论著·基础医学

LncRNA FGD5-AS1通过调节miR-302b-3p/E2F1轴对胃癌细胞迁移及侵袭的影响

李 娜[1],李 浩[1],林 坤[2],贺延新[1],郑英兰[1] 康复大学青岛中心医院:[1]消化内科;[2]内镜中心,山东青岛

［摘要］ **目的** 探讨长链非编码RNA FGD5-AS1(LncRNA FGD5-AS1)调节微小RNA-302b-3p(miR-302b-3p)/E2F转录因子1(E2F1)轴对胃癌细胞迁移及侵袭的影响。**方法** 实时荧光定量PCR反应(qRT-PCR)检测胃癌细胞系(SGC-7901、MKN-45、HGC-27、AGS、BGC-823)及人胃粘膜上皮细胞系GES-1中LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p、E2F1 mRNA表达,筛选最佳干预细胞。将胃癌细胞分为对照组(NC组)、sh-NC组、sh-FGD5-AS1组、sh-FGD5-AS1+anti-miR-NC组、sh-FGD5-AS1+anti-miR-302b-3p组。qRT-PCR检测细胞中LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p、E2F1 mRNA的表达水平;MTT法及流式细胞仪分别检测细胞增殖与凋亡;划痕实验及Transwell实验分别检测细胞迁移与侵袭;Western blot检测E2F1、Ki-67、Bax、Bcl-2蛋白表达;裸鼠移植瘤实验验证LncRNA FGD5-AS1对胃癌移植瘤生长的影响;双荧光素酶报告基因和RNA pull-down实验检测LncRNA FGD5-AS1、E2F1与miR-302b-3p的靶向关系。**结果** 与GES-1相比,胃癌细胞系(SGC-7901、MKN-45、HGC-27、AGS、BGC-823)中LncRNA FGD5-AS1、E2F1 mRNA表达水平升高,miR-302b-3p表达水平降低($P<0.05$),选择AGS细胞进行实验;沉默LncRNA FGD5-AS1表达可显著上调miR-302b-3p表达,下调E2F1表达,抑制胃癌细胞增殖、迁移与侵袭,促进细胞凋亡($P<0.05$);抑制miR-302b-3p表达可部分减弱沉默LncRNA FGD5-AS1对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的作用($P<0.05$);体内实验显示,沉默LncRNA FGD5-AS1表达可显著抑制胃癌移植瘤小鼠肿瘤的生长($P<0.05$);RNA pull-down实验、双荧光素酶报告基因实验证实LncRNA FGD5-AS1、E2F1与miR-302b-3p存在靶向调控关系。**结论** LncRNA FGD5-AS1在胃癌细胞中上调表达,沉默LncRNA FGD5-AS1表达可通过调节miR-302b-3p/E2F1轴,抑制胃癌恶性进展。

［关键词］ 长链非编码RNA FGD5-AS1;微小RNA-302-3p/E2F转录因子1轴;胃癌;迁移;侵袭

［中图法分类号］ R394.3;R730.23;R735.2 ［文献标志码］ A

Effects of LncRNA FGD5-AS1 on migration and invasion of gastric cancer cells by regulating miR-302b-3p/E2F1 axis

LI Na[1], LI Hao[1], LIN Kun[2], HE Yanxin[1], ZHENG Yinglan[1] [1]Department of Gastroenterology, [2]Endoscopy Center, Qingdao Central Hospital of Rehabilitation University, Qingdao, Shandong, China

［**Abstract**］ **Objective** To explore the effects of long non coding RNA FGD5-AS1 (LncRNA FGD5-AS1) on the migration and invasion of gastric cancer cells by regulating the microRNA-302b-3p (miR-302b-3p)/E2F transcription factor 1 (E2F1) axis. **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression of LncRNA FGD5-AS1, miR-302b-3p, and E2F1 in gastric cancer cell lines (SGC-7901, MKN-45, HGC-27, AGS, BGC-823) and human gastric epithelial cell line GES-1, in

［基金项目］ 青岛市2023年度医药卫生科研指导项目(2023-WJZD189)

［通信作者］ 郑英兰,E-mail:wtsgnc@163.com

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:李娜,李浩,林坤,等. LncRNA FGD5-AS1通过调节miR-302b-3p/E2F1轴对胃癌细胞迁移及侵袭的影响[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(24):3065-3076. DOI:10.16016/j.2097-0927.202510027.

Citation:LI N,LI H,LIN K,*et al*. Effects of LncRNA FGD5-AS1 on migration and invasion of gastric cancer cells by regulating miR-302b-3p/E2F1 axis[J]. J Army Med Univ,2025,47(24):3065-3076. DOI:10.16016/j.2097-0927.202510027.

order to screen for the best intervention cells. Gastric cancer cells were separated into control group (NC group), sh-NC group, sh-FGD5-AS1 group, sh-FGD5-AS1+anti-miR-NC group, and sh-FGD5-AS1+anti-miR-302b-3p group. qRT-PCR was performed to detect the expression of LncRNA FGD5-AS1, miR-302b-3p, and E2F1 in the cells. MTT assay and flow cytometry were applied to measure cell proliferation and apoptosis, respectively. Scratch and Transwell assays were carried out to measure cell migration and invasion, respectively. Western blotting was carried out to measure the protein levels of E2F1, Ki-67, Bax and Bcl-2. Nude mouse model of transplantable subcutaneous tumor was established to verify the effect of LncRNA FGD5-AS1 on the growth of gastric cancer transplant tumors. Dual luciferase reporter gene and RNA pull-down assays were used to detect the targeting relationship of LncRNA FGD5-AS1 and E2F1 with miR-302b-3p. **Results** Compared with the GES-1 cells, the gastric cancer cell lines SGC-7901, MKN-45, HGC-27, AGS and BGC-823 exhibited significantly increased mRNA levels of LncRNA FGD5-AS1 and E2F1, while decreased level of miR-302b-3p ($P<0.05$). AGS cells were finally selected for the following experiments. Silencing LncRNA FGD5-AS1 prominently up-regulated miR-302b-3p, down-regulated E2F1, and inhibited cell proliferation, migration, and invasion, and promoted cell apoptosis in gastric cancer AGS cells ($P<0.05$). Inhibition of miR-302b-3p partially weakened the effects of silencing LncRNA FGD5-AS1 on the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of gastric cancer cells ($P<0.05$). *In vivo* experiments showed that silencing LncRNA FGD5-AS1 could prominently inhibit the growth of transplanted tumors in mice ($P<0.05$). RNA pull-down and dual luciferase reporter gene assays confirmed the targeted regulatory relationship of LncRNA FGD5-AS1 and E2F1 with miR-302b-3p. **Conclusion** LncRNA FGD5-AS1 is up-regulated in gastric cancer cells, and its silencing can inhibit the malignant progression of gastric cancer by regulating the miR-302b-3p/E2F1 axis.

[**Key words**] long non coding RNA FGD5-AS1; miR-302-3p/E2F1 axis; gastric cancer; migration; invasion

Supported by the Medical Science Research Guidance Project of Qingdao City in 2023 (2023-WJZD189). Corresponding author: ZHENG Yinglan, E-mail: wtsgnc@163.com

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,也是世界上发病率和死亡率最高的癌症之一,目前,治疗胃癌的主要方式是根治性手术切除和放化疗,早期患者5年生存率可接近95%,但大多数患者确诊时为晚期癌症,治疗选择有限[1-2]。复发与转移是晚期胃癌患者死亡主要原因,肿瘤的发生与发展伴随着许多基因的异常表达,如长链非编码RNA(lncRNAs)和微小RNA(miRNAs)参与胃癌的进展机制[3]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNAs)参与调节包括转录、转录后和表观遗传过程。越来越多的证据证实lncRNA在肿瘤发生和转移中的重要作用,参与肿瘤进展、放射耐药、化疗耐药和对靶向治疗的敏感性[4]。LncRNA FGD5-AS1是其中之一,LncRNA FGD5-AS1在胃癌中具有癌基因的作用已得到证实,研究显示,LncRNA FGD5-AS1在胃癌组织中表达升高,高表达LncRNA FGD5-AS1的胃癌患者发生淋巴转移或远处转移的风险较高,且患者预后较差,敲低LncRNA FGD5-AS1的表达会减弱胃癌细胞的增殖和转移能力[5]。然而LncRNA FGD5-AS1在胃癌中具体作用机制尚不清楚。

研究显示,LncRNA FGD5-AS1可以通过海绵miRNA来调节mRNA表达,调控肿瘤细胞的恶性行为[6]。本研究前期经生物信息学分析显示,miR-302b-3p是LncRNA FGD5-AS1下游靶基因,研究显示,miR-302b-3p在胃癌是一种抑癌因子,过表达miR-302b-3p可抑制细胞增殖和细胞周期G1-S转变,诱导细胞凋亡[7]。此外,经生物信息学工具分析显示miR-302b-3p与E2F转录因子1(E2F1)有靶向结合位点,可能是E2F1的上游调控因子。E2F1是一种基因调控因子,参与调控肿瘤细胞增殖、血管生成等过程,抑制E2F1表达可抑制胃癌细胞迁移与侵袭[8-9]。通过以上研究本研究推测LncRNA FGD5-AS1可能作为胃癌细胞中竞争性内源性RNA(ceRNA),通过海绵化miR-302b-3p调控E2F1表达影响胃癌的发生发展。因此,本研究主要探讨LncRNA FGD5-AS1对胃癌恶性生物学行为及miR-302b-3p/E2F1轴的影响,初步探讨LncRNA

FGD5-AS1在胃癌中的作用机制,为胃癌的治疗提供靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人胃黏膜上皮细胞系GES-1与胃癌细胞系(SGC-7901、MKN-45、HGC-27、AGS、BGC-823)均购自中国科学院上海细胞库;

LncRNA FGD5-AS1短发夹(sh-FGD5-AS1)及阴性对照(sh-NC)、miR-302b-3p拮抗剂(anti-miR-302b-3p)及阴性对照(anti-miR-NC)、miR-302b-3p模拟物(miR-302b-3p mimics)及阴性对照(miR-NC)载体购自上海Genepharma公司;miR-302b-3p、LncRNA FGD5-AS1、GAPDH、U6引物购自广州RiboBio;蛋白提取试剂盒(HR8018)、Edu(KM0162)试剂购自北京百奥莱博科技有限公司;Lipo6000转染试剂(C0526)、MTT细胞增殖检测试剂盒(C0009S)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(C1062L)、E2F1(AF6756)、Ki-67(AF1738)、Bax(AF5120)、Bcl-2(AF0060)抗体购自上海Beyotime。

LightCycler480 PCR仪购自瑞士Roche公司;Multiskan™ FC酶标仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司;CytoFLEX S LX流式细胞仪购自美国Beckman coulter公司;IN480TC-HD18-HDM倒置显微镜购自美国AMSCOPE公司;MX63荧光显微镜购自日本Olympus公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞转染及分组 GES-1、SGC-7901、MKN-45、HGC-27、AGS、BGC-823细胞在含有10%胎牛血清(FBS)DMEM培养基中培养,培养条件:37 ℃,5% CO_2培养箱。培养48 h后,qRT-PCR法检测细胞LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p、E2F1 mRNA表达水平。

取对数生长期的AGS细胞,以1.2×10^6/孔接种于6孔板中培养过夜,密度达到20%~30%时,使用终浓度50 nmol/L的转染试剂(无血清培养基稀释)对细胞进行转染,根据载体转染将细胞分为对照组(NC组)、sh-NC组、sh-FGD5-AS1组、sh-FGD5-AS1+anti-miR-NC组、sh-FGD5-AS1+anti-miR-302b-3p组,转染后更换含有血清培养基48 h后,检测各组细胞基因表达。

1.2.2 LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p、E2F1 mRNA检测 采用qRT-PCR法检测LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p、E2F1 mRNA表达水平,使用RNA提取试剂盒提取细胞中总RNA,使用PrimeScript RT试剂盒反转录为cDNA,反应条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,45个循环,反应体系25 μL。再根据引物序列(表1),使用SYBR Premix Ex Taq Ⅱ进行PCR扩增,以GAPDH、U6为内参,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p、E2F1 mRNA相对表达。

1.2.3 MTT实验 将转染的各组细胞置于96孔板培养,孵育48 h后,每孔加入20 μL浓度为5 mg/mL的MTT溶液,孵育4 h后加入DMSO终止培养,测定Multiskan™ FC酶标仪570 nm处的光密度(OD)值。

1.2.4 Edu实验 将各组处理的胃癌细胞以1×10^{5}细胞/孔接种于24孔板中培养24 h,然后在培养基中加入10 μM Edu试剂,在37 ℃、5% CO_2条件下孵育2 h,4%多聚甲醛固定,0.5% TritonX-100渗透后,DAPI复染细胞核,荧光显微镜下观察Edu阳性细胞。

1.2.5 细胞凋亡检测 将各组培养的细胞用不含EDTA的胰蛋白酶消化并收获,使用Buffer缓冲液重悬细胞浓度为5×10^6/mL,抽取100 μL细胞悬液分别加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI,室温避光孵育,流式细胞仪分析细胞凋亡。

1.2.6 划痕实验 将各组转染的细胞以4×10^{5}个/孔接种于6孔板内,细胞融合约70%时,使用200 μL移液枪头在平板内划痕,PBS洗涤去除漂浮细胞,分别观察并拍照记录0 h与48 h的划痕情况,Image J软件分析划痕愈合率。

1.2.7 Transwell实验 Transwell小室的上室,加入100 μL 50 ng/μL的Matrigel溶液,待胶凝胶后,将各组胃癌细胞使用无血清培养基调整密度为2×10^{5}个细胞/mL,于上室中加入100 μL细胞悬浮液,下室加入含

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence for qRT-PCR

Genes	Upsteam (5′-3′)	Downsteam (5′-3′)
LncRNA FGD5-AS1	CCTTGTCCTTCCCTGTTTCA	ACTGGGCACTTGATGCTTTC
E2F1	CACACCAAAGGACAAGAAGG	CAAGACAGACCTTCTCCACA
GAPDH	GGAGTCCACTGGTGTCTTCA	GGGAACTGAGCAATTGGTGG
miR-302b-3p	GCGTAAGTGCTTCCATGTT	TCCAGGGACCGAGGA
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

10%FBS的培养液,37 ℃孵育48 h后,室温用4%多聚甲醛固定10 min,1%结晶紫溶液染色20 min,倒置显微镜(放大200倍)计数5个随机视野的穿膜细胞数。

1.2.8 RNA pull-down实验 将生物素化(Bio标记)的miR-302b-3p野生型或突变型(wt/mut)载体转染AGS细胞,以Bio-NC作为对照,48 h后,裂解细胞,使用链霉亲和素包被的磁珠分离复合物,RT-qPCR检测复合物中LncRNA FGD5-AS1、E2F1 mRNA相对富集。

1.2.9 双荧光素酶报告基因实验 分别构建含有与miR-302b-3p结合位点的LncRNA FGD5-AS1与E2F1野生型(wt)与突变型(mut)的PmirGLO表达载体,将构建的FGD5-AS1-wt、FGD5-AS1-mut、E2F1-wt、E2F1-mut分别与miR-NC、miR-302b-3p mimics共转染AGS细胞48 h,双荧光素酶报告基因检测系统检测相对荧光素酶活性。

1.2.10 Western blot检测E2F1、Ki-67、Bax、Bcl-2蛋白 采用细胞蛋白提取试剂盒从各组细胞中分离总蛋白,SDS-PAGE电泳后,将分离的总蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温下,用2%牛血清白蛋白阻断PVDF膜2 h,将膜与E2F1、Ki-67、Bax、Bcl-2一抗稀释液4 ℃下孵育过夜,加入二抗孵育2 h后,使用化学发光ECL试剂盒显示条带,并使用ImageJ软件进行定量分析。

1.2.11 裸鼠移植瘤实验 将6周龄雄性BALB/c裸鼠(购于山东艾莱克生物科技有限公司,生产许可:SCXK(鲁)2022 0007,实验经山东艾莱克生物科技有限公司动物伦理委员会批准(批号:DW2024088-01)。分为sh-NC组、sh-FGD5-AS1组,每组5只,将转染相应病毒载体的AGS细胞注射到裸鼠背部,每只小鼠5×10^5个细胞,每周测量移植瘤体积,5周后脱颈处死,取移植瘤称重并测量体积。qRT-PCR法检测移植瘤组织LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p表达。免疫组化法检测移植瘤组织E2F1、Ki-67蛋白表达。

1.3 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行统计分析,符合正态分布的实验数据以($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用Tukey事后检验,$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p、E2F1 mRNA在胃癌细胞系中表达

与GES-1相比,胃癌细胞系(SGC-7901、MKN-45、HGC-27、AGS、BGC-823)中LncRNA FGD5-AS1、E2F1 mRNA表达水平显著升高($P<0.05$),miR-302b-3p表达水平显著降低($P<0.05$)。如表2所示,AGS中LncRNA FGD5-AS1表达水平最高,miR-302b-3p表达最低,选择表达差异最大的AGS细胞进行后续实验。

表2 不同胃癌细胞系中LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p、E2F1 mRNA表达比较 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of LncRNA FGD5-AS1, miR-302b-3p, E2F1 mRNA expression in different gastric cancer cell lines ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Cell line	LncRNA FGD5-AS1/GAPDH	miR-302b-3p/U6	E2F1 mRNA/GAPDH
GES-1	1.00±0.15	0.99±0.10	1.02±0.14
SGC-7901	1.65±0.13[a]	0.85±0.08[a]	1.41±0.11[a]
MKN-45	2.12±0.15[a]	0.61±0.06[a]	1.76±0.14[a]
HGC-27	1.83±0.17[a]	0.74±0.07[a]	1.63±0.13[a]
AGS	3.68±0.25[a]	0.31±0.03[a]	2.54±0.21[a]
BGC-823	2.72±0.31[a]	0.45±0.05[a]	2.12±0.15[a]

The data was detected by qRT-PCR and calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with GES-1 cells as the calibration sample. a: $P<0.05$, compared with GES-1 cells

2.2 各组细胞LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p、E2F1 mRNA表达比较

与sh-NC组相比,sh-FGD5-AS1组LncRNA FGD5-AS1、E2F1 mRNA及蛋白表达水平显著降低,miR-302b-3p表达水平升高($P<0.05$);与sh-FGD5-AS1+anti-miR-NC组相比,sh-FGD5-AS1+anti-miR-302b-3p组E2F1 mRNA及蛋白表达水平升高,miR-302b-3p表达水平降低($P<0.05$);见图1。

2.3 各组细胞增殖与凋亡

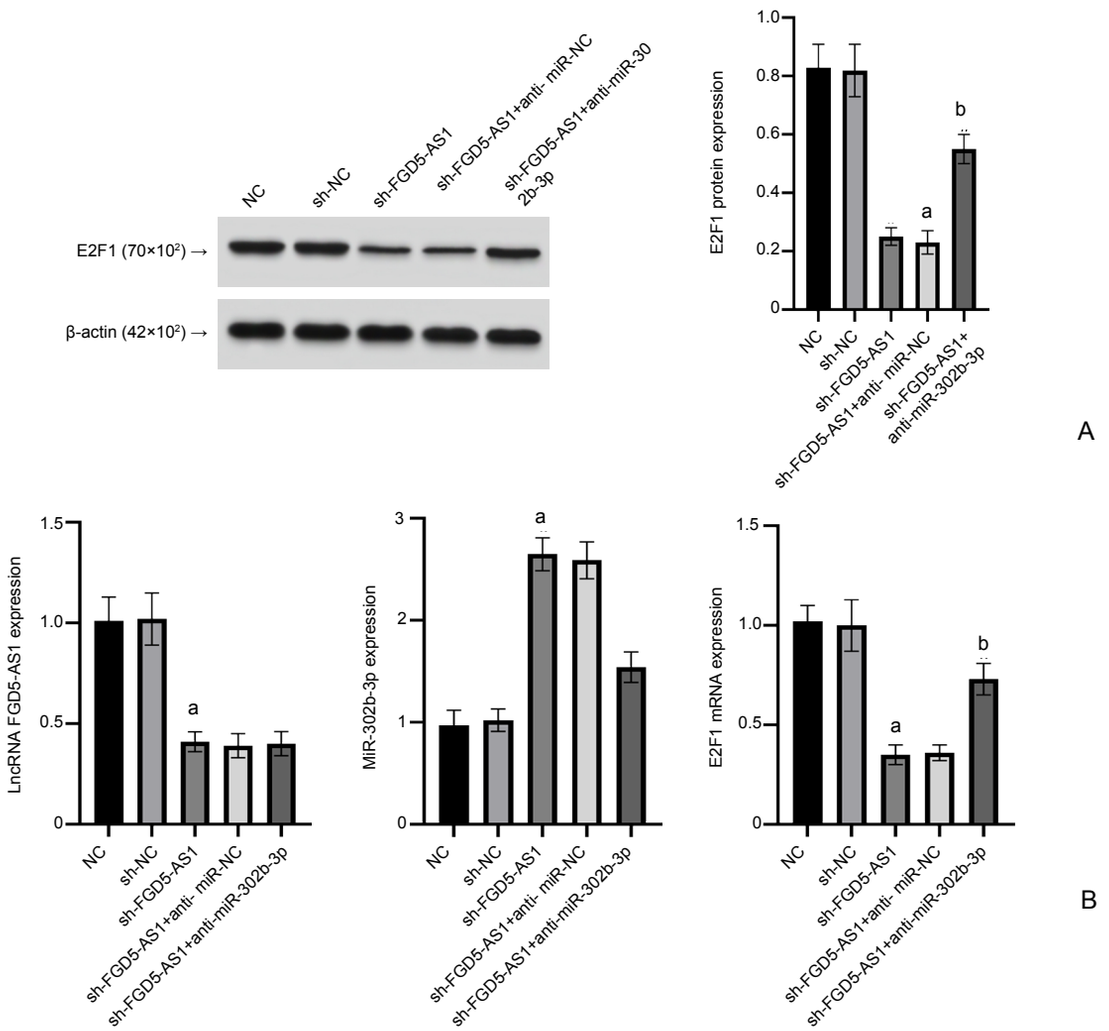
与sh-NC组相比,sh-FGD5-AS1组细胞OD值、Edu阳性率显著降低,细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与sh-FGD5-AS1+anti-miR-NC组相比,sh-FGD5-AS1+anti-miR-302b-3p组细胞OD值、Edu阳性率显著升高,细胞凋亡率显著降低($P<0.05$);见图2。

2.4 各组细胞迁移与侵袭

与sh-NC组相比,sh-FGD5-AS1组细胞划痕愈合率及侵袭数显著降低($P<0.05$);与sh-FGD5-AS1+anti-miR-NC组相比,sh-FGD5-AS1+anti-miR-302b-3p组细胞划痕愈合率及侵袭数显著升高($P<0.05$);见图3。

2.5 各组增殖与凋亡相关蛋白表达比较

与sh-NC组相比,sh-FGD5-AS1组Ki-67、Bcl-2表达水平显著降低,Bax表达升高($P<0.05$);与sh-FGD5-AS1+anti-miR-NC组相比,sh-FGD5-AS1+anti-miR-302b-3p组Ki-67、Bcl-2表达水平升高,Bax表达水平降低($P<0.05$);见图4。



A: Western blotting showing E2F1 protein expression in each group of cells; B: Comparison of LncRNA FGD5-AS1, miR-302b-3p, and E2F1 mRNA levels in different groups of cells. E2F1: E2F transcription factor 1. a: $P<0.05$, compared with the sh-NC group; b: $P<0.05$, compared with the sh-FGD5-AS1+anti miR-NC group

图1 各组细胞LncRNA FGD5-AS1、miR-302b-3p、E2F1 mRNA表达比较(n=6)

Figure 1 Comparison of LncRNA FGD5-AS1, miR-302b-3p and E2F1 mRNA expression levels in each group of gastric cancer cells (n=6)

2.6 LncRNA FGD5-AS1对胃癌移植瘤生长的影响

如图5所示,在移植21 d、28 d后,sh-FGD5-AS1组小鼠移植瘤体积与重量明显较Sh-NC组降低($P<0.05$);RT-qPCR结果显示,与Sh-NC组相比,sh-FGD5-AS1组移植瘤组织LncRNA FGD5-AS1表达显 著降低,miR-302b-3p表达显著升高($P<0.05$);免疫组化检测结果显示,sh-FGD5-AS1组移植瘤组织E2F1、Ki-67阳性表达显著低于Sh-NC组($P<0.05$),见图6。

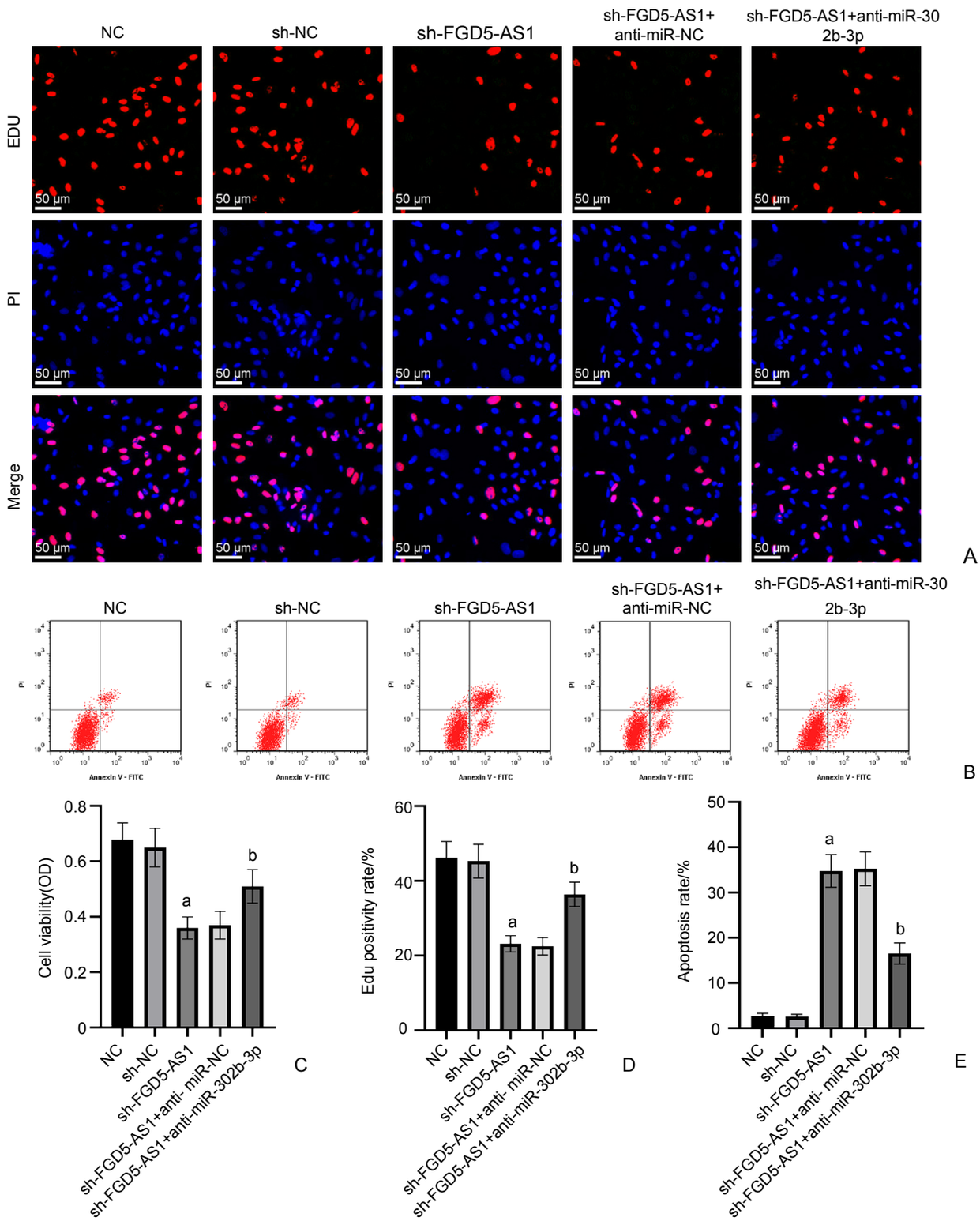
2.7 LncRNA FGD5-AS1靶向调节miR-302b-3p表达

如图7所示,经starBase在线分析显示,LncRNA FGD5-AS1、E2F1与miR-302b-3p均有结合位点;下拉实验证明,Bio-NC比较,Bio-miR-302b-3p-wt探针富集更多的LncRNA FGD5-AS1、E2F1 mRNA($P<0.05$),见表3。

双荧光素酶实验显示,FGD5-AS1-wt、E2F1-wt与miR-302b-3p mimics共转染细胞后,相对荧光素酶活性较miR-NC组显著降低($P<0.05$),见表4。

2.8 LncRNA FGD5-AS1、E2F1 mRNA在胃癌组织中的临床意义分析

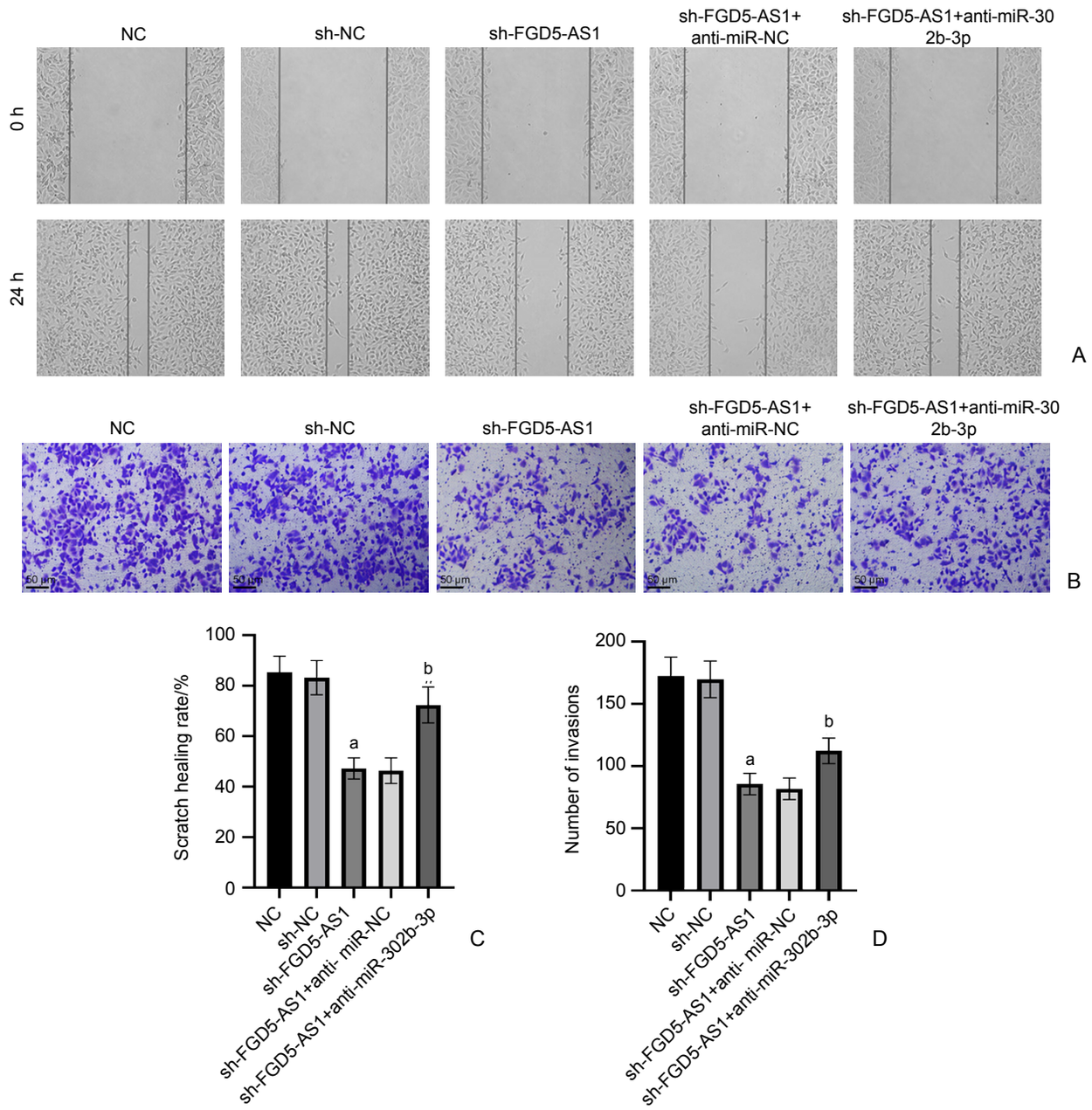
TCGA数据库分析结果显示,与正常组织相比,胃癌组织中LncRNA FGD5-AS1表达基本不变($P>0.05$),E2F1 mRNA表达升高($P<0.05$),二者均与预后无关($P>0.05$),见图8。



A: Edu experiment detects cell proliferation; B: Flow cytometry for cell apoptosis; C~E: Statistical analyses of cell vitality (C), proliferation (D) and apoptosis (E). a: $P<0.05$, compared with the sh-NC group; b: $P<0.05$, compared with the sh-FGD5-AS1+ anti miR-NC group

图2 各组细胞增殖与凋亡比较(n=6)

Figure 2 Comparison of cell proliferation and apoptosis across different groups of gastric cancer cells (n=6)



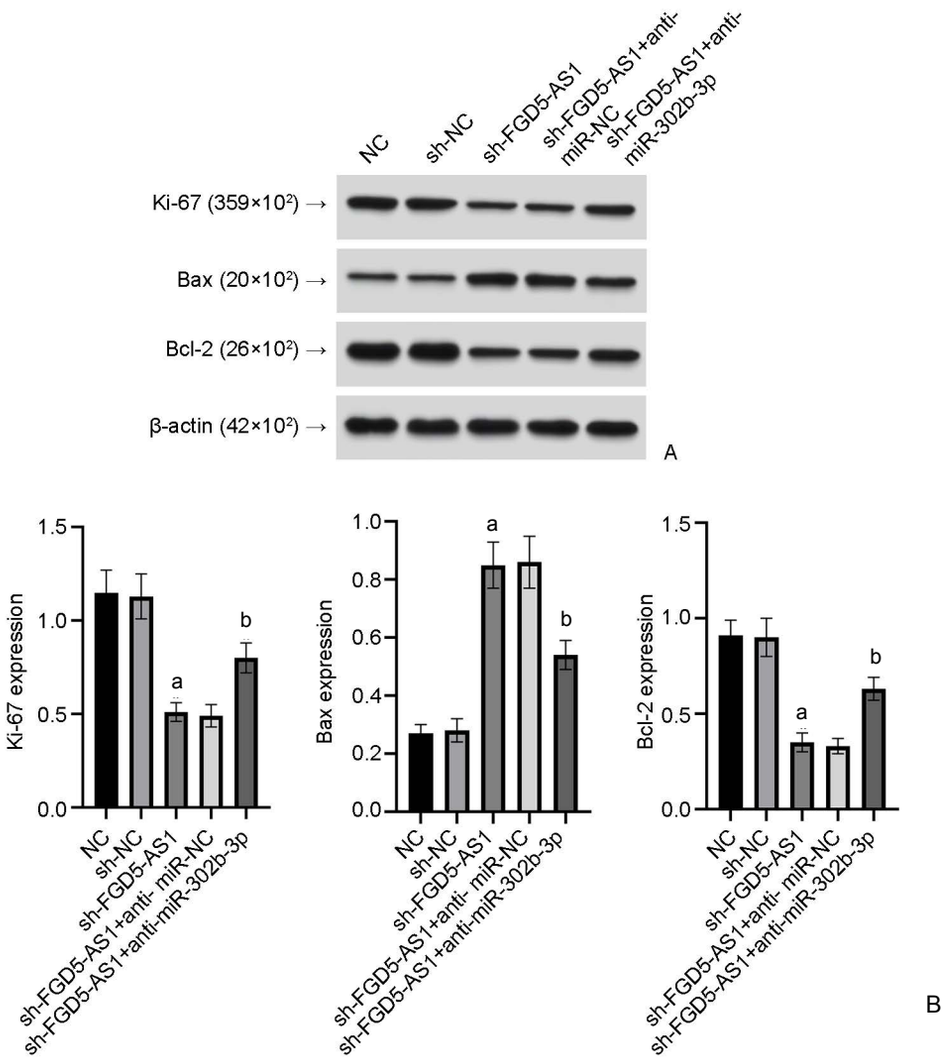
A: Representative images of cell scratch assay in each group of cells; B: Crystal violet staining showing cell invasion in each group (×200); C, D: Statistical analyses of scratch healing rates (C) and numbers of invasive cells (D) among different groups of cells. a: $P<0.05$, compared with the sh-NC group; b: $P<0.05$, compared with the sh-FGD5-AS1+anti miR-NC group

图3 各组细胞迁移与侵袭比较(n=6)

Figure 3 Comparison of cell migration and invasion among different groups (n=6)

3 讨论

胃癌是全球第五大最常见癌症,尽管胃癌早期诊断及新兴的治疗方法已取得很大进步,作为一种极具侵袭性的肿瘤,胃癌的治疗效果仍远不能令人满意[10]。LncRNAs在肿瘤中的染色质重塑、免疫逃逸、代谢和耐药性中等过程中发挥调控作用,其在胃癌中的异常表达,与肿瘤的恶性进展有关[11]。据报道显示,LncRNA FGD5-AS1在多种肿瘤中发挥致癌基因的作用,如结肠癌、口腔鳞状细胞癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌等,其高表达可促进肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭[12-14]。LncRNA FGD5-AS1还与肿瘤细胞的耐药性有关,如XIA等[15]研究显示,LncRNA FGD5-AS1在建立的5-氟尿嘧啶(5-Fu)耐药宫颈癌细胞中表达显著上



A: Western blot detection showing protein expression of Ki-67, Bax, Bcl-2 in each group of cells; B: Statistical analyses of protein levels of Ki-67, Bax and Bcl-2 in each group of cells. a: $P<0.05$, compared with the sh-NC group; b: $P<0.05$, compared with the sh-FGD5-AS1+anti miR-NC group

图4 各组增殖与凋亡相关蛋白表达比较(n=6)

Figure 4 Comparison of proliferation- and apoptosis-related protein expression in each group(n=6)

表3 RNA pull-down 实验检测 LncRNA FGD5-AS1、E2F1 mRNA 表达(n=6, $\bar{x}\pm s$)

Table 3 RNA pull-down assay for detecting LncRNA FGD5-AS1 and E2F1 mRNA expression(n=6, $\bar{x}\pm s$)

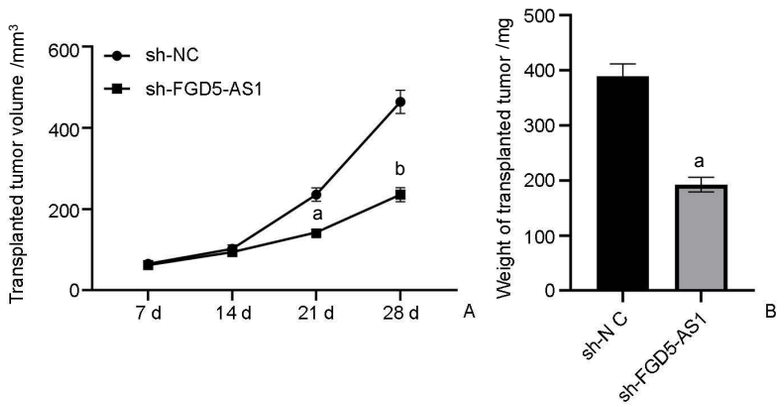
Group	LncRNA FGD5-AS1	E2F1 mRNA
Bio-NC	1.01±0.12	1.02±0.13
Bio-miR-302b-3p-mut	1.05±0.14	0.98±0.14
Bio-miR-302b-3p-wt	7.68±0.65[a]	5.47±0.46[a]

与 Bio-NC 比较, a:$P<0.05$

表4 双荧光素酶报告基因实验结果(n=6, $\bar{x}\pm s$)

Table 4 Experimental results of dual luciferase reporter gene assay(n=6, $\bar{x}\pm s$)

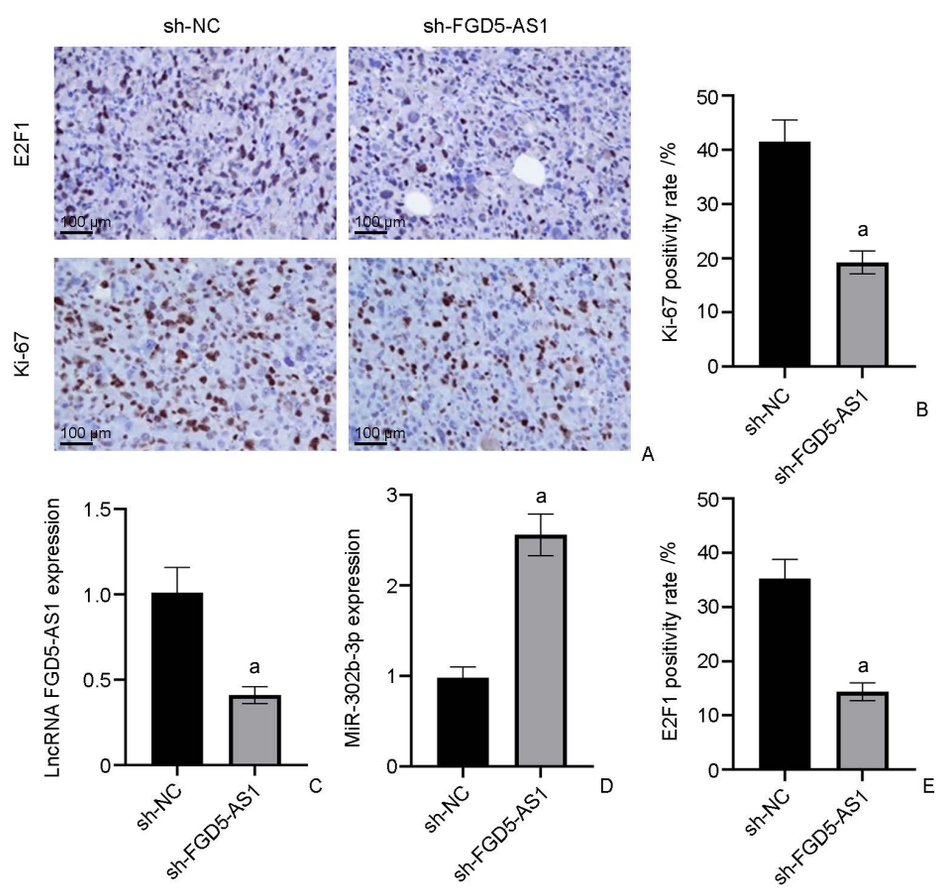
Group	FGD5-AS1-wt	FGD5-AS1-mut	E2F1-wt	E2F1-mut
miR-NC	0.98±0.12	1.01±0.15	1.00±0.15	0.98±0.13
miR-302b-3p mimics	0.35±0.04	1.03±0.14	0.51±0.06	1.00±0.14
t	12.200	0.239	7.429	0.256
P	<0.001	0.816	<0.001	0.803



A: Volume of transplanted tumors in nude mice at different time points; B: Weight of nude mouse transplanted tumor. a: P<0.05, compared with the sh-NC group

图5 裸鼠移植瘤体积及重量比较(n=5)

Figure 5 Comparison of volume and weight of transplanted tumors in nude mice (n=5)



A: Immunohistochemical assay of E2F1 and Ki-67 protein expression in transplanted tumor tissue (×200); B~E: Statistical analyses of positive rates of Ki-67 (B) and E2F1 (E) as well as expression levels of LncRNA FGD5-AS1 (C) and miR-302b-3p (D). a: P<0.05, compared with the sh-NC group

图6 LncRNA FGD5-AS1对胃癌移植瘤生长的影响(n=5)

Figure 6 Effect of LncRNA FGD5-AS1 on the growth of gastric cancer xenografts (n=5)

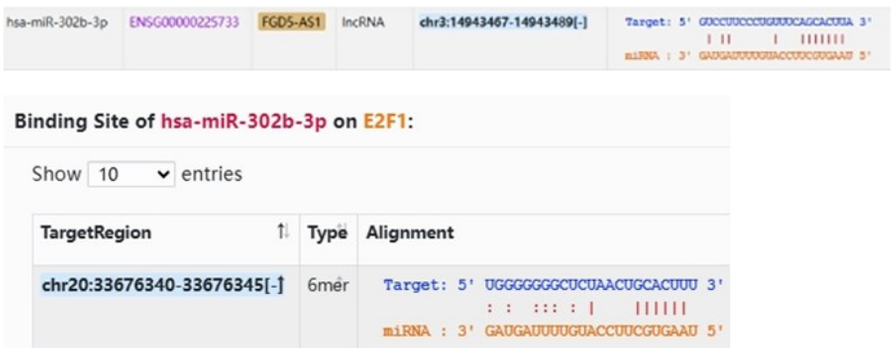


图7 LncRNA FGD5-AS1、E2F1与miR-302b-3p靶点预测

Figure 7 Prediction of LncRNA FGD5-AS1, E2F1 and miR-302b-3p targets

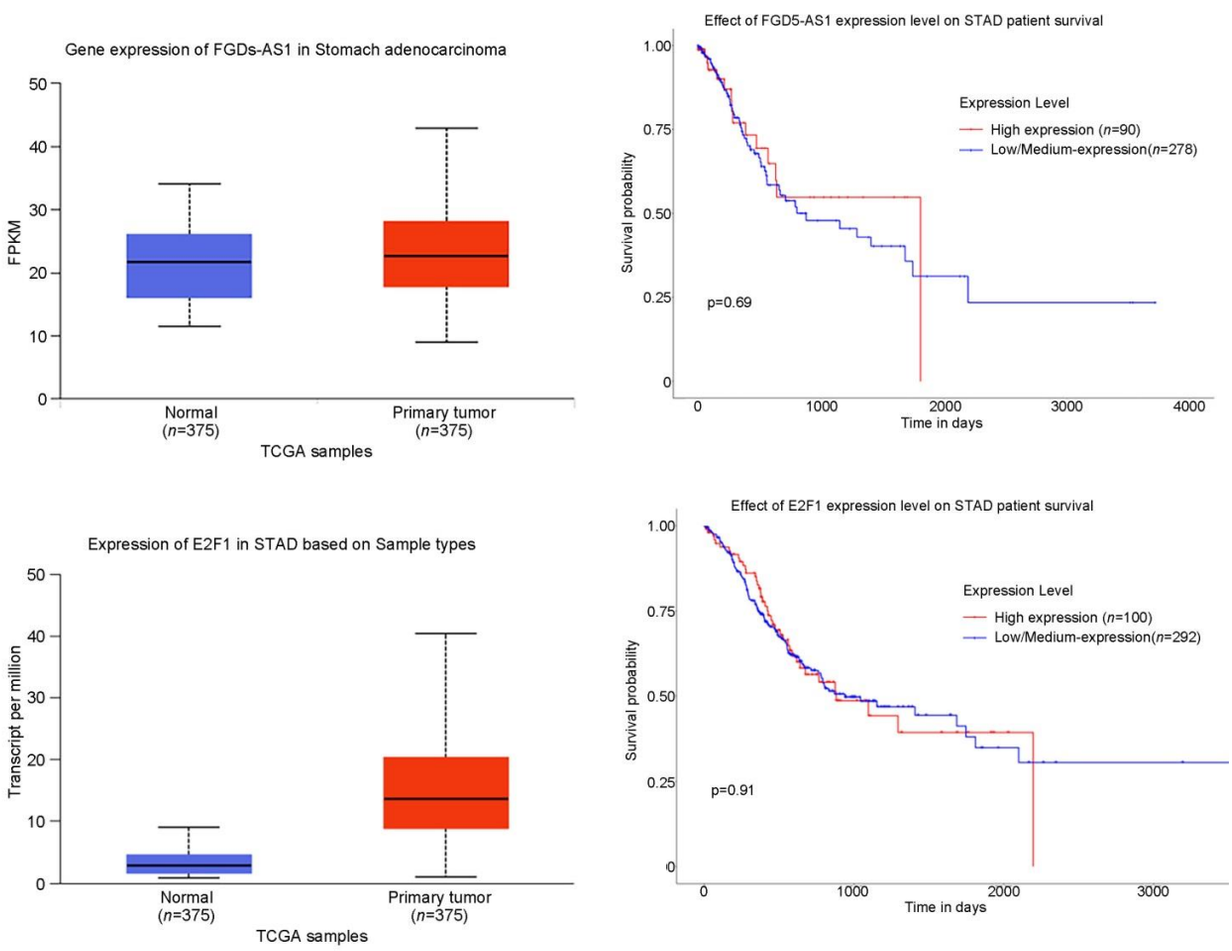


图8 LncRNA FGD5-AS1与E2F1 mRNA在胃癌组织中的表达情况及其与预后的关系

Figure 8 Expression of LncRNA FGD5-AS1 and E2F1 mRNA in gastric cancer tissue and their relationship with prognosis

调,通过调控miR-130a-3p/YTHDF2轴促进宫颈癌5-Fu耐药。已有报道显示,LncRNA FGD5-AS1在胃癌中表达水平升高,其过表达与胃癌淋巴结转移相关,并预示胃癌患者生存期较差,LncRNA FGD5-AS1过表达通过结合稳定YBX1蛋白抑制细胞衰老和ROS产生,从而促进GC进展[16]。但其在胃癌中的作用机制仍需更深入的研究。本研究结果显示,LncRNA FGD5-AS1在胃癌细胞中表达水平显著升高,与报道[16]类似,沉默LncRNA FGD5-AS1表达可显著抑制胃癌细胞增殖、迁移、侵袭,促进细胞凋亡,表明

LncRNA FGD5-AS1在胃癌中作为致癌基因发挥作用。

多项研究显示,LncRNA作为miRNA海绵,并作为ceRNA发挥作用,通过间接调节mRNA的翻译参与肿瘤的发生发展。多项报道表明LncRNA FGD5-AS1可调控多种miRNA参与调节肿瘤细胞的恶性行为[17]。本研究通过生物信息学分析发现,miR-302b-3p可能作为LncRNA FGD5-AS1的下游靶分子。miR-302b-3p是miRNA之一,具有组织特异性,通过靶向调节mRNA表达,在不同的癌症中发挥不同的生物学功能,如胰腺癌中发挥抑癌的作用,敲低LncRNA SNHG16可上调miR-302b-3p表达,降低胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭[18]。而在喉癌中起着促癌基因的作用[19]。研究显示,miR-302b-3p在胃癌组织与细胞中下调表达,circ_HN1通过海绵化miR-302b-3p上调ROCK2,在胃癌中发挥致癌作用[20]。本研究通过双荧光素酶实验与RNA pull-down实验,在分子水平直接证实了LncRNA FGD5-AS1与miR-302b-3p间的特异性结合,结合胃癌细胞中miR-302b-3p表达显著下调的观察结果,从“表达”与“互作”两个维度共同支持LncRNA FGD5-AS1作为miR-302b-3p功能性分子海绵的假设。在功能层面,抑制miR-302b-3p表达可部分回补因沉默LncRNA FGD5-AS1所引发的细胞增殖、迁移与侵袭抑制及凋亡促进作用,这一“表型回复”实验不仅进一步验证了二者在调控胃癌恶性行为中的上下游关系,更表明miR-302b-3p是LncRNA FGD5-AS1驱动肿瘤进展过程中的关键下游效应分子。

本研究还显示,E2F1是miR-302b-3p的下游靶基因。E2F1属于E2F家族成员,是一种转录因子,作为转录激活剂驱动基因表达,调控细胞周期,促进细胞增殖。E2F1在多种肿瘤中作为致癌因子,如在口腔鳞状细胞癌、胃癌、乳腺癌、结直肠癌中表达广泛,促进癌细胞增殖与转移[21-22]。本研究显示,在胃癌细胞中E2F1表达上调。功能干预实验显示,沉默LncRNA FGD5-AS1表达可有效下调E2F1蛋白水平,而抑制其下游靶点miR-302b-3p则能够逆转这一效应,促使E2F1表达回升,提示二者在调控E2F1表达中存在功能上的拮抗关系。为进一步验证miR-302b-3p与E2F1之间的直接结合作用,本研究开展了RNA pull-down实验,结果显示经生物素标记的野生型miR-302b-3p可显著富集E2F1,进一步从分子互作层面确认了miR-302b-3p对E2F1的直接靶向关系。体内实验结果表明,沉默LncRNA FGD5-AS1表达同样显著抑制胃癌移植瘤生长,并伴随瘤体内miR-302b-3p表达的上调与E2F1表达的下降,上调miR-302b-3p表达,整体结果与体外实验一致。以上系列证据共同表明,LncRNA FGD5-AS1通过吸附miR-302b-3p解除其对E2F1的抑制作用,进而激活E2F1所介导的促癌信号,该miR-302b-3p/E2F1轴是其作为癌基因行使功能的关键下游通路。此外,为探究本研究的临床相关性,基于TCGA公共数据库分析了FGD5-AS1/miR-302b-3p/E2F1轴在胃癌队列中的表达与预后价值。分析结果显示,E2F1在胃癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织,这与我们的体外发现相一致。然而,LncRNA FGD5-AS1的表达水平及预后价值在该队列中未达到统计学显著性。推测,这种不一致性可能源于胃癌的高度异质性,本研究所揭示的FGD5-AS1/miR-302b-3p/E2F1调控轴或许在特定的胃癌分子亚型中扮演了更关键的角色,而在混合人群的分析中其信号被稀释。此外,肿瘤微环境中复杂的细胞组成也可能干扰了来自癌细胞本身的特定lncRNA信号。值得注意的是,在严格控制遗传背景的细胞系及动物模型中,本研究清晰地证实了该轴的功能性作用。未来的研究将在更均一的患者队列或特定亚型中进一步验证该通路的临床意义。

然而,本研究仍存在一定的局限性。本研究的体内实验主要依赖于皮下移植瘤模型,该模型虽然为初步评估肿瘤细胞的体内增殖能力提供了一个稳定且可量化的平台,但其肿瘤微环境(如组织特异性、免疫细胞浸润及血管生成等方面)与人体真实情况或原位肿瘤模型存在差异。因此,本研究结果在反映胃癌在原位微环境中的完整生物学行为方面可能存在不足。在未来的研究中,构建胃癌原位移植瘤模型对于进一步验证LncRNA FGD5-AS1/miR-302b-3p/E2F1轴在更接近生理病理条件下的功能,特别是对其在肿瘤侵袭和转移过程中作用的深入探索,将是至关重要且必要的方向。

综上所述,LncRNA FGD5-AS1在胃癌细胞中上调表达,沉默LncRNA FGD5-AS1表达可通过调节miR-302b-3p/E2F1轴,抑制胃癌恶性进展。本研究新发现LncRNA FGD5-AS1在胃癌中可能的作用机制,可能成为胃癌的治疗靶点,但其在临床中的应用价值仍需进一步研究。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] 王斌, 王涛. 胃癌的科学预防、早期诊断与精准治疗[J]. 陆军军医大学学报, 2025, 47(5): 385-395. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202501072.
WANG B, WANG T. Effective prevention, early diagnosis

and precise treatment of gastric cancer[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(5): 385-395. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202501072.

[2] MATSUOKA T, YASHIRO M. Bioinformatics analysis and validation of potential markers associated with prediction and prognosis of gastric cancer[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(11): 5880. DOI: 10.3390/ijms25115880.

[3] SALEH R O, AL-HAWARY S I S, HAMMOUD A, *et al*. The long non-coding RNAs (lncRNA) in the pathogenesis of gastric cancer cells: molecular mechanisms and involvement miRNAs [J]. Mol Biol Rep, 2024, 51(1): 615. DOI: 10.1007/s11033-024-09546-x.

[4] NASERI B, FARSAD-AKHTAR N, MARDI A, *et al*. lncRNA PVT1 silencing inhibits gastric cancer cells' progression *via* enhancing chemosensitivity to paclitaxel[J]. Gene, 2025, 932: 148900. DOI: 10.1016/j.gene.2024.148900.

[5] FENG L M, ZHENG H, ZHANG H P, *et al*. LncRNA FGD5-AS1 drives the malignant development of gastric cancer by negatively interacting with FZD3[J]. Pol J Pathol, 2022, 73(1): 72-79. DOI: 10.5114/pjp.2022.117179.

[6] ZHANG W T, ZHANG J J, SHAO Q, *et al*. FGD5-AS1 is an oncogenic lncRNA in pancreatic cancer and regulates the Wnt/β -catenin signaling pathway *via* miR-577 [J]. Oncol Rep, 2022, 47(1): 21. DOI: 10.3892/or.2021.8232.

[7] GUO B, ZHAO Z H, WANG Z, *et al*. microRNA-302b-3p suppresses cell proliferation through AKT pathway by targeting IGF-1R in human gastric cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(4): 1701-1711. DOI: 10.1159/000479419.

[8] 王建新, 王琳茜, 朱波, 等. 人参皂苷Rg3通过调控E2F1对人胃癌SGC-7901细胞生物行为学的影响[J]. 中国药理学通报, 2024, 40(5): 853-858.
WANG J X, WANG L Q, ZHU B, *et al*. Effects of ginsenoside Rg3 on biobehavior of human gastric cancer SGC-7901 cells by regulating E2F1 [J]. Chin Pharmacol Bull, 2024, 40(5): 853-858.

[9] LIN X L, HAN T, XIA Q, *et al*. CHPF promotes gastric cancer tumorigenesis through the activation of E2F1[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 876. DOI: 10.1038/s41419-021-04148-y.

[10] ACS M, PISO P, GLOCKZIN G. Peritoneal metastatic gastric cancer: local treatment options and recommendations [J]. Curr Oncol, 2024, 31(3): 1445-1459. DOI: 10.3390/curroncol31030109.

[11] LIU C C, SHEN A W, SONG J Q, *et al*. LncRNA-CCAT5-mediated crosstalk between Wnt/β -Catenin and STAT3 signaling suggests novel therapeutic approaches for metastatic gastric cancer with high Wnt activity[J]. Cancer Commun (Lond), 2024, 44(1): 76-100. DOI: 10.1002/cac2.12507.

[12] MA L, LIU W H, WANG X, *et al*. Mechanism of RBM15 in the malignant proliferation of colorectal cancer cells through regulating the stability of LncRNA FGD5-AS1 *via* m6A modification[J]. Exp Cell Res, 2025, 444(2): 114384. DOI: 10.1016/j.yexcr.2024.114384.

[13] QI W X, LIU Q, FU W J, *et al*. BHLHE40, a potential immune therapy target, regulated by FGD5-AS1/miR-15a-5p in pancreatic cancer[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 16400. DOI: 10.1038/s41598-023-43577-x.

[14] 刘晶, 张国民, 李强, 等. LncRNA FGD5-AS1调节miR-129-5p/CDK6轴对膀胱癌细胞恶性生物行为的影响[J]. 2023(12): 1079-1085. DOI: 10.3969/j.issn.1009-8291.2023.12.015.
LIU J, ZHANG G M, LI Q, *et al*. Effect of LncRNA FGD5-AS1 on malignant biological behavior of bladder cancer cells by regulating miR-129-5p/CDK6 axis[J]. J Modern Urol, 2023(12): 1079-1085. DOI: 10.3969/j.issn.1009-8291.2023.12.015.

[15] XIA Z Y, ZHANG L P, ZHOU H G, *et al*. LncRNA-FGD5-AS1 promotes 5-Fu resistance of cervical cancer cells through modulating the miR-130a-3p-YTHDF2 axis[J]. J Chemother, 2025, 37(8): 710-722. DOI: 10.1080/1120009x.2024.2436803.

[16] QIN S S, LIU Y, ZHANG X G, *et al*. lncRNA FGD5-AS1 is required for gastric cancer proliferation by inhibiting cell senescence and ROS production *via* stabilizing YBX1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1): 188. DOI: 10.1186/s13046-024-03103-x.

[17] LIU L, ZHANG C, WANG J Z, *et al*. A high level of lncFGD5-AS1 inhibits epithelial-to-Mesenchymal transition by regulating the miR-196a-5p/SMAD6/BMP axis in gastric Cancer [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 453. DOI: 10.1186/s12885-021-08192-x.

[18] XU H, MIAO X, LI X, *et al*. LncRNA SNHG16 contributes to tumor progression *via* the miR-302b-3p/SLC2A4 axis in pancreatic adenocarcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 51. DOI: 10.1186/s12935-020-01715-9.

[19] LI Y, TANG B J, LYU K X, *et al*. Low expression of lncRNA SBF2-AS1 regulates the miR-302b-3p/TGFBR2 axis, promoting metastasis in laryngeal cancer [J]. Mol Carcinog, 2022, 61(1): 45-58. DOI: 10.1002/mc.23358.

[20] WANG D, JIANG X H, LIU Y, *et al*. Circular RNA circ_HN1 facilitates gastric cancer progression through modulation of the miR-302b-3p/ROCK2 axis[J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(1): 199-212. DOI: 10.1007/s11010-020-03897-2.

[21] ZHOU F F, DENG Z, SHEN D X, *et al*. DLGAP5 triggers proliferation and metastasis of bladder cancer by stabilizing E2F1 *via* USP11[J]. Oncogene, 2024, 43(8): 594-607. DOI: 10.1038/s41388-023-02932-y.

[22] XU T, XIONG M Q, HONG Q W, *et al*. Hsa_circ_0007990 promotes breast cancer growth *via* inhibiting YBX1 protein degradation to activate E2F1 transcription[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(2): 153. DOI: 10.1038/s41419-024-06527-7.

(收稿:2025-10-14;修回:2025-11-28)

(编辑 邓强庭)