

网络出版时间: 2025-03-17 18:24:58 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250314.1613.006>

LncRNA PXN-AS1 对胃癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响

刘刚, 刘东涛, 赵伟, 何涛, 张媛
(宁夏医科大学总医院胃肠外科, 银川 750004)

摘要 目的 探讨 LncRNA PXN-AS1(简称 PXN-AS1)在胃癌组织中的表达水平及其对胃癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响,并阐述其可能的调控机制。方法 收集 43 例胃癌患者的胃癌组织及癌旁组织,采用 qRT-PCR 法检测胃癌组织中 PXN-AS1 和 miR-125a-5p 表达水平,并分析 PXN-AS1 表达水平与胃癌患者临床病理参数的关系;采用 Pearson 法分析胃癌组织 PXN-AS1 和 miR-125a-5p 的相关性。将 PXN-AS1 siRNA 质粒(si-PXN-AS1)及阴性对照质粒(si-NC)与 miR-125a-5p inhibitor(inhibitor)及阴性对照 miRNA 抑制剂(inhibitor NC)分别或同时共转染至 HGC-27 细胞中,分为 si-NC 组、si-PXN-AS1 组、si-PXN-AS1 + inhibitor NC 组、si-PXN-AS1 + inhibitor 组,另设立空白对照组(blank 组)。采用 qRT-PCR 法检测各组细胞中 PXN-AS1 和 miR-125a-5p 表达水平;CCK-8 法检测各组细胞的增殖水平;EdU 实验检测各组细胞增殖情况;Transwell 实验检测各组细胞迁移及侵袭能力;流式细胞术检测各组细胞的凋亡水平;双荧光素酶报告基因系统验证 PXN-AS1 海绵吸附 miR-125a-5p 并调控其表达水平。应用生物信息学筛选 miR-125a-5p 下游靶基因,并进行 GO 和 KEGG 富集分析。结果 与癌旁组织比较,胃癌组织中 PXN-AS1 表达水平明显升高,而 miR-125a-5p 表达水平明显降低(均 $P < 0.05$),PXN-AS1 和 miR-125a-5p 呈负相关($r = -0.452, P = 0.002$)。此外, PXN-AS1 高表达的胃癌患者淋巴结转移阳性和低分化比例明显增高(均 $P < 0.05$)。与 blank 组和 si-NC 组比较, si-PXN-AS1 组 HGC-27 细胞中 PXN-AS1 表达水平、细胞增殖能力、细胞迁移和侵袭数量明显降低(均 $P < 0.05$),而细胞凋亡水平明显升高($P < 0.05$)。双荧光素酶报告系统结果显示,在 HGC-27 细胞中 PXN-AS1 特异性吸附 miR-125a-5p。敲低 miR-125a-5p 可逆转沉默 PXN-AS1 对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用,对细胞凋亡的促进作用。生信分析结果显示, miR-125a-5p 的下游靶基因可以参与多种生物过程,包括 DNA 损伤、T 细胞凋亡和分化、RNA 代谢合成过程及信号转导。此外, 其还参与 HIF-1 信号通路、JAK-STAT 信号通路以及细胞凋亡等信号通路。结论 PXN-AS1 在胃癌中表达上调,并且作为 miR-125a-5p 的竞争性海绵,促进胃癌细胞 HGC-27 的增殖、迁移和侵袭能力,抑制细胞凋亡。

关键词 LncRNA PXN-AS1; 胃癌; 增殖; 迁移和侵袭; PXN-AS1/miR-125a-5p 轴

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)03-0430-10

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.007

胃癌是全球主要的公共卫生问题,2020 年全球新发病例近 109 万,发病率居全球第五,病死率居第四^[1]。其发生与遗传因素、环境因素及幽门螺杆菌感染等密切相关^[2]。尽管手术切除联合新辅助化疗是当前的标准治疗方案^[3],但晚期胃癌患者的生存率仍未显著提高,主要原因在于癌细胞的侵袭与转移机制尚未被充分阐明。因此,揭露胃癌侵袭转移的分子机制对于开发新的治疗策略至关重要。长链非编码 RNA(long noncoding RNAs, lncRNAs)在多种癌症的发生发展中发挥重要作用^[4],可调控肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等生物学行为^[5]。LncRNA

PXN-AS1(简称 PXN-AS1)在不同癌症中呈现异质性作用,如在肝细胞癌中促进肿瘤进展^[6],而在胰腺癌中发挥抑癌作用^[7]。然而, PXN-AS1 在胃癌中的表达及其功能尚不明确。因此,该研究旨在探讨 PXN-AS1 在胃癌组织及细胞系中的表达情况,并通过体外实验分析其对胃癌细胞生物学功能的影响及潜在机制,以期作为胃癌的潜在生物标志物和治疗靶点提供可靠数据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集于宁夏医科大学总医院接受手术的 43 例胃癌患者的胃癌组织和邻近非癌性胃组织(癌旁组织)。男性 30 例,女性 13 例,平均年龄(61.27 ± 11.40)岁。纳入标准:① 经过病理学确诊为胃癌;② 术前未进行任何放化疗或其他靶向药物治疗;③ 临床资料完整。排除标准:① 合并其他类型恶性肿瘤病史的患者;② 合并严重心、肝、肾功

2024-12-10 接收

基金项目:宁夏回族自治区科技厅重点研发计划项目(编号:2022BEG03154)

作者简介:刘刚,男,主治医师;

刘东涛,男,副主任医师,通信作者, E-mail: wewkliugang@163.com

能不全患者; ③ 伴有严重感染(如乙型肝炎、丙型肝炎、艾滋病)或免疫抑制患者。切除的标本经常规石蜡包埋后室温保存备用。本研究获得医院伦理委员会批准(批准号: KYLL-2021-766)。

1.2 细胞株及主要试剂 人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 人胃癌细胞系 HGC-27、MKN45、NCI-N87、SNU-1 均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; RPMI-1640 完全培养基和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒和 BeyoClick™ EdU-594 细胞增殖检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; miR-125a-5p mimic 及其阴性对照(mimic NC)、miR-125a-5p inhibitor 及其阴性对照(inhibitor NC)、si-PXN-AS1 及其阴性对照(si-NC)均购自上海 GenePharma 公司; pGL3 荧光素酶报告载体购自美国 Promega 公司; Lipofectamine 3000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒和荧光定量试剂盒均购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

1.3 细胞培养 人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 及人胃癌细胞系 HGC-27、MKN45、NCI-N87、SNU-1 均在含 10% 胎牛血清和 RPMI-1640 完全培养基中培养, 然后置于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中继续培养至细胞密度达到 80% 时, 进行后续操作。

1.4 细胞转染和分组 取对数生长期 HGC-27 细胞, 按 1.0×10^5 个/孔的细胞密度将细胞接种至 6 孔培养板中, 待细胞生长至约 80% 融合度时, 使用质粒转染试剂 Lipofectamine 3000 按照试剂制造商的说明, 将 si-PXN-AS1 或 si-NC、miR-125a-5p mimic 或 mimic NC 以及 miR-125a-5p inhibitor 或 inhibitor NC 质粒单独转染或共转染至各组 HGC-27 细胞中, 分为 blank 组、si-NC 组、si-PXN-AS1 组、si-PXN-AS1 + inhibitor 组、si-PXN-AS1 + inhibitor NC 组、mimic NC 组和 miR-125a-5p mimic 组。转染 48 h 后, 利用 qRT-PCR 法检测转染效率。

1.5 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 法检测 PXN-AS1 和 miR-125a-5p 的表达水平 利用 TRIzol 试剂提取人胃癌组织或细胞总 RNA, 使用逆转录酶将总 RNA 逆转录为 cDNA。利用快速 qPCR 试剂 TB Green® Premix Ex Taq™ II FAST qPCR 试剂盒检测组织或细胞中 PXN-AS1 和 miR-125a-5p 的表达水平, 详细实验步骤按照制造商说明书进行。引物序列为: PXN-AS1, 5'-

AAGCCCTGGGTCCGCATCA-3' 和 5'-CACTCATTTA-GAAGTAGG GAA-3'; miR-125a-5p, 5'-TATCTCAGC-CCTCAACACGAA-3' 和 5'-GGCAGAAGGCACAGAC-GAA-3'; β -actin, 5'-GGGAAATCGTGCGTGACATTA-AG-3' 和 5'-TG TGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3'; U6, 5'-GGGAAATCGTGCGTGACATTAAG-3' 和 5'-TGT-GTTGGCGTACAGGTCTTTG-3'。PCR 反应程序: 预变性 95 ℃ 反应 30 s, 变性 95 ℃ 反应 5 s, 退火 60 ℃ 反应 10 s, 变性退火循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 PXN-AS1 和 miR-125a-5p 的相对表达水平。

1.6 CCK-8 法检测各组细胞增殖水平 取各组对数生长期 HGC-27 细胞, 按 2×10^4 个/孔的浓度将细胞接种于 96 孔细胞培养板中培养 24、48、72、96 h。每组细胞设置 6 个重复孔, 每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 继续置于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 4 h。取出细胞培养板, 利用酶标仪测定每孔溶液在 450 nm 波长处的吸光度(optical density, OD)。细胞增殖活性(%) = $(OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.7 乙基脱氧尿苷(ethynyl deoxyuridine, EdU) 法检测各组细胞增殖水平 取各组 HGC-27 细胞, 将细胞浓度调整为 1×10^4 个/孔, 加入 100 μ l 含 50 μ mol/L EdU 细胞培养基于 37 ℃ 孵育 2 h。1 638 r/min 室温离心 5 min, 弃上清液。将含有 1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 的 PBS 溶液加入并重悬细胞, 混匀后 1 638 r/min 室温离心 5 min, 弃上清液。加入 100 μ l 含 4% 多聚甲醛的 PBS 溶液重悬细胞, 充分混匀后室温避光孵育 15 min。用 100 μ l 含 3% BSA 的 PBS 溶液重悬细胞, 重复 2 次后, 加入 100 μ l 含 0.3% TritonX-100 的 PBS 溶液混匀, 室温孵育 20 min。加入 100 μ l 含 3% BSA 的 PBS 溶液重悬细胞, 重复 2 次。去除孔中洗涤液后, 加入 100 μ l Click 反应液, 室温避光孵育 30 min。1 638 r/min 室温离心 5 min, 弃上清液。加入 100 μ l 含 3% BSA 的 PBS 溶液洗涤细胞 3 次后, 去除洗涤液, 加入 $1 \times$ Hoechst 33342 室温避光孵育 10 min 后, 去除染色液, 加入 100 μ l 含 3% BSA 的 PBS 溶液洗涤细胞 3 次, 使用荧光显微镜采集 EdU/Hoechst 33342 荧光信号。

1.8 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平 取出各组 HGC-27 细胞, 将细胞浓度调整为 1×10^5 个/孔, 接种于 6 孔细胞培养板中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h。加入不含 EDTA 的胰蛋白酶消化液消化细胞。当贴壁细胞可以轻轻吹打下来

时,吸去消化液,加入细胞培养终止液终止消化。4 230 r/min 室温下离心 5 min 收集细胞,然后加入 4 ℃ 预冷的 PBS 溶液洗涤细胞 2 次。收集细胞后,加入 500 μ l 结合缓冲液重悬细胞。分别加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 PI,轻轻吹打混匀后,室温避光孵育 15 min,1 h 内使用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡水平。

1.9 Transwell 法检测各组细胞迁移和侵袭能力 将细胞浓度调整为 5×10^4 个/孔,接种至含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基溶液中,然后在 24 孔 Transwell 小室中进行迁移实验。另外,将细胞接种至涂有 Matrigel 胶的 24 孔 Transwell 小室中进行侵袭实验。将进行细胞迁移和侵袭实验的 Transwell 小室分别置于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h 和 48 h。取出 Transwell 小室,加入甲醛固定细胞,然后加入 0.1% 结晶紫染色 10 min,加入预冷的 PBS 溶液洗涤 2 次后,在显微镜下观察视野内发生迁移或侵袭的细胞数量。

1.10 双荧光素酶报告系统检测 PXN-AS1 和 miR-125a-5p 的靶向关系 利用在线软件 starBase v2.0 寻找 PXN-AS1 与 miR-125a-5p 的结合位点。将含有 miR-125a-5p 结合位点和突变结合序列的 PXN-AS1 野生型 3'UTR 克隆到 pSI-Check2 质粒中,分别标记为 PXN-AS1-WT 和 PXN-AS1-MUT。在人胃癌细胞 HGC-27 细胞中共转染 3'UTR 荧光素酶报告基因构建物 (PXN-AS1-WT 和 PXN-AS1-MUT) 和 miRNA (miR-125a-5p 阴性对照和 miR-125a-5p mimic)。转染 48 h 后,根据双荧光素酶报告基因测定试剂盒操作说明,使用酶标仪测定上述基团的荧光素酶活性,以检测 PXN-AS1 与 miR-125a-5p 的结合关系。

1.11 miR-125a-5p 下游靶基因的生信分析 使用在线数据库 miRDB、miRWalk 和 Mirtarbase 分别预测 miR-125a-5p 的靶基因集合,取 3 个靶基因集合的交集后,利用基因本体 (gene ontology, GO) 在线分析网站对筛选出的交集靶基因进行生理功能富集分析,然后再利用京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库对筛选出的交集靶基因进行信号通路富集分析。

1.12 统计学处理 所有数据均使用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。采用 Shapiro-Wilk 检验计量数据是否符合正态分布。计量数据若符合则以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组组间差异比较采用单因素方差检测,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验分析;若不符合则以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用非参数秩和检验。计数数

据采用 $n(\%)$ 表示,组间比较采用卡方检验。利用 Lnc2cancer 3.0 数据库分析 PXN-AS1 在人胃癌组织中的表达水平。采用 Pearson 法分析人胃癌组织中 PXN-AS1 和 miR-125a-5p 的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PXN-AS1 在人胃癌组织及细胞系中高表达 与正常胃组织比较,人胃癌组织中 PXN-AS1 基因的表达水平明显上调 ($P < 0.05$, 图 1A)。与癌旁组织比较,胃癌组织中 PXN-AS1 基因的表达水平明显升高 ($Z = 7.591, P < 0.05$, 图 1B)。与人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 比较,人胃癌细胞系 HGC-27、MKN45、NCI-N87、SNU-1 中 PXN-AS1 基因表达水平均明显升高 ($t = 29.367, 11.167, 16.598, 63.934$, 均 $P < 0.05$, 图 1C)。其中, HGC-27 细胞中 PXN-AS1 基因的表达水平最高。因此,选择 HGC-27 细胞作为后续研究的对象。

2.2 PXN-AS1 表达水平与胃癌患者病理参数的关系 如表 1 所示,与 PXN-AS1 低表达组比较, PXN-AS1 高表达组的胃癌患者淋巴结转移阳性比例 (83.3% vs 52.6%) 和低分化比例 (88.0% vs 55.6%) 显著升高 ($\chi^2 = 4.739, 5.787$, 均 $P < 0.05$), 而年龄、

表 1 PXN-AS1 表达与胃癌患者临床病理特征的关系 ($n = 43$)

Tab. 1 Relationship between PXN-AS1 expression levels and clinicopathological features of gastric cancer patients ($n = 43$)

Features	PXN-AS1 expression		χ^2	<i>P</i> value
	High	Low		
Gender				
Male	16	14	0.248	0.619
Femal	8	5		
Age(year)				
≤ 60	7	8	1.835	0.176
> 60	19	9		
Tumor diameter(cm)				
≤ 5	10	9	0.512	0.474
> 5	10	14		
Differentiation				
Well/Moderate	3	8	5.787	0.016
Poor	22	10		
Lymph node metastasis				
Yes	20	10	4.739	0.029
No	4	9		
TNM				
I	3	3	2.330	0.507
II	8	7		
III	8	6		
IV	2	6		

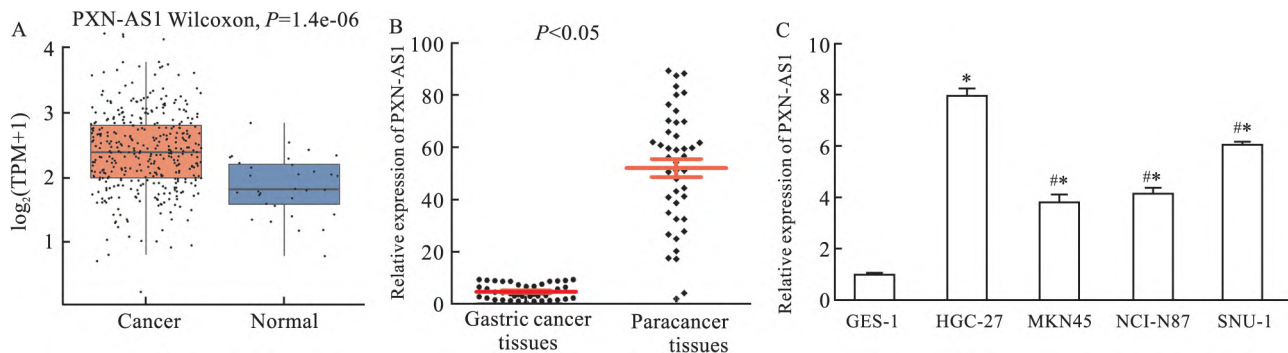


图1 PXN-AS1 在人胃癌组织和细胞系中的表达水平

Fig. 1 The expression level of PXN-AS1 in human gastric cancer tissues and cell lines

A: The expression level of PXN-AS1 in human gastric cancer tissues was analyzed in Lnc2cancer 3.0 database; B: The expression level of PXN-AS1 in gastric cancer tissues and adjacent tissues of clinical gastric cancer patients was detected by qRT-PCR; C: The expression level of PXN-AS1 in human gastric mucosal epithelial cell line GES-1 and various gastric cancer cell lines was detected by qRT-PCR; * $P < 0.05$ vs GES-1 cells; # $P < 0.05$ vs HGC-27 cells.

性别、肿瘤直径和 TNM 分期的组间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.3 沉默 PXN-AS1 对胃癌细胞增殖、侵袭及凋亡的影响 与 blank 组或 si-NC 组比较, si-PXN-AS1 组 HGC-27 细胞中 PXN-AS1 基因表达水平、细胞增殖能力及细胞迁移和侵袭数量明显降低, 而细胞凋亡水平明显升高(均 $P < 0.05$)。见图 2~5。

2.4 PXN-AS1 可海绵吸附 miR-125a-5p 并调控其表达 与癌旁组织比较, 胃癌组织中 miR-125a-5p 的表达水平明显降低($Z = 7.603, P < 0.05$)。Pearson 相关性分析表明, 43 例胃癌患者的癌组织中 PXN-AS1 与 miR-125a-5p 的表达水平呈负相关($r = -0.451, P = 0.002$)。在 PXN-AS1 WT 中, 与

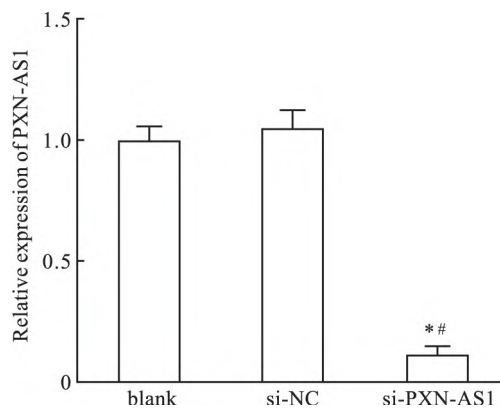


图2 构建沉默 PXN-AS1 胃癌 HGC-27 细胞

Fig. 2 Construction of silent PXN-AS1 gastric cancer HGC-27 cells

* $P < 0.05$ vs blank group; # $P < 0.05$ vs si-NC group.

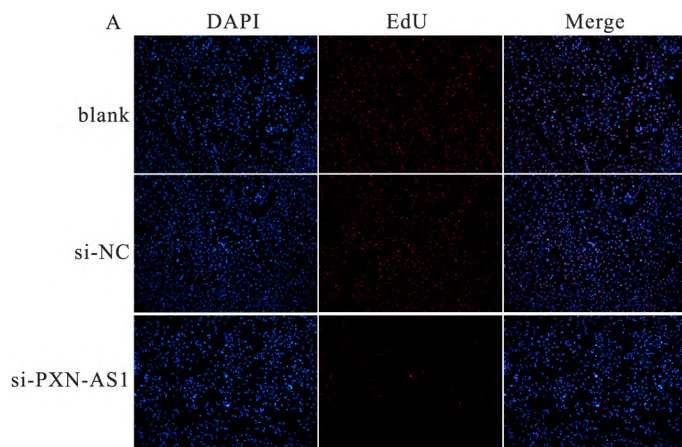
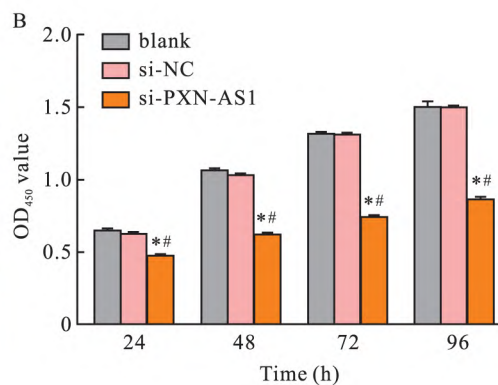


图3 沉默 PXN-AS1 对胃癌 HGC-27 细胞增殖能力的影响

Fig. 3 Effect of silencing PXN-AS1 on proliferation of gastric cancer HGC-27 cells

A: Cell proliferation detected by EdU $\times 100$; B: CCK-8 was used to detect cell proliferation activity; * $P < 0.05$ vs blank group; # $P < 0.05$ vs si-NC group.



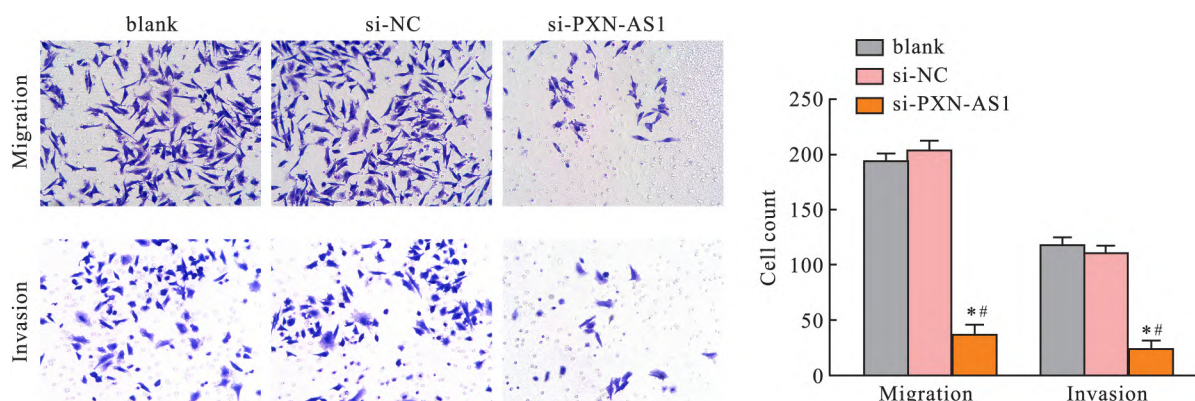


图4 沉默PXN-AS1对胃癌HGC-27细胞迁移及侵袭能力的影响 ×200

Fig. 4 Effect of PXN-AS1 silencing on the migration and invasion ability of gastric cancer HGC-27 cells ×200

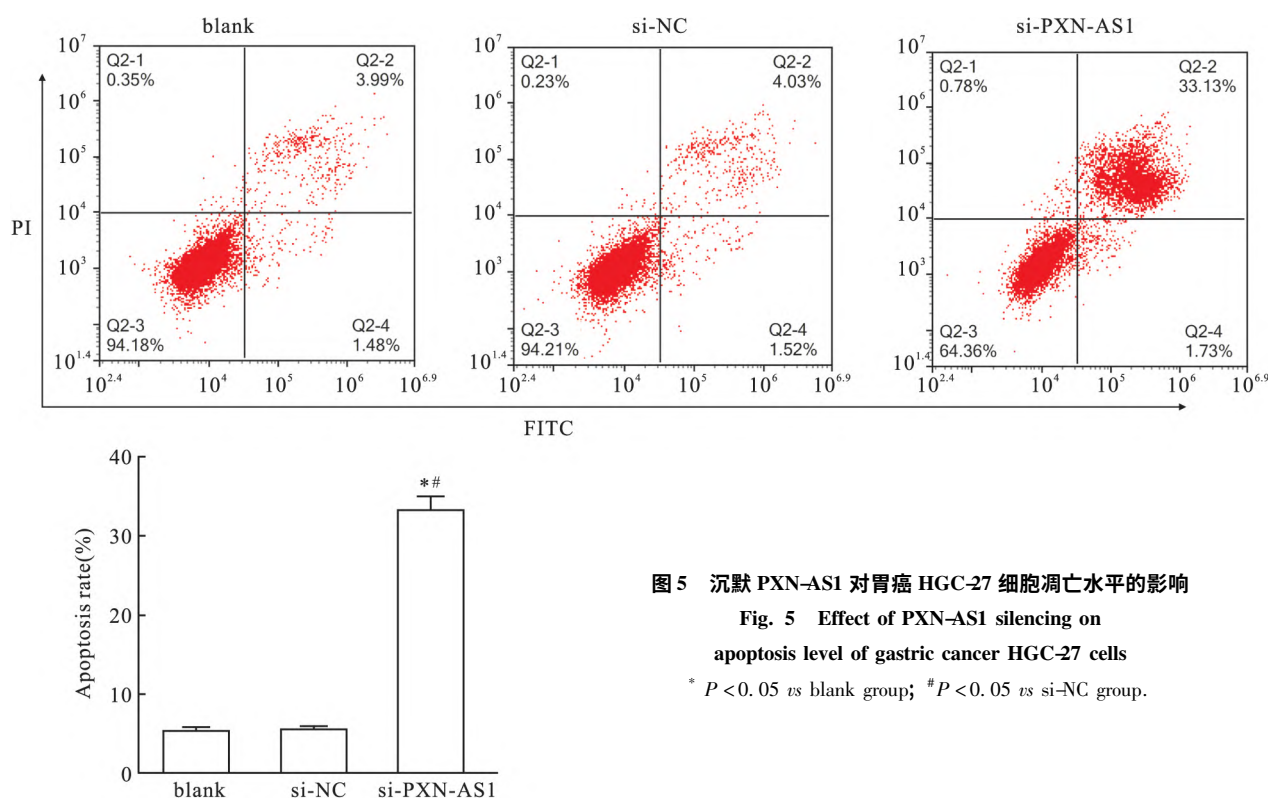
* $P < 0.05$ vs blank group; [#] $P < 0.05$ vs si-NC group.

图5 沉默PXN-AS1对胃癌HGC-27细胞凋亡水平的影响

Fig. 5 Effect of PXN-AS1 silencing on apoptosis level of gastric cancer HGC-27 cells

* $P < 0.05$ vs blank group; [#] $P < 0.05$ vs si-NC group.

NC mimic 组比较, miR-125a-5p mimic 组双荧光素酶活性显著降低 ($t = 19.701, P < 0.05$); 而在 PXN-AS1 MUT 中, 与 NC mimic 组比较, miR-125a-5p mimic 组双荧光素酶活性差异无统计学意义 ($t = 0.275$)。此外, 与 blank 组或 si-NC 组比较, si-PXN-AS1 组 HGC-27 细胞中 miR-125a-5p 表达水平明显增加 ($P < 0.05$)。见图 6。

2.5 敲低 miR-125a-5p 逆转 PXN-AS1 沉默对胃癌细胞增殖、侵袭及凋亡的影响 与 si-NC 组比较, si-PXN-AS1 组 HGC-27 细胞中 miR-125a-5p 的表达

水平 (6.691 ± 0.571 vs 1.027 ± 0.075) 和细胞凋亡水平明显升高 ($t = 17.023, 11.604, P < 0.05$), 而细胞的增殖能力和迁移、侵袭能力明显降低 ($t = 14.771, 22.036, 8.017, P < 0.05$); 与 si-PXN-AS1 + inhibitor NC 组比较, si-PXN-AS1 + inhibitor 组 HGC-27 细胞中 miR-125a-5p 表达水平和细胞凋亡水平明显降低 ($t = 10.045, 7.971, P < 0.05$), 而细胞的增殖能力和迁移侵袭能力明显增加 ($t = 8.043, 9.095, 5.810, P < 0.05$)。见图 7~9。

2.6 miR-125a-5p 下游靶基因的 GO 和 KEGG 信

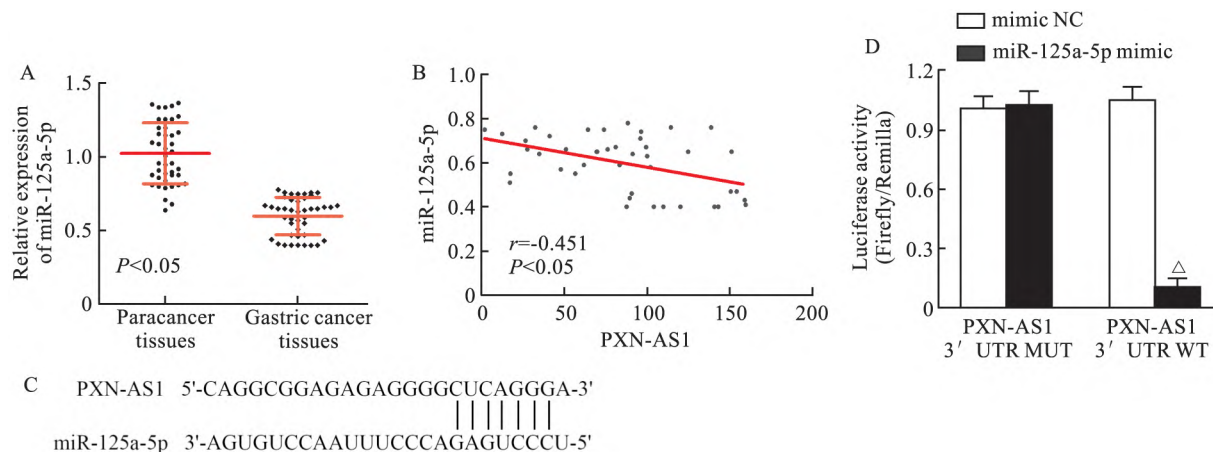


图6 PXN-AS1 海绵吸附 miR-125a-5p 并调控其表达水平

Fig. 6 PXN-AS1 sponge adsorbed miR-125a-5p and regulated its expression level

A: The expression level of miR-125a-5p in gastric cancer tissues was detected by qRT-PCR; B: The correlation between PXN-AS1 and miR-125a-5p in gastric cancer tissues was analyzed by Pearson method; C: Map of binding sites of PXN-AS1 and miR-125a-5p; D: Double luciferase reporter gene experiment; E: The expression level of miR-125a-5p in cells of each group after PXN-AS1 silencing was detected by qRT-PCR; $* P < 0.05$ vs blank group; $\# P < 0.05$ vs si-NC group; $\Delta P < 0.05$ vs mimic NC group.

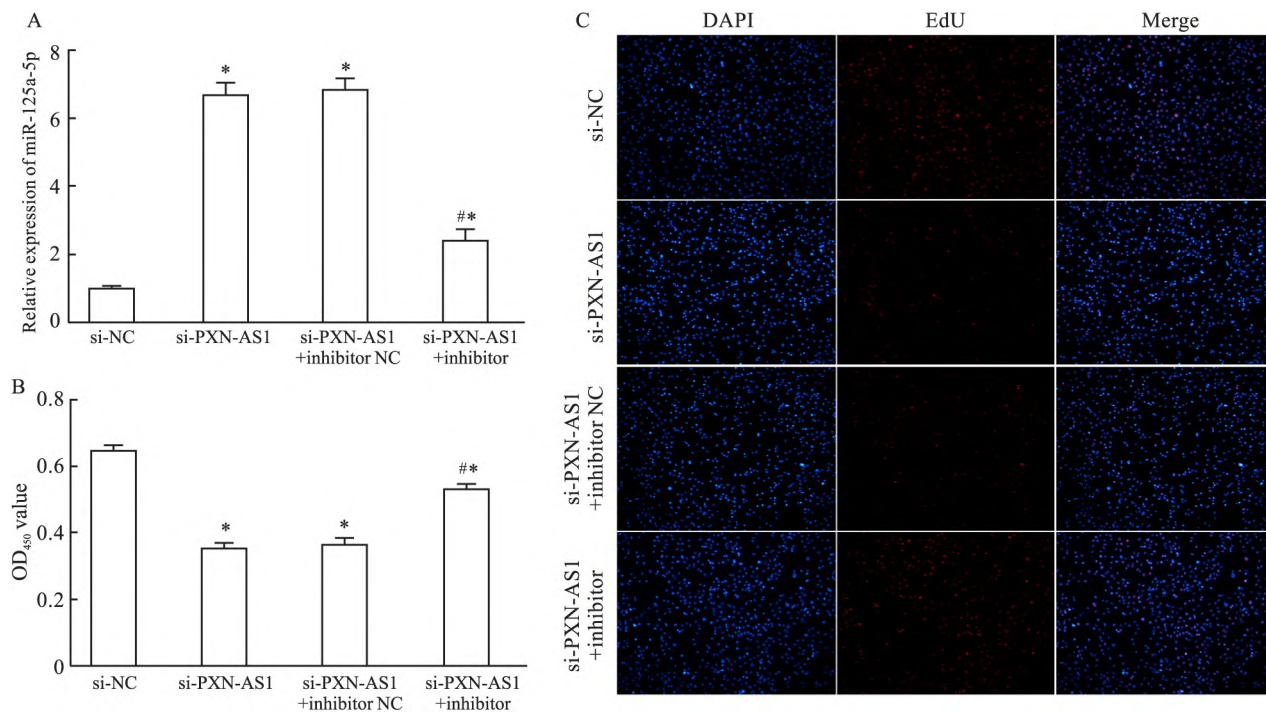


图7 敲低 miR-125a-5p 逆转 PXN-AS1 沉默对胃癌细胞增殖能力的影响

Fig. 7 Effect of miR-125a-5p knockdown reversing PXN-AS1 silencing on proliferation of gastric cancer cells

A: The expression level of miR-125a-5p in cells of each group was detected by qRT-PCR; B: Cell proliferation activity was detected by CCK-8; C: EdU was used to detect cell proliferation $\times 100$; $* P < 0.05$ vs si-NC group; $\# P < 0.05$ vs si-PXN-AS1 + inhibitor NC group.

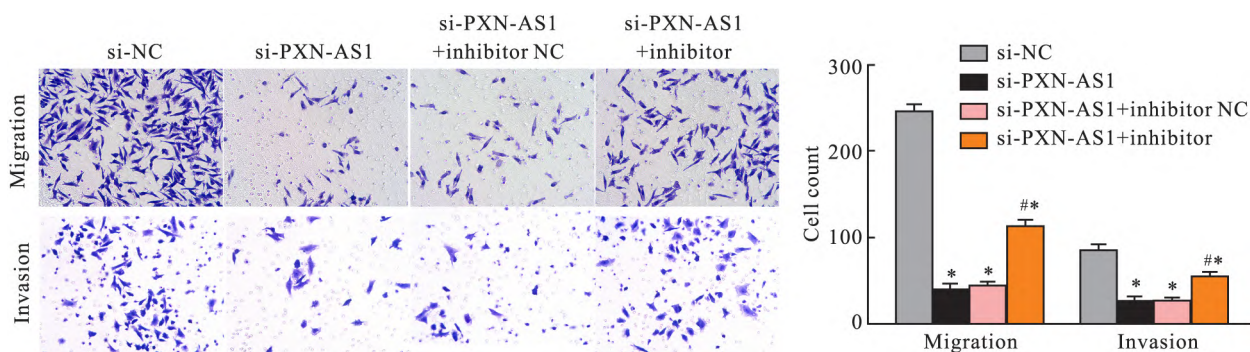


图8 敲低 miR-125a-5p 逆转 PXN-AS1 沉默对胃癌细胞迁移及侵袭能力的影响 ×200

Fig. 8 Effect of miR-125a-5p knockdown reversing PXN-AS1 silencing on migration and invasion of gastric cancer cells ×200

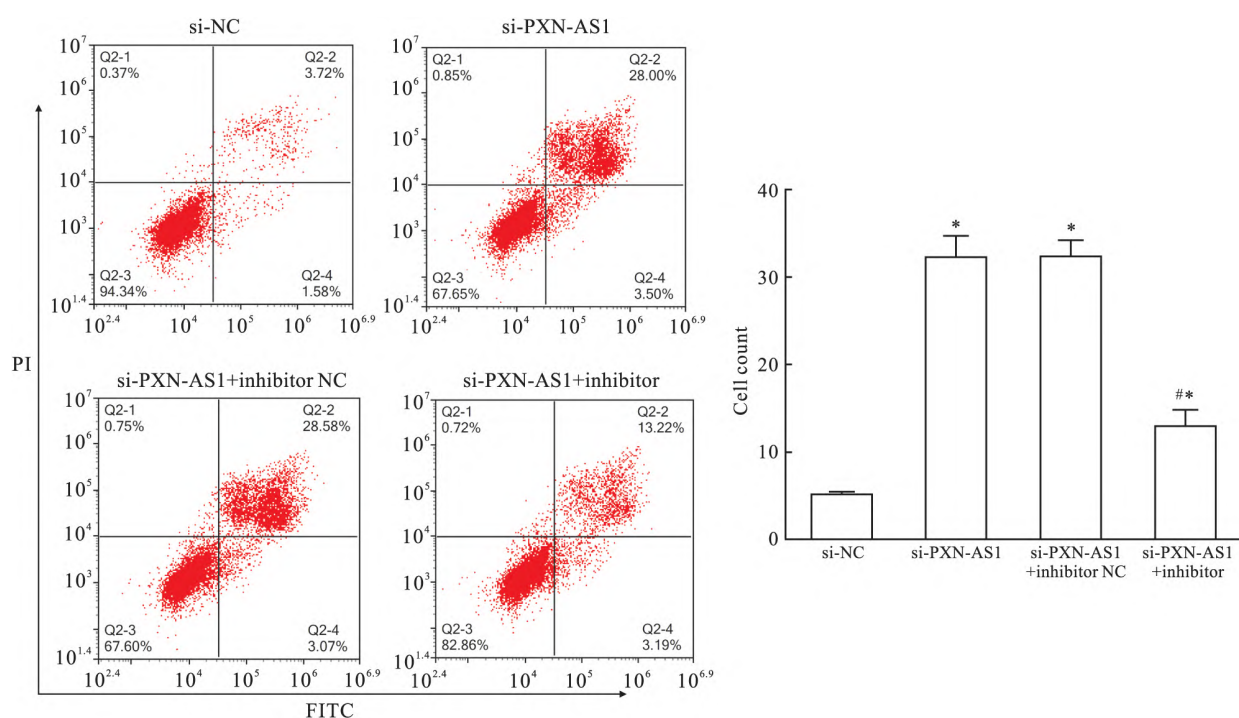
* $P < 0.05$ vs si-NC group; # $P < 0.05$ vs si-PXN-AS1 + inhibitor NC group.

图9 敲低 miR-125a-5p 逆转 PXN-AS1 沉默对胃癌细胞凋亡水平的影响

Fig. 9 Effect of miR-125a-5p knockdown reversing PXN-AS1 silencing on apoptosis of gastric cancer cells

* $P < 0.05$ vs si-NC group; # $P < 0.05$ vs si-PXN-AS1 + inhibitor NC group.

号通路分析 通过 miRDB、miRtarbase 和 TargetScan8.0 数据库分别预测 miR-125a-5p 的靶基因,结果以韦恩图呈现,3 个数据库分别预测出 921、282 和 931 个 miR-125a-5p 的靶基因。将 miR-125a-5p 预测的靶基因合并取交集后,共有 68 个靶基因。根据 GO 功能富集分析结果显示,miR-125a-5p 的靶基因可通过与 BH 结构域、凋亡结构域、DNA、有机环化合物及离子结合特性参与蛋白酶体复合物的形成,发挥分子功能。此外,miR-125a-5p 还参与多种生物过程,包括 DNA 损伤、T 细胞凋亡和分化、RNA 代谢合成过程以及信号转导。根据 KEGG 富集分

析结果显示,miR-125a-5p 基因主要参与 HIF-1 信号通路、JAK-STAT 信号通路以及细胞凋亡等信号通路,见图 10。

3 讨论

胃癌是世界上最常见的上皮来源肿瘤之一,在中晚期容易发生血运、淋巴或局部转移,具有较高侵袭性。因此,需要进一步研究中晚期胃癌进展的机制,以降低胃癌的病死率。最近的研究^[8]表明,在调节癌症进展过程中,lncRNA 的表达失调起着重要作用。lncRNA PXN-AS1 的全长为 863 个核苷酸,

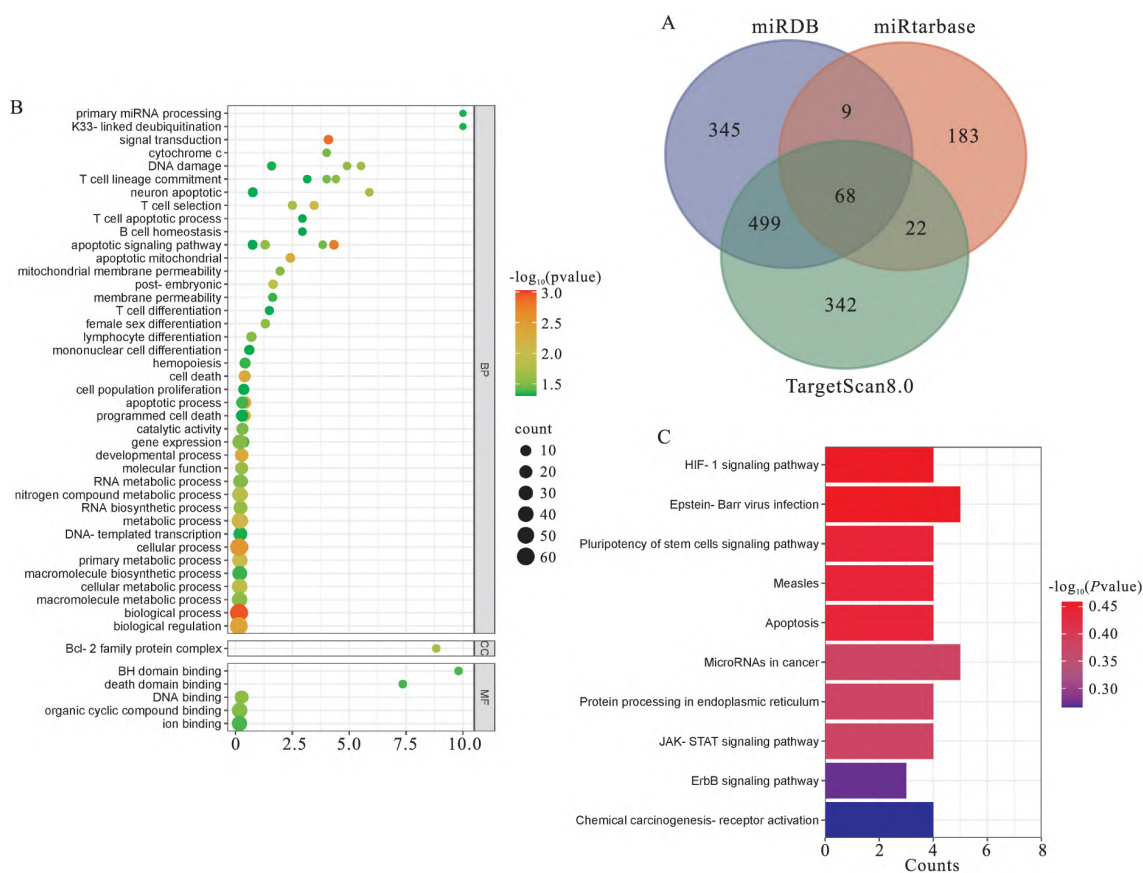


图10 miR-125a-5p 靶基因的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 10 GO and KEGG enrichment analysis of miR-125a-5p target genes

A: miR-125a-5p target gene screening; B: GO enrichment analysis; C: KEGG enrichment analysis.

其基因位于染色体 12q24.23,与 PXN 呈反向互补。最近的研究发现,PXN-AS1 在肝细胞癌^[8]、脑胶质瘤^[9]、肺癌^[10]、鼻咽癌^[11]和胰腺癌^[12]中参与多种类型肿瘤的迁移和侵袭过程,但其是否参与胃癌的进展尚不清楚。首先,本研究通过临床数据库 Lnc2cancer 3.0 的分析发现,PXN-AS1 在胃癌组织中呈明显高表达,并且根据临床组织标准,其在胃癌组织中的表达较癌旁组织明显上调。此外,本研究还观察到,PXN-AS1 在胃癌细胞系中表达明显上调。这些数据证实了 PXN-AS1 在胃癌组织和细胞中的表达上调。此外,本研究还分析了 PXN-AS1 表达水平与胃癌患者病理参数的关系,结果显示,PXN-AS1 与淋巴结转移、TNM 分期及不良预后呈正相关。这些数据提示,PXN-AS1 可能参与了胃癌的进展。

通过功能丧失即沉默 PXN-AS1 的表达,本研究探讨了 PXN-AS1 在胃癌体外细胞中的作用。结果显示,沉默 PXN-AS1 可降低胃癌细胞的增殖,促进其凋亡,并抑制迁移和侵袭能力。因此,本研究数据

表明,PXN-AS1 在胃癌中也可能起致癌基因的作用,类似于 PXN-AS1 在肝癌和肺癌中的作用。然而,一些研究^[7]提出,在胰腺癌组织和细胞中,PXN-AS1 的表达异常低,这表明 PXN-AS1 在肿瘤中的作用具有异质性,需要进一步研究。PXN-AS1 在胃癌组织和细胞中的上调以及其在胃癌中的致癌作用提示,PXN-AS1-L 可能是胃癌的潜在治疗靶点。LncRNAs 可以作为 miRNA 竞争海绵,降低肿瘤细胞中癌症相关 miRNA 的表达^[13]。例如,lncRNA LGALS8-AS1 在胃癌中的高表达与淋巴结转移率高、肿瘤增大呈正相关。LGALS8-AS1 可作为 miR-138-5p 的分子海绵,促进胃癌细胞的增殖、迁移和转移^[14]。lncRNA ELFN1-AS1 的沉默抑制了胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡,并通过 ELFN1-AS1/miR-211-3p/TRIM29 轴维持胃癌细胞的致癌性^[15]。本研究探讨了 PXN-AS1 和 miR-125a-5p 之间的潜在关联。双荧光素酶实验显示,PXN-AS1 作为 miR-125a-5p 的上游调节因子,可作为 miR-125a-5p 的分子海绵,促进胃癌细胞的增殖、抑制细胞凋亡并促进

细胞的迁移和侵袭能力。为了进一步确认 PXN-AS1/miR-125a-5p 是否参与胃癌细胞增殖凋亡以及迁移侵袭过程,本研究进一步设计了挽救实验,即敲低 miR-125a-5p 对 PXN-AS1 沉默的影响。结果显示, PXN-AS1 对胃的致癌性被 miR-125a-5p 逆转。本研究首次提出了 PXN-AS1 在胃癌中的表达水平和生物学效应的研究,结果显示 PXN-AS1 的表达缺失可以诱导 miR-125a-5p 的表达,从而抑制胃癌细胞的增殖、促进细胞凋亡,并抑制细胞的迁移和侵袭。

综上所述,本研究结果表明 PXN-AS1 在胃癌中表达上调,并作为 miR-125a-5p 的竞争性海绵,促进胃癌细胞 HGC-27 的增殖、迁移和侵袭能力。这为胃癌的治疗提供一定理论依据,表明 PXN-AS1 可能是胃癌的潜在生物标志物和治疗靶点。

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): 209–49. doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] 陈定宇, 何小凤, 程薇, 等. CDH1 受幽门螺杆菌感染调控及其在胃癌组织中表达分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(3): 412–7. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.014.
- [3] Chen D Y, He X F, Cheng W, et al. Study on the expression level of CDH1 and *Helicobacter pylori*-related gastric cancer [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(3): 412–7. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.014.
- [4] Deng J, Zhang W, Xu M, et al. Imaging advances in efficacy assessment of gastric cancer neoadjuvant chemotherapy [J]. *Abdom Radiol (NY)*, 2023, 48(12): 3661–76. doi: 10.1007/s00261-023-04046-1.
- [5] 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.
- [6] Jiang T, Zhu J, Jiang S, et al. Targeting lncRNA DDIT4-AS1 sensitizes triple negative breast cancer to chemotherapy via suppressing of autophagy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(17): e2207257. doi: 10.1002/advs.202207257.
- [7] Zhou H Z, Li F, Cheng S T, et al. DDX17-regulated alternative splicing that produced an oncogenic isoform of PXN-AS1 to promote HCC metastasis [J]. *Hepatology*, 2022, 75(4): 847–65. doi: 10.1002/hep.32195.
- [8] Yan J, Jia Y, Chen H, et al. Long non-coding RNA PXN-AS1 suppresses pancreatic cancer progression by acting as a competing endogenous RNA of miR-3064 to upregulate PIP4K2B expression [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 390. doi: 10.1186/s13046-019-1379-5.
- [9] Zhang C, Wang H, Liu Q, et al. lncRNA CCAT1 facilitates the progression of gastric cancer via PTBP1-mediated glycolysis enhancement [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 246. doi: 10.1186/s13046-023-02827-6.
- [10] Yuan J H, Liu X N, Wang T T, et al. The MBNL3 splicing factor promotes hepatocellular carcinoma by increasing PXN expression through the alternative splicing of lncRNA-PXN-AS1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(7): 820–32. doi: 10.1038/ncb3538.
- [11] Shang F, Du S W, Ma X L. Up-regulation of lncRNA PXN-AS1-L is associated with unfavorable prognosis in patients suffering from glioma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(20): 8950–5. doi: 10.26355/eurrev_201910_19293.
- [12] Zhang Z, Peng Z, Cao J, et al. Long noncoding RNA PXN-AS1-L promotes non-small cell lung cancer progression via regulating PXN [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 20. doi: 10.1186/s12935-019-0734-0.
- [13] Jia X, Niu P, Xie C, et al. Long noncoding RNA PXN-AS1-L promotes the malignancy of nasopharyngeal carcinoma cells via up-regulation of SAPCD2 [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(9): 4278–91. doi: 10.1002/cam4.2227.
- [14] Zhang R, Pan T, Xiang Y, et al. Curcumenol triggered ferroptosis in lung cancer cells via lncRNA H19/miR-19b-3p/FTH1 axis [J]. *Bioact Mater*, 2022, 13: 23–36. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.11.013.
- [15] Wang G, Shen K, Xiao J, et al. Long non-coding RNA LGALS8-AS1 facilitates PLACL2-mediated malignant phenotypes in gastric cancer [J]. *J Gene Med*, 2023, 25(6): e3487. doi: 10.1002/jgm.3487.
- [16] Huang J, Yuan W, Chen B, et al. lncRNA ELF1-AS1 upregulates TRIM29 by suppressing miR-211-3p to promote gastric cancer progression [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2023, 55(3): 484–97. doi: 10.3724/abbs.2023023.

Effects of LncRNA PXN-AS1 on proliferation, apoptosis and invasion of gastric cancer cells

Liu Gang, Liu Dongtao, Zhao Wei, He Tao, Zhang Yuan

(Dept of Gastroenterology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

Abstract Objective To investigate the expression of LncRNA PXN-AS1 (abbreviated as PXN-AS1) in gastric

cancer tissues and its impact on the proliferation, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells, and to explore its potential regulatory mechanisms. **Methods** Gastric cancer tissues and adjacent tissues from 43 patients with gastric cancer were collected. The expression levels of PXN-AS1 and miR-125a-5p in gastric cancer tissues were detected using qRT-PCR, and the relationship between the expression level of PXN-AS1 and the clinical pathological parameters of patients with gastric cancer was analyzed. Pearson correlation analysis was conducted to evaluate the correlation between PXN-AS1 and miR-125a-5p in gastric cancer tissues. PXN-AS1 siRNA plasmid (si-PXN-AS1) and negative control plasmid (si-NC), as well as miR-125a-5p inhibitor (inhibitor) and negative control miRNA inhibitor (inhibitor NC), were transfected alone or in combination into HGC-27 cells. The cells were divided into si-NC group, si-PXN-AS1 group, si-PXN-AS1 + inhibitor NC group, si-PXN-AS1 + inhibitor group, and a blank control group was also established. qRT-PCR was utilized to assess the expression levels of PXN-AS1 and miR-125a-5p in each cell group. CCK-8 assay was employed to evaluate the proliferation levels of cells in each group. EdU experiment was conducted to assess the proliferation status of cells in each group. Transwell assay was performed to examine the migration and invasion capabilities of cells in each group; flow cytometry was employed to measure the apoptosis levels of cells in each group; the dual-luciferase reporter gene system was used to validate the sponge adsorption of PXN-AS1 on miR-125a-5p and regulate its expression levels. Bioinformatics analysis was employed to screen downstream target genes of miR-125a-5p and perform GO and KEGG enrichment analysis. **Results** Compared with adjacent cancerous tissues, the expression level of the PXN-AS1 in gastric cancer tissues significantly increased, while the expression level of miR-125a-5p markedly decreased (both $P < 0.05$). PXN-AS1 and miR-125a-5p exhibited a negative correlation ($r = -0.452$, $P = 0.002$). Furthermore, gastric cancer patients with high expression of PXN-AS1 exhibited the proportions of lymph node metastasis positivity and low differentiation were significantly higher (all $P < 0.05$). Compared to the blank group and si-NC group, the si-PXN-AS1 group of HGC-27 cells showed significantly reduced levels of PXN-AS1 expression, cell proliferation capacity, and the number of cell migration and invasion (all $P < 0.05$), while the level of cell apoptosis significantly increased ($P < 0.05$). The dual-luciferase reporter system results demonstrated specific adsorption of miR-125a-5p by PXN-AS1 in HGC-27 cells. Knockdown of miR-125a-5p could reverse the effect of PXN-AS1 silencing on the inhibition of proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells, and promote apoptosis. The bioinformatics analysis results indicated that the downstream target genes of miR-125a-5p were involved in various biological processes, including DNA damage, T cell apoptosis and differentiation, RNA metabolism synthesis processes, and signal transduction. Additionally, miR-125a-5p was implicated in signaling pathways such as the HIF-1 pathway, JAK-STAT pathway, and cell apoptosis signaling pathway. **Conclusion** PXN-AS1 is upregulated in gastric cancer. Moreover, acting as a competitive sponge for miR-125a-5p, PXN-AS1 promotes the proliferation, migration, and invasion abilities of gastric cancer cells HGC-27 while inhibiting apoptosis.

Key words lncRNA PXN-AS1; gastric cancer; proliferation; migration and invasion; PXN-AS1/miR-125a-5p axis

Fund program Key Research and Development Program of Science and Technology Department of Ningxia(No. 2022BEG03154)

Corresponding author Liu Dongtao, E-mail: wwkliugang@163.com