

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: LINC02086 通过调控 Wnt/ β -catenin 通路介导巨噬细胞 M2 极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

作者: 李军, 卜亚飞, 陈杰, 丁波, 王磊

网络首发日期: 2026-01-07

引用格式: 李军, 卜亚飞, 陈杰, 丁波, 王磊. LINC02086 通过调控 Wnt/ β -catenin 通路介导巨噬细胞 M2 极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260107.1132.002>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

LINC02086 通过调控 Wnt/ β -catenin 通路介导巨噬细胞 M2 极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

李 军¹, 卜亚飞², 陈 杰², 丁 波¹, 王 磊¹

(宁夏医科大学总医院 ¹胃肠外科、²急诊科, 银川 750004)

摘要 目的 探讨长链间隔非编码 RNA02086 (*LINC02086*) 过表达介导的巨噬细胞极化对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及机制。**方法** 采用 qRT-PCR 检测人胃黏膜上皮细胞 GES-1 及人胃癌细胞系 HCG-27、NCI-N87、AGS 中的 *LINC02086* 表达水平。使用佛波酯 (PMA) 将人急性单核细胞白血病细胞 (THP-1) 诱导分化为 M0 型巨噬细胞, 分别用 *LINC02086* 过表达慢病毒 (OE-*LINC02086*) 及其阴性对照慢病毒 (Vector) 感染 HGC-27 细胞, 收集培养上清液作为条件培养基 1 (CM1); 将 M0 型巨噬细胞与感染后的 HGC-27 细胞共培养, 收集培养上清液得到 CM2。使用 CM1 单独或联合 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 (IWR-1) 处理 M0 型巨噬细胞, 分别设为 Vector+CM1 组、OE-*LINC02086*+CM1 组和 OE-*LINC02086*+CM1+IWR-1 组; 通过流式细胞术检测细胞中甘露糖受体 (CD206) 水平; qRT-PCR 检测细胞中白细胞介素-10 (*IL-10*)、转化生长因子- β (*TGF- β*)、血管内皮生长因子 (*VEGF*) 和趋化因子配体 22 (*CCL22*) mRNA 表达水平; Western blot 检测细胞中 CD206、VEGF 蛋白和 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白 Wnt 家族成员 3A (Wnt3a)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、 β -连环蛋白 (β -catenin) 表达水平。使用 CM2 单独或联合 IWR-1 处理 HGC-27 细胞, 分别设为 Vector+CM2 组、OE-*LINC02086*+CM2 组和 OE-*LINC02086*+CM2+IWR-1 组; CCK-8 法检测细胞增殖活性; Transwell 检测细胞迁移、侵袭能力。**结果** 与 GES-1 细胞比较, HCG-27、NCI-N87 及 AGS 细胞中 *LINC02086* 表达水平均升高 ($P<0.05$), 其中 HCG-27 细胞升高幅度最小。与 Vector+CM1 组比较, OE-*LINC02086*+CM1 刺激后, 巨噬细胞中 CD206 水平以及 *IL-10*、*TGF- β* 、*VEGF* 和 *CCL22* mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$), 同时, 细胞中 Wnt3a 和 β -catenin 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$), GSK-3 β 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$); 然而, IWR-1 联合干预可明显逆转 *LINC02086* 过表达对巨噬细胞 CD206 和 *IL-10*、*TGF- β* mRNA 等 M2 型极化标志物表达的促进作用 ($P<0.05$), 以及对 Wnt/ β -catenin 通路的激活作用 ($P<0.05$)。与 Vector+CM2 组比较, OE-*LINC02086*+CM2 处理后, HGC-27 细胞增殖活性及迁移、侵袭细胞数量升高 ($P<0.05$); 然而, IWR-1 联合干预可明显逆转 *LINC02086* 过表达对 HGC-27 细胞增殖、迁移和侵袭的促进作用 ($P<0.05$)。**结论** *LINC02086* 过表达可通过激活 Wnt/ β -catenin 通路介导巨噬细胞 M2 极化并促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词 长链非编码 RNA02086; 过表达; 胃癌; 巨噬细胞; 极化; 增殖; Wnt/ β -catenin 通

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (编号: 2024AAC03688)

作者简介: 李 军, 男, 主任医师;

王 磊, 男, 主任医师, 通信作者, E-mail: wanglei1182@sina.com

路

中图分类号 R 735.2

文献标识码 A

Effects of *LINC02086* on proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by regulating Wnt/ β -catenin pathway mediated M2 polarization of macrophages

Li Jun¹, Bu Yafei², Chen Jie², Ding Bo¹, Wang Lei¹

(¹Department of Gastrointestinal Surgery, ²Department of Emergency, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

Abstract **Objective** To investigate the effect and mechanism of long intergenic non-coding RNA02086 (*LINC02086*) overexpression mediated macrophage polarization on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells. **Methods** The expression levels of *LINC02086* in the human gastric epithelial cell line GES-1 and human gastric cancer cell lines HGC-27, NCI-N87, and AGS were determined by qRT-PCR. Human acute monocytic leukemia cells (THP-1) were induced to differentiate into M0 macrophages using phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). HGC-27 cells were infected with either *LINC02086* overexpression lentivirus (OE-*LINC02086*) or its negative control lentivirus (Vector), and the culture supernatants were collected as conditioned medium (CM1). M0 macrophages were co-cultured with the infected HGC-27 cells, and the resulting supernatants were designated as conditioned medium 2 (CM2). M0 macrophages were treated with CM1 alone or in combination with Wnt/ β -catenin pathway inhibitor IWR-1, forming the Vector+CM1, OE-*LINC02086*+CM1, and OE-*LINC02086*+CM1+IWR-1 groups, respectively. Flow cytometry was used to detect mannose receptor C-type 1 (CD206) expression, and qRT-PCR was employed to measure mRNA levels of interleukin-10 (*IL-10*), transforming growth factor- β (*TGF- β*), vascular endothelial growth factor (*VEGF*), and chemokine ligand 22 (*CCL22*). Western blot was performed to evaluate protein expression of CD206, VEGF, and key components of the Wnt/ β -catenin pathway—Wnt family member 3a (Wnt3a), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), and β -catenin. HGC-27 cells were treated with CM2 alone or combined with IWR-1, establishing the Vector+CM2, OE-*LINC02086*+CM2, and OE-*LINC02086*+CM2+IWR-1 groups. CCK-8 assay was used to evaluate cell proliferation, and Transwell assays were conducted to assess migration and invasion capabilities. **Results** Compared with GES-1 cells, the expression levels of *LINC02086* were upregulated in HGC-27, NCI-N87, and AGS cells ($P < 0.05$), with the smallest increase observed in HGC-27 cells. Compared with Vector+CM1 group, the level of CD206 and the expression levels of *IL-10*, *TGF- β* , *VEGF* and *CCL22* mRNA in macrophages stimulated by OE-*LINC02086*+CM1 increased ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression levels of Wnt3a and β -catenin proteins in cells increased ($P < 0.05$), and the expression level of GSK-3 β protein decreased ($P < 0.05$).

However, co-treatment with IWR-1 markedly reversed the promoting effects of *LINC02086* overexpression on the expression of M2 polarization markers, including CD206, *IL-10*, and *TGF- β* mRNA, in macrophages ($P<0.05$), as well as its activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway ($P<0.05$). Compared with Vector+CM2 group, HGC-27 cells infected with OE-*LINC02086*+CM2 had increased proliferation activity and increased number of migration and invasion cells ($P<0.05$). However, the combined intervention of IWR-1 significantly reversed the promotion of *LINC02086* overexpression on the proliferation, migration and invasion of HGC-27 cells ($P<0.05$). **Conclusion** *LINC02086* overexpression promotes the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by activating Wnt/ β -catenin pathway to mediate M2 polarization of macrophages.

Key words long non-coding RNA02086; overexpression; gastric cancer; macrophages; polarization; proliferation; Wnt/ β -catenin pathway

Fund program Natural Science Foundation of Ningxia (No. 2024AAC03688)

Corresponding Author Wang Lei, E-mail: wanglei1182@sina.com

胃癌是全球癌症致死的主要原因之一，由于其发病隐匿且缺乏早期诊断靶标，多数患者确诊时已处于中晚期，导致预后不良^[1]。肿瘤的进展与肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME）密切相关，其中肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophage, TAM）是关键免疫细胞，可极化为抗肿瘤的 M1 表型或促肿瘤的 M2 表型，后者通过分泌细胞因子促进胃癌细胞恶性进展^[2-3]。长链非编码 RNA（long non coding RNA, LncRNA）是重要的调控分子，常通过充当“分子海绵”竞争性吸附 miRNA 影响 TME^[4]。例如，*LncRNA NR_109* 和 *LncRNA CRNDE* 已被证实通过诱导 TAM 的 M2 型极化促进胃癌进展^[5-6]。长链间隔非编码 RNA02086（long intergenic non coding RNA02086, *LINC02086*）是近年来被关注的 LncRNA，在胰腺癌等多种消化道癌中高表达，并促进其发展^[7]。在胃癌中，*LINC02086* 特异性高表达，可通过吸附 miR-93a-5p 上调基质金属蛋白酶 3（matrix metalloproteinase-3, *MMP3*）表达，进而激活细胞外基质重塑通路，推动胃癌细胞增殖和迁移^[8]。然而，*LINC02086* 是否通过调控巨噬细胞极化影响胃癌进展尚未明确。该研究拟探讨 *LINC02086* 过表达对巨噬细胞极化及胃癌细胞恶性行为的影响与机制，旨在为胃癌诊断和治疗提供新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞

人急性单核细胞白血病细胞 THP-1、人胃黏膜上皮细胞 GES-1 及人胃癌细胞 HCG-27、NCI-N87、AGS（货号：h213、h062、h095、h164、h016）购自上海赛百慷生物技术股份有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基（货号：SH30809、SH30243）购自美国 Hyclone 公

司; F12K 培养基、青-链霉素双抗 (货号: PM150910B、PB180120) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) (货号: P1585) 购自美国 Sigma 公司; Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 IWR-1 (货号: HY-12238) 购自美国 MedChemExpress 公司; FITC-甘露糖受体 (mannose receptor C-type 1, CD206)、CD206、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、Wnt 家族成员 3A (Wnt family member 3a, Wnt3a)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、GAPDH 抗体 (货号: ab270647、ab64693、ab46154、ab219412、ab93926、ab32572、ab8245) 购自英国 Abcam 公司; 结晶紫、CCK-8 试剂盒 (货号: Y268091、C0038) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 荧光显微镜 (型号: CX23) 购自日本 OLYMPUS 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (型号: LightCycler 96) 购自瑞士 Roche 公司; 流式细胞仪 (型号: CytoFLEX) 购自美国 Beckman Coulter 公司; 全波长酶标仪 (型号: Multiskan SkyHigh) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 凝胶成像仪 (型号: Gel Doc EZ) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中, 分别使用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗 (青-链霉素) 的 RPMI-1640 完全培养基培养 THP-1、GES-1 及 NCI-N87 细胞, 使用 DMEM 完全培养基培养 HGC-27 细胞, 使用 F12K 完全培养基培养 AGS 细胞。THP-1 细胞生长至 8×10^5 个/mL 时进行传代, 其余细胞融合度生长至 80%~90% 时进行传代。

1.3.2 慢病毒感染

构建 LINC02086 慢病毒过表达载体 (pLVX-Puro), 经过慢病毒包装、纯化及浓缩得到相应慢病毒溶液 (滴度 1×10^8 TU/mL)。按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 30, 使用 LINC02086 过表达慢病毒及其阴性对照慢病毒感染 HGC-27 细胞, 经过嘌呤霉素筛选得到稳定过表达 LINC02086 的 HGC-27 细胞系, 分别命名为 Vector 组和 OE-LINC02086 组, 另设置空白对照组 (Blank)。LINC02086 慢病毒过表达载体构建、病毒包装、纯化及浓缩由苏州赛业生物科技有限公司完成并提供。

1.3.3 M0 型巨噬细胞诱导及条件培养基 (conditioned medium, CM) 获取

体外培养 THP-1 细胞, 加入 10 nmol/L PMA 诱导 48 h 后得到未分化的 M0 型巨噬细胞^[9]。将感染慢病毒后的 HGC-27 细胞置于无血清 RPMI-1640 培养基中培养 24 h, 收集上清液, 经过 0.45 μ mol/L 滤膜过滤得到条件培养基 CM1, 分别命名为 Vector+CM1、OE-LINC02086+CM1, 另设置空白对照 CM1 (Blank+CM1); 在 Transwell 共培养体系中, 将感染慢病毒后的 HGC-27 细胞接种于 6 孔板底部, 将 M0 型巨噬细胞接种于与之匹配的 Transwell 小室中, 待二者分开培养至贴壁后, 将培养 M0 型巨噬细胞的小室移至培养 HGC-27 细胞的 6 孔板中建立共培养体系, 无血清培养基共培养 24 h, 收集上清液得到条件培养基 CM2, 分别命名为 Vector+CM2、OE-LINC02086+CM2, 另设置空白对照 CM2 (Blank+CM2)。

[10]。该研究中，CM1 用于评估 *LINC02086* 过表达的胃癌细胞自身分泌因子对巨噬细胞的直接作用，CM2 用于模拟 TME 中胃癌细胞与巨噬细胞双向交互后的状态，其中包含了被胃癌细胞诱导 M2 极化后的巨噬细胞所反馈分泌的因子。

1.3.4 细胞分组及处理

采用 qRT-PCR 检测 GES-1、HGC-27、NCI-N87 及 AGS 细胞中的 *LINC02086* 表达水平。对 HGC-27 细胞进行以下分组及处理：① Control-1 组：M0 型巨噬细胞不经任何处理；Blank+CM1 组、Vector+CM1 组、OE-*LINC02086*+CM1 组：使用对应来源的 CM1 刺激 M0 型巨噬细胞 24 h；Vector+CM1+IWR-1 组、OE-*LINC02086*+CM1+IWR-1 组：使用 10 μmol/L IWR-1^[11]预处理 M0 型巨噬细胞 2 h 后，再使用对应来源的 CM1 刺激 M0 型巨噬细胞 24 h；② Control-2 组：HGC-27 细胞不经任何处理；Blank+CM2 组、Vector+CM2 组、OE-*LINC02086*+CM2 组：使用对应来源的 CM2 处理 HGC-27 细胞 24 h；Vector+CM2+IWR-1 组、OE-*LINC02086*+CM2+IWR-1 组：使用 10 μmol/L IWR-1 预处理 M0 型巨噬细胞 2 h 后，再使用对应来源的 CM2 刺激 M0 型巨噬细胞 24 h。

1.3.5 流式细胞术检测 CD206 阳性细胞比例

收集各组巨噬细胞至流式测定管中，1 500 r/min 离心 3 min 后去除培养基，加入 PBS 重悬细胞，使其浓度达到 1×10⁶ 个/mL。4%多聚甲醛固定细胞 15 min 后破膜，使用 1%的牛血清白蛋白封闭液封闭细胞表面非特异性结合位点，加入 FITC-CD206 抗体，避光孵育 30 min，于流式细胞仪上检测各组 CD206 阳性细胞比例。

1.3.6 qRT-PCR

收集各组 HGC-27 细胞和巨噬细胞，加入 TRIzol 试剂使细胞充分裂解，使用氯仿和异丙醇溶液对 RNA 进行分离，检测 RNA 浓度后，根据反转录试剂盒说明书操作进行 cDNA 合成。设计引物（表 1），配置包含 2×SYBR 扩增预混液、引物混合物、cDNA 模板和无酶水的 PCR 反应体系，于实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应，反应条件：95 °C预变性 2 min；95 °C变性 10 s，55 °C退火 15 s，72 °C延伸 10 s，循环 40 次。根据扩增和熔解曲线，以 GAPDH 作为对照，采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences	
Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>LINC02086</i>	F: TCCCTTGGAGGTATTGAC
	R: CTCAGAACAACCGATGAC
<i>IL-10</i>	F: AGAACCTGAAGACCCTCAGGC
	R: CCACGGCCTTGCTCTTGTT
<i>TGF-β</i>	F: TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC

	R: GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA
<i>VEGF</i>	F: CAGGGACAGTTGCTTCTGGA
	R: CAGGGACAGTTGCTTCTGGA
<i>CCL22</i>	F: GAGATCTGTGCCGATCCCAG
	R: AGGGAATGCAGAGAGTTGGC
<i>GAPDH</i>	F: AATCCCATCACCATCTTC
	R: AGGCTGTTGTCATACTTC

1.3.7 CCK-8 实验

将对数生长期的 HGC-27 细胞接种于 96 孔板中，每孔 3×10^3 个/100 μL ，待细胞贴壁后按照分组要求进行处理，随后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，轻轻振荡混匀，继续孵育 1 h，于酶标仪波长 450 nm 处检测各孔吸光度 (Absorbance, A) 值。细胞增殖活性 (%) = (实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 空白孔 A 值) $\times 100\%$ 。

1.3.8 Transwell 实验

按照分组要求对 HGC-27 细胞进行处理，随后分别进行迁移和侵袭实验。迁移实验：将细胞接种于 Transwell 上室中的无血清培养基中进行培养，将含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基添加到 Transwell 下室中，将孔板置于培养箱中培养 24 h 后，取出小室，经过 4% 多聚甲醛固定、0.1% 结晶紫染色，于显微镜下进行拍照和计数，对迁移细胞的数量进行统计。侵袭实验：提前在小室中铺入 50 μL 基质胶，后续步骤同迁移实验。

1.3.9 Western blot 实验

收集各组巨噬细胞和 HGC-27 细胞，加入裂解缓冲液后 4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡、1 500 r/min 离心 3 min 取上清液，对蛋白质浓度进行测定。将 40 μg 蛋白质上样至 SDS-PAGE 凝胶中 (100 V 分离 1 h)，随后转至 PVDF 膜上 (60 V 转膜 2 h)，将膜置于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 1 h，加入 1 $\square$ 1 000 稀释后的一抗 (Wnt3a、GSK-3 β 、 β -catenin、CD206、VEGF、GAPDH) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，加入 1 $\square$ 5 000 稀释后的辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记二抗室温孵育 1 h，加入 ECL 化学发光底物进行显色，ImageJ 软件分析条带，以 GAPDH 为内参，计算目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 26.0 软件分析数据，结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组均数比较采用单因素方差分析，事后两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌 HGC-27 细胞中 *LINC02086* 表达水平及其过表达对 M0 型巨噬细胞 M2 极化的影

响

采用 qRT-PCR 检测各细胞系及慢病毒感染后 HGC-27 细胞中的 *LINC02086* 表达水平，结果显示（图 1），与 GES-1 细胞比较，HCG-27、NCI-N87 及 AGS 细胞中 *LINC02086* 表达水平均升高（均 $P<0.01$ ， $LSD-t=9.67、37.53、24.26$ ），其中 HCG-27 细胞升高幅度最小。感染慢病毒后，与 Blank 组比较，OE-*LINC02086* 组 HGC-27 细胞中 *LINC02086* 表达水平升高（ $P<0.01$ ， $LSD-t=31.09$ ），Vector 组差异无统计学意义（ $P>0.05$ ， $LSD-t=0.04$ ）。采用不同来源的 CM1 刺激 M0 型巨噬细胞，结果显示（图 2），与 Control-1 组比较，Blank+CM1 组巨噬细胞中 CD206 水平以及 *IL-10*、*TGF-β*、*VEGF* 和 *CCL22* mRNA 表达水平均升高（均 $P<0.05$ ， $LSD-t=12.61、5.59、3.44、5.80、2.52$ ）；与 Blank+CM1 组比较，OE-*LINC02086*+CM1 组巨噬细胞中 CD206 水平以及 *IL-10*、*TGF-β*、*VEGF* 和 *CCL22* mRNA 表达水平均升高（均 $P<0.05$ ， $LSD-t=12.73、8.87、13.44、3.20、14.85$ ），Vector+CM1 组以上指标差异无统计学意义（ $P>0.05$ ， $LSD-t=0.07、0.20、0.67、0.40、0.18$ ）。提示 *LINC02086* 过表达可促进巨噬细胞向 M2 型极化。

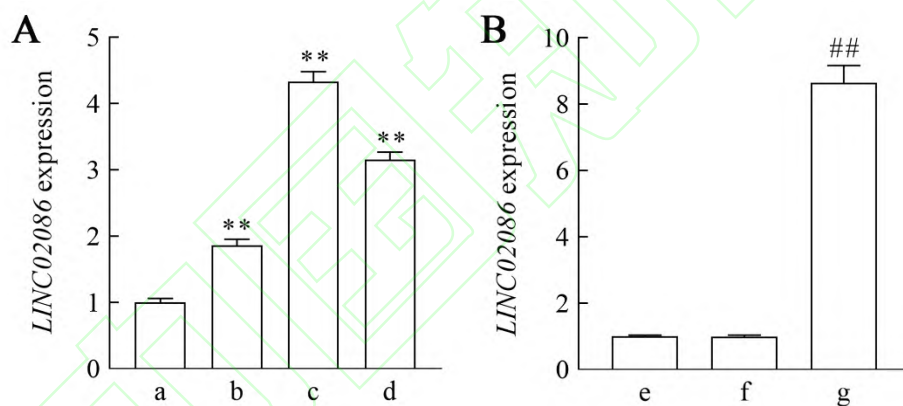


图 1 qRT-PCR 检测细胞中 *LINC02086* 表达水平

Fig. 1 The expression level of *LINC02086* in cells was detected by qRT-PCR

A: Expression levels of *LINC02086* in each cell line; B: Expression levels of *LINC02086* in cells after lentivirus infection; a: GES-1 cells; b: HGC-27 cells; c: NCI-N87 cells; d: AGS cells; e: Blank group; f: Vector group; g: OE-*LINC02086* group; ** $P<0.01$ vs GES-1 cells; ## $P<0.01$ vs Blank group.

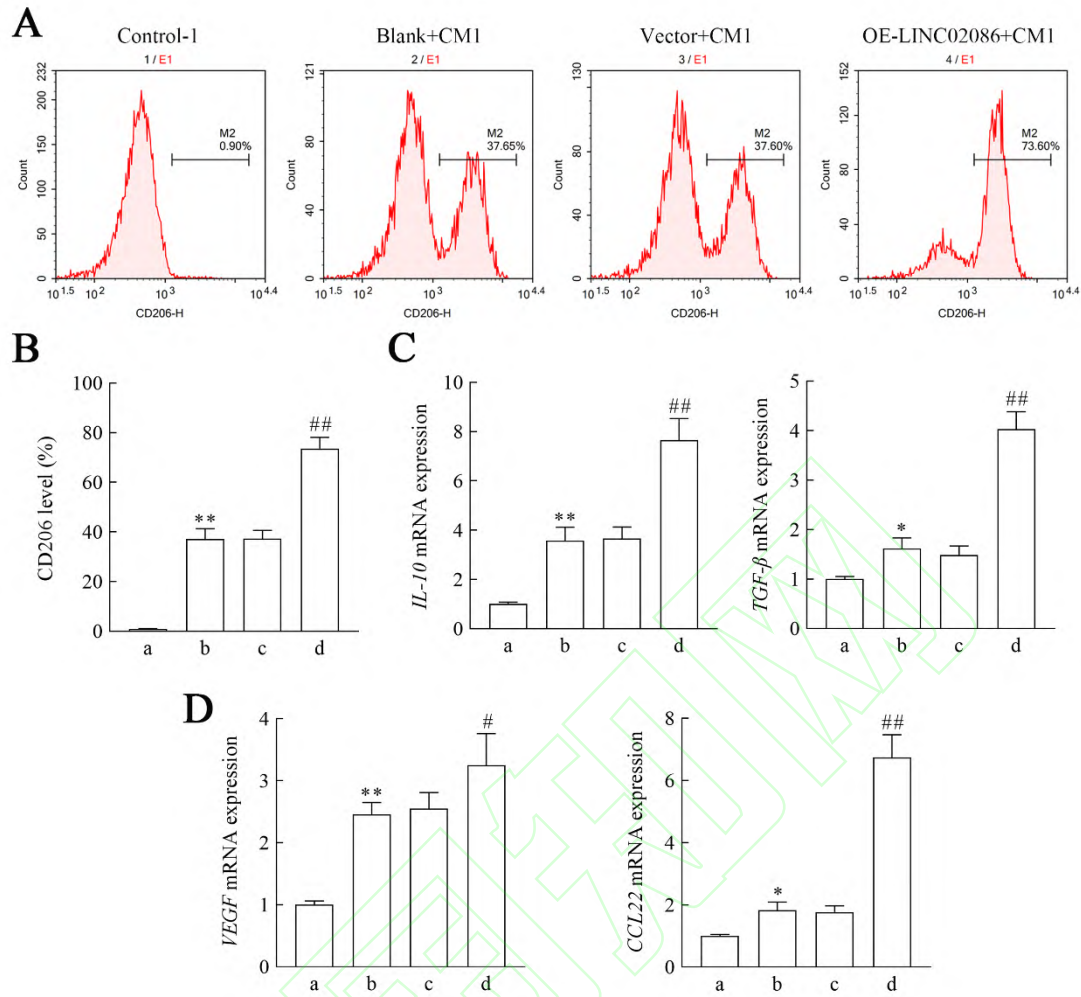


图2 胃癌 HGC-27 细胞中 *LINC02086* 过表达对 M0 型巨噬细胞的影响

Fig. 2 The effects of *LINC02086* overexpression in gastric cancer HGC-27 cells on M0 type macrophages

A, B: CD206 levels in cells of each group; C, D: *IL-10*, *TGF-β*, *VEGF* and *CCL22* mRNA expression levels in cells of each group; a: Control-1 group; b: Blank+CM1 group; c: Vector+CM1 group; d: OE-*LINC02086*+CM1 group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Control-1 group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs Blank+CM1 group.

2.2 *LINC02086* 过表达介导的巨噬细胞 M2 极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

采用不同来源的 CM2 刺激 HGC-27 细胞, 结果显示 (图 3), 与 Control-2 组比较, Blank+CM2 组 HGC-27 细胞增殖活性升高 ($P<0.05$, $LSD-t=2.43$), 迁移、侵袭细胞数量增加 (均 $P<0.05$, $LSD-t=3.39$ 、 2.53); 与 Blank+CM2 组比较, OE-*LINC02086*+CM2 组 HGC-27 细胞增殖活性升高 ($P<0.01$, $LSD-t=3.81$), 迁移、侵袭细胞数量进一步增加 ($P<0.01$, $LSD-t=12.83$ 、 12.32), Vector+CM2 组以上指标差异无统计学意义 ($P>0.05$, $LSD-t=0.31$ 、 1.18 、 0.63)。

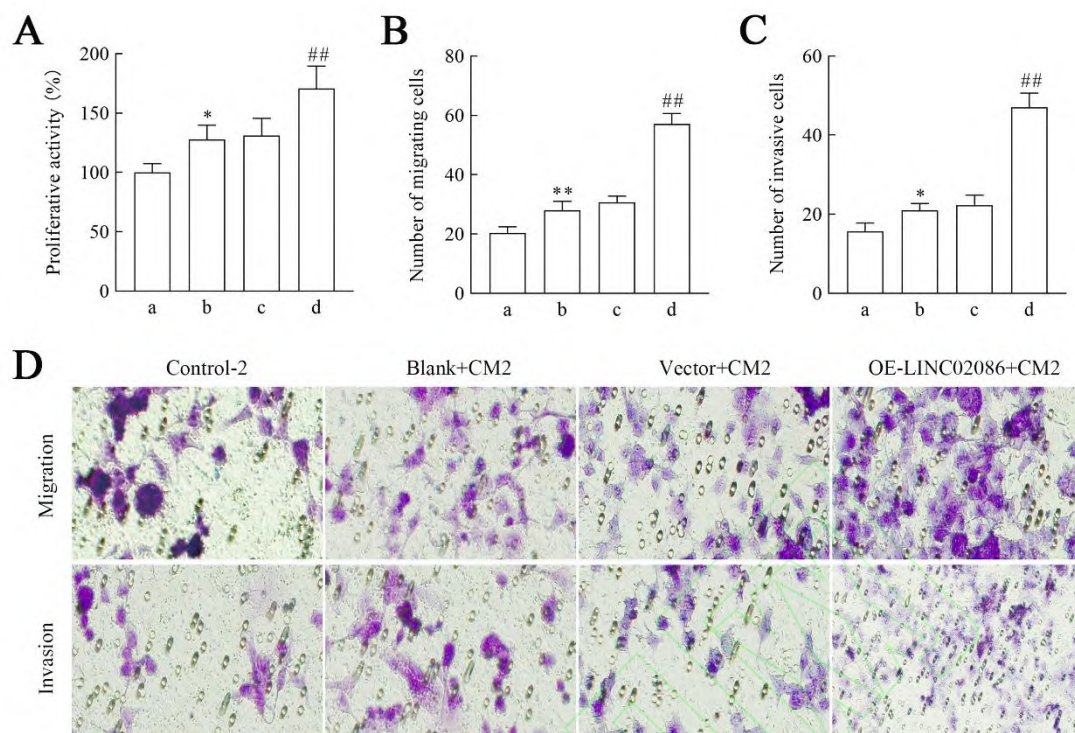


图3 *LINC02086* 过表达介导的巨噬细胞 M2 极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

Fig. 3 The effects of M2 polarization of macrophages mediated by *LINC02086* overexpression on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells

A: Cell proliferation activity in each group; B: Number of migrating cells in each group; C: Number of invasive cells in each group; D: Transwell assay was used to detect cell migration and invasion $\times 200$; a: Control-2 group; b: Blank+CM2 group; c: Vector+CM2 group; d: OE-LINC02086+CM2 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control-2 group; ## $P < 0.01$ vs Blank+CM2 group.

2.3 *LINC02086* 过表达通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进巨噬细胞向 M2 型极化

采用不同来源的 CM1 刺激 M0 型巨噬细胞, 结果显示 (图 4), 与 Control-1 组比较, Blank+CM1 组巨噬细胞中 Wnt3a 和 β -catenin 蛋白表达水平升高, GSK-3 β 蛋白表达水平降低 (均 $P < 0.01$, LSD- $t = 14.25$ 、 7.25 、 3.83); 与 Blank+CM1 组比较, OE-LINC02086+CM1 组巨噬细胞中 Wnt3a 和 β -catenin 蛋白表达水平升高, GSK-3 β 蛋白表达水平降低 (均 $P < 0.01$, LSD- $t = 7.00$ 、 12.25 、 10.67), Vector+CM1 组以上指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$, LSD- $t = 1.00$ 、 0.33 、 0.50)。采用不同来源的 CM1 联合 IWR-1 刺激 M0 型巨噬细胞, 结果显示 (图 5), 与 Vector+CM1 组比较, Vector+CM1+IWR-1 组巨噬细胞中 CD206 水平以及 *IL-10*、*TGF- β* 、*VEGF* 和 *CCL22* mRNA 表达水平均降低 (均 $P < 0.05$, LSD- $t = 7.37$ 、 3.46 、 2.38 、 3.24 、 2.53), 同时, 细胞中 β -catenin、CD206 和 VEGF 蛋白表达水平均降低 (均 $P < 0.05$, LSD- $t = 3.75$ 、 3.83 、 2.60); OE-LINC02086+CM1 组巨噬细胞中 CD206 水平以及 *IL-10*、*TGF- β* 、*VEGF* 和 *CCL22* mRNA 表达水平均升高 (均 $P < 0.01$, LSD- $t = 11.18$ 、 31.05 、 23.43 、 25.95 、 12.35), 同

时, 细胞中 β -catenin、CD206 和 VEGF 蛋白表达水平均升高 (均 $P<0.01$, LSD- $t=16.75$ 、12.00、13.20); 与 OE-LINC02086+CM1 组比较, OE-LINC02086+CM1+IWR-1 组巨噬细胞中 CD206 水平以及 $IL-10$ 、 $TGF-\beta$ 、 $VEGF$ 和 $CCL22$ mRNA 表达水平均降低 (均 $P<0.01$, LSD- $t=8.01$ 、27.64、18.10、9.76、4.24), 同时, 细胞中 β -catenin、CD206 和 VEGF 蛋白表达水平均降低 (均 $P<0.01$, LSD- $t=9.75$ 、6.83、6.00)。

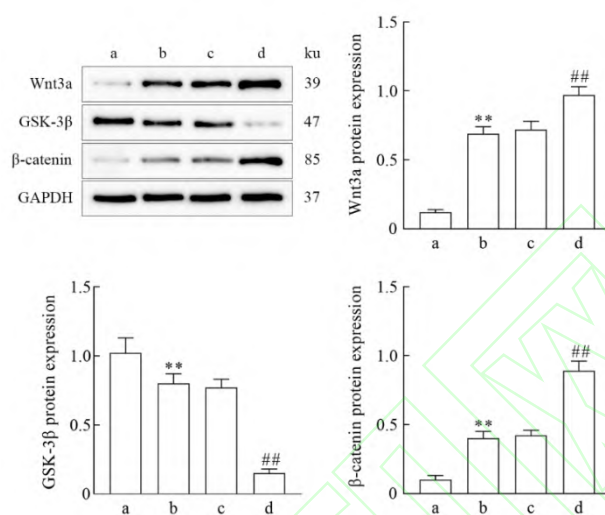


图4 胃癌来源 CM1 对巨噬细胞中 Wnt/ β -catenin 通路的影响

Fig. 4 The effects of gastric cancer derived CM1 on Wnt/ β -catenin pathway in macrophages

a: Control-1 group; b: Blank+CM1 group; c: Vector+CM1 group; d: OE-LINC02086+CM1 group;

** $P<0.01$ vs Control-1 group; ## $P<0.01$ vs Blank+CM1 group.

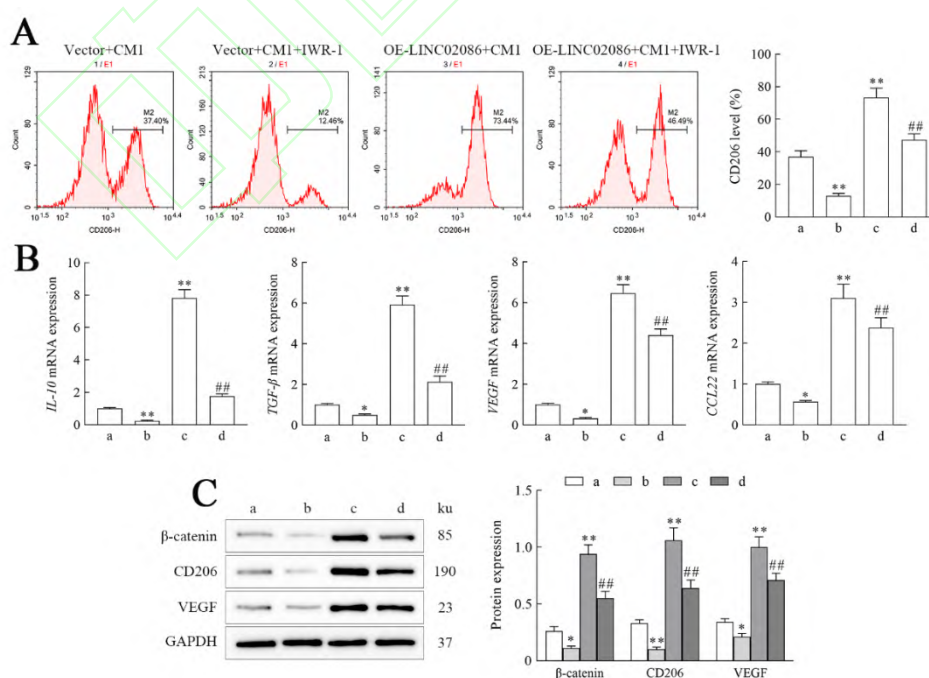


图5 CM1 联合 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂对巨噬细胞向 M2 型极化的影响

Fig. 5 The effects of CM1 combined with Wnt/ β -catenin pathway inhibitors on the M2 polarization of macrophages

A: CD206 levels in cells in each group; B: mRNA expression levels of M2-type macrophage-associated cytokines in cells in each group; C: Protein expression of β -catenin, CD206 and VEGF levels in cells in each group; a: Vector+CM1 group; b: Vector+CM1+IWR-1 group; c: OE-LINC02086+CM1 group; d: OE-LINC02086+CM1+IWR-1 group; * P <0.05, ** P <0.01 vs Vector+CM1 group; ## P <0.01 vs OE-LINC02086+CM1 group.

2.4 阻断 Wnt/ β -catenin 通路抑制 *LINC02086* 过表达介导的巨噬细胞 M2 极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

采用不同来源的 CM2 联合 IWR-1 刺激 HGC-27 细胞, 结果显示(图 6), 与 Vector+CM2 组比较, Vector+CM2+IWR-1 组 HGC-27 细胞增殖活性降低 (P <0.05, $LSD-t=3.22$), 迁移、侵袭细胞数量减少 (均 P <0.05, $LSD-t=5.01$ 、 5.95); 而 OE-LINC02086+CM2 组 HGC-27 细胞增殖活性升高 (P <0.01, $LSD-t=5.50$), 迁移、侵袭细胞数量增加 (均 P <0.01, $LSD-t=17.43$ 、 10.85)。与 OE-LINC02086+CM2 组比较, OE-LINC02086+CM2+IWR-1 组 HGC-27 细胞增殖活性降低 (P <0.05, $LSD-t=4.42$), 迁移、侵袭细胞数量减少 (均 P <0.01, $LSD-t=8.71$ 、 8.01)。

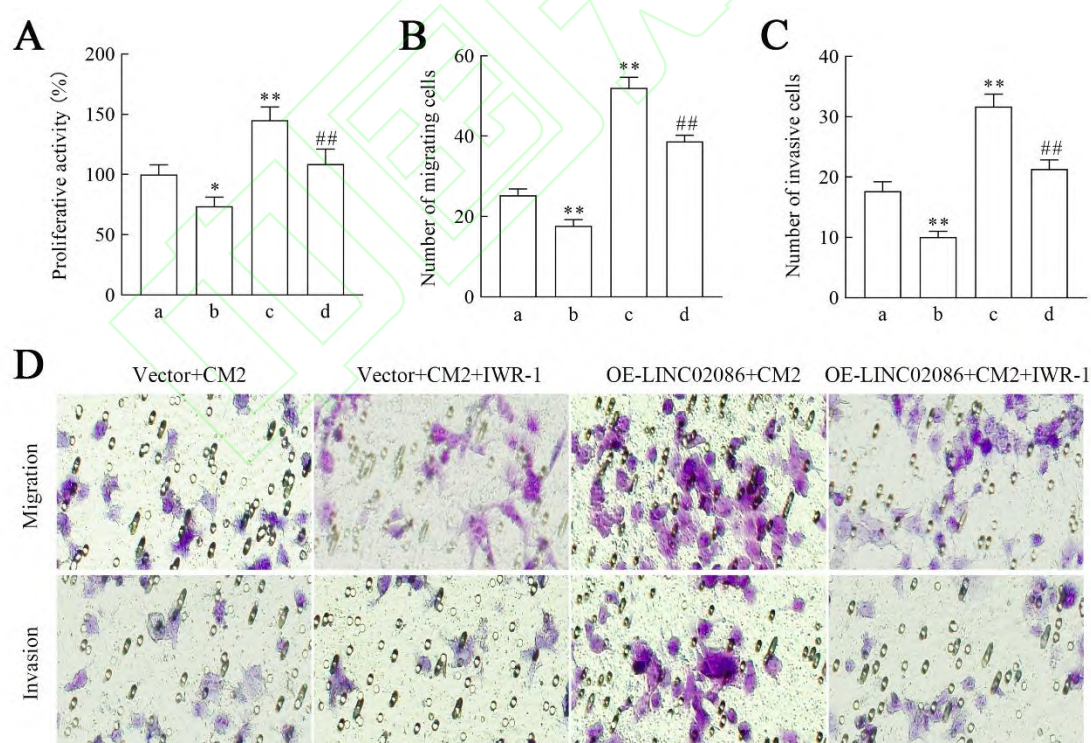


图 6 阻断 Wnt/ β -catenin 通路抑制 *LINC02086* 过表达介导的巨噬细胞 M2 极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

Fig. 6 Blocking Wnt/ β -catenin pathway inhibited the proliferation, migration and invasion

of gastric cancer cells by inhibiting the M2 polarization of macrophages mediated by *LINC02086* overexpression

A: cell proliferation activity in each group; B: number of migrating cells in each group; C: number of invasive cells in each group; D: Transwell assay was used to detect cell migration and invasion $\times 200$; a: Vector+CM2 group; b: Vector+CM2+IWR-1 group; c: OE-LINC02086+CM2 group; d: OE-LINC02086+CM2+IWR-1 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Vector+CM2 group; ## $P < 0.01$ vs OE-LINC02086+CM2 group.

3 讨论

TAM 是 TME 中重要的先天免疫细胞群之一,参与刺激肿瘤的慢性炎症、血管生成以及癌细胞免疫逃逸、侵袭和转移^[12]。近年来,靶向 TAM 干预胃癌的进展受到关注,通过介导肿瘤与 TAM 之间的相互作用可以抑制或促进胃癌细胞转移,然而其具体的分子机制仍有待进一步深入阐明^[13]。

巨噬细胞作为机体免疫系统的核心成员,其表型分化和功能重塑受到周围微环境调节。在病原体侵袭过程中,巨噬细胞一方面迅速对病原体发生免疫和炎症反应,一方面对组织进行修复和重塑,这些功能分别由 M1 型和 M2 型两种不同亚型的巨噬细胞主导,两种极化状态可通过相互转换维持细胞稳态。M2 型 TAM 在 TME 中占优势地位,通过增加 TGF- β 和 VEGF 含量促进血管内皮细胞活性,导致癌细胞的快速生长和远处转移,而癌细胞反过来又通过分泌高水平的 CCL22 等趋化因子来募集和扩增 TAM,造成恶性循环^[14-15]。钟裕昌等^[16]研究显示,M2 型 TAM 可促进胃癌细胞的侵袭和迁移,过表达 M2 型 TAM 中的 *TLA1* 基因可通过阻断磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路抑制胃癌细胞侵袭和迁移。本研究采用 CM1 诱导 M0 型巨噬细胞以模拟胃癌肿瘤环境,结果显示,巨噬细胞中 CD206 水平以及 *IL-10*、*TGF- β* 、*VEGF* 和 *CCL22* mRNA 表达水平较 Blank 组均显著升高,说明肿瘤环境中的巨噬细胞向 M2 型极化。近年来,*LINC02086* 展现出的在胰腺癌^[7]、乳腺癌^[17]、肺腺癌^[18]等肿瘤中的治疗潜力引起关注,并被预测可作为胃癌预后的潜在生物标志物^[8],但其在胃癌中的作用及机制还需进一步验证。本研究证实 *LINC02086* 在胃癌细胞系中高表达,并选择表达水平相对较低的 HGC-27 细胞进行慢病毒介导的过表达,以探究 *LINC02086* 对胃癌细胞恶性表型的影响及其机制。进一步研究发现,*LINC02086* 过表达能诱导巨噬细胞向 M2 型极化;在此基础上,通过收集极化后巨噬细胞的条件培养基 (CM2) 模拟肿瘤微环境中的反馈作用,验证了 *LINC02086* 通过介导巨噬细胞 M2 极化,进而促进胃癌 HGC-27 细胞增殖、迁移及侵袭的作用。

巨噬细胞极化受 Wnt/ β -catenin、PI3K/AKT/mTOR、Notch 等经典信号通路以及细胞因子微环境、外泌体介导的细胞间通讯的精密调控,Wnt/ β -catenin 通路尤为重要^[19]。Wnt3a 作为 Wnt 家族中的关键配体,与其共受体结合后激活支架蛋白 Disheveled,通过解离 GSK-3 β 和酪蛋白激酶 1 (casein kinase 1, CK1) 形成的复合体,使胞质 β -catenin 蛋白入核启动靶基

因转录, 诱导后续细胞反应^[20]。一方面, TAM 来源的 VEGF 通过 Wnt/ β -catenin 通路以自分泌和旁分泌的方式促进肿瘤干性^[21]; 另一方面, 肿瘤细胞释放的 Wnt 配体亦可激活该通路, 诱导 TAM 向 M2 型极化进而促进癌细胞生长和转移^[22]。*LINC00662* 被报道可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路介导巨噬细胞 M2 型极化促进肝癌转移^[23]。而本研究发现, *LINC00662* 过表达能激活 Wnt/ β -catenin 通路, 诱导巨噬细胞 M2 极化并增强 HGC-27 细胞的恶性表型; 而使用该通路抑制剂则可逆转上述效应。说明 *LINC02086* 可能通过调控 Wnt/ β -catenin 通路介导巨噬细胞 M2 极化促进胃癌细胞增殖和转移。

综上所述, *LINC02086* 过表达可促使巨噬细胞向 M2 型分化, 并进一步促进胃癌 HGC-27 细胞的增殖、迁移和侵袭, 其机制可能与激活 Wnt/ β -catenin 通路有关, 本研究为 *LINC02086* 作为胃癌诊疗靶点提供了依据。但研究中还存在一定局限性, 例如, 沉默 *LINC02086* 是否可抑制胃癌细胞的增殖及转移, 该过程中是否还涉及其他机制, 都还需进行进一步探索。

参考文献

- [1] Yang W J, Zhao H P, Yu Y, et al. Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2023, 29(16): 2452-68. doi: 10.3748/wjg.v29.i16.2452.
- [2] Li J, Sun J, Zeng Z, et al. Tumour-associated macrophages in gastric cancer: From function and mechanism to application[J]. Clin Transl Med, 2023, 13(8): e1386. doi: 10.1002/ctm2.1386.
- [3] Deng C, Huo M, Chu H, et al. Exosome circATP8A1 induces macrophage M2 polarization by regulating the miR-1-3p/STAT6 axis to promote gastric cancer progression[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 49. doi: 10.1186/s12943-024-01966-4.
- [4] Xu Z, Chen Y, Ma L, et al. Role of exosomal non-coding RNAs from tumor cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment[J]. Mol Ther, 2022, 30(10): 3133-54. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.01.046.
- [5] Zhang C, Wei S, Dai S, et al. The NR_109/FUBP1/c-Myc axis regulates TAM polarization and remodels the tumor microenvironment to promote cancer development[J]. J Immunother Cancer, 2023, 11(5): e006230. doi: 10.1136/jitc-2022-006230.
- [6] Xin L, Zhou L Q, Liu C, et al. Transfer of LncRNA CRNDE in TAM-derived exosomes is linked with cisplatin resistance in gastric cancer[J]. EMBO Rep, 2021, 22(12): e52124. doi: 10.15252/embr.202052124.
- [7] Xiong Y, Kong X, Tu S, et al. LINC02086 inhibits ferroptosis and promotes malignant phenotypes of pancreatic cancer via miR-342-3p/CA9 axis[J]. Funct Integr Genomics, 2024, 24(2): 49. doi: 10.1007/s10142-024-01329-8.
- [8] Chen Y, Gao X, Dai X, et al. Integrated bioinformatics and experimental analysis of long noncoding RNA associated-CeRNA as prognostic biomarkers in advanced stomach adenocarcinoma[J]. J Cancer, 2024, 15(6): 1536-50. doi: 10.7150/jca.89526.
- [9] Ackermann K, Bonaterra G A, Kinscherf R, et al. Growth differentiation factor-15 regulates

- oxLDL-induced lipid homeostasis and autophagy in human macrophages[J]. *Atherosclerosis*, 2019, 281: 128-36. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.009.
- [10] 代 朦, 靳 鑫, 雷优扬, 等. 过表达 miR-382 的肿瘤相关巨噬细胞对三阴性乳腺癌生物学特性的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2018, 40(15): 1375-82.
- [10] Dai M, Jin X, Lei Y Y, et al. Effect of miR-382 overexpressing tumor-associated macrophages on biological properties of triple-negative breast cancer 4T1 cells[J]. *J Third Mil Med Univ*, 2018, 40(15): 1375-82.
- [11] Li H, Zhao J, Sun J, et al. Demethylation of the *SFRP4* promoter drives gastric cancer progression *via* the Wnt pathway[J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(9): 1454-64. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0933.
- [12] Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 221: 107753. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107753.
- [13] Wang Y, Zhang J, Shi H, et al. M2 tumor-associated macrophages-derived exosomal MALAT1 promotes glycolysis and gastric cancer progression[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(24): e2309298. doi: 10.1002/advs.202309298.
- [14] Gao J, Liang Y, Wang L. Shaping polarization of tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 888713. doi: 10.3389/fimmu.2022.888713.
- [15] 吴婧婧, 黄 琦, 彭 瑶, 等. SPP1、PD-L1 的表达与 M2 巨噬细胞在肝细胞癌中的关系及对预后的影响研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(6): 970-5.
- [15] Wu J J, Huang Q, Peng Y, et al. The correlation of the expression of SPP1, PD-L1 and M2-polarized macrophages in hepatocellular carcinoma and their influence on prognosis[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(6): 970-5.
- [16] 钟裕昌, 阮笃激, 戴 霖, 等. 过表达 M2 型肿瘤相关巨噬细胞 TIA1 基因通过调控 PI3K/AKT 信号通路抑制胃癌细胞侵袭和迁移[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(8): 1658-64.
- [16] Zhong Y C, Ruan D J, Dai L, et al. Overexpression of TIA1 gene in M2-type tumor-associated macrophages inhibited invasion and migration of gastric cancer cells by regulating the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Chin J Immunol*, 2024, 40(8): 1658-64.
- [17] Han X, Shi F, Guo S, et al. LINC02086 promotes cell viability and inhibits cell apoptosis in breast cancer by sponging miR-6757-5p and up-regulating EPHA2[J]. *World J Surg Oncol*, 2023, 21(1): 371. doi: 10.1186/s12957-023-03245-w.
- [18] Gu X, Li X, Zhang X, et al. Noncoding RNA-mediated high expression of PFKFB3 correlates with poor prognosis and tumor immune infiltration of lung adenocarcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2023, 16: 767-83. doi: 10.2147/OTT.S416155.
- [19] Mohapatra S, Pioppini C, Ozpolat B, et al. Non-coding RNAs regulation of macrophage polarization in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 24. doi: 10.1186/s12943-021-01313-x.
- [20] 张延平, 庄昆彬, 江 琴, 等. 珠子草素调控 GSK3 β / β -catenin 通路对结肠癌大鼠肿瘤生长和免疫功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(8): 2009-13. doi:10.3969/j.issn.1005-

9202.2024.08.054.

- [20] Zhang Y P, Zhuang K B, Jiang Q, et al. Effects of callicariin regulating GSK3 β / β -catenin pathway on tumor growth and immune function in colon cancer rats[J]. Chin J Gerontol, 2024, 44(8): 2009-13. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2024.08.054.
- [21] Wang L, Zhang L, Zhao L, et al. VEGFA/NRP-1/GAPVD1 axis promotes progression and cancer stemness of triple-negative breast cancer by enhancing tumor cell-macrophage crosstalk[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(2): 446-63. doi: 10.7150/ijbs.86085.
- [22] Tsukanov V V, Tonkikh J L, Kasparov E V, et al. Inhibition of M2 tumor-associated macrophages polarization by modulating the Wnt/ β -catenin pathway as a possible liver cancer therapy method[J]. World J Gastroenterol, 2024, 30(40): 4399-403. doi: 10.3748/wjg.v30.i40.4399.
- [23] Wang J, Shen D, Li S, et al. LINC00665 activating Wnt3a/ β -catenin signaling by bond with YBX1 promotes gastric cancer proliferation and metastasis[J]. Cancer Gene Ther, 2023, 30(11): 1530-42. doi: 10.1038/s41417-023-00657-4.