网络出版时间:2023 - 10 - 09 09:29:16 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230929.1229.015

LINC00092 对神经胶质瘤增殖、迁移和侵袭的影响

杨金亮[1,2],李 佳[3],安 静[4],郗玉巧[5],叶 雷[1],程宏伟[1]

摘要 目的 探究长链非编码 RNA LINC00092 对神经胶质瘤增殖、迁移和侵袭的影响。**方法** 通过癌症基因组图谱(TCGA)数据库和基因型 - 基因表达量关联数据库(GTEx),分析 LINC00092 在泛癌中的表达情况以及对神经胶质瘤预后的影响。另外,构建了 LINC00092 过表达质粒。通过细胞增殖实验、迁移实验(Transwell)和流式细胞术,检测 LINC00092 对神经胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。最后,通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 检测过表达 LINC00092 对胰岛素样生长因子 2 结合蛋白 1(IGF2BP1)表达水平的影响。**结果** 公共数据库的分析显示 LINC00092 在肿瘤中普遍低表达,且 LINC00092 与多形成性胶质细胞瘤(GBM)和脑低级别胶质瘤(LGG)的预后存在相关性。体外实验表明过表达 LINC00092 显著降低了神经胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,神经胶质瘤细胞的凋亡增加。过表达 LINC00092 减低了 IGF2BP1 的表达水平。**结论** LINC00092 可能通过靶向 IGF2BP1 抑制神经胶质瘤的增殖、迁移和侵袭,促进神经胶质瘤细胞的凋亡。

关键词 神经胶质瘤;预后;LINC00092;IGF2BP1;侵袭
中图分类号 R 739.4
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2023)11 - 1898 - 06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.11.016

神经胶质瘤是一种极易恶化的,起源于神经组织中胶质细胞的肿瘤[1]。患者初期一般表现为头痛、呕吐和视力视野改变,随着疾病的进一步加深,会出现持续性头痛、癫痫发作、记忆力下降和脑疝等显著症状[2]。亚硝基化合物、遗传、电离辐射、脑部疾病史等已被广泛认为是影响神经胶质瘤发生和发展的主要因素[3],但具体的病因尚不完全明确。由于神经胶质瘤细胞具有免疫逃逸能力,机体很难对其产生特异性杀伤,从而有效避免了免疫系统的抑制和清除。由于个体差异,不同患者的肿瘤病类型往往也存在着很大的区别。因此,迫切需要了解神经胶质瘤进展的关键分子机制,以制定更有效的治疗方法。该研究中,首先利用数据库对 LINC00092 在泛癌中的表达以及临床意义进行了相关分析。接着通过体外实验分析了 LINC00092 对神经胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响,以及 LINC00092 对胰岛素样生长因子 2 结合蛋白 1(insulin-like growth factor 2 binding protein 1,IGF2BP1)的调控作用。研究旨在阐明 LINC00092 在神经胶质瘤发生和发展过程中的调控机制,可能为诊断和治疗神经胶质瘤提供新的靶标。

1 材料与方法

1.1 公共数据库分析 LINC00092 在泛癌中的表达和预后 基因型 - 组织表达数据库(genotype-tissue expression, GTEx; http://commonfund.nih.gov/GTEx/)包含了大量健康人体组织的 RNA 测序数据,常在癌症的研究中与癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库联合使用。基于 TCGA 和 GTEx 数据库中的样本信息,检测了 LINC00092 在泛癌中表达。借助 R 软件,对 LINC00092 在泛癌中的总体生存(overall survival, OS)预后进行了单变量 Cox 回归分析,绘制了森林图,并并计算了相应的 *P* 值和 95% 置信区间下的风险比(*HR*)。

1.2 细胞培养 从中国科学院上海细胞库购买该实验所用到的胶质瘤细胞(U87),将其放置在含有 10% 胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)的杜尔贝科改良伊格尔培养基(dulbecco's modified eagle medium,DMEM)中,并往该培养基中添加 1% 的青 - 链霉素。在含有 5% CO_2 的恒温细胞培养箱中培养细胞,培养条件 37 ℃。

1.3 质粒和转染 对于细胞的转染,首先将 U87 细胞以每孔 1×10^5 的密度添加到 6 孔板中。LINC00092 的过表达质粒购自上海 Genechem 公司,以空载体 pcDNA3.1 作为阴性对照。其次,按照说

2023 - 06 - 21 接收
基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1908085MH284)
作者单位:[1]安徽医科大学第一附属医院神经外科,合肥 230022
安徽医科大学附属阜阳医院[2] 神经外科、[3] 急诊外科颅脑创伤中心、[4] 门诊手术室,阜阳 236000
[5]安徽汉库医学诊断技术有限公司质量部,阜阳 236000
作者简介:杨金亮,男,硕士研究生;
程宏伟,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:hongwei.cheng@ahmu.edu.cn

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

明书,通过 Lipofactamine 2000 对细胞进行质粒的转染。

1.4 荧光定量 PCR 技术 使用 TRIzol 试剂提取 U87 细胞中的总 RNA,通过测量 260 和 280 nm 处的相对吸光度来评估 RNA 质量,通过逆转录试剂盒将逆转录为互补 DNA。在通过 SYBR Green 的方法对互补 DNA 进行荧光定量 PCR 检测。在 Applied Biosystems 7500 实时荧光定量 PCR 系统中进行检测。随后借助 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算相对表达水平。

1.5 细胞增殖实验 对于细胞的增殖实验,使用 CCK-8 试剂盒进行检测。首先将转染后的 U87 细胞以 2×10^3 的密度接种在 96 孔板中,检测前每个孔中加入 10 μl 的 CCK-8 溶液,37 ℃孵育 2 h。通过酶标仪分别在 0、24、48、72 和 96 h 检测细胞在 450 nm 处的吸光度,并描绘生存力曲线以此来观察细胞增殖的活力。

1.6 细胞迁移和侵袭实验 利用 Transwell 对 U87 细胞进行迁移和侵袭的检测。首先,将转染后的 U87 细胞用无血清 DMEM 培养基稀释,添加到 Transwell 小室的上层腔室,对于侵袭实验,在 Transwell 中加入基质胶,而迁移实验则不需要。之后在 Transwell 的下层腔室中添加含有 10% FBS 的 DMEM 培养基。经过一段时间的孵育后,取出小室,用棉签擦除上层腔室多余的细胞。随后用多聚甲醛固定迁移和侵袭的细胞,并用 0.1% 的结晶紫进行染色。最后通过光学显微镜观察细胞迁移和侵袭的数量,进行比较分析。

1.7 细胞凋亡检测 对于细胞凋亡检测,将转染后的 U87 细胞 48 h 内用磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗 2 次,并用 100 μl 结合缓冲液重悬在避光环境中,对其进行膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素和碘化丙锭的双重染色。随后按照制造商提供的指示,通过流式细胞仪进行细胞凋亡分析。

1.8 蛋白质印迹实验 利用 RIPA 裂解液从 U87 细胞中提取总蛋白,通过 BCA 蛋白质定量试剂盒测量提取的蛋白质浓度。随后通过十二烷基硫酸钠 – 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质并转移到 PVDF 膜上。将膜在 5% 脱脂乳中封闭 3 h,与 anti-IGF2BP1(1∶1 000)和 anti-GAPDH(1∶10 000)在 4 ℃的环境下孵育过夜。经磷酸盐缓冲液冲洗后,利用 ECL 化学发光试剂盒检测 IGF2BP1 的蛋白质的表达水平。

1.9 统计学处理 通过 SPSS 16.0 软件进行数据分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。对于符合正态分布的数据,采用独立样本的 t 检验进行两组间差异的评估;对于 3 个或更多独立样本的情况,采用单因素方差分析(ANOVA)评估组间差异。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LINC00092 在泛癌中表达情况 通过 TCGA 和 GTEx 数据库中的样本,分析了 LINC00092 在泛癌中的表达情况,如图 1A-D 所示,LINC00092 在绝大多数癌症的肿瘤组织中低表达,如肾上腺皮质癌(adrenal cortical carcinoma,ACC),膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma,BLCA),乳腺浸润癌(breast invasive carcinoma,BRCA)和多形成性胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme,GBM)等。此外,森林图也展示了 LINC00092 在泛癌中的 OS 的单变量 Cox 回归分析,根据 $P<0.05$ 的前提,观察到 LINC00092 在 ACC($P=0.008\ 6$)、BRAC($P=0.009\ 7$)、GBM($P=0.013\ 3$),脑低级脑胶质瘤(LGG)($P<0.000\ 1$)、肝细胞肝癌(LIHC)($P=0.039\ 2$)、肺腺癌(LUAD)($P=0.040\ 5$)中具有显著的预后价值(图 2)。

2.2 LINC00092 抑制 U87 细胞的发展并调控 IGF2BP1 的表达 在 LINC00092 的神经胶质瘤细胞实验中,首先基于荧光定量 PCR 技术检测到经 pcDNA3.1 转染后的 LINC00092 在 U87 细胞中的表达上调(图 3A)。CCK-8 试剂盒也检测到,与对照组(pcDNA)相比,过表达 LINC00092 组(pcDNA3.1-LINC00092)U87 细胞的增殖活力降低($P<0.01$)(图 3B)。Transwell 的结果也显示与对照组(pcDNA)相比,过表达 LINC00092 组(pcDNA3.1-LINC00092)U87 细胞的迁移和侵袭数量降低($P<0.000\ 1$)(图 4A、B)。反之,流式细胞术检测到与对照组(pcDNA)相比,过表达 LINC00092 组(pcDNA3.1-LINC00092)的 U87 细胞的凋亡增加($P<0.05$),如图 5 所示。因此,推断 LINC00092 作为神经胶质瘤的抑癌因子,上调其在胶质瘤细胞中的表达后肿瘤细胞的活力降低。此外,荧光定量 PCR 技术检测到与对照组(pcDNA)相比,过表达 LINC00092 组(pcDNA3.1-LINC00092)的 IGF2BP1 的表达降低($P<0.01$),而蛋白质印迹实验则显示过表达 LINC00092 后 IGF2BP1 蛋白的表达也下降($P<0.05$)(图 6A、B)。这表明了 LINC00092 能够通过靶向 IGF2BP1 的表达,影响神经胶质瘤细胞的生长过程。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

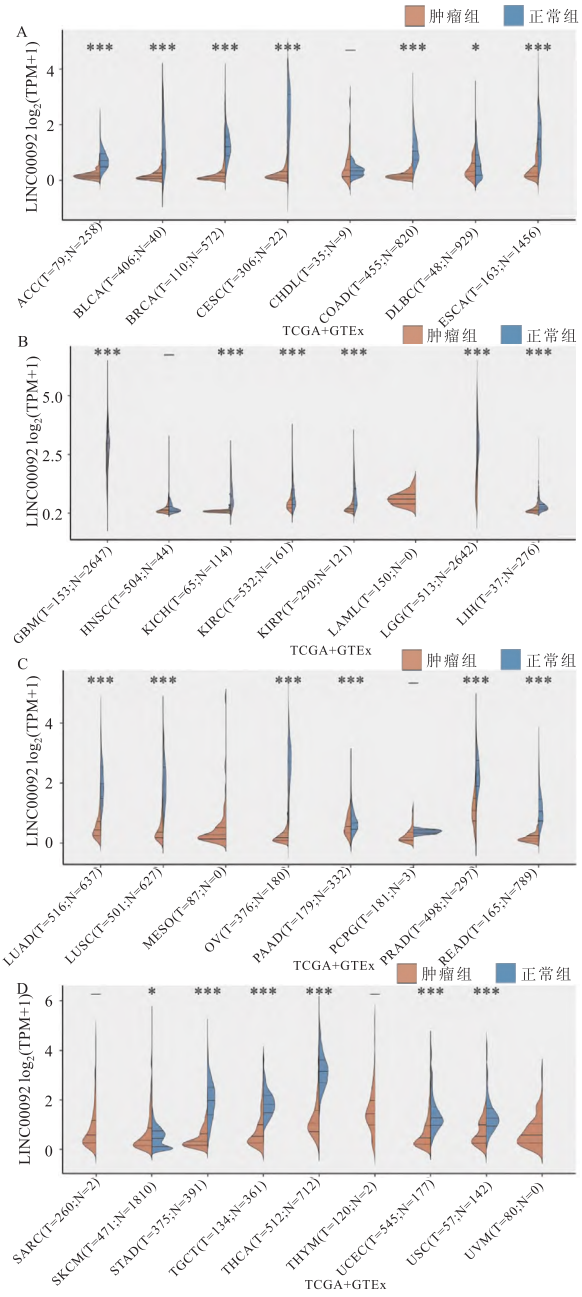

图 1　公共数据库检测 LINC00092 在泛癌中表达情况

A：LINC00092 在 ACC、BLCA、BRCA、宫颈鳞癌和腺癌（CESC）、胆管癌（CHOL）、结肠癌（COAD）、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（DLBC）和食管癌（ESCA）中的表达水平；B：LINC00092 在多形成性胶质细胞瘤（GBM）、头颈癌（HNSC）、肾嫌色细胞癌（KICH）、肾透明细胞癌（KIRC）、肾乳头状细胞癌（KIRP）、急性髓系白血病（LAML）、脑低级别胶质瘤（LGG）和肝癌（LIHC）中的表达水平；C：LINC00092 在肺腺癌（LUAD）、肺鳞状细胞癌（LUSC）、间皮瘤（MESO）、卵巢癌（OV）、胰腺癌（PAAD）、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤（PCPG）、前列腺癌（PRAD）和直肠癌（READ）中的表达水平；D：LINC00092 在肉瘤（SARC）、皮肤黑色素瘤（SKCM）、胃癌（STAD）、睾丸癌（TGCT）、甲状腺癌（THCA）、胸腺瘤（THYM）、子宫内膜样癌（UCEC）、子宫癌肉瘤（UCS）和眼部黑色素瘤（UVM）中的表达水平；与正常组比较：$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$

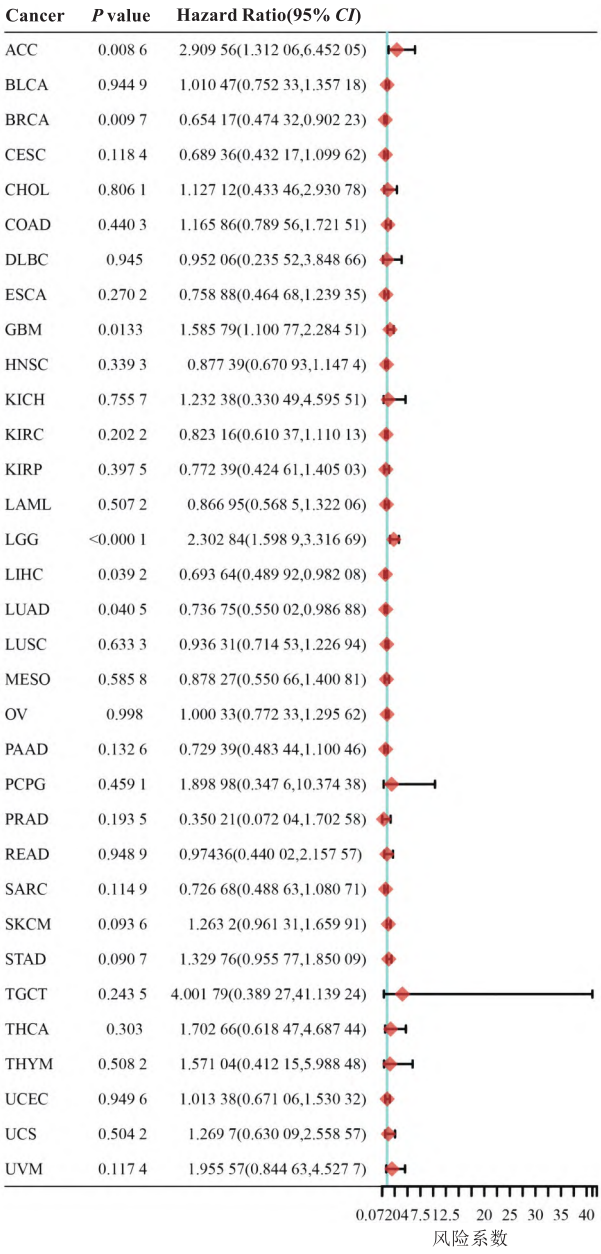

图 2　LINC00092 对 TCGA 泛癌中 OS 的单因素 Cox 回归结果

3　讨论

神经胶质瘤属于中枢神经系统肿瘤，其 5 年病死率在全身肿瘤中仅次于胰腺癌和肺癌，往往导致高致残率。当前关于神经胶质瘤患者的治疗主要是以手术切除为主，但因肿瘤难以完全切除，一般还以综合治疗即放疗、化疗等为辅，从而延长患者的 5 年生存以及遏制肿瘤的复发率[4-5]。随着生物科学技术的发展，基因、免疫等新型疗法也逐步应用于神经胶质瘤的研究中[6]。考虑到患者的个体差异性较大，肿瘤发病部位的不同，并且神经胶质瘤具有高异

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

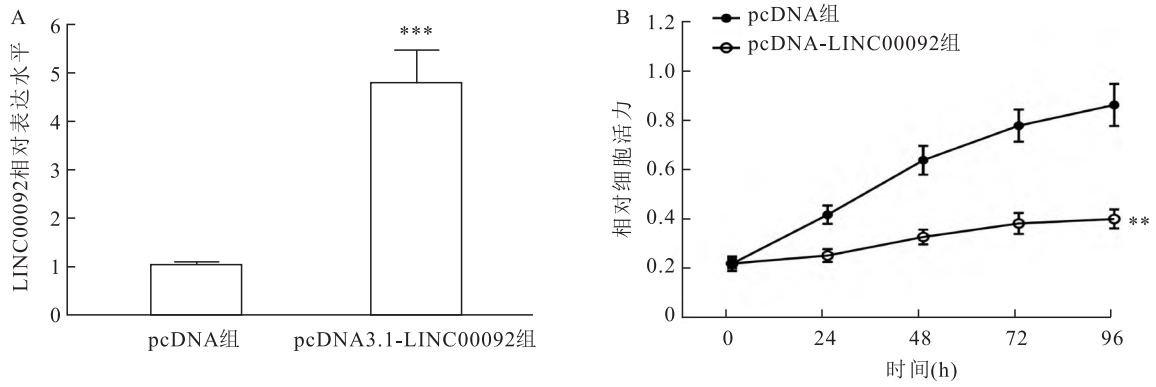

图 3 LINC00092 对 U87 细胞增殖的影响

A:荧光定量 PCR 技术检测经 pcDNA3.1 转染后,LINC00092 在 U87 细胞中的表达水平;B:CCK-8 试剂盒检测 LINC00092 对 U87 细胞增殖影响的折线图;与 pcDNA 组比较:$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$

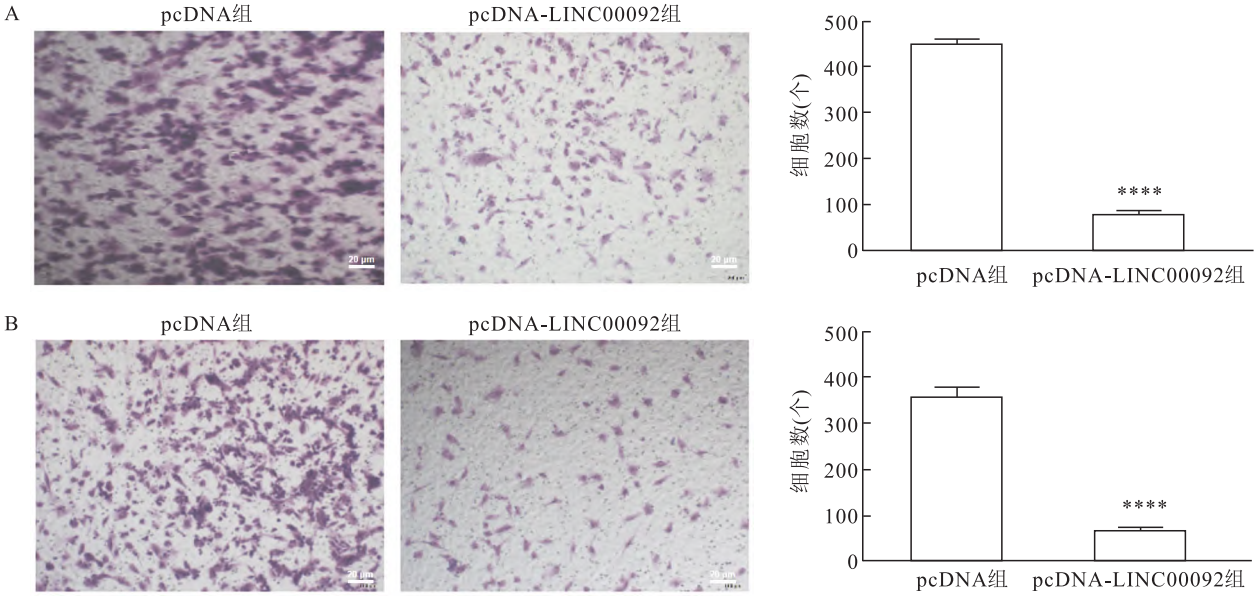

图 4 LINC00092 对 U87 细胞迁移和侵袭的调控 ×200

A:Transwell 迁移实验检测 U87 细胞经转染对照组(pcDNA)和过表达 LINC00092 后细胞垂直迁移能力及直方图统计;B:Transwell 侵袭实验检测 U87 细胞经转染对照组(pcDNA)和过表达 LINC00092 后细胞侵袭能力及直方图统计;与 pcDNA 组比较:$^{****}P<0.0001$

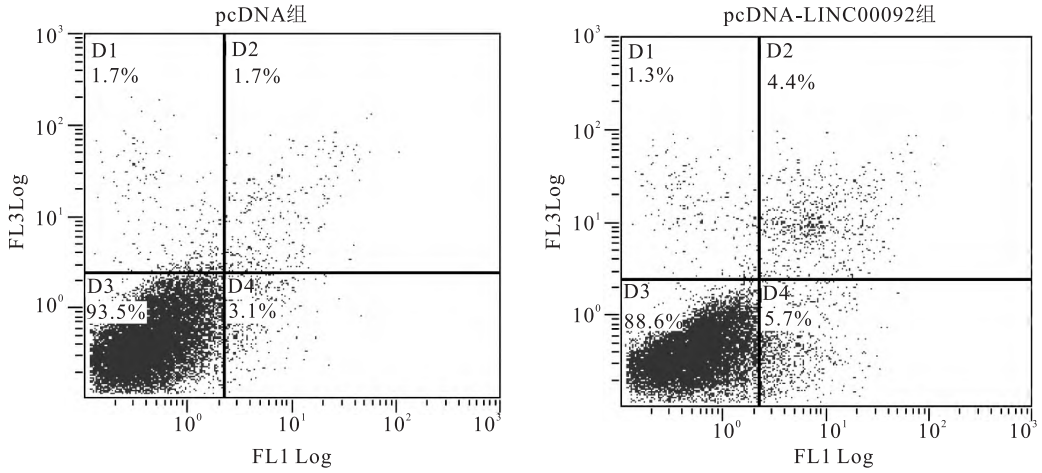

图 5 LINC00092 对 U87 细胞凋亡的影响

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

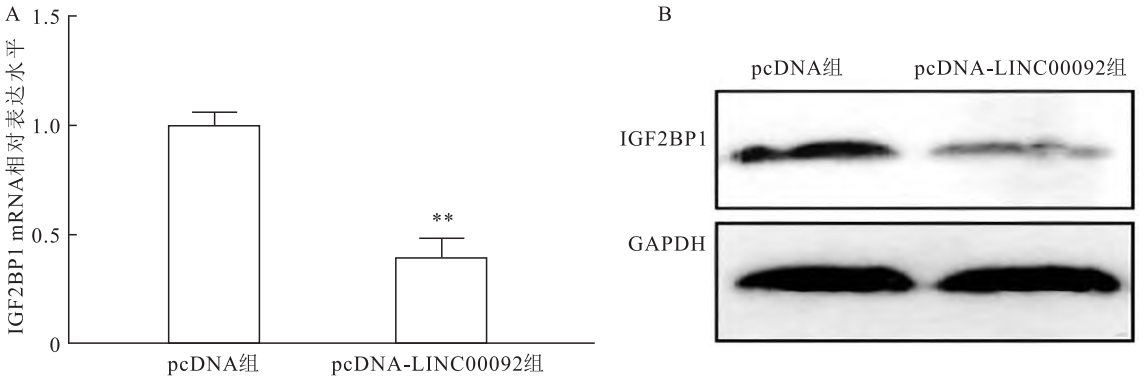

图 6 LINC00092 下调 IGF2BP1 在 U87 细胞中的表达

A:荧光定量 PCR 检测 U87 细胞经转染对照组(pcDNA)和过表达 LINC00092 后细胞中 IGF2BP1 表达水平的变化;B:蛋白质印迹检测 U87 细胞经转染对照组(pcDNA)和过表达 LINC00092 后细胞中 IGF2BP1 蛋白水平的变化;与 pcDNA 组比较:$^{**}P<0.01$

质性和治疗抵抗的特点,临床治疗效果也会有所不同,部分患者的预后往往较差。因此,基于生物信息学的方法对公共数据库中的神经胶质瘤数据进行探究,能够为寻找有效治疗靶点提供新思路。

在当前的临床生物学领域,通过生物信息学的方法对 TCGA 数据库中的癌症进行了遗传学、表观遗传学等研究,以此掌握癌症发病机制[7-8]。相关研究表明 lncRNA 可在癌症诊断与预后中作为有效生物标志物,为癌症的预防、治疗提供了有价值的线索。该研究基于公共数据库评估得到 LINC00092 在多个癌症的肿瘤样本中显著低表达,并且对 ACC、BRCA、LUAD 等肿瘤具有显著的预后价值。尤其重要的是分析结果显示 LINC00092 在 LGG 和 GBM 中低表达,而单因素 Cox 分析显示 LINC00092 在 LGG 和 GBM 中是危险预后因素($HR>1$)。通过数据库分析的结果显示 LINC00092 可能是神经胶质瘤预后中的重要标志物。

作为一种长链非编码 RNA,LINC00092 参与一些疾病发展过程中的调控,并与一些肿瘤的发生和发展相关。Chen et al[9]研究表明 LINC00092 主要在心脏成纤维细胞中表达,可通过抑制糖酵解来减弱人心脏成纤维细胞激活。Li et al[10]在甲基化驱动基因与乳腺癌的研究中通过分析显示 LINC00092 在乳腺癌中低表达,是导致乳腺癌的不良预后的因素,上调其表达能够显著抑制乳腺癌细胞的增殖和细胞周期。其他研究还指出 LINC00092 在肺腺癌中低表达,下调 LINC00092 表达会对肺腺癌的迁移和侵袭产生影响,并且 LINC00092 可能与肺腺癌的不良预后有关[11]。然而,关于 LINC00092 在神经胶质瘤细胞中的作用机制还不明确,该研究旨在进一步阐明 LINC00092 在神经胶质瘤中的作用机制,LINC00092 可能是神经胶质瘤中的重要标志物。

在体外细胞实验中,通过 CCK-8、Transwell 和流式细胞术的方法显示上调 LINC00092 在神经胶质瘤细胞中的表达会导致 U87 细胞增殖、迁移受到显著抑制,并加速 U87 细胞的凋亡进程,这表明 LINC00092 在神经胶质瘤的中发挥着抑癌作用。此外,结合网站 ENCORI: The Encyclopedia of RNA Interactomes.(sysu.edu.cn)预测得到 LINC00092 可能调控 IGF2BP1 的表达。通过 qRT-PCR 和 Western blot 的方法检测到 LINC00092 负向调控 IGF2BP1 在神经胶质瘤细胞中的表达水平。IGF2BP1 是一种蛋白质编码基因,与甲状腺肉瘤和结直肠癌、卵巢癌等疾病相关[12]。研究[13]表明 IGF2BP1 的过表达促进胶质瘤细胞进展,microRNA-4500 通过靶向该基因能抑制神经胶质瘤细胞的发展。Wang et al[14]的研究表明 miR-873 通过下调 IGF2BP1 的表达能达到同样抑制胶质母细胞瘤的发生和转移的效果。因此,LINC00092 可能通过靶向 IGF2BP1 的表达影响神经胶质瘤的发生和发展,该研究存在一定的局限性,在后续的研究中,将进一步通过实验阐明 LINC00092 靶向 IGF2BP1 作用机制。

参考文献

[1] 龙腾飞, 张红雁, 吴爱林, 等. 基于 CGGA 数据库的 325 例脑胶质瘤患者 PSMB8 表达水平与临床特征的相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(11): 1833-7.

[2] Armstrong T S, Bishof A M, Brown P D, et al. Determining priority signs and symptoms for use as clinical outcomes assessments in trials including patients with malignant gliomas: Panel 1 Report [J]. Neuro Oncol, 2016, 18(suppl 2): ii1-12.

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[3] 马 伟, 马青龙, 魏 丽, 等. 电离辐射促进神经胶质瘤细胞初级纤毛发生[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2021, 39(2): 29 - 36.
[4] 李光烈. 术后放疗开始时间与高级别胶质瘤预后的关系[D]. 大连:大连医科大学, 2020.
[5] 刘志强, 李玉辉, 石文建, 等. 高压氧联合放化疗同期治疗对胶质瘤术后患者康复疗效的评估[J]. 河北医药, 2013,35(18): 2808 - 9.
[6] Zhan W L, Gao N, Tu G L, et al. LncRNA LINC00689 promotes the tumorigenesis of glioma *via* mediation of miR-526b-3p/IGF2BP1 axis[J]. Neuromolecular Med,2021,23(3):383 - 94.
[7] 谢龙祥, 闫中义, 党艺方, 等. TCGA 数据库:海量癌症数据的源泉[J]. 河南大学学报(医学版),2018, 37(3): 223 - 8.
[8] 张燕明, 韩 涛, 郑振东, 等. 基于 GTEx 联合 TCGA 数据集筛选肝癌中 mRNA 研究[J]. 临床军医杂志, 2019, 47(12): 1281 - 3.
[9] Chen Z T, Zhang H F, Wang M, et al. Long non-coding RNA Linc00092 inhibits cardiac fibroblast activation by altering glycolysis in an ERK-dependent manner[J]. Cell Signal, 2020, 74: 109708.
[10] Li J, Lu F, Shao X, et al. Investigating the potential clinical significance of long non-coding RNA 00092 in patients with breast cancer[J]. Ann Transl Med,2022,10(10):602.
[11] Wang X, Wang X, Huang G, et al. Lower expression of LINC00092 in lung adenocarcinoma might mean poorer prognosis: a study based on data mining and bioinformatics[J]. Medicine, 2020,99(44):e23012.
[12] 何哲锋, 裴铁民, 孟庆辉. IGF2BP1 与肿瘤[J]. 国际肿瘤学杂志,2021, 48(2): 4.
[13] Li Z, Xue M, Zhu B X, et al. microRNA-4500 inhibits human glioma cell progression by targeting IGF2BP1[J]. Biochem Biophys Res Commun,2019,513(4):800 - 6.
[14] Wang R, Li J, Bao B, et al. MicroRNA-873 (miRNA-873) inhibits glioblastoma tumorigenesis and metastasis by suppressing the expression of IGF2BP1[J]. J Biol Chem,2015,290(14):8938 - 48.

The effects of LINC00092 on the proliferation, migration and invasion of glioma

Yang Jinliang[1,2], Li Jia[3], An Jing[4], Xi Yuqiao[5], Ye Lei[1], Cheng Hongwei[1]

([1]*Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022;
[2]*Dept of Neurosurgery*, [3]*Emergency Surgery Trauma Center*, [4]*Outpatient Operating Room, Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang* 236000; [5]*Dept of Quality, Anhui Hanku Medical Diagnosis Technology Co., Ltd, Fuyang* 236000)

Abstract ***Objective*** To explore the effects of long non-coding RNA LINC00092 on the proliferation, migration and invasion of glioma. ***Methods*** Using the cancer genome atlas(TCGA) and genotype-tissue expression (GTEx) databases, this study analyzed the expression of LINC00092 in pan-carcinoma and its effect on the prognosis of glioma. In addition, LINC00092 overexpression plasmid was constructed to detect the effects of LINC00092 on proliferation, migration, invasion and apoptosis of glioma cells by cell function experiments, including CCK-8 assay, Transwell assay and flow cytometry. Finally, qRT-PCR and Western blot were used to detect the effect of overexpression of LINC00092 on the expression level of IGF2BP1. ***Results*** The analysis of public databases revealed a widespread downregulation of LINC00092 in tumors, and its association with the development of glioblastoma multiforme (GBM) and low-grade glioma (LGG). *In vitro* experiments demonstrated that overexpression of LINC00092 significantly reduced the proliferation, migration and invasion of glioma cells, while promoting apoptosis. Moreover, overexpression of LINC00092 led to a decrease in the expression levels of IGF2BP1. ***Conclusion*** LINC00092 may inhibit glioma proliferation, migration and invasion by targeting IGF2BP1, and promote glioma cell apoptosis.

Key words glioma; prognosis; LINC00092; IGF2BP1; invasion

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net