各组细胞单克隆形成数的比较 与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较,LINC_00355 mimics 组单克隆形成数增加($P < 0.05$),LINC_00355 inhibitor 组单克隆形成数减少($P < 0.05$);与 LINC_00355 mimics 组比较,LINC_00355 inhibitor 组单克隆形成数减少($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组细胞单克隆形成数的比较($\bar{x} \pm s$,个)

组别	复孔数(<i>n</i>)	单克隆形成数
A549 肺癌细胞组	6	614.58±89.32
lncRNA-NC 组	6	618.33±75.27
LINC_00355 mimics 组	6	1 235.24±135.24 ^a
LINC_00355 inhibitor 组	6	263.27±52.38 ^{ab}

注:与 A549 肺癌细胞组比较,^a $P < 0.05$;与 LINC_00355 mimics 组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 各组细胞凋亡率比较 与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较,LINC_00355 mimics 组细胞凋亡率降低($P < 0.05$),LINC_00355 inhibitor 组细胞凋亡率升高($P < 0.05$);与 LINC_00355 mimics 组比

较,LINC_00355 inhibitor 组细胞凋亡率升高($P<0.05$)。见表 3、图 1。

表 3 各组细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s, \%$)		
组别	复孔数(n)	凋亡率
A549 肺癌细胞组	6	13.99 ± 1.10
lncRNA-NC 组	6	14.01 ± 1.13
LINC_00355 mimics 组	6	9.32 ± 1.01^a
LINC_00355 inhibitor 组	6	23.46 ± 1.58^{ab}

注:与 A549 肺癌细胞组比较,^a $P<0.05$;与 LINC_00355 mimics 组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 各组细胞侵袭能力比较 与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较,LINC_00355 mimics 组穿膜数增加($P<0.05$),LINC_00355 inhibitor 组穿膜数减少($P<0.05$);与 LINC_00355 mimics 组比较,LINC_00355 inhibitor 组穿膜数减少($P<0.05$)。见表 4、图 2。

2.5 各组细胞迁移能力比较 与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较,LINC_00355 mimics 组迁移距离增加($P<0.05$),LINC_00355 inhibitor 组迁移距离缩短($P<0.05$);与 LINC_00355 mimics 组比较,

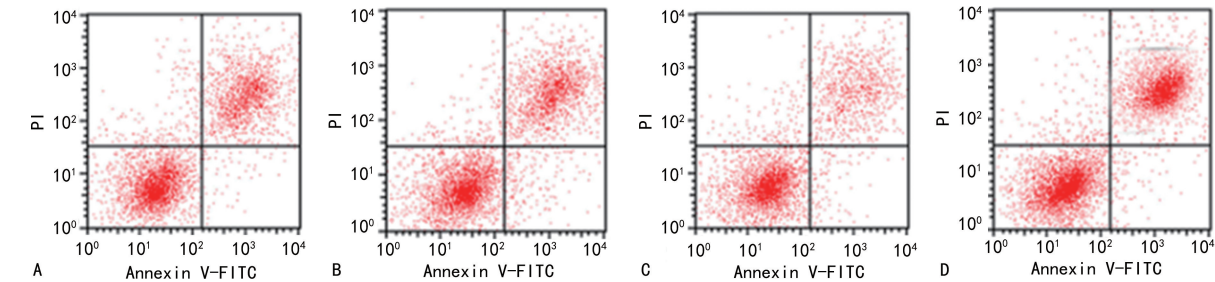
LINC_00355 inhibitor 组迁移距离缩短($P<0.05$)。见表 5、图 3。

表 4 各组 A549 肺癌细胞穿膜数的比较($\bar{x}\pm s, \text{个}$)		
组别	复孔数(n)	穿膜数
A549 肺癌细胞组	6	896.53 ± 24.22
lncRNA-NC 组	6	859.34 ± 25.30
LINC_00355 mimics 组	6	1625.48 ± 23.94^a
LINC_00355 inhibitor 组	6	402.02 ± 42.34^{ab}

注:与 A549 肺癌细胞组比较,^a $P<0.05$;与 LINC_00355 mimics 组比较,^b $P<0.05$ 。

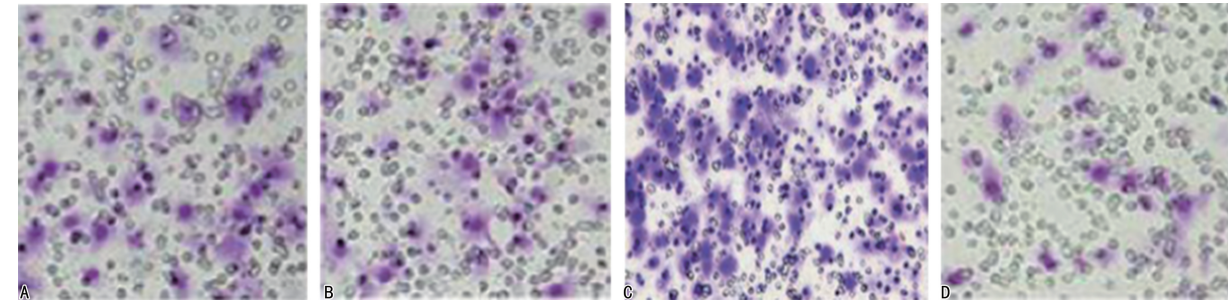
表 5 各组 A549 肺癌细胞迁移能力的比较($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$)		
组别	复孔数(n)	迁移距离
A549 肺癌细胞组	6	45.36 ± 5.25
lncRNA-NC 组	6	49.33 ± 6.30
LINC_00355 mimics 组	6	325.63 ± 22.33^a
LINC_00355 inhibitor 组	6	103.32 ± 15.20^{ab}

注:与 A549 肺癌细胞组比较,^a $P<0.05$;与 LINC_00355 mimics 组比较,^b $P<0.05$ 。



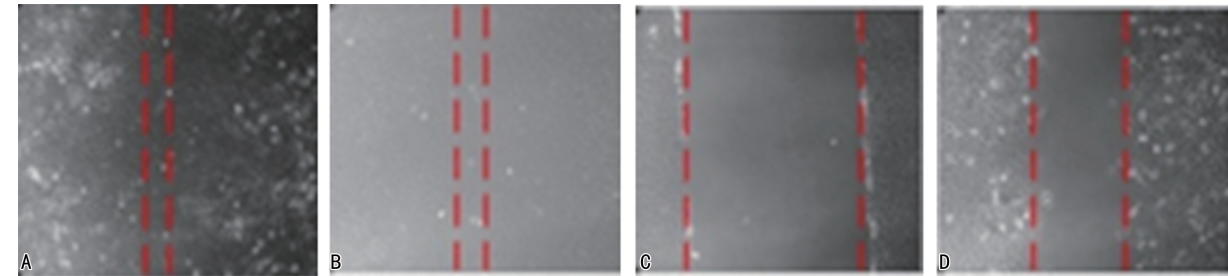
注:A 为 A549 肺癌细胞组;B 为 lncRNA-NC 组;C 为 LINC_00355 mimics 组;D 为 LINC_00355 inhibitor 组。

图 1 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率



注:A 为 A549 肺癌细胞组;B 为 lncRNA-NC 组;C 为 LINC_00355 mimics 组;D 为 LINC_00355 inhibitor 组。

图 2 各组细胞穿膜数比较(结晶紫染色, $\times 200$)



注:A 为 A549 肺癌细胞组;B 为 lncRNA-NC 组;C 为 LINC_00355 mimics 组;D 为 LINC_00355 inhibitor 组。

图 3 各组肺癌 A549 细胞迁移距离比较($\times 50$)

2.6 LINC_00355 对 miR-15a-5p 的靶向调节作用 通过生物信息学网站(www. Targetscan. org)检索发现,LINC_00355 与 miR-15a-5p 有潜在的结合位点; 萤光素酶报告基因实验显示,LINC_00355 过表达可降低 miR-15a-5p-wt(wt 表示野生型)的萤光素酶活性($P<0.05$),LINC_00355 低表达可提高 miR-15a-5p-wt 的萤光素酶活性($P<0.05$);LINC_00355 过表达或低表达对 miR-15a-5p-mut(mut 表示突变型)均无有影响,差异均无统计学意义($P>0.05$)。表明 LINC_00355 与 miR-15a-5p 存在靶向调节作用。见表 6、图 4。

表 6 萤光素酶报告基因实验验证 LINC_00355 对 miR-15a-5p 的靶向调节作用($\bar{x}\pm s$)

组别	复孔数 (<i>n</i>)	miR-15a- 5p-wt	miR-15a- 5p-mut
A549 肺癌细胞组	6	1.00±0.23	1.05±0.18
lncRNA-NC 组	6	1.13±0.12	1.06±0.19
LINC_00355 mimics 组	6	0.66±0.14 ^{ab}	0.99±0.17
LINC_00355 inhibitor 组	6	1.82±0.17 ^{abc}	1.03±0.16

注:与 A549 肺癌细胞组比较,^a $P<0.05$;与 lncRNA-NC 组比较,^b $P<0.05$;与 LINC_00355 mimics 组比较,^c $P<0.05$ 。

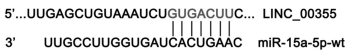


图 4 Targetscan 网站预测 LINC_00355 与 miR-15a-5p 的互补配对序列

2.7 miR-15a-5p 对 PHF19 的靶向调节作用 通过生物信息学网站(www. Targetscan. org)检索发现, miR-15a-5p 与 PHF19 有潜在的结合位点;萤光素酶报告基因实验显示, miR-15a-5p 过表达可降低 PHF19-wt 的萤光素酶活性($P<0.05$),miR-15a-5p 低表达可明显提升 PHF19-wt 的萤光素酶活性($P<0.05$);miR-15a-5p 过表达或低表达对 PHF19-mut 没有影响,差异无统计学意义($P<0.05$)。表明 miR-

27a-3p 与 PHF19 存在靶向调节作用。见表 7、图 5。

表 7 萤光素酶报告基因实验验证 miR-15a-5p 对 PHF19 的靶向调节作用($\bar{x}\pm s$)

组别	复孔数 (<i>n</i>)	PHF19-wt	PHF19-mut
A549 肺癌细胞组	6	1.00±0.17	1.03±0.17
miR-NC 组	6	1.05±0.09	1.02±0.22
miR-15a-5p 过表达组	6	0.62±0.15 ^{ab}	0.99±0.16
miR-15a-5p 低表达组	6	1.83±0.14 ^{abc}	1.01±0.13

注:与 A549 肺癌细胞组比较,^a $P<0.05$;与 miR-NC 组比较,^b $P<0.05$;与 miR-15a-5p 过表达组比较,^c $P<0.05$ 。

2.8 各组 A549 肺癌细胞 LINC_00355、miR-15a-5p、PHF19 表达水平比较 与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较, LINC_00355 mimics 组细胞 LINC_00355、PHF19 mRNA 表达上调($P<0.05$), miR-15a-5p 表达降低($P<0.05$),LINC_00355 inhibitor 组细胞 LINC_00355、PHF19 mRNA 表达降低($P<0.05$), miR-15a-5p 表达升高($P<0.05$);与 LINC_00355 mimics 组比较,LINC_00355 inhibitor 组细胞 LINC_00355、PHF19 mRNA 表达降低($P<0.05$),miR-15a-5p 表达升高($P<0.05$)。见表 8。

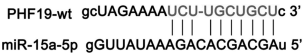


图 5 Targetscan 预测 miR-15a-5p 与 PHF19 mRNA 的互补配对系列

2.9 各组细胞 PHF19 蛋白表达水平比较 与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较,LINC_00355 mimics 组细胞 PHF19 蛋白表达上调($P<0.05$),LINC_00355 inhibitor 组细胞 PHF19 蛋白表达降低($P<0.05$);与 LINC_00355 mimics 组比较,LINC_00355 inhibitor 组细胞 PHF19 蛋白表达降低($P<0.05$)。见表 9、图 6。

表 8 各组细胞 LINC_00355、miR-15a-5p mRNA 相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

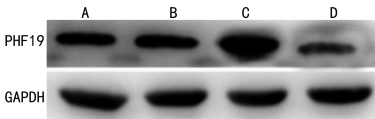
组别	复孔数	LINC_00355	miR-15a-5p	PHF19
A549 肺癌细胞组	6	1.93±0.15	4.33±0.45	1.56±0.10
lncRNA-NC 组	6	1.94±0.16	4.32±0.46	1.57±0.11
LINC_00355 mimics 组	6	3.93±0.23 ^a	2.18±0.35 ^a	3.47±0.14 ^a
LINC_00355 inhibitor 组	6	0.92±0.09 ^{ab}	6.39±0.67 ^{ab}	0.63±0.07 ^{ab}

注:与 A549 肺癌细胞组比较,^a $P<0.05$;与 LINC_00355 mimics 组比较,^b $P<0.05$ 。

表 9 各组细胞 PHF19 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	复孔数(<i>n</i>)	PHF19
A549 肺癌细胞组	6	0.96±0.15
lncRNA-NC 组	6	0.95±0.15
LINC_00355 mimics 组	6	1.78±0.11 ^a
LINC_00355 inhibitor 组	6	0.34±0.17 ^{ab}

注:与 A549 肺癌细胞组比较,^a $P<0.05$;与 LINC_00355 mimics 组比较,^b $P<0.05$ 。



注:A 为 A549 肺癌细胞组;B 为 lncRNA-NC 组;C 为 LINC_00355 mimics 组;D 为 LINC_00355 inhibitor 组。

图 6 Western blot 检测各组细胞 PHF19 蛋白表达水平

3 讨 论

本研究首次探讨了 LINC_00355 在肺癌发展中

的作用及其潜在机制,证明了 LINC_00355 过表达促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭并诱导细胞凋亡,敲低 LINC_00355 则出现相反的效果;LINC_00355 通过竞争性抑制 miR-15a-5p 的结合来增加 PHF19 的表达,PHF19 被确定为肺癌发展的促进者。因此,本研究表明 LINC_00355 可能通过抑制 miR-15a-5p 表达进而诱导 PHF19 表达来促进肺癌的发展。

研究表明,lncRNA 在调节细胞过程中起着至关重要的作用,包括细胞周期、生长和细胞凋亡。lncRNA 在转录或转录后水平的变化直接或间接导致不受控制的肿瘤生长。临床研究显示,LINC_00355 与结直肠癌的临床特征相关,与生存率呈负相关^[9];此外,LINC_00355 在前列腺癌中高表达,并且与癌症患者的存活率相关;在胃癌组织和细胞中也观察到高表达的 LINC_00355,表明 LINC_00355 可能在胃癌的发生发展中起到促进作用^[10-11]。本研究结果表明,与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较,LINC_00355 mimics 组 A 值、细胞活力、单克隆形成数、穿膜数、迁移距离增加,凋亡率降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);LINC_00355 inhibitor 组 A 值、细胞活力、单克隆形成数、穿膜数、迁移距离减少,凋亡率升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 LINC_00355 mimics 组比较,LINC_00355 inhibitor 组 A 值、细胞活力、单克隆形成数、穿膜数、迁移距离减少,凋亡率升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这表明,LINC_00355 过表达促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭并诱导细胞凋亡,敲低 LINC_00355 则出现相反的效果。相关研究显示,LINC_00355 抑制还可改善其他癌症的恶性表型,例如,LINC_00355 敲低抑制了膀胱癌细胞的增殖和侵袭;LINC_00355 的下调抑制了 HNSCC 中癌症干细胞的活力、侵袭、迁移和上皮-间质转化,并促进了肿瘤干细胞的凋亡^[12]。这些研究与本研究结果一致。

miR-15a-5p 在多种癌症的发展中发挥负调节作用,包括胃癌、膀胱癌和宫颈癌。具体而言,miR-15a-5p 在胃癌中的表达患者显著减少,miR-15a-5p 过表达抑制了胃癌细胞增殖和肿瘤侵袭;证明 miR-15a-5p 下调与晚期肿瘤分级和转移有关^[13-14]。生物信息学分析表明 LINC_00355 与 miR-15a-5p 之间存在结合位点,双萤光素酶报告基因检测证实了这一点。单个 lncRNA 通常通过吸收多个 miRNA 在癌症中发挥作用。例如,LINC_00355 通过结合 miR-195 促进 HNSCC 进展;在肝细胞癌(HCC)中,LINC_00355 作为 ceRNA 海绵化 miR-6777-3p 并进一步促进 HCC 进展^[15];这些发现表明 LINC_00355 通过多种途径调节癌症发展并突出了 LINC_00355 在癌症进展中的重要作用。本研究证明 LINC_00355 通过负调控 miR-15a-5p 促进肺癌进展,表明 LINC_00355/miR-15a-5p 轴可能是 LINC_00355 调控肺癌发展的方式之一。

PHF19 是多梳状蛋白的成员,可以调节多梳抑制复合物 2(PRC2)的酶活性和募集。PHF19 表达的失调与多种癌症的发展有关。先前的研究发现 PHF19 表达与胶质母细胞瘤进展呈正相关;PHF19 沉默减少了卵巢癌细胞的增殖,并诱导细胞凋亡和细胞周期停滞;此外,PHF19 的过表达与胃癌患者的紫杉醇耐药性相关^[16-17];此外,最近的一项研究表明,PHF19 的下调可以抑制胃癌细胞的增殖和迁移^[18]。这些该研究结果突出了 PHF19 在癌症发展中的正向调节作用。本研究结果显示:与 A549 肺癌细胞组、lncRNA-NC 组比较,LINC_00355 mimics 组细胞 LINC_00355、PHF19 mRNA 升高,miR-15a-5p 降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),LINC_00355 inhibitor 组细胞 LINC_00355、PHF19 mRNA 和蛋白降低,miR-15a-5p 升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 LINC_00355 mimics 组比较,LINC_00355 inhibitor 组单细胞 LINC_00355 mRNA、PHF19 mRNA 和蛋白降低,miR-15a-5p 升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这说明 LINC_00355 负调控 miR-15a-5p 上调肺癌细胞中 PHF19 的表达。

综上所述,LINC_00355 过表达促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭并诱导细胞凋亡,敲低 LINC_00355 则出现相反的效果;其机制可能与 LINC_00355 负调控 miR-15a-5p 进而上调肺癌细胞中 PHF19 的表达有关。

参考文献

- [1] LIU S Y M,ZHENG M M,PAN Y,et al. Emerging evidence and treatment paradigm of non-small cell lung cancer[J]. J Hematol Oncol,2023,16(1): 40.
- [2] RECK M,REMON J,HELLMANN M D. First-line immunotherapy for non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol,2022,40(6): 586-597.
- [3] DALY M E,SINGH N,ISMAILA N,et al. Management of stage III non-small-cell lung cancer: ASCO guideline[J]. J Clin Oncol,2022,40(12): 1356-1384.
- [4] ETELEEB A M,THUNUGUNTALA P K,GELEV K Z,et al. LINC00355 regulates p27KIP expression by binding to MENIN to induce proliferation in late-stage relapse breast cancer[J]. NPJ Breast Cancer,2022,8(1): 49.
- [5] ZHAO W,ZHANG Y,ZHANG W,et al. Exosomal LINC00355 promotes the malignant progression of gastric cancer through histone deacetylase HDAC3-mediated TP53INP1 transcriptional inhibition[J]. Life Sci,2023,315:121387.
- [6] LU S,SUN Z,TANG L,et al. LINC00355 promotes tumor progression in HNSCC by hindering MicroRNA-195-mediated suppression of HOXA10 expression[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2020,19: 61-71.
- [7] 李玖明,崔凯飒,王雪,黄朝晖. Linc00355 在结肠癌中表达上调并促进肿瘤细胞增殖和侵袭[J]. 肿瘤,2021,41(3):175-185.

(下转第 640 页)

Detection of β cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(47):19018-19023.

[45] KURODA A, RAUCH T A, TODOROV I, et al. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation[J]. *PLoS One*, 2009, 4(9):e6953.

[46] HUMARDANI F M, MULYANATA L T, DWI PUTRA S E. Adipose cell-free DNA in diabetes[J]. *Clin Chim Acta*, 2023, 539(1):191-197.

[47] HEROLD K C, USMANI-BROWN S, GHAZI T, et al. β cell death and dysfunction during type 1 diabetes development in at-risk individuals[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(3):1163-1173.

[48] FISHER M M, WATKINS R A, BLUM J, et al. Elevations in circulating methylated and unmethylated preproinsulin DNA in new-onset type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2015, 64(11):3867-3872.

[49] GALA-LOPEZ B L, NEIMAN D, KIN T, et al. Beta cell death by cell-free DNA and outcome after clinical islet transplantation[J]. *Transplantation*, 2018, 102(6):978-985.

[50] LUN F M, CHIU R W, SUN K, et al. Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(11):1583-1594.

[51] YU S C Y, JIANG P, PENG W, et al. Single-molecule sequencing reveals a large population of long cell-free DNA molecules in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(50):e2114937118.

[52] GORDEVIČIUS J, NARMONTÈ M, GIBAS P, et al. Identification of fetal unmodified and 5-hydroxymethylated CG sites in maternal cell-free DNA for non-invasive prenatal testing[J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1):153.

[53] CHENG A P, CHENG M P, LOY C J, et al. Cell-free DNA profiling informs all major complications of hematopoietic cell transplantation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(4):e2113476118.

[54] COX D R A, LOW N, GOH S K, et al. Low levels of hepatocyte-specific methylation in cell-free DNA are a strong negative predictor for acute T cell-mediated rejection requiring treatment following liver transplantation[J]. *Liver Transpl*, 2022, 28(6):1024-1038.

[55] SUN H W, DAI S J, KONG H R, et al. Accurate prediction of acute pancreatitis severity based on genome-wide cell free DNA methylation profiles[J]. *Clin Epigenetics*, 2021, 13(1):223.

[56] ANDARGIE T E, TSUJI N, SEIFUDDIN F, et al. Cell-free DNA maps COVID-19 tissue injury and risk of death and can cause tissue injury[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(7):e147610.

[57] LIN K W. mSEPT9(Epi proColon) blood test for colorectal cancer screening[J]. *Am Fam Physician*, 2019, 100(1):10-11.

(收稿日期:2023-07-17 修回日期:2023-12-30)

(上接第 634 页)

[8] WANG H, FENG Y, ZHENG X, et al. The diagnostic and therapeutic role of snoRNA and lincRNA in bladder cancer[J]. *Cancers*, 2023, 15(4):1007.

[9] ZHANG J, LV W, LIU Y, et al. LINC_00355 promotes gastric cancer progression by upregulating PHF19 expression through sponging miR-15a-5p[J]. *BMC cancer*, 2021, 21(1):657.

[10] YAN L, WANG P, FANG W, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived exosomes-mediated transfer of LINC00355 regulates bladder cancer cell proliferation and invasion[J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(3):257-265.

[11] ZHAO W, JIN Y, WU P, et al. LINC00355 induces gastric cancer proliferation and invasion through promoting ubiquitination of P53[J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6(1):99.

[12] LI W J, LI G, LIU ZW, et al. LncRNA LINC00355 promotes EMT and metastasis of bladder cancer cells through the miR-424-5p/HMGA2 axis[J]. *Neoplasma*, 2021, 68(6):1225-1235.

[13] NI Y, YANG Y, RAN J, et al. miR-15a-5p inhibits metastasis and lipid metabolism by suppressing histone acetylation in lung cancer[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 161:150-162.

[14] HE Y, HUANG H, JIN L, et al. CircZNF609 enhances hepatocellular carcinoma cell proliferation, metastasis, and stemness by activating the Hedgehog pathway through the regulation of miR-15a-5p/15b-5p and GLI2 expressions[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5):358.

[15] CHAVA S, REYNOLDS C P, PATHANIA A S, et al. miR-15a-5p, miR-15b-5p, and miR-16-5p inhibit tumor progression by directly targeting MYCN in neuroblastoma[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(1):180-196.

[16] WU H, TIAN X, ZHU C. Knockdown of lncRNA PVT1 inhibits prostate cancer progression in vitro and in vivo by the suppression of KIF23 through stimulating miR-15a-5p[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20:283.

[17] JAIN P, BALLARE C, BLANCO E, et al. PHF19 mediated regulation of proliferation and invasiveness in prostate cancer cells[J]. *Elife*, 2020, 9:e51373.

[18] GHAMLOUCH H, BOYLE E M, BLANEY P, et al. Insights into high-risk multiple myeloma from an analysis of the role of PHF19 in cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1):380.

(收稿日期:2023-07-12 修回日期:2023-12-28)