

长链非编码 RNA GATA3-反义 RNA 1 调控结直肠癌细胞 SW620 增殖、迁移和侵袭的机制研究

盛华明¹, 李森², 邓立春¹, 姚勇²

(东南大学医学院附属江阴医院, 1. 肿瘤内科, 2. 肛肠外科, 江苏 江阴, 214400)

摘要:目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)GATA3-反义 RNA 1(lncRNA GATA3-AS1)是否通过靶向微小 RNA-574-3p(miR-574-3p)调控结直肠癌细胞 SW620 的增殖、迁移和侵袭。方法 采用逆转录-定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 43 例结直肠癌组织及其对应癌旁组织中 lncRNA GATA3-AS1 和 miR-574-3p 表达情况。根据转染物的不同,将 SW620 细胞分为 si-NC 组、si-GATA3-AS1 组、miR-NC 组、miR-574-3p 组、si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC 组、si-GATA3-AS1 + anti-miR-574-3p 组。采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法检测细胞增殖活性,采用克隆形成实验检测细胞克隆形成数,采用细胞划痕实验检测划痕愈合率,采用 Transwell 实验检测细胞侵袭能力,采用蛋白质印迹法(Western blot)检测迁移侵袭相关蛋白 E-cadherin 和 N-cadherin 表达。采用双荧光素酶报告基因实验检测 lncRNA GATA3-AS1 与 miR-574-3p 的靶向关系。结果 结直肠癌组织中 lncRNA GATA3-AS1 表达量高于癌旁组织,miR-574-3p 表达量低于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。si-GATA3-AS1 组 SW620 细胞的增殖活性、克隆形成数、划痕愈合率、侵袭细胞数和 N-cadherin 蛋白表达量均低于 si-NC 组,E-cadherin 蛋白表达量高于 si-NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。miR-574-3p 组 SW620 细胞的增殖活性、克隆形成数、划痕愈合率、侵袭细胞数和 N-cadherin 蛋白表达量均低于 miR-NC 组,E-cadherin 蛋白表达量高于 miR-NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。lncRNA GATA3-AS1 靶向调控 miR-574-3p 的表达。si-GATA3-AS1 + anti-miR-574-3p 组 SW620 细胞的增殖活性、克隆形成数、划痕愈合率、侵袭细胞数和 N-cadherin 蛋白表达量均高于 si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC 组,E-cadherin 蛋白表达量低于 si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 lncRNA GATA3-AS1 在结直肠癌中表达上调,可通过靶向调控 miR-574-3p 促进结直肠癌细胞 SW620 的增殖、迁移和侵袭。

关键词: 结直肠癌细胞;长链非编码 RNA GATA3-反义 RNA 1;微小 RNA-574-3p;增殖;迁移;侵袭

中图分类号: R 735.3; R 365 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2023)14-051-07 DOI: 10.7619/jcmp.20231117

Mechanism of long non-coding RNA GATA3-antisense RNA 1 in regulating the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer SW620 cells

SHENG Huaming¹, LI Sen², DENG Lichun¹, YAO Yong²

(1. Department of Oncology, 2. Department of Anorectal Surgery, Jiangyin Hospital Affiliated to School of Medicine of Southeast University, Nanjing, Jiangsu, 214400)

Abstract: Objective To explore whether long noncoding RNA (lncRNA) GATA3-antisense RNA 1 (lncRNA GATA3-AS1) regulates the proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer SW620 cells by targeting microRNA-574-3p (miR-574-3p). **Methods** Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to determine the expressions of lncRNA GATA3-AS1 and miR-574-3p in colorectal cancer tissues of 43 cases and para-cancerous tissue. The SW620 cells were divided into si-NC group, si-GATA3-AS1 group, miR-NC group, miR-574-3p group, si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC group, si-GATA3-AS1 + anti-miR-574-3p group according to different transfection. The cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect cell proliferation activity, the clone formation experiment to measure the number of cell clones, the scratch test to examine the scratch healing rate, the Transwell experiment to analyze cell invasion, and the Western blot to determine

收稿日期: 2023-04-10 修回日期: 2023-06-19

基金项目: 国家中医药管理局名医方评价与转化重点实验室项目(NZYJDMF-2018001);

北京希思科临床肿瘤学研究基金会(Y-2019Genecast-006);江苏省无锡市卫生健康委科研项目(MS201922)

通信作者: 李森, E-mail: 1113723935@qq.com

the expression of migration and invasion related proteins E-cadherin and N-cadherin. The dual luciferase reporter experiment was used to detect the targeting relationship between lncRNA GATA3-AS1 and miR-574-3p. **Results** The expression of lncRNA GATA3-AS1 in colorectal cancer tissues was higher, and the expression of miR-574-3p decreased compared with that in the adjacent tissues ($P < 0.05$). SW620 cells in the si-GATA3-AS1 group had lower proliferation activity, the number of clone formation, scratch healing rate, the number of invasive cell, and N-cadherin protein expression than the si-NC group, but the expression of E-cadherin protein was higher than that of si-NC group ($P < 0.05$). SW620 cell proliferation activity, the number of clone formation, scratch healing rate, the number of invasive cells, and N-cadherin protein expression in the miR-574-3p group were lower than those in the miR-NC group, and the E-cadherin protein expression level was higher than that of the miR-NC group ($P < 0.05$). lncRNA GATA3-AS1 targeted and regulated the expression of miR-574-3p. The proliferation activity, the number of clone cells, scratch healing rate, number of invasive cells and N-cadherin protein expression of SW620 cells in the si-GATA3-AS1 + anti-miR-574-3p group were all higher than those in si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC group, while the expression level of E-cadherin protein was lower than that of the si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA GATA3-AS1 is up-regulated in colorectal cancer, and can promote the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells SW620 by targeting miR-574-3p regulation.

Key words: colorectal cancer cells; long noncoding RNA GATA3-antisense RNA 1; microRNA-574-3p; proliferation; migration; invasion

结直肠癌是男性第 3 大常见癌症和女性第 2 大常见癌症^[1], 有约 40% 患者会死于结直肠癌^[2], 故亟需探寻基于结直肠癌进展潜在机制的新疗法。研究^[3]证实, 长链非编码 RNA (lncRNA) 广泛参与关键的生理病理过程, 例如细胞增殖和凋亡、细胞生长和衰老以及免疫激活或失活, 并且与肿瘤等疾病的发生和发展密切相关。lncRNA 发挥作用的明确机制之一是通过与竞争性内源 RNA (ceRNA) 竞争海绵微小 RNA (miRNA), 从而影响其调节功能^[4]。miRNA 是长度约 22 个核苷酸的非编码小 RNA, 通过直接结合特定靶基因的 3' UTR 参与基因表达的调节, 从而影响细胞分化、发育、凋亡、增殖和其他生物学活性^[5]。研究^[6]表明, lncRNA GATA3-反义 RNA 1 (lncRNA GATA3-AS1) 是一种新的反义基因, 与 GATA3 共享启动子区域, 是 GATA3 高效转录所必需的。lncRNA GATA3-AS1 已被证实是胰腺癌^[7]、肝癌^[8]的致癌基因, 然而 lncRNA GATA3-AS1 在结直肠癌中的表达水平和功能尚未明确。微小 RNA-574-3p (miR-574-3p) 在结直肠癌组织中表达下调, 可作为结直肠癌的新型候选治疗剂^[9], 但其与 lncRNA GATA3-AS1 的关系尚未明确。本研究观察结直肠癌组织中 lncRNA GATA3-AS1 的表达情况, 并探讨 lncRNA GATA3-AS1 在结直肠癌细胞 SW620 增殖、迁移和侵袭中

的作用与机制, 以期明确 lncRNA GATA3-AS1 在结直肠癌中的生物学作用及可能涉及的 miRNA 调节机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

收集 2019 年 8 月—2021 年 10 月在本院进行手术切除的 43 例结直肠癌患者 (男 29 例, 女 14 例, 均未接受过任何相关性治疗) 的结直肠癌组织和癌旁组织, 所有组织储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境。本研究经医院伦理委员会审核批准, 且所有患者知情同意。

结直肠癌细胞株 SW620 (美国类型培养物保藏中心), Lipofectamine 2000 试剂、Super Script 第一链 cDNA 试剂盒 (美国 Invitrogen), SYBR Premix ExTaq II 试剂盒 (大连宝生物工程), Taq Man microRNA 试剂盒 (美国 Applied Biosystems), 细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) (日本 Dojindo), si-NC、si-GATA3-AS1、miR-NC、miR-574-3p 模拟物、anti-miR-NC、anti-miR-574-3p、pcDNA、pcDNA-GATA3-AS1 (上海 GenePharm), pmirGLO 载体、双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (美国 Promega), 二辛可宁酸 (BCA) 蛋白测定试剂盒 (上海碧云天), 聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜 (美国 GE Health), 抗 E-cadherin 抗体、抗 N-cadherin 抗体 (美国

Abcam), Matrigel(美国 BD Biosciences)。

1.2 细胞培养与分组处理

将结直肠癌细胞 SW620 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中。将 SW620 细胞分为 si-NC 组、si-GATA3-AS1 组、miR-NC 组、miR-574-3p 组、si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC 组、si-GATA3-AS1 + anti-miR-574-3p 组。根据 Lipofectamine 2000 试剂说明步骤进行转染,在 6 孔板中接种 1×10^5 个 SW620 细胞,待其融合至约 70% 时,分别用 si-NC、si-GATA3-AS1、miR-NC、miR-574-3p 模拟物、anti-miR-NC 与 si-GATA3-AS1、anti-miR-574-3p 与 si-GATA3-AS1 转染 48 h,后续进行细胞评价。

1.3 逆转录-定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测

lncRNA GATA3-AS1 和 miR-574-3p 表达

根据制造商 Invitrogen 的说明,使用 Trizol 试剂从结直肠癌组织、癌旁组织和结直肠癌细胞 SW620 中提取总 RNA。使用 Super Script 第一链 cDNA 试剂盒将合格的 RNA [260 nm 与 280 nm 处光密度(OD)比值(OD_{260 nm/280 nm})为 1.8 ~ 2.0] 转化为 cDNA。使用 SYBR Premix ExTaq II 试剂盒在 Applied Biosystems 7500 实时 PCR 系统上进行 qPCR,以 GAPDH 量化 lncRNA GATA3-AS1 的相对表达。miR-574-3p 水平使用 Taq Man microRNA 试剂盒按照制造商的说明进行检测,以 U6 量化 miR-574-3p 的相对表达。使用 2^{- $\Delta\Delta Ct$} 方法计算相对表达量。引物序列:lncRNA GATA3-AS1 正向 5'-TTGTTCCCTCTTCGCTCCT-3', 反向 5'-TTGTTCCCTCACCGCATG-3'; miR-574-3p 正向 5'-ATCGGAAGTTGAGTGAGCCGCGTC-3', 反向 5'-GCCGTGAGTCAGGAGTGGT-3'。GAPDH 正向 5'-AGAACGGGAAGCTTGTCATC-3', 反向 5'-CATCGCCCACTTGATTTTG-3'。U6 正向 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', 反向 5'-CGCTTCAGAA TTTGCGTGTGCAT-3'。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖活性

转染后,在 96 孔板中接种 1×10^4 个 SW620 细胞。孵育 48 h 后,加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 °C 保持 1 h。通过 Synergy H4 多功能酶标仪检测 450 nm 波长处 OD(OD_{450 nm})。

1.5 克隆形成实验检测细胞克隆形成数

转染后,在 6 孔板中接种 200 个 SW620 细胞。孵育 14 d 后,将细胞用 4% 甲醛 37 °C 固定 10 min,0.5% 结晶紫 37 °C 染色 15 min,于显微镜下观察细胞克隆形成数。

1.6 细胞划痕实验检测划痕愈合率

通过细胞划痕实验评估 SW620 细胞的体外迁移能力。转染后,将 1×10^5 个细胞接种到 6 孔板中,待细胞融合成单层,用移液器吸头垂直刮擦细胞单层。用磷酸盐缓冲液洗涤后,继续培养 24 h。使用显微镜观察 0 h 和 24 h 的划痕,通过 ImageJ 图像分析软件检测划痕愈合率。

1.7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

37 °C 条件下,用 30 μ g Matrigel 对 Transwell 腔室膜预处理 30 min,形成重建的基底膜。将 1×10^5 个结直肠癌细胞(置于 200 μ L 不含胎牛血清的 RPMI-1640 中)接种到 Transwell 腔室的上孔,下孔填充 600 μ L 含有 10% 胎牛血清作为趋化剂的 RPMI-1640。孵育 48 h 后,将细胞在 4% 甲醛中固定 30 min,然后用结晶紫染色 15 min。用湿棉签小心地从 Transwell 上表面(内部)去除非侵袭细胞,用显微镜(放大倍数 200 倍)对侵袭细胞进行计数。

1.8 蛋白质印迹法(Western blot)检测迁移侵袭

相关蛋白 E-cadherin 和 N-cadherin 表达

转染后,将 SW620 细胞在冰上裂解缓冲液中裂解,再将裂解液进行离心(10 min,12 000 转/min,4 °C),并进行 BCA 法定量。总蛋白通过 8% ~ 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,样品在转移缓冲液中电转移到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶于 37 °C 封闭 2 h,4 °C 条件下与抗 E-cadherin(1:1 000)、抗 N-cadherin(1:1 000)和抗 GAPDH(1:2 000)抗体孵育过夜。然后,将条带与 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG 于 37 °C 孵育 2 h,通过增强化学发光检测系统对条带进行可视化。

1.9 双荧光素酶报告基因实验检测 lncRNA

GATA3-AS1 与 miR-574-3p 的靶向关系

运用生物信息学软件 LncBase Predicted v. 2 预测 lncRNA GATA3-AS1 与 miR-574-3p 的靶向结合关系。将含有 miR-574-3p 潜在位点的 lncRNA GATA3-AS1 野生型(WT)或突变型(MUT)序列插入到 pmirGLO 载体中,合成 WT-GATA3-AS1 或 MUT-GATA3-AS1。将 1×10^4 个 SW620 细胞接种到 6 孔板中,并使用 Lipofectamine 2000 将 WT-GATA3-AS1 或 MUT-GATA3-AS1 与 miR-574-3p 模拟物或对照 miR-NC 共转染。转染 48 h 后,收获细胞,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。另向 SW620 细胞中分别转染 pcDNA、pcDNA-GATA3-AS1、si-NC、si-GATA3-AS1,

分别设为 pcDNA 组、pcDNA-GATA3-AS1 组、si-NC 组、si-GATA3-AS1 组, 48 h 后通过 RT-qPCR 检测 miR-574-3p 表达。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件分析数据, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 描述, 2 组间数据比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA GATA3-AS1 和 miR-574-3p

在结直肠癌组织中的表达

结直肠癌组织中 lncRNA GATA3-AS1 表达量高于癌旁组织(增加约 3.24 倍), miR-574-3p 表达量低于癌旁组织(减少约 0.62 倍), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 lncRNA GATA3-AS1、miR-574-3p 在结直肠癌组织和癌旁组织中的表达 $(\bar{x} \pm s)$

组织	n	lncRNA GATA3-AS1	miR-574-3p
癌旁组织	43	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.05
结直肠癌组织	43	4.24 ± 0.30*	0.38 ± 0.04*

lncRNA GATA3-AS1: 长链非编码 RNA GATA3-反义 RNA 1; miR-574-3p: 微小 RNA-574-3p。与癌旁组织比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达对结直肠癌细胞 SW620 增殖能力的影响

si-GATA3-AS1 组 SW620 细胞中 lncRNA GATA3-AS1 表达量、细胞增殖活性和克隆形成数

均低于 si-NC 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1、表 2。

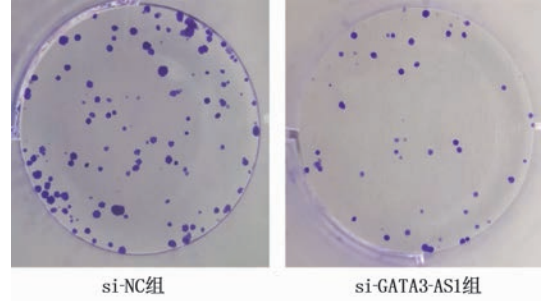


图 1 干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达对结直肠癌细胞 SW620 克隆形成的影响

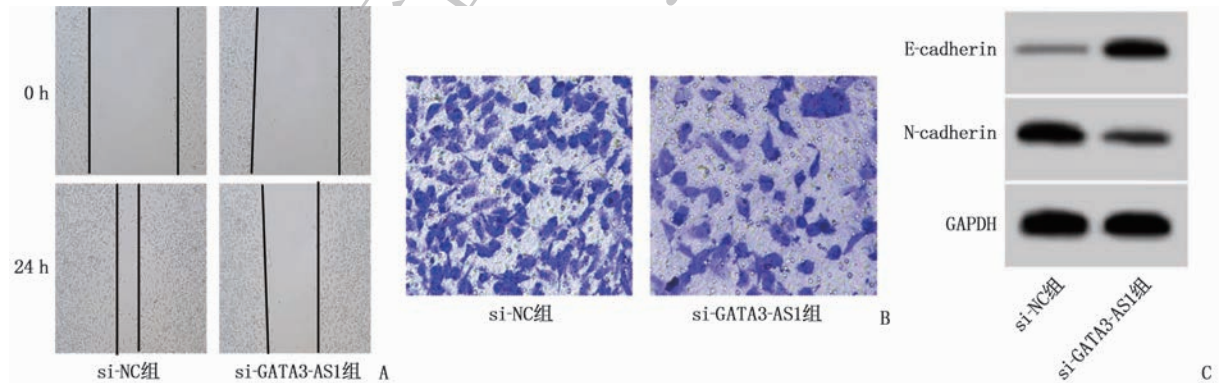
表 2 干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达对结直肠癌细胞 SW620 增殖能力的影响 $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	lncRNA GATA3-AS1	OD _{450nm}	细胞克隆形成数/个
si-NC 组	3	1.00 ± 0	1.03 ± 0.08	86.66 ± 6.53
si-GATA3-AS1 组	3	0.24 ± 0.02*	0.51 ± 0.04*	37.33 ± 3.65*

OD_{450nm}: 450 nm 波长处光密度。与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达对结直肠癌细胞 SW620 迁移和侵袭能力的影响

si-GATA3-AS1 组 SW620 细胞的划痕愈合率、侵袭细胞数和 N-cadherin 蛋白表达量均低于 si-NC 组, 而 E-cadherin 蛋白表达量高于 si-NC 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 2、表 3。



A: 细胞划痕实验检测划痕愈合率; B: Transwell 实验检测细胞侵袭能力; C: Western blot 检测迁移侵袭相关蛋白 E-cadherin 和 N-cadherin 表达。

图 2 干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达对结直肠癌细胞 SW620 迁移和侵袭能力的影响

2.4 lncRNA GATA3-AS1 靶向调控 miR-574-3p 的表达

LncBase Predicted v. 2 预测结果显示, lncRNA GATA3-AS1 与 miR-574-3p 含有互补配对的碱基序列, 见图 3。miR-574-3p 模拟物与 WT-GATA3-AS1 共转染的荧光素酶活性低于 miR-NC 与 WT-GATA3-AS1 共转染, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 但 miR-

574-3p 模拟物或 miR-NC 分别与 MUT-GATA3-AS1 共转染的荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义($P = 0.850$), 见表 4。pcDNA 组、pcDNA-GATA3-AS1 组、si-NC 组、si-GATA3-AS1 组 SW620 细胞中 miR-574-3p 表达量分别为 (1.00 ± 0) 、 (0.41 ± 0.05) 、 (0.98 ± 0.06) 、 (2.84 ± 0.24) , pcDNA-GATA3-AS1 组 miR-574-3p 表达量低于 pcDNA 组,

表 3 干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达对 SW620 细胞迁移和侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	划痕愈合率/%	侵袭细胞数/个	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
si-NC 组	3	70.78 ± 6.13	107.33 ± 10.62	0.19 ± 0.02	0.73 ± 0.06
si-GATA3-AS1 组	3	29.31 ± 2.11*	51.66 ± 4.81*	0.59 ± 0.04*	0.28 ± 0.03*

与 si-NC 组比较, *P < 0.05。

si-GATA3-AS1 组 miR-574-3p 表达量高于 si-NC 组, 差异均有统计学意义 (P < 0.05)。



图 3 lncRNA GATA3-AS1 与 miR-574-3p 的靶向关系预测结果

表 4 双荧光素酶报告基因实验检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

转染物	n	WT-GATA3-AS1	MUT-GATA3-AS1
miR-NC	3	0.97 ± 0.06	0.99 ± 0.07
miR-574-3p 模拟物	3	0.35 ± 0.03*	0.98 ± 0.05

与 miR-NC 比较, *P < 0.05。

2.5 miR-574-3p 过表达对结直肠癌细胞 SW620 增殖、迁移和侵袭能力的影响

miR-574-3p 组 SW620 细胞的 miR-574-3p 表

表 5 miR-574-3p 过表达对结直肠癌细胞 SW620 增殖、迁移和侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-574-3p	OD _{450 nm}	细胞克隆形成数/个	划痕愈合率/%	侵袭细胞数/个	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
miR-NC 组	3	1.00 ± 0	1.02 ± 0.07	89.66 ± 7.03	71.84 ± 6.12	108.66 ± 11.61	0.16 ± 0.02	0.75 ± 0.05
miR-574-3p 组	3	2.78 ± 0.25*	0.60 ± 0.06*	43.66 ± 4.33*	32.58 ± 3.17*	59.33 ± 4.94*	0.51 ± 0.04*	0.32 ± 0.04*

与 miR-NC 组比较, *P < 0.05。

2.6 抑制 miR-574-3p 表达对干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达的 SW620 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

si-GATA3-AS1 + anti-miR-574-3p 组 SW620 细胞的 miR-574-3p 表达量低于 si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC 组, 细胞增殖活性、克隆形成数、划痕愈合率、侵袭细胞数和 N-cadherin 蛋白表达量均高于 si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC 组, E-cadherin 蛋白表达量低于 si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC 组, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 表明抑制 miR-574-3p 表达逆转了干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达对结直肠癌 SW620 细胞增殖、迁移和侵袭的作用, 见图 5、表 6。

3 讨论

将合适的 lncRNA 作为诊断生物标志物或干预靶点, 或可为结直肠癌的诊断和治疗提供新的思路。CONTRERAS-ESPINOSA 等^[10] 利用转录

达量高于 miR-NC 组, 细胞增殖活性、克隆形成数、划痕愈合率、侵袭细胞数和 N-cadherin 蛋白表达量均低于 miR-NC 组, E-cadherin 蛋白表达量高于 miR-NC 组, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 见图 4、表 5。

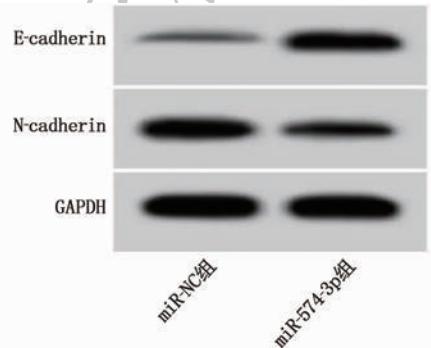


图 4 miR-574-3p 过表达对 SW620 细胞迁移侵袭相关蛋白表达的影响

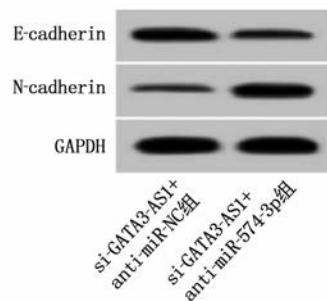


图 5 抑制 miR-574-3p 表达对干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达的 SW620 细胞迁移侵袭相关蛋白表达的影响

组分析将 lncRNA GATA3-AS1 鉴定为与局部晚期乳腺癌患者新辅助化疗耐药相关的 lncRNA。ZHU Y P 等^[11] 发现, lncRNA GATA3-AS1 在人膀胱癌组织中显著上调。lncRNA GATA3-AS1 在胰腺癌^[7]、肝癌^[8] 和三阴性乳腺癌^[12] 组织和细胞中过表达, 敲低 lncRNA GATA3-AS1 可抑制胰腺癌、肝癌和三阴性乳腺癌细胞增殖, 并减弱胰腺癌细胞侵袭能力和肝癌细胞迁移能力。本研究发现, 结直肠癌组织中 lncRNA GATA3-AS1 表达显著上

表 6 抑制 miR-574-3p 表达对干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达的 SW620 细胞增殖、迁移和侵袭的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-574-3p	OD _{450 nm}	细胞克隆形成数/个	划痕愈合率/%	侵袭细胞数/个	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC 组	1.00 ± 0	0.50 ± 0.04	35.99 ± 3.39	27.92 ± 2.49	49.33 ± 4.11	0.58 ± 0.05	0.27 ± 0.03
si-GATA3-AS1 + anti-miR-574-3p 组	0.42 ± 0.04*	0.88 ± 0.07*	74.44 ± 6.61*	61.34 ± 5.11*	87.44 ± 6.62*	0.28 ± 0.03*	0.61 ± 0.05*

与 si-GATA3-AS1 + anti-miR-NC 组比较, * $P < 0.05$ 。

调,提示其异常表达可能有助于结直肠癌的进展(类似其在胰腺癌、肝癌和三阴性乳腺癌中的致癌作用)。为了更好地了解 lncRNA GATA3-AS1 在结直肠癌中的生物学作用,本研究进一步开展体外细胞实验,发现干扰结直肠癌细胞 SW620 中 lncRNA GATA3-AS1 表达能明显抑制细胞增殖活性和克隆形成、迁移、侵袭能力,下调 N-cadherin 表达和上调 E-cadherin 表达,表明干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达可抑制结直肠癌细胞 SW620 的迁移和侵袭能力。由此证实, lncRNA GATA3-AS1 作为致癌基因而加速结直肠癌的进展。

据报道, miR-574-3p 可在上皮性卵巢癌^[13]、食管癌^[14]和肝癌^[15]中充当抗肿瘤因子,抑制癌细胞增殖和转移。miR-574-3p 在结直肠癌组织中低表达,上调其表达可抑制结直肠癌细胞的增殖和迁移,促进细胞凋亡^[16]。miR-574-3p 在卵巢癌组织和细胞中低表达,过表达 miR-574-3p 可抑制卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭^[17]。miR-574-3p 过表达上调了胃癌细胞中 E-cadherin 的表达,同时下调了波形蛋白的表达^[18]。本研究结果显示, miR-574-3p 在结直肠癌组织中表达降低,且 miR-574-3p 过表达可抑制结直肠癌细胞 SW620 的增殖、迁移和侵袭能力,表明 miR-574-3p 在结直肠癌进展中起抑制作用。

lncRNA 作为特定 miRNA 的 ceRNA,可调节基因表达^[19]。例如, LINC00997 通过与 miR-574-3p 相互作用,可促进宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭和自噬^[20]。lncRNA ZEB2-AS1 通过 miR-574-3p/HMGA2 轴促进食管鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[21]。为了深入了解 lncRNA GATA3-AS1 的潜在调控机制,本研究通过生物信息学软件预测了 miR-574-3p 与 lncRNA GATA3-AS1 的靶向关系,发现两者含有互补配对的碱基序列,且该结果得到双荧光素酶报告基因实验的证实。本研究中,结直肠癌细胞 SW620 中 lncRNA GATA3-AS1 可负向调控 miR-574-3p 的表达,这意味着 lncRNA GATA3-AS1 可直接结合 miR-574-3p,并破坏 miR-574-3p 的稳定性。本研究还发现,抑制 miR-574-3p 表达后,干扰 lncRNA GATA3-AS1 表达抑制结直肠癌细胞 SW620 增殖、迁移和侵袭的结

果被逆转。由此表明, lncRNA GATA3-AS1 在结直肠癌细胞 SW620 中充当 miR-574-3p 的 ceRNA,从而发挥对结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的调控作用。

综上所述, lncRNA GATA3-AS1 在结直肠癌中表达上调,可通过调控 miR-574-3p 促进结直肠癌细胞 SW620 的增殖、迁移和侵袭,提示 lncRNA GATA3-AS1 可能作为癌基因在结直肠癌中发挥作用,具有作为结直肠癌诊断生物标志物的潜在价值。

参考文献

- [1] PERISETTI A, GOYAL H, THARIAN B, *et al.* Aspirin for prevention of colorectal cancer in the elderly: friend or foe[J]. *Ann Gastroenterol*, 2021, 34(1): 1-11.
- [2] HULTRANTZ R. Aspects of colorectal cancer screening, methods, age and gender[J]. *J Intern Med*, 2021, 289(4): 493-507.
- [3] CHEN Y Y, LI Z J, CHEN X G, *et al.* Long non-coding RNAs: from disease code to drug role[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(2): 340-354.
- [4] DRILLIS G, GOULIELMAKI M, SPANDIDOS D A, *et al.* Non-coding RNAs (miRNAs and lncRNAs) and their roles in lymphogenesis in all types of lymphomas and lymphoid malignancies[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(5): 393.
- [5] LIU M, LIU H M, ZHOU J, *et al.* miR-140-5p inhibits the proliferation of multiple myeloma cells by targeting VEGFA[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(1): 53.
- [6] GIBBONS H R, SHAGINUROVA G, KIM L C, *et al.* Divergent lncRNA GATA3-AS1 regulates GATA3 transcription in T-helper 2 cells[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2512.
- [7] LIU Y H, XU G, LI L. LncRNA GATA3-AS1-miR-30b-5p-Tex10 axis modulates tumorigenesis in pancreatic cancer[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(5): 59.
- [8] LUO X E, ZHOU N, WANG L, *et al.* Long noncoding RNA GATA3-AS1 promotes cell proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by suppression of PTEN, CDKN1A, and TP53[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2019, 2019: 1389653.
- [9] LIU D F, PENG S H, LI Y Y, *et al.* Circ-MFN2 positively regulates the proliferation, metastasis, and radioresistance of colorectal cancer by regulating the miR-574-3p/IGF1R signaling axis[J]. *Front Genet*, 2021, 12: 671337.
- [10] CONTRERAS-ESPINOSA L, ALCARAZ N, DE LA ROSA-VELÁZQUEZ I A, *et al.* Transcriptome analysis identifies GATA3-AS1 as a long noncoding RNA associated with resistance to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer patients[J]. *J Mol Diagn*, 2021, 23(10): 1306-1323.
- [11] ZHU Y P, BIAN X J, YE D W, *et al.* Long noncoding RNA expression signatures of bladder cancer revealed by microarray[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(4): 1197-1202.

- [12] ZHANG M, WANG N, SONG P, *et al.* lncRNA GATA3-AS1 facilitates tumour progression and immune escape in triple-negative breast cancer through destabilization of GATA3 but stabilization of PD-L1 [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(9): e12855.
- [13] ZHANG P N, ZHU J, ZHENG Y, *et al.* miRNA-574-3p inhibits metastasis and chemoresistance of epithelial ovarian cancer (EOC) by negatively regulating epidermal growth factor receptor (EGFR) [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7): 4151-4165.
- [14] JIN L L, ZHANG S J, LU G X, *et al.* miR-574-3p inhibits proliferation and invasion in esophageal cancer by targeting FAM3C and MAPK1 [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36(5): 318-327.
- [15] ZHA Z M, JIA F X, HU P G, *et al.* microRNA-574-3p inhibits the malignant behavior of liver cancer cells by targeting ADAM28 [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(3): 3015-3023.
- [16] LI W C, WU Y Q, GAO B, *et al.* MiRNA-574-3p inhibits cell progression by directly targeting CCND2 in colorectal cancer [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(12): BSR20190976.
- [17] ZHENG J, ZHOU Y, LI X J, *et al.* miR-574-3p exerts as a tumor suppressor in ovarian cancer through inhibiting MMP3 expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(16): 6839-6848.
- [18] WANG M Q, ZHANG R W, ZHANG S, *et al.* microRNA-574-3p regulates epithelial mesenchymal transition and cisplatin resistance via targeting ZEB1 in human gastric carcinoma cells [J]. *Gene*, 2019, 700: 110-119.
- [19] LIN S Y, ZHAO M Y, LV Y B, *et al.* The lncRNA GATA3-AS1/miR-495-3p/CENPU axis predicts poor prognosis of breast cancer via the PLK1 signaling pathway [J]. *Aging*, 2021, 13(10): 13663-13679.
- [20] CHU D M, LIU T T, YAO Y, *et al.* LINC00997/MicroRNA 574-3p/CUL2 promotes cervical cancer development via mitogen-activated protein kinase signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2021, 41(8): e0005921.
- [21] XU J H, CHEN R Z, LIU L Y, *et al.* lncRNA ZEB2-AS1 promotes the proliferation, migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cell through miR-574-3p/HMGA2 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(10): 5391-5403. (本文编辑: 陆文娟 钱锋)

(上接第 50 面)

苷等,人参皂苷通过调节肿瘤抑制因子、自然杀伤(NK)细胞等来发挥抗肿瘤、调节免疫功能、减轻化疗毒副作用等作用。研究^[10]表明麦冬皂苷可以通过抑制基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达来抑制人胃癌 MGC-803 细胞的侵袭和迁移能力。

本研究通过在真实世界环境中收集多家医院胃癌患者的医院信息系统(HIS)数据,通过 PSM 的方法,使参麦组与对照组的混杂因素均衡可比,进而在真实世界中研究参麦注射液对Ⅱ、Ⅲ期胃癌患者生存期的影响。本研究发现,参麦组相较于对照组可使中位 OS 和中位 PFS 分别延长 1 744 个月和 7.66 个月;与对照组相比,参麦组的 1、3、5 年生存率也显著提高;Cox 比例风险回归模型分析发现,病理类型为腺癌含印戒细胞癌,侵犯脉管, TNM 分期为Ⅲa 期、Ⅲb 期、Ⅲc 期对胃癌患者的生存预后可产生负面影响,这也符合临床上胃癌Ⅲ~Ⅳ期的患者生存预后较差的情况;参麦组、化疗这 2 个因素对其产生正面影响,进一步证明参麦注射液可以使胃癌患者的生存明显获益。

由于在真实世界环境下不同患者的治疗方案存在差异,本研究进一步探讨了参麦注射液联合不同中西医治疗手段的关联作用,发现参麦注射液联合根治性手术和化疗的胃癌患者生存获益显著,可以有效发挥增效减毒的作用。同时,中医治疗手段关联分析表明,胃癌患者生存获益明显主要与联合中药煎剂、鸦胆子注射液、艾迪注射液、香菇多糖注射液和参芪十一味颗粒相关,其中与

艾迪注射液联用获益最为显著。因此,对于接受根治性手术和化疗的临床胃癌患者,可以联合应用参麦注射液、艾迪注射液、鸦胆子注射液,从而达到增效减毒、延长生存期、提高生活质量的功效,为临床用药决策提供一定的参考。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCHE H I, *et al.* Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648.
- [3] 张国平, 李攀, 费浙韵, 等. 参麦注射液联合 FOLFOX 方案化疗治疗进展期胃癌近期疗效及对患者免疫功能和肿瘤标志物的影响 [J]. *中国基层医药*, 2021, 28(12): 1839-1843.
- [4] 孙慧. 参麦注射液治疗消化系统恶性肿瘤的临床疗效分析 [J]. *黑龙江医药*, 2012, 25(4): 595-597.
- [5] 刘包欣子, 邵杰, 舒鹏, 等. FOLFOX4 方案联合参麦注射液对胃癌患者骨髓功能和免疫功能的影响 [J]. *西部中医药*, 2020, 33(9): 8-11.
- [6] 杨蝶, 张禹森, 张晓春. 复方苦参注射液对胃癌患者生存期的影响: 一项真实世界回顾性、多中心队列研究 [J]. *中医杂志*, 2022, 63(23): 2259-2265.
- [7] 刘学梅, 段世玲, 刘勇峰. 参麦注射液联合化疗治疗进展期胃癌 29 例 [J]. *河南中医*, 2015, 35(9): 2285-2287.
- [8] 张艳, 周淑如, 韩仕阳, 等. 人参皂苷对免疫功能的调节作用及机制 [J/OL]. *江苏大学学报(医学版)*: 1-9 [2022-12-16].
- [9] 王冬雪, 吴新民, 蔺冬梅, 等. 人参皂苷抗胃癌作用研究进展 [J]. *特产研究*, 2022, 44(3): 118-123, 128.
- [10] 杨婧, 孙超, 姜泽群, 等. 麦冬皂苷 B 对人胃癌 MGC-803 细胞侵袭和迁移能力的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(6): 2742-2745.

(本文编辑: 梁琥 钱锋)