

LncRNA PICSAR 敲低对卵巢癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响及其作用机制

唐雪俊, 窦晓卫, 应小燕

(南京医科大学第二附属医院妇科, 南京 210003)

摘要 目的 探讨长链非编码 RNA (LncRNA) PICSAR 在卵巢癌中的表达, 探究 LncRNA PICSAR 对卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响以及其可能的作用机制。方法 使用荧光定量 PCR 法检测卵巢癌组织和细胞系 A2780、OVCAR-3、HO-8910 以及正常卵巢组织和细胞系 IOSE386 中 LncRNA PICSAR 的表达水平。将 LncRNA PICSAR 表达最高的卵巢癌细胞系分为对照组和实验组, 通过脂质体转染技术分别转染阴性对照小干扰 RNA (siRNA-NC) 或 PICSAR 小干扰 RNA (siRNA-PICSAR)。细胞计数实验 (CCK-8)、克隆形成实验、划痕实验和 Transwell 实验以及流式细胞术分别分析 LncRNA PICSAR 敲低对卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。Western blot 法测定各组细胞的凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 和自噬蛋白 LC3B、ATG7、Beclin-1 的表达水平。使用雷帕霉素和羟氯喹分别作为自噬激活剂和抑制剂处理卵巢癌细胞, 并通过 Western blot 实验检测细胞凋亡水平。结果 与正常卵巢组织相比, 卵巢癌组织中 LncRNA PICSAR 表达水平升高。与 IOSE386 细胞系比较, 卵巢癌细胞系 A2780、OVCAR-3、HO-8910 中 LncRNA PICSAR 表达水平均升高。与 si-NC 组比较, si-PICSAR 组卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力均降低, 细胞凋亡率增高。si-PICSAR 组卵巢癌细胞的自噬水平较 si-NC 组降低, siRNA-PICSAR 转染后, 用雷帕霉素激活自噬降低了细胞凋亡水平, 而用羟氯喹抑制自噬促进了细胞凋亡。结论 LncRNA PICSAR 在卵巢癌组织和细胞系中高表达, LncRNA PICSAR 敲低能够抑制卵巢癌细胞的恶性生物学行为。敲低 LncRNA PICSAR 可能是通过调节自噬促进卵巢癌细胞凋亡。

关键词 卵巢癌; 长链非编码 RNA; PICSAR; 增殖; 凋亡; 自噬

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1509-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.003

卵巢癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一。由于疾病早期无明显特异性症状, 大多数患者就诊时已属晚期, 加之复发和化疗耐药, 卵巢癌患者病死率高^[1]。目前卵巢癌的主要治疗方法是将肿瘤细胞减灭术与化疗相结合。进一步了解卵巢癌生物学的分子机制, 以发现新的靶向治疗策略。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, LncRNA) 参与调节蛋白质合成和稳定性, 影响细胞增殖、分化和存活, 并在多种疾病中发挥重要作用^[2]。近些年研究证实卵巢癌组织中存在 LncRNA 异常表达, 这不仅影响了卵巢癌细胞增殖、迁移和凋亡, 还与化疗耐药相关^[3]。最近, 研究^[4]显示 LncRNA PICSAR 与多种疾病相关, 如 PICSAR 高表达与肝细胞癌、肾透明细

胞癌以及类风湿性关节炎等有关^[5-6]。PICSAR 被确定为皮肤鳞状细胞癌的潜在预后标志物和治疗靶点。该研究先检测 LncRNA PICSAR 在卵巢癌组织和细胞系中的表达水平, 随后研究 LncRNA PICSAR 敲低以后对卵巢癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响, 并进一步探究 LncRNA PICSAR 可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 选取 2020 年 10 月 - 2023 年 10 月 在南京医科大学第二附属医院妇科进行手术的患者 的卵巢癌组织样本和正常卵巢组织样本各 30 份。术后病理证实卵巢癌组织标本为上皮性卵巢癌, 患者术前均未接受治疗。正常卵巢组织标本取自子宫肌瘤患者行子宫卵巢切除术。所有组织标本立即在液氮中速冻, 于 -80 °C 冰箱保存待用。本研究经南京医科大学第二附属医院伦理委员会批准, 所有参加者均签署知情同意书 (编号: 2023-KY-192-01)。

1.1.2 主要试剂与仪器 正常卵巢上皮细胞系 IOSE386 和人卵巢癌细胞系 A2780、OVCAR-3、HO-

2024-06-07 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82201779); 江苏省妇幼健康重点学科项目 (编号: FXK201712)

作者简介: 唐雪俊, 女, 硕士研究生;

应小燕, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: xi-aoyanying_cool@163.com

8910 购自北纳生物公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)以及胰酶购自美国 Gibco 公司。PBS 缓冲液、RPMI-1640 完全培养基购自 Bio-Channel 生物公司。Matrigel 基质胶、结晶紫染色液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购自上海碧云天生物技术公司。RIPA 组织细胞高效裂解液购自翼飞雪生物科技公司。蛋白酶抑制剂、雷帕霉素和羟氯喹购自美国 MCE 公司。Transwell 小室购自美国 Corning 公司。超灵敏 ECL 化学发光试剂和 4% 多聚甲醛通用型组织固定液购自 Biosharp 生物技术有限公司。TRIzol 试剂、qPCR、CCK-8 以及 RNA 逆转录试剂盒均购自诺唯赞生物公司。Hieff Trans Liposomal Transfection Reagent 脂质体核酸转染试剂和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自翊圣生物公司。山羊抗兔一抗 Bcl-2、Bax、LC3B、ATG7、Beclin-1 和 GAPDH 以及山羊抗兔 IgG 二抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。LncRNA PICSAR siRNA (5'-CACGGCCAACGTGGAGCTCTA-3') 和阴性对照 NC-siRNA (5'-CGCCGAGCCAGTGAGTCCAAT-3') 均由锐博生物公司构建。QuantStudio 7 Flex 荧光定量 PCR 仪购自赛默飞世尔科技公司, BD FACSVerser 流式细胞仪购自 BD 生物公司, Nikon 倒置显微镜购自斯高普仪器公司, BioTek 酶标仪购自睿捷生物科技公司, Tanon 全自动化学发光荧光图像购自麦高德生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 复苏 A2780、HO-8910、OVCAR-3、IOSE-386 细胞, 用添加有 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基, 放入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。按照 Hieff Trans Liposomal Transfection Reagent 脂质体核酸转染试剂说明书进行转染, 首先在 6 孔板中接种 HO-8910 细胞, 待细胞铺板密度为 90% ~ 95% 时开始转染, 以 siRNA-PICSAR 为实验组, siRNA-NC 为对照组。转染后对 siRNA 沉默效果检测时间为 24 ~ 72 h, 本实验收集转染 48 h 后的细胞用于后续实验。

1.2.2 荧光定量 PCR 实验 使用 TRIzol 试剂把卵巢癌组织和卵巢癌细胞中的总 RNA 提取出来, 将 RNA 逆转录为 cDNA。按照 qPCR 试剂盒说明书, 上机反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火与延伸 30 s, 设置 40 个循环, 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 进行 qRT-PCR。GAPDH 上下游引物序列分别为 5'-GAAGGTGAAG-GTCCGAGTC-3', 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3';

PICSAR 上下游引物序列分别为 5'-GGTGCCTCTTC-CTCAGACATCT-3', 5'-CAAGGAAAAGGACTGGGCTGG-3'; 以 GAPDH 为内参, 用 2^{-ΔΔC_T} 值表示 PICSAR 的相对表达量。

1.2.3 CCK-8 实验 使用 CCK-8 试剂盒检测转染后的不同组 HO-8910 细胞的增殖能力, 接种细胞至 96 孔板, 终体积为 100 μl, 每孔接种 2 × 10³ 个细胞。0、24、48、72、96 h 后, 避光操作, 于 96 孔板中加入 10 μl CCK-8 溶液, 放入培养箱中孵育 2 h, 然后酶标仪检测 450 nm 处的吸光值。

1.2.4 克隆形成实验 利用克隆形成实验进一步研究不同处理组的 HO-8910 细胞的增殖能力。在 6 孔板中接种 1 × 10³ 个 HO-8910 细胞, 用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基培养 10 ~ 14 d, 每 3 d 更换一次培养基, 培养期间适时观察细胞生长状况。用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 再用结晶紫染色液染色 10 min, PBS 洗涤细胞 3 次。计数染色细胞克隆形成的群落数, 然后再进行统计学分析。

1.2.5 划痕实验 细胞划痕法检测卵巢癌 HO-8910 细胞的迁移能力, 在 6 孔培养板中以每孔 2 × 10⁵ 个细胞的密度接种各组细胞, 待细胞汇合度为 90% 左右时用 10 μl 枪头比着直尺垂直沿同一方向刮伤, 于 0 h 和 24 h 后在显微镜下拍摄结果照片。

1.2.6 Transwell 实验 Transwell 法检测卵巢癌 HO-8910 细胞的侵袭能力, 用无血清培养基将预冷的基质胶稀释, 将稀释了的基底膜加入 Transwell 小室上室, 覆盖整个上室底膜, 在 37 °C 培养箱中孵育 30 min 使之形成凝胶。在下室中加入 500 μl 含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 在上室中加入 1 × 10⁵ 个细胞/孔的无血清细胞悬液。继续培养 24 ~ 48 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 加入 0.1% 结晶紫染色液染色 10 min, 然后用 PBS 洗涤 3 次, 再用棉球擦去表面细胞, 放在显微镜下观察穿过小室的细胞并拍照。

1.2.7 流式细胞术 流式细胞术检测卵巢癌 HO-8910 细胞的凋亡情况。采用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒进行细胞凋亡分析。经过 siRNA-NC 或 siRNA-PICSAR 转染后, 用 100 nmol/L 雷帕霉素或 100 nmol/L 羟氯喹处理 HO-8910 细胞 24 h。每组收取 1 × 10⁶ 个 HO-8910 细胞, 不同分组做好标记, 使用提前预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次后吸弃洗涤液。接着取 100 μl 1 × Binding Buffer 重悬各组细胞后分别加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI 染色溶液 Staining Solution 避光反应 10 ~ 15 min, 操作轻柔。最后

每管加入 400 μl 1 \times Binding Buffer 使其终体积为 500 μl , 混匀后放在冰上, 尽快使用流式细胞仪进行凋亡检测, 并通过 Flowjo 软件进行分析。

1.2.8 蛋白质印迹实验 在 HO-8910 细胞中加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂, 充分吹打, 离心后获得总蛋白质。使用 BCA 试剂盒检测蛋白质浓度后加入适量上样缓冲液, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中煮沸 10 min, 自然冷却后保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。取 20 μg 蛋白进行凝胶电泳, 然后转移到 PVDF 膜上, 把膜放入 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h。按照蛋白分子量裁出相应蛋白条带, 然后分别放入 Be1-2、Bax、LC3B、ATG7、Beclin-1 和 GAPDH(均按 1:1 000 稀释)的一抗稀释液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。TBST 洗膜 3 次后加入二抗稀释液, 室温孵育 1 h。再次洗膜 3 次后滴加超灵敏 ECL 显影液反应 30 s, 随后在成像系统上显出蛋白条带, 并使用 Image J 软件进行定量分析。

1.2.9 雷帕霉素和羟氯喹处理细胞 所购买的雷帕霉素规格为: 浓度 10 mmol/L, 用 DMSO 稀释, 羟氯喹的规格为: 浓度 10 mmol/L, 用 DEPC 水稀释。雷帕霉素和羟氯喹使用浓度均为 100 nmol/L。细胞处理时间为 24 h。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析, 所有结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间差异比较采用 t 检验, 多组间差异比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PICSAR 在上皮性卵巢癌组织中的表达与临床病理特征的关系分析 对 30 例上皮性卵巢癌患者卵巢组织中 LncRNA PICSAR 的表达与国际妇产科联盟 (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) 分期、分化程度、年龄、淋巴结转移和远处转移进行相关性分析。结果表明, 与 FIGO I、II 期相比, III、IV 期卵巢癌组织中 LncRNA PICSAR 的表达升高 ($P = 0.022$); 与高/中分化相比, 低分化卵巢癌组织中 LncRNA PICSAR 的表达升高 ($P = 0.019$); LncRNA PICSAR 的表达与患者年龄 ($P = 0.713$)、淋巴结转移 ($P = 0.263$) 和远处转移 ($P = 0.442$) 无关。见表 1。

2.2 上皮性卵巢癌组织和细胞系中 PICSAR 表达升高 如图 1A 所示, 与正常卵巢组织相比, PICSAR 在上皮性卵巢癌组织中的表达明显升高, 差异有统计学意义 ($t = 8.89, P < 0.001$)。同样, 与正常卵巢

上皮细胞系 IOSE386 相比, PICSAR 在人卵巢癌细胞系 A2780、OVCAR-3 和 HO-8910 中表达均升高 ($t = 5.17, P < 0.01$; $t = 11.59, P < 0.001$; $t = 29.79, P < 0.001$), 见图 1B。在该实验中, HO-8910 细胞的 PICSAR 表达最高, 因此选该细胞系用于后续实验。

表 1 LncRNA PICSAR 与上皮性卵巢癌临床病理特征的关系

Tab. 1 Relationship between LncRNA PICSAR and clinicopathological features of epithelial ovarian cancer

Clinicopathological parameters	Cases	PICSAR expression		P value
		Low	High	
FIGO stage				0.022
I - II	11	8	3	
III - IV	19	5	14	
Degree of differentiation				0.019
High/medium differentiation	9	7	2	
Poorly differentiated	21	6	15	
Age (years)				0.713
≤ 55	13	7	6	
> 55	17	7	10	
Lymphatic invasion				0.263
No	18	11	7	
Yes	12	4	8	
Distant metastasis				0.442
No	20	12	8	
Yes	10	4	6	

2.3 HO-8910 细胞转染 PICSAR 小干扰 RNA 敲低效果 与对照组相比, 经过转染 PICSAR 小干扰 RNA 后 HO-8910 细胞中 PICSAR 表达明显减少, 差异有统计学意义 ($t = 16.11, P < 0.001$), 见图 2A, 结果表明敲低成功, PICSAR 小干扰 RNA 可有效抑制 HO-8910 细胞中 PICSAR 的表达。

2.4 PICSAR 敲低抑制 HO-8910 细胞增殖 如图 2B, CCK-8 实验结果显示, 在 4 d 时间里, 实验组 HO-8910 细胞的吸光度值低于对照组 ($t = 13.42, P < 0.001$), 表明敲低 PICSAR 抑制了 HO-8910 细胞的增殖活性。克隆形成实验结果显示, PICSAR 敲低后, 细胞的克隆形成数目明显减少 ($t = 6.67, P < 0.01$), 见图 2C, 表明 PICSAR 敲低抑制了 HO-8910 细胞的增殖能力。

2.5 PICSAR 敲低抑制 HO-8910 细胞迁移和侵袭能力 划痕实验显示, PICSAR 敲低后 HO-8910 细胞迁移率明显变小, 差异有统计学意义 ($t = 4.29, P < 0.05$), 见图 3A, 表明 PICSAR 敲低后能够减弱 HO-8910 细胞的迁移能力。同样, Transwell 实验显示, PICSAR 敲低后 HO-8910 细胞侵袭数明显变少,

表明 PICSAR 敲低以后 HO-8910 细胞的侵袭能力明显减弱($t = 9.65, P < 0.001$)。

2.6 PICSAR 敲低促进 HO-8910 细胞凋亡 如图 4A 所示,与对照组相比,PICSAR 敲低提高了 HO-8910 细胞的凋亡率($t = 19.47, P < 0.001$)。此外,

蛋白质印迹实验结果显示,PICSAR 敲低后抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显减少($t = 28.47, P < 0.001$),而促凋亡蛋白 Bax 表达明显增多($t = 10.37, P < 0.001$) (图 4C)。结果表明 PICSAR 敲低促进了卵巢癌 HO-8910 细胞凋亡。

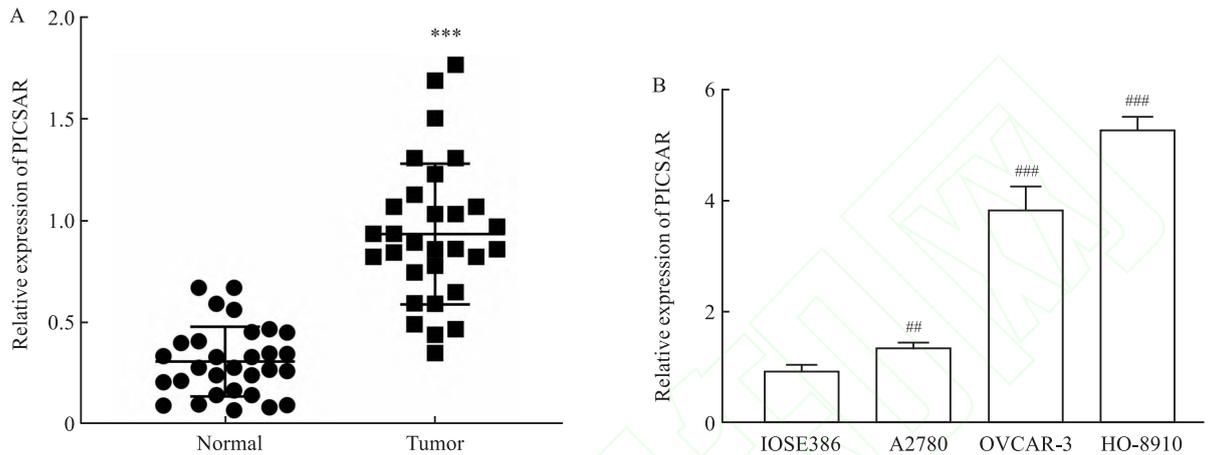


图 1 PICSAR 在上皮性卵巢癌中表达升高

Fig. 1 PICSAR expression is elevated in epithelial ovarian cancer

A: qRT-PCR was used to detect the expression level of PICSAR in epithelial ovarian cancer and normal ovarian tissue; B: The expression levels of PICSAR in epithelial ovarian cancer cell line and normal ovarian epithelial cell line IOSE386 was detected by qRT-PCR; *** $P < 0.001$ vs normal ovarian tissue; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs IOSE386 cells.

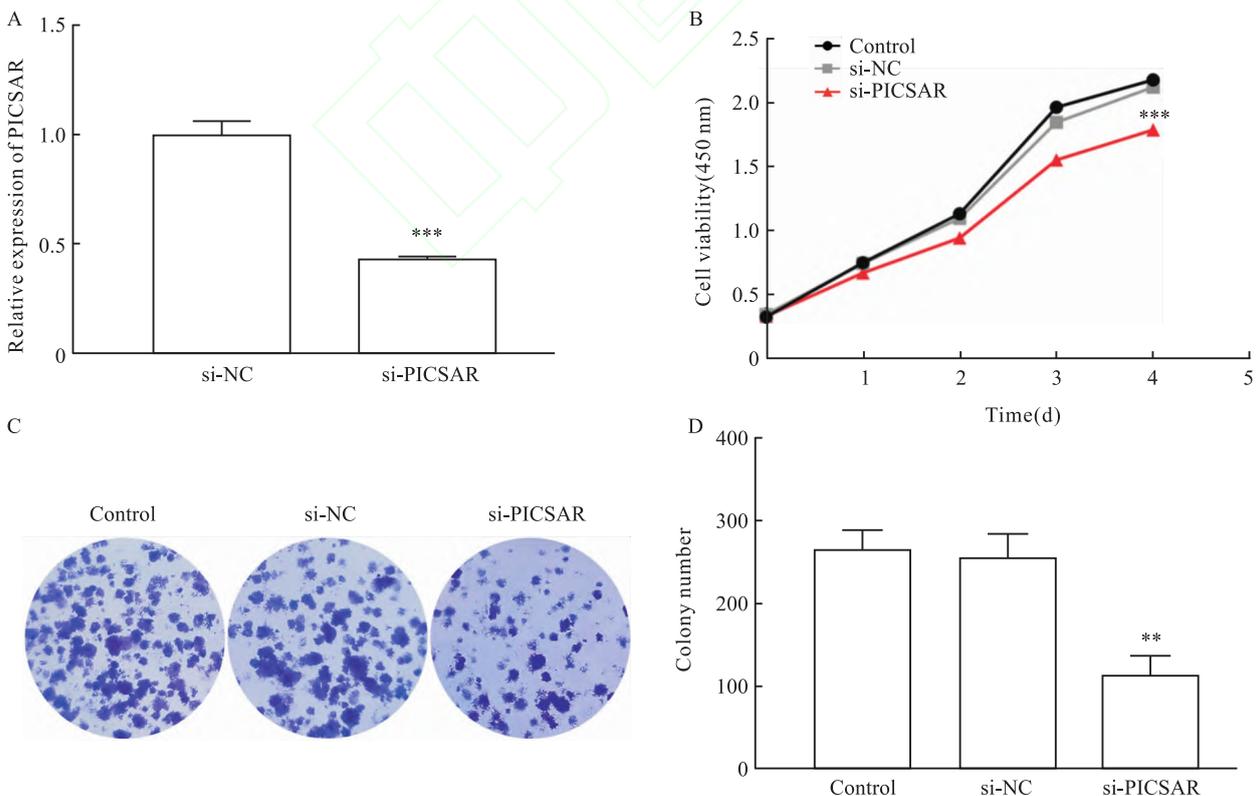


图 2 敲低 PICSAR 对卵巢癌细胞增殖能力的影响

Fig. 2 Effect of PICSAR knockdown on proliferation of ovarian cancer cells

A: qRT-PCR was used to detect the knockdown effect of PICSAR; B: Results of CCK-8 experiment; C: Clone formation experiment results by crystal violet staining $\times 20$; D: Comparison of number of clones formed; * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs si-NC group.

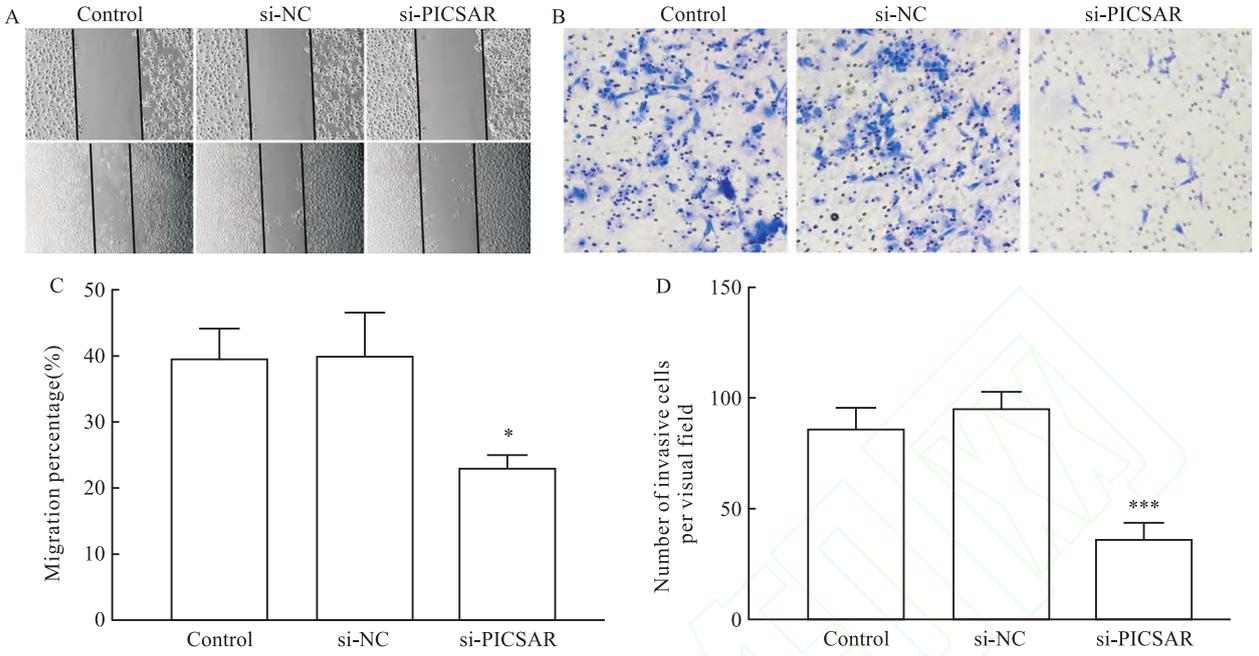


图3 敲低 PICSAR 对卵巢癌细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.3 Effects of PICSAR knockdown on migration and invasion of ovarian cancer cells

A: Scratch test results $\times 10$; B: Analysis of cell mobility rate; C: Transwell results by crystal violet staining $\times 40$; D: Statistical histogram; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs si-NC group.

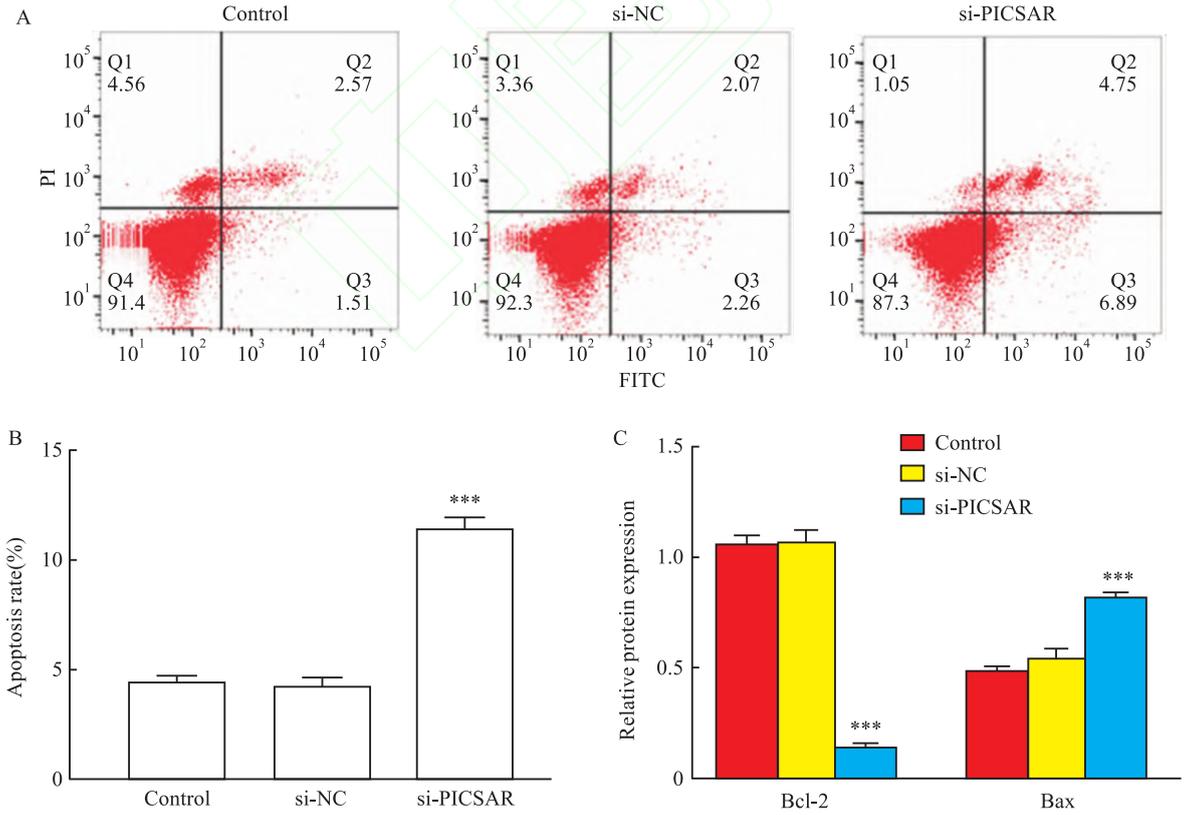
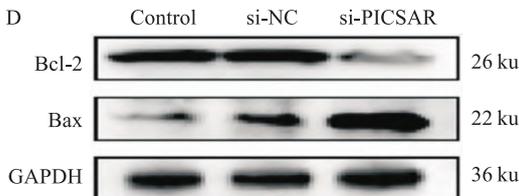


图4 敲低 PICSAR 对卵巢癌细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of PICSAR knockdown on apoptosis of ovarian cancer cells

A: Flow cytometry results; B: Cell apoptosis rate analysis; C: Statistical analysis of relative protein expression; D: Western blot detection of apoptosis-related proteins expression; *** $P < 0.001$ vs si-NC group.



2.7 PICSAR 敲低抑制 HO-8910 细胞自噬 根据 Western blot 实验(图 5)结果,PICSAR 敲低显著减少了自噬主要相关蛋白 ATG7、Beclin-1 和 LC3B 的表达水平($t = 10.05, P < 0.001$; $t = 12.04, P < 0.001$; $t = 9.92, P < 0.001$)。因此,PICSAR 可能参与卵巢癌细胞自噬。

2.8 PICSAR 敲低后调节 HO-8910 细胞内自噬水平对细胞凋亡的影响 如图 6A,雷帕霉素可显著提高 PICSAR 敲低后 HO-8910 细胞中 ATG7、Beclin-1 和 LC3B 的蛋白水平($t = 17.63, P < 0.001$; $t = 30.70, P < 0.001$; $t = 15.57, P < 0.001$),而羟氯喹降低了 ATG7、Beclin-1 和 LC3B 的蛋白水平($t = 6.83, P < 0.01$; $t = 4.74, P < 0.01$; $t = 8.08, P < 0.01$),表明通过雷帕霉素或羟氯喹可以调节 HO-8910 细胞的自噬水平。通过 Western blot 实验表明 PICSAR 敲低后,加入雷帕霉素增加了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的水平($t = 10.41, P < 0.001$),降低了凋亡蛋白 Bax 的水平($t = 22.79, P < 0.001$)。然而,PICSAR 敲低后,加入羟氯喹对 HO-8910 细胞的作用是相反的(图 6B)。这些结果表明,在 PICSAR 敲低后,激活 HO-8910 细胞内自噬可抑制细胞凋亡,而抑制 HO-8910 细胞内自噬可促进细胞凋亡。LncRNA PICSAR 敲低可能是通过调节自噬促进卵巢癌细胞凋亡。

3 讨论

研究^[7]表明 lncRNA 在细胞中广泛存在,许多 lncRNA 在细胞生物学活动中起着至关重要的作用,如参与调控细胞的增殖迁移、自噬和细胞凋亡等。lncRNA 的异常表达与自身免疫病、心血管疾病、肿瘤等多种疾病的发生发展有关^[8]。研究^[9-10]

显示卵巢癌发生发展的分子机制与非编码 RNA 有关,尤其是 lncRNA。NRSN2-AS1、CRNDE、KC-NQ10T1 等 lncRNA 已被研究证实可影响卵巢癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡等生物学行为,在卵巢癌的发生、发展中起到重要作用。然而,参与卵巢癌发生和发展的关键 lncRNA 仍未完全掌握。

已有的研究^[11-12]表明,lncRNA PICSAR 在肝细胞癌和皮肤鳞状细胞癌中表达显著升高,下调 PICSAR 可抑制肝癌细胞和皮肤鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并促进细胞凋亡。lncRNA PICSAR 是一种肿瘤促进因子。然而,PICSAR 在卵巢癌中的表达和功能尚不明确。根据该研究结果,与正常卵巢组织和细胞系相比,PICSAR 在卵巢癌组织和细胞系中的表达显著升高,表明 PICSAR 在卵巢癌中可能发挥促癌功能,与上述的研究报道一致。该研究通过克隆形成实验、CCK-8 实验、划痕实验以及 Transwell 实验证实,PICSAR 敲低可抑制卵巢癌 HO-8910 细胞增殖、迁移和侵袭能力。该研究结果显示,lncRNA PICSAR 作为促癌因子在上皮性卵巢癌的发生发展中可能发挥重要作用。

细胞凋亡在疾病发展中具有重要作用。然而,细胞凋亡并不是决定细胞命运的唯一因素。自噬已被证明与细胞凋亡有复杂的相互作用关系,并被证明可根据不同的细胞微环境促进细胞存活或死亡^[13]。有研究^[14]显示,抑制自噬可降低卵巢癌细胞活性并诱导细胞凋亡。该研究中,PICSAR 敲低促进了 HO-8910 细胞凋亡,此外,该研究还发现 PICSAR 的下调抑制了自噬相关蛋白(包括 ATG7、Beclin-1 和 LC3B)的表达。为了研究自噬对卵巢癌细胞凋亡的影响,本研究通过雷帕霉素或羟氯喹来调节 HO-8910 细胞的自噬水平。Western blot 实验结

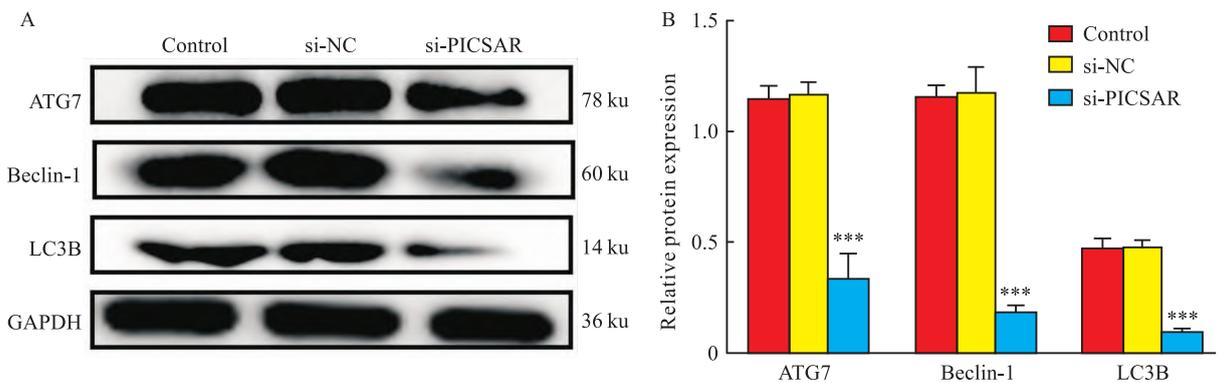


图 5 敲低 PICSAR 对卵巢癌细胞自噬的影响

Fig. 5 Effect of PICSAR knockdown on autophagy of ovarian cancer cells

*** $P < 0.001$ vs si-NC group

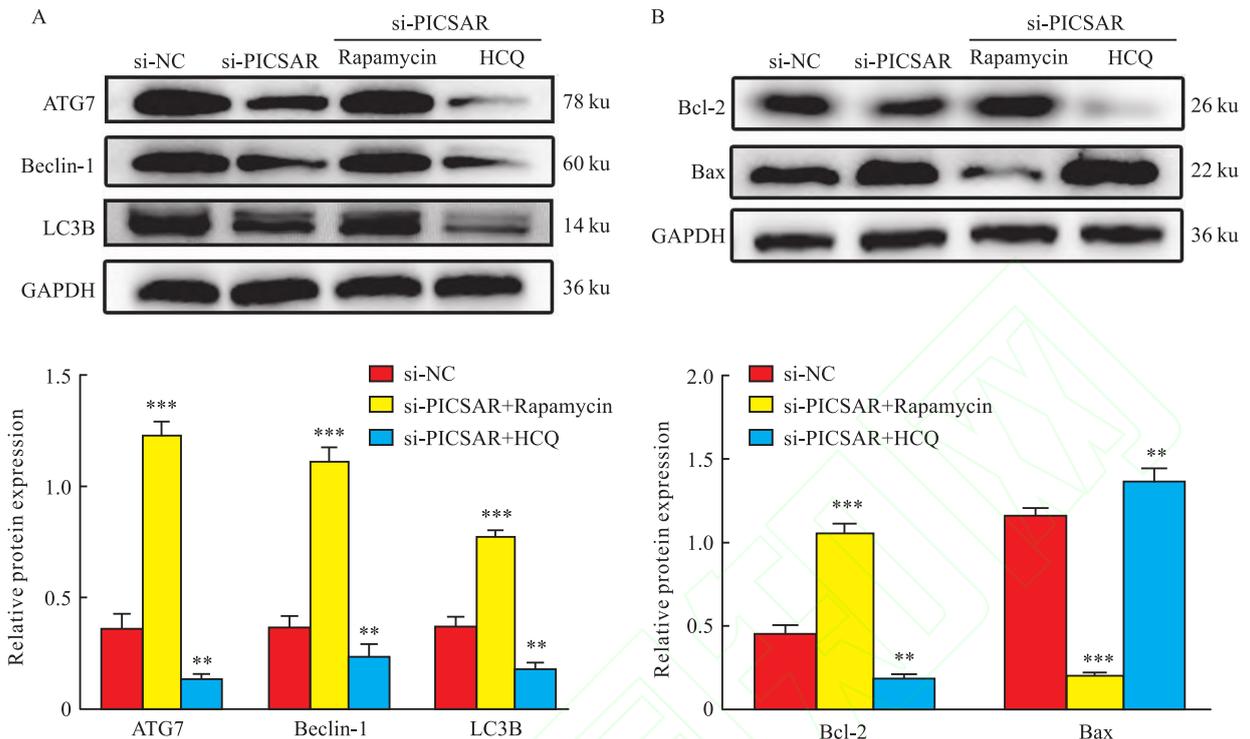


图6 敲低 PICSAR 后卵巢癌细胞自噬对细胞凋亡的调控作用

Fig. 6 The regulatory effect of autophagy on apoptosis of ovarian cancer cells after PICSAR knockdown

A: The expression levels of ATG7, Beclin-1 and LC3B in cells of each group were measured by Western blot; B: The expression levels of Bcl-2 and Bax in each group were detected by Western blot; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs si-NC group.

果表明,雷帕霉素激活自噬可显著减少 HO-8910 细胞凋亡,而羟氯喹抑制自噬可增加细胞凋亡。PICSAR 的下调对细胞凋亡有促进作用,对细胞自噬有抑制作用。激活自噬可减少 PICSAR 敲低诱导的细胞凋亡,而抑制自噬可增加卵巢癌细胞的凋亡。

综上所述,PICSAR 在卵巢癌组织及细胞系中高表达,PICSAR 敲低抑制卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡。PICSAR 敲低可能是通过调节自噬促进卵巢癌细胞凋亡。PICSAR 可能是卵巢癌治疗的潜在靶点,本研究为 LncRNA PICSAR 在卵巢癌靶向治疗的应用研究提供了参考。本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 LncRNA PICSAR 通过自噬调节细胞凋亡的作用机制。

参考文献

[1] Tossetta G, Inversetti A. Ovarian cancer: Advances in pathophysiology and therapies[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 8930. doi: 10.3390/ijms24108930.

[2] Herman A B, Tsitsipatis D, Gorospe M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation [J]. Mol Cell, 2022, 82(12): 2252-66. doi:10.1016/j.molcel.2022.05.027.

[3] Wang J Y, Lu A Q, Chen L J. LncRNAs in ovarian cancer[J]. Clin Chim Acta, 2019, 490: 17-27. doi:10.1016/j.cca.2018.12.013.

[4] Lv J P, Zhang W, Wang Y H. Long non-coding RNA PICSAR serves as a non-invasive biomarker for the diagnosis and prognosis of cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Clin Exp Med, 2021, 21(4): 579-86. doi:10.1007/s10238-021-00721-z.

[5] Xu S X, Liu D Z, Chang T H, et al. Cuproptosis-associated lncRNA establishes new prognostic profile and predicts immunotherapy response in clear cell renal cell carcinoma[J]. Front Genet, 2022, 13: 938259. doi:10.3389/fgene.2022.938259.

[6] Bi X, Guo X H, Mo B Y, et al. LncRNA PICSAR promotes cell proliferation, migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes by sponging miRNA-4701-5p in rheumatoid arthritis [J]. EBio-Medicine, 2019, 50: 408-20. doi:10.1016/j.ebiom.2019.11.024.

[7] Rinn J L, Chang H Y. Long Noncoding RNAs: Molecular modalities to organismal functions[J]. Annu Rev Biochem, 2020, 89: 283-308. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-012708.

[8] Du B, Tang L, Liu L, et al. Predicting lncRNA-disease association based on generative adversarial network[J]. Curr Gene Ther, 2022, 22(2): 144-51. doi: 10.2174/1566523221666210506131055.

[9] Wu Y B, Li S Y, Liu J Y, et al. Long non-coding RNA NRSN2-AS1 promotes ovarian cancer progression through targeting PTK2/

- β -catenin pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2023,14(10):696. doi: 10.1038/s41419-023-06214-z.
- [10] Jin Y P, Qiu J P, Lu X F, et al. LncRNA CACNA1G-AS1 up-regulates FTH1 to inhibit ferroptosis and promote malignant phenotypes in ovarian cancer cells[J]. *Oncol Res*, 2023,31(2):169-79. doi:10.32604/or.2023.027815.
- [11] Liu Z, Mo H Y, Sun L K, et al. Long noncoding RNA PICSAR/miR-588/EIF6 axis regulates tumorigenesis of hepatocellular carcinoma by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Cancer Sci*, 2020,111(11):4118-28. doi:10.1111/cas.14631.
- [12] Lu X Y, Gan Q, Gan C B, et al. Long non-coding RNA PICSAR knockdown inhibits the progression of cutaneous squamous cell carcinoma by regulating miR-125b/YAP1 axis[J]. *Life Sci*, 2021,274:118303. doi:10.1016/j.lfs.2020.118303.
- [13] Chen R C, Zou J, Zhong X, et al. HMGB1 in the interplay between autophagy and apoptosis in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2024,581:216494. doi:10.1016/j.canlet.2023.216494.
- [14] Nokhostin F, Azadehrah M, Azadehrah M. The multifaced role and therapeutic regulation of autophagy in ovarian cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2023,25(5):1207-17. doi:10.1007/s12094-022-03045-w.

Effect and mechanism of LncRNA PICSAR knockdown on proliferation, migration and apoptosis of ovarian cancer cells

Tang Xuejun, Dou Xiaowei, Ying Xiaoyan

(Dept of Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003)

Abstract Objective To investigate the expression of long non-coding RNA (LncRNA) PICSAR in ovarian cancer, and explore the effects of LncRNA PICSAR on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of ovarian cancer cells as well as its possible mechanism of action. **Methods** The expression levels of LncRNA PICSAR in ovarian cancer tissue and cell line A2780, OVCAR-3, HO-8910 and normal ovarian tissue and cell line IOSE386 were detected by fluorescence quantitative PCR. Ovarian cancer cell lines with the highest expression of LncRNA PICSAR were divided into control group and experimental group, and transfected with negative control small interfering RNA (siRNA-NC) or PICSAR knockout small interfering RNA (siRNA-PICSAR) by liposome transfection technique, respectively. The effects of LncRNA PICSAR knockdown on the invasion, migration, proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells were analyzed by cell counting assay (CCK-8), clonogenic assay, scratch assay, transwell assay and flow cytometry and so on. The expression levels of autophagy related proteins and apoptosis-related proteins in each group were determined by Western blot. Ovarian cancer cells were treated with rapamycin and hydroxychloroquine as autophagy activator and inhibitor, and Western blot assay was used to detect apoptosis. **Results** The expression level of LncRNA PICSAR in ovarian cancer tissues was higher than that in normal ovarian tissues. Compared with IOSE386 cell line, LncRNA PICSAR expression levels in ovarian cancer cell lines HO-8910, OVCAR-3 and A2780 increased. Compared with the si-NC group, the proliferation, invasion and migration ability of ovarian cancer cells in si-PICSAR group decreased, and the apoptosis rate increased. The autophagy level of ovarian cancer cells in si-PICSAR group was lower than that in si-NC group. After transfection with siRNA-PICSAR, rapamycin activated autophagy to reduce apoptosis, while hydroxychloroquine inhibited autophagy to promote apoptosis. **Conclusion** LncRNA PICSAR is highly expressed in ovarian cancer tissues and cell lines, and the malignant biological behavior of ovarian cancer cells can be inhibited by knockout of LncRNA PICSAR. The knockdown of LncRNA PICSAR may promote the apoptosis of ovarian cancer cells by regulating autophagy.

Key words ovarian cancer; long noncoding RNA; PICSAR; proliferation; apoptosis; autophagy

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82201779); Key Discipline Project of Maternal and Child Health in Jiangsu Province (No. FXK201712)

Corresponding author Ying Xiaoyan, E-mail: xiaoyanying_cool@163.com