

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research敲低 *LncRNA PCAT19* 对人胃癌细胞奥沙利铂敏感性的研究Research of *LncRNA PCAT19* knockdown on the sensitivity of human gastric cancer cells to oxaliplatin

左丽萌, 赵小雨, 张建新

(许昌学院 医学院, 河南 许昌 461000)

ZUO Li-meng, ZHAO Xiao-yu,
ZHANG Jian-xin(Medical College, Xuchang University,
Xuchang 461000, Henan Province,
China)

作者简介: 左丽萌(1986-), 女, 讲师, 主要从事
临床微生物及检验技术等方面的
研究

通信作者: 张建新, 高级讲师

MP: 13598968367

E-mail: 774173775@qq.com

摘要:目的 探究敲低长链非编码核糖核酸前列腺癌相关转录本 19 (*LncRNA PCAT19*) 通过调控微小核糖核酸 (*miR*) - 200c - 3p 介导共济失调毛细血管扩张突变相关蛋白 (ATM) 与 Rad3 相关蛋白激酶 (ATR)/细胞周期检查点激酶 1 (CHK1) 信号通路对人胃癌细胞奥沙利铂 (OXA) 敏感性的机制。方法 人胃癌细胞 (AGS) 细胞随机分为 OXA 组 ($8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA)、OXA + si - NC + inh - NC 组 (si - NC 和 inh - NC 共转染 + $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA)、OXA + si - PCAT19 + inh - NC 组 (si - PCAT19 和 inh - NC 共转染 + $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA)、OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p inh 组 (si - PCAT19 和 miR - 200c - 3p inh 共转染 + $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA)。用 5 - 乙炔基 - 2' - 脱氧尿苷实验检测各组细胞增殖情况, 用原位末端转移酶标记技术检测各组细胞凋亡情况, 用细胞划痕实验检测各组细胞迁移情况, 用免疫荧光法检测各组细胞中磷酸化组蛋白 H2A.X ($\gamma\text{H2A.X}$)、辐射敏感蛋白 51 (RAD51) 表达水平。结果 OXA 组、OXA + si - NC + inh - NC 组、OXA + si - PCAT19 + inh - NC 组和 OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p inh 组的细胞增殖率分别为 $(58.83 \pm 6.52)\%$ 、 $(59.42 \pm 6.86)\%$ 、 $(45.59 \pm 6.09)\%$ 和 $(55.71 \pm 7.69)\%$, 凋亡率分别为 $(20.06 \pm 2.44)\%$ 、 $(20.32 \pm 2.66)\%$ 、 $(31.74 \pm 4.43)\%$ 和 $(24.60 \pm 3.29)\%$, 迁移率分别为 $(54.50 \pm 6.14)\%$ 、 $(56.11 \pm 6.72)\%$ 、 $(31.51 \pm 4.13)\%$ 和 $(48.59 \pm 7.26)\%$, $\gamma\text{H2A.X}$ 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.08 、 0.97 ± 0.12 、 4.84 ± 0.82 和 2.11 ± 0.41 , RAD51 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.06 、 1.08 ± 0.15 、 0.22 ± 0.04 和 0.55 ± 0.08 , OXA + si - NC + inh - NC 组的上述指标与 OXA 组比较, 在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); OXA + si - PCAT19 + inh - NC 组的上述指标与 OXA + si - NC + inh - NC 组比较、OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p inh 组的上述指标与 OXA + si - PCAT19 + inh - NC 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 敲低 *LncRNA PCAT19* 通过靶向负调控 *miR* - 200c - 3p 影响胃癌细胞增殖、迁移、凋亡及脱氧核糖核酸修复, 从而增强胃癌细胞对 OXA 的敏感性, 这可能与 ATR/CHK1 信号通路有关。

关键词: 奥沙利铂; 胃癌; 耐药性; DNA 修复; 长链非编码 RNA

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.11.010

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)11-1550-06

Abstract: Objective To explore the mechanism of long non-coding RNA prostate cancer-associated transcript 19 (*LncRNA PCAT19*) knockdown on oxaliplatin (OXA) sensitivity of human gastric cancer cells by regulating microRNA (*miR*) - 200c - 3p mediated ataxia-telangiectasia mutated proteins (ATM) and Rad3-related kinase-related kinase (ATR) / checkpoint kinase1 (CHK1) signaling pathway.

Methods Human gastric adenocarcinoma cells (AGS) were randomly divided into OXA group ($8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA), OXA + si - NC + inh - NC group (si - NC and inh - NC co - transfected with $+8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA), OXA + si - PCAT19 + inh - NC group (si - PCAT19 and inh - NC co - transfected $+8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA), OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p inh group (si - PCAT19 and miR - 200c - 3p inh co - transfected $+8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA). Cell proliferation in each group was detected by 5 - acetyliden - 2' - deoxyuridine assay; cell apoptosis was detected by in situ terminal transferase labeling technique; cell migration was detected by cell scratch assay; the expression levels of phosphorylated histone H2A.X ($\gamma\text{H2A.X}$) and radiation - sensitive protein 51 (RAD51) were detected by immunofluorescence. **Results** In OXA group, OXA + si - NC + inh - NC group, OXA + si - PCAT19 + inh - NC group, OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p group, the cell proliferation rates were $(58.83 \pm 6.52)\%$, $(59.42 \pm 6.86)\%$, $(45.59 \pm 6.09)\%$ and $(55.71 \pm 7.69)\%$, respectively; the apoptosis rates were $(20.06 \pm 2.44)\%$, $(20.32 \pm 2.66)\%$, $(31.74 \pm 4.43)\%$ and $(24.60 \pm 3.29)\%$, respectively; the migration rates were $(54.50 \pm 6.14)\%$, $(56.11 \pm 6.72)\%$, $(31.51 \pm 4.13)\%$ and $(48.59 \pm 7.26)\%$, respectively; the relative fluorescence intensities of $\gamma\text{H2A.X}$ were 1.00 ± 0.08 , 0.97 ± 0.12 , 4.84 ± 0.82 and 2.11 ± 0.41 , respectively; the relative fluorescence intensities of RAD51 were 1.00 ± 0.06 , 1.08 ± 0.15 , 0.22 ± 0.04 and 0.55 ± 0.08 , respectively. There were no significant differences between OXA + si - NC + inh - NC group and OXA group (all $P > 0.05$). The above indexes of OXA + si - PCAT19 + inh - NC group were compared with those of OXA + si - NC + inh - NC group, the above indexes in OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p inh group were compared with those of OXA + si - PCAT19 + inh - NC group, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Knockdown of *LncRNA PCAT19* can affect the proliferation, migration, apoptosis and deoxyribonucleic acid repair of gastric cancer cells by targeting and negatively regulating *miR - 200c - 3p*, thereby enhancing the sensitivity of gastric cancer cells to OXA, which may be related to the ATR/CHK1 signaling pathway.

Key words: oxaliplatin; stomach neoplasms; drug resistance; DNA repair; long non - coding RNA

胃癌在全球范围内的发病率和死亡率均较高,早期胃癌症状隐匿,缺乏特异性表现,不易发现,导致临床诊断时多数患者已进展至中晚期,而晚期预后差且易转移,极大地增加了治疗难度^[1]。奥沙利铂(oxaliplatin, OXA)是胃癌的一线化疗药物,在治疗中发挥着重要作用。然而,部分患者耐药造成的OXA敏感性降低是化疗失败的主要原因^[2]。大量研究表明,长链非编码核糖核酸(long non - coding RNA, *LncRNA*)与肿瘤细胞的恶性生物学行为及化疗耐药有关,在胃癌中,*LncRNA* 前列腺癌相关转录本 19 (*LncRNA prostate cancer - associated transcript 19*, *LncRNA PCAT19*)上调,且其较高水平与患者不良预后有关,敲低 *LncRNA PCAT19* 可抑制胃癌细胞的增殖与侵袭^[3]。此外,微小核糖核酸(*microRNA*, *miR*) - 200c - 3p 也被报道与胃癌细胞耐药性有关,其可以通过调控胃癌细胞糖酵解逆转紫杉醇耐药^[4]。本研究旨在验证 *LncRNA PCAT19* 与 *miR - 200c - 3p* 的靶向关系,并探究其在胃癌细胞 OXA 耐药中的作用及机制,以期为逆转胃癌 OXA 耐药治疗提供参考,为临床治疗提供依据,改善胃癌患者的治疗结局。

材料与方法

1 材料

细胞 人胃黏膜细胞(GES - 1)、人胃腺癌细胞(AGS)、胃癌细胞(HGC - 27)、人胚肾 293T 细胞(293T),均购自武汉尚恩生物技术有限公司。

药品与试剂 OXA,规格:每瓶 100 mg,纯度:98.02%,批号:238306,美国 TargetMol 公司生产。细胞计数试剂盒 - 8 (cell counting kit - 8, CCK - 8) 试剂盒、5 - 乙炔基 - 2' - 脱氧尿苷(5 - ethynyl - 2' deoxyuridine, EdU) 细胞增殖试剂盒、原位末端转移酶标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick - end labeling, TUNEL) 凋亡检测试剂盒,均为上海碧云天生物技术有限公司生产;双荧光素酶报告基因检测试剂盒,翌圣生物科技(上海)股份有限公司生产;引物和质粒,均为上海生工生物工程有限公司生产;Lipofectamine™ 3000,美国赛默飞世尔科技有限公司产品;兔抗磷酸化组蛋白 H2A.X (phosphorylated histone H2AX, $\gamma\text{H2A.X}$) 抗体、小鼠抗辐射敏感蛋白 51 (radiation sensitive protein 51, RAD51) 抗体、Alexa Fluor 488 山羊抗兔抗体、Alexa Fluor 647 山羊抗

小鼠抗体、兔抗共济失调毛细血管扩张突变相关蛋白(ataxia-telangiectasia mutated proteins, ATM)、磷酸化(phospho, p)-ATM、ATM与Rad3相关蛋白激酶(ATM and Rad3-related kinase, ATR)、p-ATR、细胞周期检查点激酶1(checkpoint kinase1, Chk1)、p-CHK1抗体、辣根过氧化物酶山羊抗兔抗体,均为英国Abcam公司生产。

仪器 DM750 荧光显微镜,德国Leica公司产品; Criterion Dodeca 电泳槽,美国Bio-Rad公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[3]

GES-1、AGS、HGC-27、293T均用相应专用培养基培养,置于37℃、5% CO₂培养箱培养,按说明书进行传代培养,取对数生长期细胞进行后续实验。

2.2 细胞分组与给药方法

GES-1组:正常培养的GES-1细胞,不做任何处理。HGC-27组:正常培养的HGC-27细胞,不做任何处理。

取对数生长期的AGS细胞,将细胞随机分为空白对照组、si-NC组、si-PCAT19组、OXA组、OXA+si-NC+inh-NC组、OXA+si-PCAT19+inh-NC组和OXA+si-PCAT19+miR-200c-3p inh组。空白对照组:不做任何处理的AGS细胞;si-NC组:按Lipofectamine 3000说明书将si-NC(5'-CUCUCG-GAACAUGUCACAU-3')转染至AGS细胞;si-PCAT19组:按Lipofectamine 3000说明书将si-PCAT19(5'-GCUCUUCUUUAAGCAAUAU-3')转染至AGS细胞;OXA组:用8 μg·L⁻¹ OXA处理AGS细胞48 h;OXA+si-NC+inh-NC组:按Lipofectamine 3000说明书将si-NC和inh-NC共转染至AGS细胞,然后用8 μg·L⁻¹ OXA处理AGS细胞48 h;OXA+si-PCAT19+inh-NC组:按Lipofectamine 3000说明书将si-PCAT19和inh-NC共转染至AGS细胞,然后用8 μg·L⁻¹ OXA处理AGS细胞48 h;OXA+si-PCAT19+miR-200c-3p inh组:按Lipofectamine 3000说明书将si-PCAT19和miR-200c-3p inh共转染至AGS细胞,然后用8 μg·L⁻¹ OXA处理AGS细胞48 h。

2.3 逆转录实时荧光定量聚合酶链反应检测细胞中LncRNA PCAT19和miR-200c-3p的表达水平^[3]

收集各组细胞,用TRIzol试剂提取各组细胞总核糖核酸,并测定纯度与浓度,以提取的总核糖核酸为模板进行逆转录反应,根据逆转录试剂盒说明书逆转录合成互补脱氧核糖核酸,以互补脱氧核糖核酸为模

板进行实时荧光定量聚合酶链反应,分别以甘油醛-3-磷酸脱氢酶和U6小核糖核酸为内参计算LncRNA PCAT19和miR-200c-3p相对表达水平。

2.4 CCK-8法检测细胞增殖率^[3]

分别用0、2、4、6、8、16和32 μg·mL⁻¹ OXA处理AGS细胞24 h,处理结束后向各孔细胞中加入CCK-8试剂孵育2 h,在450 nm处测定各孔光密度值。

2.5 双荧光素酶报告基因检测验证LncRNA PCAT19和miR-200c-3p靶向关系^[3]

通过ENCORI数据库(<https://rnasysu.com/encori/index.php>)预测LncRNA PCAT19与miR-200c-3p的结合位点,并设计LncRNA PCAT19-WT和LncRNA PCAT19-Mut质粒,按照Lipofectamine 3000说明书将其分别与mimics-NC、miR-200c-3p mimics共转染至293T细胞,根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测双荧光素酶活性。

2.6 EdU实验检测各组细胞增殖情况^[3]

AGS细胞按“2.2”的方法进行分组与给药,然后用EdU增殖检测试剂盒检测各组细胞增殖情况。根据试剂盒说明书配制EdU工作液,向各孔加入EdU工作液孵育2 h,去除培养液,加入4%多聚甲醛固定15 min,洗涤,通透液孵育10 min,再次洗涤,加入反应液避光孵育30 min,染核后在荧光显微镜下观察。

2.7 TUNEL实验检测各组细胞凋亡情况^[5]

AGS细胞按“2.2”的方法进行分组与给药,然后依据TUNEL凋亡检测试剂盒对细胞进行检测。用4%多聚甲醛固定细胞30 min,洗涤,加入0.3%曲拉通X-100孵育5 min,根据试剂盒说明书配制TUNEL工作液,向每孔加入TUNEL工作液后37℃避光孵育1 h,洗涤,染核,用抗荧光淬灭封片液封片后在荧光显微镜下观察。

2.8 细胞划痕实验检测各组细胞迁移情况^[5]

AGS细胞按“2.2”的方法进行分组与给药,处理完后用20 μL的枪头在各孔中央划痕,用磷酸盐缓冲液洗去死细胞,继续培养48 h,在0和48 h对同一位置进行拍照,用Image J软件对图像进行分析处理。

2.9 免疫荧光法检测各组细胞中γH2A.X和RAD51相对表达水平^[6]

AGS细胞按“2.2”的方法进行分组与给药,处理结束后用4%多聚甲醛固定细胞。加入封闭液室温封闭10 min。加入兔抗γH2A.X抗体、小鼠抗RAD51抗体(1:100)4℃孵育过夜,加入Alexa Fluor 488山羊抗兔抗体、Alexa Fluor 647山羊抗小鼠抗体(1:500)室温孵育

2 h,用抗荧光淬灭封片液封片,在荧光显微镜下观察。

2.10 蛋白质印迹法检测各组细胞内 p-ATM、ATM、p-ATR、ATR、p-CBK1 和 CBK1 的蛋白相对表达水平^[6]

收集各组细胞,裂解细胞提取总蛋白,用二喹啉甲酸法测定总蛋白。取变性后的蛋白样品进行电泳分离、转膜、封闭,加入一抗 4 ℃ 孵育,次日加入二抗室温孵育 1 h。用化学发光法进行显影,分析蛋白条带的灰度值。一抗为兔抗 ATM、p-ATM、ATR、p-ATR、CBK1、p-CBK1 抗体(均为 1:1 000),二抗为辣根过氧化物酶山羊抗兔抗体(1:3 000)。

3 统计学方法

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 *t* 检验。

结 果

1 胃癌细胞 *LncRNA PCAT19* 和 *miR-200c-3p* 的相对表达水平

GES-1、AGS 和 HGC-27 细胞中 *LncRNA PCAT19* 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.07 、 4.39 ± 0.66 和 2.23 ± 0.35 ,*miR-200c-3p* 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.54 ± 0.06 和 0.61 ± 0.09 。AGS 和 HGC-27 细胞中 *LncRNA PCAT19* 和 *miR-200c-3p* 的表达水平与 GES-1 细胞相比,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),由于 AGS 细胞中 *LncRNA PCAT19* 和 *miR-200c-3p* 相对表达水平与 GES-1 细胞相比,差异更为显著,故后续实验用 AGS 细胞进行。

2 敲低 *LncRNA PCAT19* 增强 AGS 细胞对 OXA 的敏感性

si-NC 组转染 si-NC; si-PCAT19 组转染 si-PCAT19。

0、2、4、6、8、16 和 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OXA 处理 si-NC 组和 si-PCAT19 组细胞 24 h 后,细胞增殖率分别为 $(100.08 \pm 1.13)\%$ 、 $(82.96 \pm 9.20)\%$ 、 $(71.86 \pm 8.48)\%$ 、 $(57.37 \pm 7.43)\%$ 、 $(43.85 \pm 7.17)\%$ 、 $(33.92 \pm 6.53)\%$ 和 $(5.24 \pm 1.15)\%$, si-PCAT19 组细胞增殖率分别为 $(100.02 \pm 1.16)\%$ 、 $(73.84 \pm 10.23)\%$ 、 $(58.91 \pm 9.39)\%$ 、 $(47.40 \pm 8.26)\%$ 、 $(31.51 \pm 6.21)\%$ 、 $(13.55 \pm 3.20)\%$ 和 $(1.86 \pm 0.58)\%$,用 0 和 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OXA 处理细胞时, si-PCAT19 组细胞增殖率与 si-NC 组相比,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);4、6、8、16 和 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OXA 处理细胞时, si-PCAT19 组细胞增

殖率与 si-NC 组相比均显著下降(均 $P < 0.05$)。 si-NC 组细胞的 IC_{50} 值为 $(7.43 \pm 2.43) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, si-PCAT19 组细胞的 IC_{50} 值为 $(4.89 \pm 1.46) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,敲低 *LncRNA PCAT19* 后,AGS 细胞对 OXA 的敏感性显著增强($P < 0.05$)。

3 *LncRNA PCAT19* 与 *miR-200c-3p* 的靶向关系

LncRNA PCAT19 和 *miR-200c-3p* 的结合位点,见图 1。*LncRNA PCAT19*-WT 与 mimics-NC、*miR-200c-3p* mimics 分别共转染后的荧光素酶相对活性为 1.00 ± 0.09 和 0.59 ± 0.06 ,*LncRNA PCAT19*-Mut 与 mimics-NC、*miR-200c-3p* mimics 分别共转染后的荧光素酶相对活性为 1.00 ± 0.09 和 0.99 ± 0.12 ,*LncRNA PCAT19*-WT 与 *miR-200c-3p* mimics 共转染荧光素酶活性显著低于与 mimics-NC 共转染($P < 0.05$),*LncRNA PCAT19*-Mut 与 *miR-200c-3p* mimics 共转染荧光素酶活性与 mimics-NC 共转染,在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$)。 si-NC 组、si-PCAT19 组的 *miR-200c-3p* 的表达水平分别为 1.00 ± 0.13 和 2.25 ± 0.37 ,在统计学上差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4 *LncRNA PCAT19* 调控 *miR-200c-3p* 改变 AGS 细胞对 OXA 的敏感性

OXA 组:细胞用 8 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA 处理,OXA + si-NC + inh-NC 组:细胞共转染 si-NC 和 inh-NC + 8 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA,OXA + si-PCAT19 + inh-NC 组:细胞共转染 si-PCAT19 和 inh-NC + 8 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA,OXA + si-PCAT19 + *miR-200c-3p* inh 组:细胞共转染 si-PCAT19 和 *miR-200c-3p* inh + 8 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA。

OXA + si-NC + inh-NC 组的细胞增殖率、凋亡率、迁移率与 OXA 组比较,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);OXA + si-PCAT19 + inh-NC 组细胞增殖率、迁移率与 OXA + si-NC + inh-NC 组比较,均显著降低,细胞凋亡率显著升高(均 $P < 0.001$);OXA + si-PCAT19 + *miR-200c-3p* inh 组细胞增殖率、迁移率与 OXA + si-PCAT19 + inh-NC 组比较显著升高,细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),见表 1。

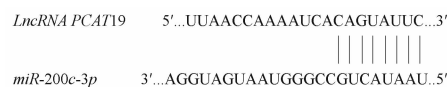


图 1 *LncRNA* 前列腺癌相关转录本 19(*LncRNA PCAT19*)与微小 RNA-200c-3p(*miR-200c-3p*)间结合位点关系

Figure 1 The binding site relationship between *LncRNA* prostate cancer-associated transcript 19 (*LncRNA PCAT19*) and microRNA-200c-3p (*miR-200c-3p*)

表 1 各组细胞增殖、凋亡和迁移率的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Comparison of cell proliferation, apoptosis and migration rates in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	Proliferation rate (%)	Apoptosis rate (%)	Migration rate (%)
OXA	58.83 ± 6.52	20.06 ± 2.44	54.50 ± 6.14
OXA + si - NC + inh - NC	59.42 ± 6.86	20.32 ± 2.66	56.11 ± 6.72
OXA + si - PCAT19 + inh - NC	45.59 ± 6.09 ***	31.74 ± 4.43 ***	31.51 ± 4.13 ***
OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p inh	55.71 ± 7.69 [△]	24.60 ± 3.29 ^{△△}	48.59 ± 7.26 ^{△△△}

OXA group: AGS cells were treated with $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA for 48 h; OXA + si - NC + inh - NC group: si - NC and inh - NC were co - transfected into AGS cells according to Lipofectamine 3000 instructions, and then AGS cells were treated with $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA for 48 h; OXA + si - PCAT19 + inh - NC group: si - PCAT19 and inh - NC were transfected into AGS cells according to Lipofectamine 3000 instructions, and then AGS cells were treated with $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA for 48 h; OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p inh group: si - PCAT19 and miR - 200c - 3p inh were co - transfected into AGS cells according to Lipofectamine 3000 instructions, and then AGS cells were treated with $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ OXA for 48 h; Compared with the OXA + si - NC + inh - NC group, *** $P < 0.001$; Compared with the OXA + si - PCAT19 + inh - NC group, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.001$.

5 *LncRNA PCAT19* 调控 *miR - 200c - 3p* 介导 AGS 细胞 OXA 耐药中脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 损伤修复

OXA 组、OXA + si - NC + inh - NC 组、OXA + si - PCAT19 + inh - NC 组、OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p inh 组的 $\gamma\text{H2A.X}$ 的相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.08 、 0.97 ± 0.12 、 4.84 ± 0.82 和 2.11 ± 0.41 , RAD51 的相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.06 、 1.08 ± 0.15 、 0.22 ± 0.04 和 0.55 ± 0.08 , OXA + si - NC + inh - NC 组的上述指标与 OXA 组比较,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$), OXA + si - PCAT19 + inh - NC 组的上述指标与 OXA + si - NC + inh - NC 组比较、OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p

inh 组的上述指标与 OXA + si - PCAT19 + inh - NC 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

6 *LncRNA PCAT19* 调控 *miR - 200c - 3p* 介导 ATR/CHK1 信号通路

OXA 组、OXA + si - NC + inh - NC 组、OXA + si - PCAT19 + inh - NC 组和 OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p inh 组的 p - ATM/ATM 水平分别为 1.00 ± 0.14 、 0.99 ± 0.15 、 0.71 ± 0.13 和 0.89 ± 0.13 , p - ATR/ATR 水平分别为 1.00 ± 0.09 、 1.03 ± 0.14 、 0.56 ± 0.08 和 0.92 ± 0.12 , p - CHK1/CHK1 水平分别为 1.00 ± 0.15 、 1.01 ± 0.11 、 0.77 ± 0.12 和 0.93 ± 0.17 , OXA + si - NC + inh - NC 组的上述指标与 OXA 组比较,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$), OXA + si - PCAT19 + inh - NC 组的上述指标与 OXA + si - NC + inh - NC 组比较、OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p inh 组的上述指标与 OXA + si - PCAT19 + inh - NC 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图 2。

讨 论

LncRNA PCAT19 在胃癌、喉癌、肺癌、结直肠癌、乳腺癌等多种癌症中异常表达,发挥致癌作用或抑癌作用,在肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移、代谢以及肿瘤生长和转移中发挥作用,是具有潜力的癌症治疗靶点^[7]。WANG 等^[8]研究发现,过表达 *LncRNA PCAT19* 可促进膀胱癌细胞的活力、增殖、迁移和侵袭能力,显著抑制细胞凋亡。本研究发现,胃癌细胞 AGS 和 HGC - 27 细胞中 *LncRNA PCAT19* 的表达水平均上升,敲低 *LncRNA PCAT19* 可增强 AGS 细胞对 OXA 的敏感性,并且具有抑制 OXA 处理后 AGS 细胞增殖和迁移以及 DNA 损伤修复、诱导细胞凋亡的作

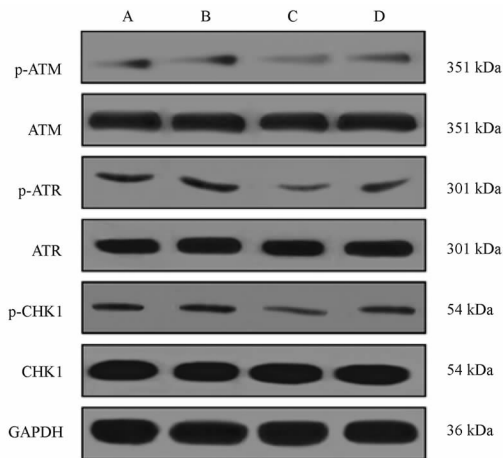


图 2 各组细胞中 ATM 与 Rad3 相关蛋白激酶(ATR)/细胞周期检查点激酶 1 (CHK1) 信号通路相关蛋白表达情况

Figure 2 Expression levels of ATM and Rad3 - related kinase (ATR)/ checkpoint kinase1 (CHK1) signaling pathway in cells of each group

A: OXA group; B: OXA + si - NC + inh - NC group; C: OXA + si - PCAT19 + inh - NC group; D: OXA + si - PCAT19 + miR - 200c - 3p group.

用。*miR-200c-3p* 具有抑癌作用,在胃癌中,高水平 *miR-200c-3p* 与胃癌患者侵袭减少、组织学类型良好和总生存期提高相关^[9]。本研究发现,胃癌细胞 AGS 和 HGC-27 细胞中 *miR-200c-3p* 的表达水平均下降,且抑制 *miR-200c-3p* 的表达可部分逆转敲低 *LncRNA PCAT19* 对 AGS 细胞增殖和迁移以及 DNA 损伤修复、细胞凋亡的影响。同时,本研究用双荧光素酶实验验证了 *LncRNA PCAT19* 靶向负调控 *miR-200c-3p*,这表明敲低 *LncRNA PCAT19* 通过靶向负调控 *miR-200c-3p* 影响 OXA 处理后的 AGS 细胞增殖、迁移、凋亡及 DNA 损伤修复,从而增强 AGS 细胞对 OXA 的敏感性。

在周菲等^[10]的研究中,黄芩苷联合 OXA 通过调控 *miR-433-3p*/病毒癌发挥协同作用抑制胃癌细胞 SGC-7901 增殖和侵袭、诱导细胞凋亡。厚玉瑾等^[11]研究表明,Ras 关联域家族成员 6 基因可通过抑制胃癌细胞增殖、促进癌细胞自噬与凋亡来提高 OXA 的敏感性。本研究发现,敲低 *LncRNA PCAT19* 可以通过影响胃癌细胞增殖、迁移、凋亡增强癌细胞对 OXA 的敏感性。钟彧婧等^[12]研究发现,间皮素可能通过上调耐药相关基因、DNA 结合信号通路,维持卵巢癌细胞 DNA 损伤修复能力介导高级别浆液性卵巢癌铂类化疗耐药。在游雅婷等^[13]的研究中,叉头盒蛋白超家族 1 通过调控性别决定区 Y-box 蛋白 5 激活介导 DNA 损伤修复促进下咽癌顺铂耐药。本研究显示,敲低 *LncRNA PCAT19* 后 DNA 损伤修复因子 RAD51 水平下降, DNA 损伤标志物 γ H2A.X 水平升高,说明敲低 *LncRNA PCAT19* 通过增强 DNA 损伤,降低 DNA 损伤修复能力提高胃癌细胞的 OXA 敏感性。真核细胞通过激活 ATM-CHK2 和(或)ATR-CHK1 通路来响应 DNA 损伤:调节细胞周期进程、促进损伤修复和控制细胞凋亡^[14]。HUANG 等^[15]研究表明,p21 活性激酶 6 通过激活 ATR/CHK1 信号通路修复 OXA 引起的 DNA 损伤,使胃癌细胞免受 OXA 诱导的细胞凋亡,增强化疗耐药性,当敲低 p21 活性激酶 6 后癌细胞恢复 OXA 敏感性。本研究发现,敲低 *LncRNA PCAT19* 可以通过调控 *miR-200c-3p* 抑制 ATR/CHK1 信号通路,提示敲低 *LncRNA PCAT19* 增强胃癌细胞的 OXA 敏感性可能是通过抑制 ATR/CHK1 信号通路实现的。

本研究提示:敲低 *LncRNA PCAT19* 通过靶向负调控 *miR-200c-3p* 影响 AGS 细胞增殖、迁移、凋亡及 DNA 损伤修复,从而增强 AGS 细胞对 OXA 的敏感

性,这可能与 ATR/CHK1 信号通路有关。

参考文献:

- [1] 赵颖异,吕星,谭雅兰,等. 中药通过细胞外信号调节激酶信号通路调控胃癌的研究进展[J]. 世界中医药,2024,19(7):1043—1048,1055.
- [2] 郑培明,李俊蒙,张鹏,等. 巨噬细胞外泌体源 *miR-223* 促进胃癌细胞对奥沙利铂的耐药研究[J]. 中国癌症杂志,2021,31(5):368—376.
- [3] XIAO L, YUAN W, HUANG C, et al. *LncRNA PCAT19* induced by SP1 and acted as oncogene in gastric cancer competitively binding to *miR429* and upregulating *DHX9* [J]. *J Cancer*, 2022, 13(1):102—111.
- [4] 周欣亮,李艳艳,张雪,等. *miR-200c* 通过调控糖酵解逆转胃癌细胞紫杉醇耐药的实验研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2024,31(22):1370—1377.
- [5] 徐孙勉,张宁,翟学峰,等. 帕瑞昔布钠对 BT474 乳腺癌细胞增殖、迁移与侵袭能力的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(17):2004—2008.
- [6] 杨琪,段俊颖,王雪林,等. 黄芪多糖对肺癌 A549 细胞自噬的作用及机制研究[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(12):1329—1333.
- [7] HU H, LUO H, DENG Z. *PCAT19*: The role in cancer pathogenesis and beyond[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024,17(2):158—163.
- [8] WANG C, JIANG H. Long non-coding RNA *PCAT19* regulates the malignant progression of bladder cancer through the *miR-335-5p*/IER2 axis[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2022,32(8):81—94.
- [9] SHICHIRI K, OSHI M, ZIAZADEH D, et al. High *miR-200c* expression is associated with suppressed epithelial-mesenchymal transition, TGF- β signaling and better survival despite enhanced cell proliferation in gastric cancer patients[J]. *Am J Cancer Res*, 2023,13(7):3027—3040.
- [10] 周菲,庄敏之,吴瑛. 黄芩苷联合奥沙利铂调控 *miR-433-3p*/SRC 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 药物评价研究,2024,47(3):529—537.
- [11] 厚玉瑾,郭婷,赵岳阳,等. *RASSF6* 介导凋亡与自噬提高奥沙利铂对胃癌细胞的化疗敏感性[J]. 西安交通大学学报(医学版),2021,42(6):850—856.
- [12] 钟彧婧,王艺颖,刘海鸥,等. 间皮素介导高级别浆液性卵巢癌铂化疗耐药并作为化疗敏感性的预测指标[J]. 复旦学报(医学版),2024,51(6):873—881.
- [13] 游雅婷,刘义钊,李维,等. *SOX5* 介导的 DNA 损伤修复在下咽癌顺铂耐药性中的作用及其机制研究[J]. 中国医院药学杂志,2024,44(20):2376—2385.
- [14] GHELLI LUSERNA DI RORÀ A, GHETTI M, LEDDA L, et al. Exploring the ATR-CHK1 pathway in the response of doxorubicin-induced DNA damages in acute lymphoblastic leukemia cells[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2023,9(3):795—811.
- [15] HUANG W, HAN Z, SUN Z, et al. PAK6 promotes homologous-recombination to enhance chemoresistance to oxaliplatin through ATR/CHK1 signaling in gastric cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2022,13(7):658.

(收稿日期 2024-12-22)