

· 临床研究 ·

长链非编码 RNA linc00460 在胃癌中的表达及对预后的影响

李锡丁¹, 周永平^{2*}¹南京医科大学附属无锡第二医院普外科,²肝胆外科,江苏 无锡 214000

[摘要] **目的:**探讨长链非编码 RNA linc00460 在胃癌中的表达及其与胃癌患者临床病理特征和预后的关系。**方法:**通过癌症基因组图谱(TCGA)胃癌数据集系统评估 linc00460 的差异表达,并采用实时定量 PCR(qRT-PCR)在 88 例接受胃癌手术的患者中验证 TCGA 结果。采用 qRT-PCR 检测胃癌细胞株和正常人胃上皮细胞中 linc00460 的表达情况。采用基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)法预测 linc00460 的调控基因。将 AGS 细胞分别转染 linc00460 过表达质粒(pcDNA-linc00460)和阴性对照序列(pcDNA3.1),分别采用 Western blot 检测相关蛋白表达和 CCK-8 法检测两组细胞的增殖情况。**结果:**我们发现并证实 linc00460 在胃癌组织和细胞中显著高表达($P < 0.05$);高 linc00460 表达与患者 M 分期相关;linc00460 表达与胃癌患者总生存期之间存在显著负相关($P < 0.05$);且 Cox 比例风险模型的单变量和多变量分析证实其为胃癌相关独立生存预测因子($P < 0.05$)。linc00460 相对高表达样本富集到 P53 类介质对 DNA 损伤反应信号转导的调控($P=0.002$)、P53 类介质对信号转导的正向调节作用($P < 0.001$)、细胞分裂的正向调节($P < 0.001$)、核分裂的正向调节($P=0.002$)等基因集。AGS 细胞过表达质粒 pcDNA-linc00460 转染组中 linc00460 表达水平显著高于 pcDNA3.1 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测结果表明 linc00460 可下调 P53 蛋白表达,上调 Bel-2 和 Cyclin B1 表达。CCK-8 结果表明 pcDNA-linc00460 组 AGS 细胞增殖指数均高于 pcDNA3.1 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**linc00460 在胃癌组织中高表达,且其高表达的患者预后较差,linc00460 可能通过上调 P53 信号通路促进胃癌细胞生长,linc00460 可能参与了胃癌的恶性进展。

[关键词] 胃癌;癌症基因组图谱;linc00460;表达;预后;功能**[中图分类号]** R735.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)10-1442-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20191007

Expression of linc00460 and its correlation with the prognosis of gastric cancer

Li Xiding¹, Zhou Yongping^{2*}¹Department of General Surgery, ²Department of Hepatobiliary Surgery, Wuxi No.2 Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214000, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the expression of long intergenic noncoding RNA 460 (linc00460) in gastric cancer and its relationship with clinicopathological features and prognosis of gastric cancer patients. **Methods:** Differential expression of linc00460 was systematically evaluated based on the Cancer Genome Atlas (TCGA) gastric cancer database. Then 88 patients who underwent gastric cancer surgery were included to verify TCGA results by RT-qPCR. The linc00460 expression in AGS, HGC-27, MKN45, MGC-803, and normal gastric epithelial GES-1 were detected by RT-qPCR. Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to predict the regulation genes of linc00460. AGS cells were transfected with pcDNA-linc00460 and pcDNA3.1, respectively. Western blot was used to detect the expression of related proteins and CCK-8 method to detect the proliferation of cells in the two groups. **Results:** We found and confirmed that linc00460 was highly expressed in gastric cancer tissue samples and cells ($P < 0.05$); moreover, high linc00460 expression was associated with M-stage; there was a strong negative correlation between the expression of linc00460 and the overall survival of patients with gastric cancer ($P < 0.05$); furthermore, univariate and multivariate analysis of the Cox proportional hazards model confirmed that linc00460 was an independent predictor of gastric cancer-related survival ($P < 0.05$). The linc00460 high-expression samples in TCGA GC datasets were enriched in the regulation of DNA damage response signal transduction by P53 class mediator, the positive regulation of signal transduction by P53 class mediator, the regulation of meiotic nuclear division and the positive regulation of nuclear division gene sets. The expression level of linc00460 in the pcDNA-linc00460 transfected AGS

[基金项目] 无锡市卫计委卫生科研项目(Q201806)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zyp19840527@aliyun.com

cells was significantly higher than that of pcDNA3.1 group ($P < 0.05$). Western blot results showed that linc00460 could down-regulate the P53 and up-regulate Bcl-2 and Cyclin B1 expressions. CCK-8 results showed cell proliferation in AGS cells of the pcDNA-linc00460 group was significantly higher than that in the pcDNA3.1 group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Linc00460 is highly expressed in gastric cancer tissues, and patients with high linc00460 level result in a poor prognosis. Linc00460 may promote the growth of gastric cancer cells by up-regulating the P53 signaling pathway, and linc00460 may be involved in the malignant progression of gastric cancer. **[Key words]** gastric cancer; TCGA; linc00460; expression; prognosis; function

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(10): 1442-1448]

胃癌是全球第四大致死肿瘤^[1]。在中国,胃癌为第一大消化系统肿瘤,每年有30万人死亡和40万新发病例^[2]。尽管近年来靶向治疗和免疫治疗均获得了重大进展,但目前早期切除仍然是治愈的唯一治疗选择。然而,相当多的患者就诊时已经伴有淋巴结转移或远处转移,或失去手术切除机会,或术后复发风险极高^[1,3-4]。为提高胃癌治疗效果,鉴定癌细胞进展和转移相关分子标志物至关重要,有助于为肿瘤治疗提供分子依据和新的思路^[3]。

长链基因间非编码RNA 460 (long intergenic noncoding RNA 460, linc00460)是位于人类染色体13q33.2上的长度为935 bp的非编码RNA。已有研究证明linc00460在大肠癌、鼻咽癌、食管癌和非小细胞肺癌等肿瘤中显著上调并与肿瘤的进展和预后密切相关^[5-10]。然而,linc00460在临床胃癌样本中的作用和临床意义仍不清楚。

本研究利用癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)和人类肿瘤相关的基因表达汇编(gene expression omnibus, GEO)公共数据集,探讨linc00460在胃癌中的表达及临床价值,利用基因集富集分析(GSEA)方法预测并验证linc00460参与胃癌恶性表型的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

选取2013年5月至2015年6月于南京医科大学附属无锡第二医院手术切除的88例胃癌手术切除标本(包括癌组织及相应癌旁组织),术前均未接受放疗、化疗及免疫治疗,术后均经病理证实为胃癌。患者中位年龄60岁(34~82岁);按TNM分期标准, I~II期28例, III~IV期60例。本研究获得医院伦理委员会批准且患者均已签署知情同意书。所有患者一般情况及临床病理资料于本院病理科收集。所有标本采集后置于焦碳酸二乙酯(DEPC)水处理后的冻存管,浸没于RNA保存液中,存放于-80℃冰箱备用。所有细胞均为本院实验室保有并

常规培养传代。正常人胃上皮细胞系GES-1培养于DMEM(Invitrogen公司,美国)基础培养基,所有4株人胃癌细胞株(AGS、HGC-27、MKN45、MGC-803)均培养于RPMI1640(Invitrogen公司,美国)培养基,所有培养基均含1%双抗(青霉素100 U/mL和链霉素100 mg/L)和10%胎牛血清(Gibco公司,美国),细胞置于37℃培养箱中,5% CO₂浓度下培养。2~3 d细胞融合度达80%~90%可进行传代。

TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国),逆转录试剂盒及PCR试剂盒(大连TaKaRa公司),DEPC,上海生工生物工程有限公司。引物序列:β-actin上游:5'-CAGCC GCTTCACCTACAGC-3',下游:5'-TTTTGTATTCA-ATCACTGTCTTGCC-3'; linc00460上游:5'-GGCGGATGAACCACCATTGCC-3',下游:5'-CCC-ACGCTCAGTCTTTCT-3',均由上海生工生物工程有限公司合成。pcDNA3.1质粒和pcDNA3.1-linc00460质粒购自上海权阳生物科技有限公司,并经测序证实。CCK-8试剂盒购自南京正鼎生物技术服务中心。大肠杆菌DH5α感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司。P53抗体(10442-1-AP, 1:1 000)、Bcl-2抗体(12789-1-AP, 1:1 000)和Cyclin B1抗体(55004-1-AP, 1:2 000)均购自美国Proteintech公司。

1.2 方法

1.2.1 数据集筛选

利用Bioconductor/TCGAbiolinks函数包从TCGA数据库(<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>)下载并预处理胃癌数据集(STAD)的mRNA表达数据RNA-seqV2。在做临床资料及预后相关性分析时仅保留TCGA数据集中包含上述资料的病例。收集资料包括患者年龄、性别、肿瘤组织学分级、肿瘤浸润深度(T)分期、淋巴结(N)分期、转移(M)分期、TNM分期和总生存期。GSE62254胃癌数据集中linc00460预后价值分析结果从<http://kmpplot.com/>在线GEO数据库分析网站下载。

1.2.2 实时定量PCR(qRT-PCR)

将组织放入研钵,迅速倒入液氮,研磨至粉末

状;细胞弃去上清,按说明书要求使用TRIzol提取组织总RNA,用蛋白核酸分析仪检测其浓度和纯度,按试剂盒说明加反转录试剂进行反转录,然后进行PCR反应。20 μ L反应体系,反应条件:预变性95 $^{\circ}$ C 30 s后,进行40个循环反应:95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s。运用熔解曲线检测扩增产物的纯度。获得C_t值,基因表达量采用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}进行法相对定量。

1.2.3 GSEA

采用GSEA 2.2.1版软件进行分析。利用GSEA网站MsigDB数据库中获得e5.bp.v6.0.symbols.gmt数据集;根据TCGA GC数据集中的linc00460基因表达,将384例样本分为高、中、低3组,将最高组和最低组的样本进行比较,并按缺省加权富集统计的方法进行富集分析,设置随机组合次数为1 000次。按P < 0.05且错误发现率(false discovery rates, FDR) < 0.25的基因集判断显著富集基因集。

1.2.4 质粒转染

在6孔板中接种2.5 \times 10⁵个/孔AGS细胞,第2天细胞密度达到60%~70%。按照转染试剂说明书分别将pcDNA-linc00460和阴性对照质粒pcDNA3.1转染细胞(2 μ g质粒,5 μ L Lipofectamine 3000),转染6 h后换液。转染24 h后消化细胞供后续功能实验使用,转染48 h后细胞用于提取RNA检测转染效率。

1.2.5 CCK-8法检测细胞增殖能力

用DMEM培养液分别制备转染了pcDNA3.1或pcDNA-linc00460的AGS细胞的单细胞悬液,计数并调整细胞浓度为3 \times 10³个/100 μ L,96孔板中每孔加入100 μ L细胞悬液,每组6个复孔,共5块板。设置贴壁时间为0 h,之后每24 h取出1块96孔板,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,在细胞培养箱内避光继续孵育2 h后,用酶标仪检测其在波长450 nm处的吸光度值。连续记录72 h的实验结果,分析各组细胞增殖能力。

1.2.6 Western blot检测

转染48 h后弃去细胞培养液,以预冷PBS洗涤

细胞2次。胰酶消化细胞,用细胞裂解液裂解,4 $^{\circ}$ C离心收集上清并进行蛋白定量。上样进行SDS-PAGE变性电泳后浸泡于适量的转移缓冲液中平衡5 min,再用湿式电转移仪(Bio-Rad)将蛋白转到PVDF膜上,TBS洗膜,加入一抗,室温平缓摇动孵育1 h,4 $^{\circ}$ C过夜;TBST洗膜10 min \times 3次;加入相应二抗工作液(1:2 000,TBST稀释),室温缓摇孵育1 h;TBST洗膜10 min \times 3次;用显色底物(Pierce)显色5 min。以 β -actin作为内参。利用增强化学发光方法试剂盒(GE Healthcare Life Sciences,美国)对目的蛋白进行显影。

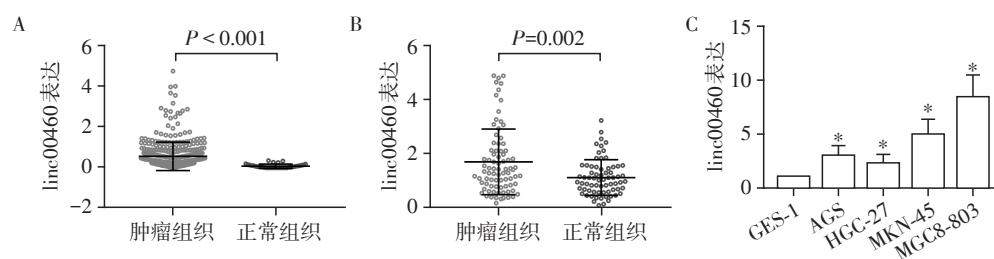
1.3 统计学方法

使用SPSS24.0和Graphpad prism 8.0软件进行统计学分析和画图,所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用t检验,多个样本计量资料比较采用单因素方差分析,生存分析采用Kaplan-Meier和Log-rank检验法。P \leq 0.05为差异有统计学意义。应用单变量Cox比例风险回归估计患者总生存期的个体风险比(hazard ratio,HR)。测量95%置信区间(confidence interval,CI)的HR以估计个体因素的危险风险。

2 结果

2.1 linc00460在胃癌中的表达情况

首先比较了TCGA胃癌队列中linc00460表达情况,结果显示linc00460 mRNA在384例胃癌组织(0.570 \pm 0.697)中表达显著高于37例正常胃黏膜组织(0.085 \pm 0.099)(P < 0.001,图1A)。随后采用qRT-PCR方法检测88对胃癌标本,结果显示胃癌组织中linc00460 mRNA相对表达量(1.748 \pm 1.212)显著高于癌旁组织(1.170 \pm 0.658,P=0.002),结果见图1B。在4株人胃癌细胞株AGS、HGC-27、MKN45、MGC-803中linc00460的表达量均显著高于正常人胃上皮GES-1细胞株(P < 0.05,图1C)。以上结果证实



A、B:linc00460 mRNA在TCGA队列(A)和本院队列(B)胃癌组织和正常组织中的表达;C:linc00460 mRNA在胃癌细胞及正常胃上皮细胞中的表达;与GES-1细胞比较,*P < 0.05。

图1 linc00460在胃癌组织及细胞中的表达

Figure 1 The expression level of linc00460 in gastric cancer and cell lines

linc00460在胃癌组织及细胞系中表达升高。

2.2 linc00460与胃癌的临床病理相关性

linc00460表达水平与胃癌临床病理特征的关系由表1可见。在TCGA胃癌队列中我们观察到,当以linc00460在胃癌组织中表达量的均值(0.570)

表1 在TCGA和本院队列中linc00460表达与患者临床病理参数相关性

Table 1 Relationship between linc00460 expression and clinicopathologic parameters of gastric cancer patients

变量	TCGA队列 (n=360)	P值	本院队列 (n=88)	P值
年龄[岁,中位数 (范围)]	65(30~90)	0.331	60(34~82)	0.355
性别[n(%)]		0.015		0.483
男	234(65.0)		69(78.4)	
女	126(35.0)		19(21.6)	
原发部位[n(%)]		<0.001		0.185
贲门/近端	85(23.6)		18(20.5)	
胃底/体	132(36.7)		36(40.9)	
幽门/远端	137(38.1)		24(27.3)	
其他	6(1.7)		10(11.4)	
分级[n(%)]		0.279		0.451
G1/G2	133(36.9)		23(26.1)	
G3	218(60.6)		62(70.5)	
未知*	9(2.5)		3(3.4)	
T分期[n(%)]		0.323		0.195
T1	17(4.7)		5(5.7)	
T2	70(19.4)		11(12.5)	
T3	167(46.4)		14(15.9)	
T4	105(29.2)		58(65.9)	
未知*	1(0.3)		0(0.0)	
N分期[n(%)]		0.339		0.313
N0	113(31.4)		26(29.5)	
N1	94(26.1)		7(8.0)	
N2	72(20.0)		24(27.3)	
N3	75(20.8)		31(35.2)	
未知*	6(1.7)		0(0.0)	
M分期[n(%)]		0.033		<0.001
M0	328(91.1)		72(81.8)	
M1	18(5.0)		16(18.2)	
未知*	14(3.9)		0(0.0)	
TNM分期[n(%)]		0.090		0.108
I	44(12.2)		10(11.4)	
II	107(29.7)		18(20.5)	
III	162(45.0)		46(52.3)	
IV	28(7.8)		14(15.9)	
未知*	19(5.3)		0(0.0)	

*:指病例的对应状态因临床病理参数缺失而未知。

为界限值时,linc00460在胃癌中的表达与患者性别($P=0.015$)、肿瘤位置($P < 0.001$)和肿瘤M分期显著相关($P=0.033$)。同时进行相关性分析发现以linc00460在胃癌组织中表达量的均值(1.748)为界限值时,linc00460在胃癌中的表达与肿瘤M分期($P < 0.001$)显著相关。

2.3 linc00460表达与胃癌患者预后的相关性

为了研究linc00460 mRNA是否能作为胃癌预后的评价指标,本研究进行了生存期分析。在TCGA胃癌队列($\chi^2=4.060, P=0.044$)和GSE62254数据集($\chi^2=4.856, P=0.028$)中,linc00460 mRNA高表达胃癌患者的总生存期(overall survival, OS)显著低于其低表达患者。同时进行相关性分析证实linc00460 mRNA高表达胃癌患者的OS显著低于其低表达患者($\chi^2=6.734, P=0.009$,图2)。以上结果说明,胃癌中linc00460 mRNA水平可预测患者总生存期。

对两个队列中的独立预后危险因子进行分析,在TCGA队列中,通过将linc00460家族基因表达水平视为连续变量进行单因素Cox比例风险比分析,结果表明TCGA队列中患者的年龄、肿瘤T分期、N分期、M分期、TNM分期和linc00460表达与预后显著相关($P < 0.05$,表2)。然后将单因素分析中有统计学意义的因素纳入多因素分析,结果显示:年龄、T分期以及linc00460表达为OS的独立预测因子(表2)。在本院队列中,通过将linc00460家族基因表达水平视为连续变量进行单因素Cox比例风险比分析,结果表明本院队列中患者的肿瘤T分期、N分期、M分期、TNM分期和linc00460表达与预后具有统计学意义相关($P < 0.05$,表3)。然后将单因素分析中显著的因素纳入多因素分析,结果显示,TNM分期以及linc00460表达为OS的独立预测因子(表3)。

2.4 linc00460的功能基因集富集

根据TCGA胃癌队列中的linc00460基因表达,将384例样本分为高、中、低表达3组,将高表达组和低表达组的样本进行比较,并按缺省加权富集统计的方法进行富集分析,GSEA结果提示linc00460高表达样本富集到P53类介质对DNA损伤反应信号转导的调控($P=0.002$)、P53类介质对信号转导的正向调节作用($P < 0.001$)、细胞分裂的正向调节($P < 0.001$)、核分裂的正向调节($P=0.002$)等基因集(图3A)。

2.5 AGS细胞中linc00460的过表达效果

选用相对低表达的AGS细胞株进行后续实验,

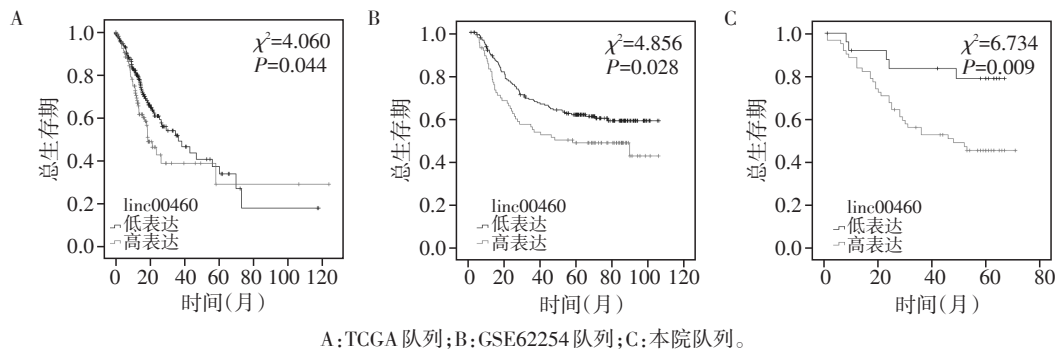


图2 Kaplan-Meier 法分析 linc00460 mRNA 表达水平与胃癌患者预后的关系

Figure 2 Survival analysis of linc00460 mRNA expression in gastric cancer patients by Kaplan-Meier plots

表2 单因素和多因素 Cox 比例风险分析在 TCGA 队列中胃癌患者总生存率

Table 2 Univariate and multivariate analysis of clinicopathological factors for overall survival in the TCGA cohort

变量	单因素分析		多因素分析	
	HR(95%CI)	P值	HR(95%CI)	P值
年龄	1.023(1.004~1.041)	0.014	1.794(1.191~2.702)	0.005
性别	1.468(0.984~2.189)	0.060	—	—
原发部位	1.013(0.814~1.260)	0.910	—	—
分级	1.354(0.949~1.931)	0.095	—	—
T分期	1.375(1.094~1.727)	0.006	1.276(0.999~1.632)	0.051
N分期	1.300(1.113~1.518)	0.001	1.297(1.102~1.526)	0.002
M分期	1.590(1.132~2.234)	0.007	1.428(1.010~2.019)	0.044
TNM分期	1.567(1.249~1.966)	<0.001	1.099(0.761~1.587)	0.614
linc00460 表达	2.103(1.159~3.187)	0.013	2.656(1.275~5.530)	0.009

表3 单因素和多因素 Cox 比例风险分析在本院队列中胃癌患者总生存率

Table 3 Univariate and multivariate analysis of clinicopathological factors for overall survival in the validation cohort

变量	单因素分析		多因素分析	
	HR(95%CI)	P值	HR(95%CI)	P值
年龄	1.005(0.974~1.037)	0.765	—	—
性别	1.192(0.564~2.519)	0.645	—	—
原发部位	0.811(0.563~1.168)	0.260	—	—
分级	1.538(0.783~3.023)	0.212	—	—
T分期	2.211(1.247~3.918)	0.007	1.572(0.866~2.855)	0.137
N分期	1.902(1.373~2.636)	<0.001	1.034(0.654~1.635)	0.886
M分期	3.194(1.601~6.373)	0.001	0.848(0.244~2.950)	0.796
TNM分期	2.925(1.833~4.666)	<0.001	2.878(1.675~4.945)	<0.001
linc00460 表达	1.362(1.090~1.703)	0.007	3.502(1.356~9.044)	0.010

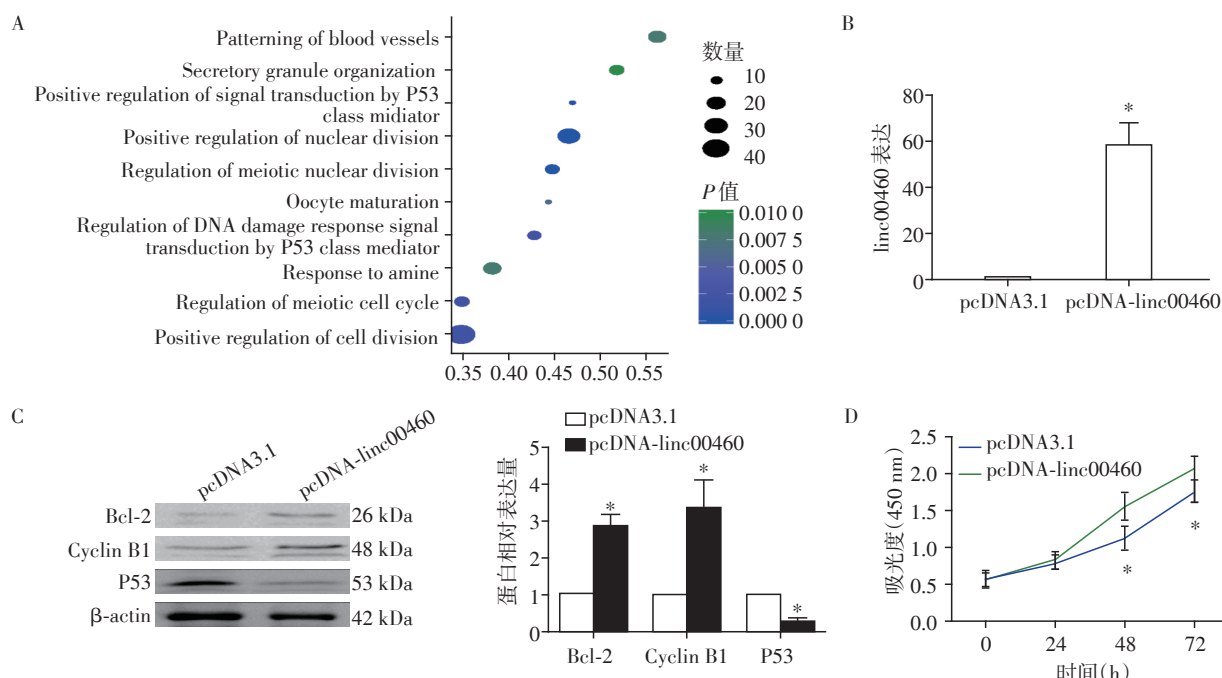
用 qRT-PCR 检测转染前后 AGS 细胞内 linc00460 的 mRNA 表达量,与 pcDNA3.1 组相比,转染过表达质粒的 pcDNA-linc00460 组中 linc00460 表达水平显著升高($P < 0.01$,图 3B)。

2.6 AGS 细胞中过表达 linc00460 的对 P53 信号分子的影响

用 Western blot 检测转染前后 AGS 细胞内

linc00460 转染过表达质粒的 pcDNA-linc00460 组中 P53、Bel-2 和 Cyclin B1 表达水平,结果显示:与 pcDNA3.1 组比较,pcDNA-linc00460 组的 Bel-2 和 Cyclin B1 表达增强,显著高于 pcDNA-3.1 组;而 P53 蛋白表达减弱,显著低于 pcDNA-3.1 组($P < 0.05$,图 3C)。

2.7 过表达 linc00460 对 AGS 细胞增殖能力的影响
通过酶标仪检测细胞在波长 450 nm 处的吸光



A: GSEA 分析结果; B: qRT-PCR 检测 pcDNA-linc00460 及阴性对照质粒 (pcDNA3.1) 瞬时转染后 AGS 细胞中 linc00460 表达情况; C: Western blot 检测 pcDNA-linc00460 及阴性对照质粒 (pcDNA3.1) 瞬时转染后 AGS 细胞中相应蛋白表达情况; D: CCK-8 法检测 pcDNA-linc00460 及 pcDNA3.1 瞬时转染后 AGS 细胞增殖情况。与 pcDNA3.1 比较, * $P < 0.05$ 。

图3 linc00460 可调控 P53 信号通路促进胃癌细胞增殖

Figure 3 linc00460 can promote gastric cancer cell proliferation by modulating P53 signaling pathway

值,结果显示:与 pcDNA3.1 组比较,pcDNA-linc00460 组的细胞增殖能力增强,转染 48、72 h 后的细胞增殖能力无法高于 pcDNA-3.1 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3D)。

3 讨论

作为全球最具侵略性的消化恶性肿瘤之一,胃癌目前已居于我国消化系统肿瘤发病率和死亡率第一位^[11]。通过不懈研究,目前在胃癌的分子机制和靶向治疗方面已取得显著进展,然而当前针对胃癌的治疗效果仍然不理想。胃癌难以早发现和易于转移等特征对患者的生存构成严重威胁^[12]。因此,继续通过对胃癌发病和发展相关的调控网络进行更深入的研究对开发新的用于胃癌的有效治疗药物大有帮助。

由于全基因组和转录组测序技术的快速发展,越来越多的 lncRNA 被发现在细胞增殖、转移和细胞凋亡等胃癌细胞生物学行为中发挥重要作用^[13-15]。例如, lncRNA-CASC2 通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路抑制体外和体内胃癌细胞生长^[16]。 lncRNA-XIST (X 无活性特异性转录物) 可作为 miR-101 的分子海绵调节 EZH2 表达来调节胃癌进展^[17]。

lncRNA-ZFAS1 的上调可促进胃癌细胞上皮-间质转化^[18]。 lnc00460 最近已被证明参与各种癌症的发展。如 linc00460 在食管癌中被 CBP/P300 转录激活后过度表达可促进肿瘤细胞恶性生物学行为^[6]。在鼻咽癌中可作为白介素-6 (IL-6) 的内源竞争 RNA (ceRNA) 竞争结合 miR-149-5p 发挥促癌作用^[9]。在大肠癌中通过调控 KLF2 和 CUL4A 促进肿瘤细胞增殖^[7]。 Wang 等^[19]发现, linc00460 可通过靶向 miR-342-3p 来调节 KDM2A 以促进细胞增殖和迁移。本研究通过分析 TCGA、GSE62254 和本院 3 组胃癌队列,确定胃癌患者肿瘤组织中 linc00460 mRNA 表达水平显著高于相应的正常胃黏膜组织。这证实 linc00460 mRNA 在胃癌发展过程中表达增加,也提示 linc00460 mRNA 是胃癌预后监测的潜在生物标志物。

通过对 TCGA 和本院队列的临床病理特征进行分析,发现 linc00460 与 TCGA 队列患者的瘤灶位置和 M 分期显著相关,而在本院队列中则与患者的 M 分期和 N 分期均显著相关。这些结果提示, linc00460 可能调控胃癌细胞的转移,而这一推论已由前人证实^[19]。进一步通过对 TCGA 胃癌队列进行 GSEA 分析,发现 linc00460 高表达的样本富集到 P53 信号通路和细胞分裂相关的基因集,提示在胃

癌中 linc00460 可能通过靶向 P53 信号通路促进细胞生长。后续进一步上调 linc00460 检测胃癌细胞增殖能力和 P53 信号通路分子的表达,相关结果也证实了我们的推论。在未来的研究中,将进一步分析 linc00460 对体内胃癌肿瘤生长的影响,并验证是否可靶向 linc00460 抑制体内肿瘤生长。

总之,本研究发现 linc00460 在胃癌组织和细胞系中的表达显著高于正常样本,提示 linc00460 是胃癌预后的独立因子。此外,linc00460 可通过在胃癌中靶向 P53 信号通路发挥促癌作用。本研究为胃癌发生和发展补充了新的分子调控机制,为接下来关于 linc00460 在胃癌中的基础和临床研究提供了线索和依据,为胃癌的靶向治疗提供新思路。

[参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1):7-30
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132
- [3] Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2009, 374(9688):477-490
- [4] Price TJ, Shapiro JD, Segelov E, et al. Management of advanced gastric cancer [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 6(2):199-208
- [5] Wang X, Mo FM, Bo H, et al. Upregulated expression of long non-coding RNA, LINC00460, suppresses proliferation of colorectal cancer [J]. *J Cancer*, 2018, 9(16):2834-2843
- [6] Liang Y, Wu Y, Chen X, et al. A novel long noncoding RNA linc00460 up-regulated by CBP/P300 promotes carcinogenesis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Bioscience Rep*, 2017, 37(5):BSR20171019
- [7] Lian Y, Yan C, Xu H, et al. A novel lincRNA, LINC00460, affects cell proliferation and apoptosis by regulating KLF2 and CUL4A expression in colorectal cancer [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 12:684-697
- [8] Li K, Sun D, Gou Q, et al. Long non-coding RNA linc00460 promotes epithelial-mesenchymal transition and cell migration in lung cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2018, 420:80-90
- [9] Kong YG, Cui M, Chen SM, et al. LncRNA-LINC00460 facilitates nasopharyngeal carcinoma tumorigenesis through sponging miR-149-5p to up-regulate IL6 [J]. *Gene*, 2018, 639:77-84
- [10] Yue QY, Zhang Y. Effects of Linc00460 on cell migration and invasion through regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) in non-small cell lung cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(4):1003-1010
- [11] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132
- [12] Hu Y, Pan J, Wang Y, et al. Long noncoding RNA linc-UBC1 is negative prognostic factor and exhibits tumor pro-oncogenic activity in gastric cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1):594-600
- [13] Shi X, Sun M, Liu H, et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases [J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2):159-166
- [14] 金星星,徐伟,张文灵,等. LncRNA HOTAIR 通过 COX-2 调控胃癌细胞增殖与侵袭 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(6):739-744
- [15] 杨小兵,王劲松,周璘,等. 长链非编码基因 PRNCR1 遗传多态性与胃癌的易感性 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(11):1520-1524
- [16] Peng L, Xue WJ, Ying F, et al. Long non-coding RNA CASC2 suppresses the proliferation of gastric cancer cells by regulating the MAPK signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(8):3522-3529
- [17] Chen D, Ju H, Lu Y, et al. Long non-coding RNA XIST regulates gastric cancer progression by acting as a molecular sponge of miR-101 to modulate EZH2 expression [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1):142
- [18] Zhou H, Wang F, Chen H, et al. Increased expression of long-noncoding RNA ZFAS1 is associated with epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer [J]. *Aging*, 2016, 8(9):2023-2035
- [19] Wang F, Liang S, Liu X, et al. LINC00460 modulates KDM2A to promote cell proliferation and migration by targeting miR-342-3p in gastric cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:6383-6394

[收稿日期] 2018-09-19