

LncRNA GHET1靶向miR-27b对胆囊癌细胞增殖、凋亡及转移的影响

阳镇, 李文川, 周宁

Effect of LncRNA GHET1 on Proliferation, Apoptosis, and Metastasis of Gallbladder Cancer Cells by Targeting miR-27b

YANG Zhen, LI Wenchuan, ZHOU Ning

The Intractable Diseases Diagnosis and Treatment Center for Liver, Gallbladder, Pancreas & Intestine, Department of Hepatobiliary Surgery, Hunan Provincial People's Hospital, The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410011, China

Corresponding Author: ZHOU Ning, E-mail: zhouning565@hunnu.edu.cn.

Abstract: Objective To investigate the effect of GHET1 on the biological behavior of gallbladder cancer cells and the regulatory mechanism of GHET1 on miR-27b. **Methods** The expression of GHET1 and miR-27b in 50 samples of gallbladder cancer was detected by real-time quantitative PCR. The si-NC vector, si-GHET1 vector, miR-27b inhibitor, and si-GHET1 vector+miR-27b inhibitor were transfected into SGC-996 cells and set as the control group, GHET1 interference group, miR-27b interference group, and GHET1+miR-27b interference group. Cell proliferation, apoptosis, and metastasis in each group were detected by MTT, flow cytometry, and Transwell assays. The regulatory effect of GHET1 on miR-27b was validated by luciferase reporter gene assay. **Results** GHET1 expression was higher in cancer tissues than that in paracancerous ones. miR-27b expression was lower in cancer tissues than that in paracancerous tissues. GHET1 was negatively correlated with miR-27b expression ($P<0.05$), and GHET1 expression was associated with TNM staging and lymph node metastasis ($P<0.05$). High GHET1 expression was associated with poor prognosis of patients with gallbladder cancer ($P<0.05$). Compared with the control group, the GHET1 interference group showed decreased cell-proliferation ability, increased apoptosis rate, and reduced number of cell metastasis. The miR-27b interference group showed increased cell-proliferation ability, decreased apoptosis rate, and increased number of cell metastasis ($P<0.05$). Compared with the GHET1 interference group, the GHET1+miR-27b interference group showed increased cell-proliferation ability, decreased apoptosis rate, and increased number of cell metastasis ($P<0.05$). GHET1 inhibited miR-27b expression by acting as a sponge of miR-27b. **Conclusion** GHET1 promotes the proliferation and metastasis and inhibits the apoptosis of gallbladder cancer cells by targeting miR-27b, suggesting that GHET1/miR-27b axis plays a role in gallbladder cancer progression.

Key words: GHET1; miR-27b; Gallbladder cancer; Proliferation; Metastasis

Funding: Science and Health Joint Project of Hunan Provincial Nature Science Foundation (No. 2022JJ70100); Science and Technology Plan Project of Changsha City (No. kq2004117)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 探讨GHET1对胆囊癌细胞生物学行为的影响及其对miR-27b的调控机制。方法 采

用实时荧光定量PCR检测50例胆囊癌样本中GHET1与miR-27b的表达情况。利用si-NC载体、si-GHET1载体、miR-27b抑制物以及si-GHET1载体+miR-27b抑制物转染至SGC-996细胞,并分别作为对照组、GHET1干扰组、miR-27b干扰组以及GHET1+miR-27b干扰组。采用MTT法、流式细胞术以及Transwell实验检测各组细胞增殖、凋亡以及转移情况,以荧光素酶报告基因实

收稿日期: 2022-12-12; 修回日期: 2023-02-01

基金项目: 湖南省自然科学基金科卫联合项目(2022JJ70100); 长沙市科技计划项目(kq2004117)

作者单位: 410011 长沙, 湖南省人民医院/湖南师范大学附属第一医院肝胆外科, 肝胆胰肠疑难病诊疗中心

通信作者: 周宁(1984-), 男, 博士, 副主任医师, 主要从事肝移植相关临床与基础研究, E-mail: zhouning565@hunnu.edu.cn, ORCID: 0000-0002-7416-1494

作者简介: 阳镇(1997-), 男, 硕士在读, 主要从事肝胆胰外科相关临床与基础研究, ORCID: 0009-0005-0743-1166

验证GHET1对miR-27b的调控作用。结果 GHET1在癌组织中的表达较癌旁组织升高,而miR-27b在癌组织中的表达较癌旁组织降低, GHET1与miR-27b表达呈负相关 ($P<0.05$)。GHET1表达与TNM分期和淋巴结转移相关 ($P<0.05$)。高GHET1表达与胆囊癌患者预后较差相关 ($P<0.05$)。与对照组比较, GHET1干扰组细胞增殖能力降低、凋亡率升高且细胞转移数量减少,而miR-27b干扰组细胞增殖能力升高、凋亡率降低且细胞转移数量增加 ($P<0.05$)。与GHET1干扰组比较, GHET1+miR-27b干扰组细胞增殖能力升高、凋亡率降低且细胞转移数量增加 ($P<0.05$)。GHET1可以海绵吸附miR-27b并抑制其表达。结论 GHET1靶向miR-27b促进胆囊癌细胞增殖和转移并抑制细胞凋亡,提示GHET1/miR-27b轴在胆囊癌进展中具有一定的作用。

关键词: 胃癌增殖增强转录物1; miR-27b; 胆囊癌; 增殖; 转移

中图分类号: R735.8

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

胆囊癌(gallbladder cancer, GBC)是一种极具转移性的胆道恶性肿瘤,也是全球第五常见的消化道肿瘤^[1-2]。近年来,尽管高通量芯片发现了上千种lncRNAs在胆囊癌样本中呈差异表达^[3],但仅有少数lncRNAs的功能得到了比较详细的阐明。胃癌增殖增强转录物1(gastric carcinoma proliferation enhancing transcript 1, GHET1)于2014年首次在胃癌研究中被发现具有促进细胞增殖的作用,随后证实其在膀胱癌、乳腺癌以及宫颈癌中也发挥促癌作用^[4]。miR-27b在多种肿瘤中低表达并发挥抑癌因子功能^[5],经相关公共数据库与生物信息学分析,发现miR-27b可能受到GHET1的调控。有关GHET1与miR-27b在胆囊癌中的作用报道较少。鉴于此,本研究将明确GHET1对胆囊癌细胞生物学行为的影响及其对miR-27b的调控机制,以期为胆囊癌的诊疗提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RNA提取试剂(Tiagen, 北京), miRNA反转录试剂盒(Clontech, 美国), 普通反转录与实时荧光定量PCR试剂盒(Takara, 日本), Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)(Thermo Fisher Scientific, 美国), 胎牛血清(FBS)(Cell-Box, 香港), MTT(Beyotime Biotechnology, 上海), Transwell小室和基质胶(Corning, 美国), 荧光素酶检测试剂盒(GeneCopoeia, 美

国), lipofectamine 2000转染试剂(Invitrogen, 美国), si-NC载体、si-GHET1载体以及miR-27b抑制物(Bersinbio, 广州), GHET1-wt和GHET1-mut报告载体(Ribobio, 广州)。

1.2 临床标本

收集2016年1月—2019年12月在湖南省人民医院肝胆外科行手术治疗的50例胆囊癌患者的癌组织与癌旁组织。其中男21例,女29例,年龄39~77岁(55.18 ± 11.69 岁)。所有患者术前均未接受放疗、化疗或其他抗癌治疗。纳入标准:原发性胆囊癌患者,经影像学检查与病理检查确诊,并具有手术治疗指征。排除标准:其他类型胆道肿瘤患者,严重心、肝、肾功能衰竭患者,出血性疾病或凝血功能严重异常患者,精神障碍疾病患者,伴有其他手术禁忌证患者。收集的组织存入液氮中备用。所有患者均签署知情同意书。本研究通过湖南省人民医院医学研究伦理委员会审批(伦理号2019009)。

1.3 细胞培养

SGC-996细胞来自中国科学院上海研究所细胞培养库。采用DMEM培养基和10%FBS培养细胞,并加入100 U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素进行抑菌处理。细胞培养箱温度设定为37 $^{\circ}$ C,含5%CO₂和95%空气。每隔两天更换一次培养基,并进行常规传代。待细胞状态到达对数生长期时,进行体外细胞实验。

1.4 实验分组和细胞转染

体外细胞实验分成对照组、GHET1干扰组、miR-27b干扰组以及GHET1+miR-27b干扰组,分别向SGC-996细胞中转染si-NC载体、si-GHET1载体、miR-27b抑制物以及si-GHET1载体+miR-27b抑制物。将SGC-996细胞均匀接种至6孔板,使每孔细胞数量约为 5×10^6 个。上述各组细胞培养24 h后,采用lipofectamine 2000转染试剂分别瞬时转染2.5 μ g si-NC载体、2.5 μ g si-GHET1载体、200 nmol miR-27b抑制物、2.5 μ g si-GHET1载体+200 nmol miR-27b抑制物。24 h后1 200 r/min离心5 min,收集各组细胞,检测转染效率。

1.5 实时荧光定量PCR

采用RNA提取试剂提取组织与细胞中的总RNA。分别采用miRNA反转录与普通反转录试剂盒合成针对miR-27b和GHET1的cDNA。随后以各自cDNA作为模版进行实时荧光定量PCR。扩增条件设为:95 $^{\circ}$ C 10 min,之后95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s、共40个循环,随后72 $^{\circ}$ C 5 min,最后4 $^{\circ}$ C 20 min。miR-27b引物:5'-TTCACAGTGGC-

TAAGTTCTGC-3' (正向), 5'-CGCAGGGTCC-GAGGTATTC-3' (反向)。GHET1引物: 5'-CTTGAGCCTCAGTTTCTCCATC-3' (正向), 5'-CTTGCTAATTTGAGTTTCCTCGT-3' (反向)。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 分别以U6和GAPDH为内参基因计算miR-27b和GHET1相对表达水平。

1.6 MTT法检测细胞增殖

将1.4方法中的细胞均匀接种至96孔板, 使每孔细胞数量约为 3×10^3 个。在0、12、24和48 h时间点向对应孔中加入13 μ l MTT (浓度: 5 mg/ml)。培养4 h后, 再向对应孔中加入150 μ l 二甲基亚砜。室温低速摇晃15 min致结晶完全溶解。采用酶标仪测量各孔在450 nm处的吸光度(OD)值, 比较各组细胞增殖情况。

1.7 Transwell试验检测细胞转移

利用基质胶均匀覆盖Transwell上室, 并将1.4方法中的细胞均匀接种至上室, 细胞数量约为 5×10^5 个。下室中添加500 μ l DMEM培养基+10%FBS充当引诱剂。48 h后使用无菌棉条轻轻擦掉上室中的细胞, 将转移至下室中细胞用4%多聚甲醛室温固定15 min。随后采用0.1%结晶紫溶液室温染色10 min, 并采用IX71倒置显微镜观察拍照, 随机选择6处视野计算每个视野下转移细胞数。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡

将1.4方法中的细胞均匀接种至12孔板, 使每孔细胞数量约为 2.5×10^6 个。48 h后1 200 r/min离心5 min收集细胞, 以冷PBS洗涤三次。采用适量结合液将细胞重新悬浮, 使其密度为 1×10^6 /ml。取1 ml细胞, 加入5 μ l Annexin V-FITC室温避光染色30 min。再加入2 μ l 碘化丙啶(PI)室温避光染色20 min, 采用流式细胞仪比较各组细胞凋亡率。

1.9 荧光素酶报告基因实验检测GHET1与miR-27b的结合位点情况

GHET1-wt报告载体(ACUGUGA)中包含miR-

27b预测结合位点, 而GHET1-mut报告载体中(将ACUGUGA突变成UGACACU)不含miR-27b预测结合位点。将SGC-996细胞均匀接种至24孔板, 使每孔细胞数量约为 4×10^5 个。培养24 h后, 采用Lipofectamine 2000转染试剂瞬时共转染50 nmol miR-27b抑制物和0.8 μ g GHET1-wt报告载体, 0 nmol miR-27b抑制物和0.8 μ g GHET1-mut报告载体。48 h后1 200 r/min离心5 min收集细胞, 采用荧光素酶检测试剂盒检测各组海肾和萤火虫的荧光值。以萤火虫的荧光值为参照, 比较各组相对荧光素酶活性。

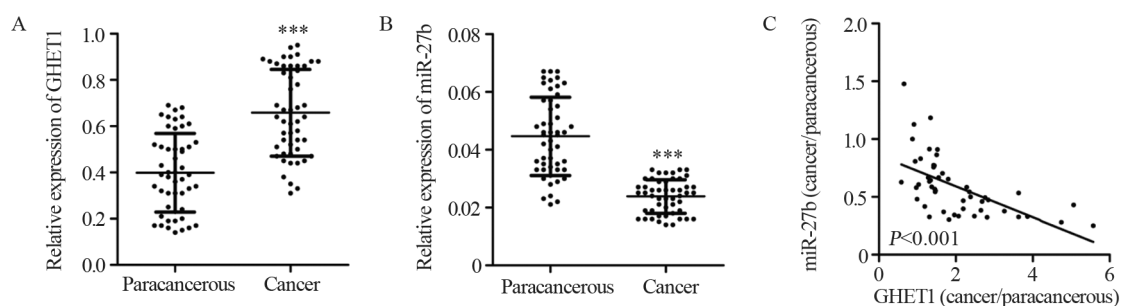
1.10 统计学方法

采用SPSS27.0与GraphPad Prism 5.0软件进行统计学分析, 每种试验独立重复3次。计数资料结果用例(%)表示, 以卡方检验进行统计比较。计量资料结果采用($\bar{x} \pm s$)表示, 癌与癌旁组织中GHET1与miR-27b的表达比较采用配对t检验, 其他两组之间的统计比较采用独立样本t检验。三组或三组以上之间的统计比较采用单因素方差分析, 两两比较采用Bonferroni法。采用Spearman相关系数检验评估GHET1与miR-27b表达之间的相关性。采用Kaplan-Meier曲线评估GHET1表达与胆囊癌患者预后的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GHET1与miR-27b在胆囊癌中的表达及其相关性

实时荧光定量PCR结果显示, 癌组织与癌旁组织中GHET1的相对表达水平分别为 0.66 ± 0.19 和 0.40 ± 0.17 , 癌组织中GHET1表达较癌旁组织高($P < 0.001$), 见图1A。癌组织与癌旁组织中miR-27b的相对表达水平分别为 0.023 ± 0.006 和 0.045 ± 0.013 , 癌组织中miR-27b表达较癌旁组织低($P < 0.001$), 见图1B。GHET1与miR-27b表达呈负相关, 相关系数为 -0.59 ($P < 0.001$), 见图1C。



***: $P < 0.001$, compared with paracancerous tissues.

图1 GHET1与miR-27b在胆囊癌中的表达(A, B)及其相关性(C)

Figure 1 Expression of GHET1 and miR-27b in gallbladder cancer(A, B) and their correlation(C)

2.2 GHET1表达与胆囊癌患者临床病理特征以及预后的关系

以癌组织中GHET1表达的中位数值(0.64)为临界点,将胆囊癌患者分为GHET1低表达组($n=25$)与GHET1高表达组($n=25$)。卡方检验结果显示, GHET1表达与淋巴结转移和TNM分期相关($P<0.05$),但与年龄、性别、肿瘤大小、病理类型以及组织学等级不相关($P>0.05$),见表1。与低GHET1表达胆囊癌患者比较,高GHET1表达胆囊癌患者两年总体生存率较差($P<0.001$),见图2。

2.3 细胞转染效率检测

实时荧光定量PCR结果显示,与对照组比较, GHET1干扰组与GHET1+miR-27b干扰组中GHET1表达下降($P=0.012$ 、 0.015),表明si-GHET1载体对GHET1表达具有良好的抑制效果。与对照组比较, miR-27b干扰组与GHET1+miR-27b干扰组中miR-27b表达下降($P=0.007$ 、 <0.001),表明miR-27b抑制物对miR-27b表达具有良好的抑制效果,见图3。

2.4 抑制GHET1和miR-27b对SGC-996细胞增殖的影响

结果显示,与对照组比较, GHET1干扰组12、24以及48 h细胞OD值下降($P=0.034$ 、 0.018 、

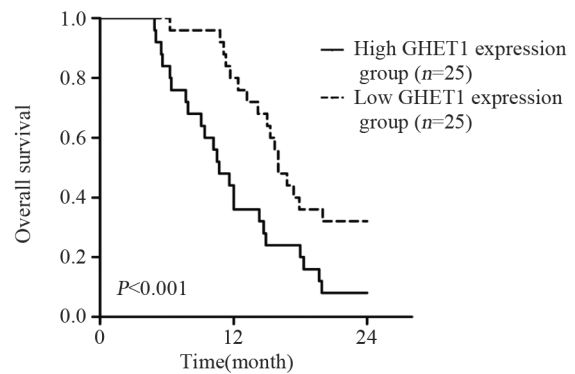


图2 Kaplan-Meier曲线分析GHET1表达与胆囊癌患者预后的关系

Figure 2 Kaplan-Meier curve analysis of relationship between GHET1 expression and prognosis of GBC patients

0.012), miR-27b干扰组12、24以及48 h细胞OD值升高($P=0.029$ 、 0.011 、 0.025)。与GHET1干扰组比较, GHET1+miR-27b干扰组12、24以及48 h细胞OD值升高($P=0.042$ 、 0.015 、 0.037),见图4。该结果表明,抑制GHET1降低SGC-996细胞增殖,而抑制miR-27b促进SGC-996细胞增殖,并且抑制miR-27b可以逆转抑制GHET1对SGC-996细胞增殖的影响。

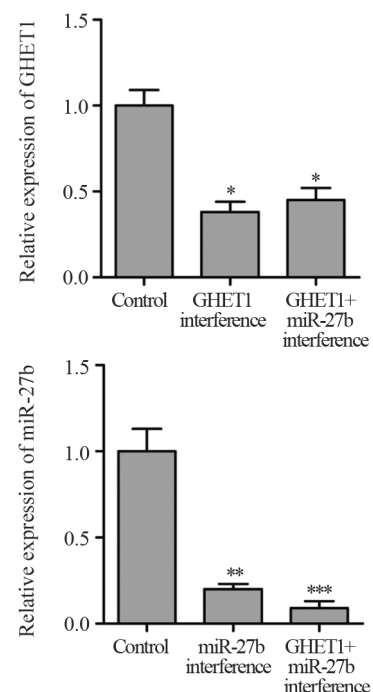
2.5 抑制GHET1和miR-27b对SGC-996细胞凋亡的影响

流式细胞术结果显示,与对照组比较, GHET1干扰组中细胞凋亡率升高($P=0.019$),

表1 GHET1表达与胆囊癌患者临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between GHET1 expression and clinicopathological characteristics of GBC patients

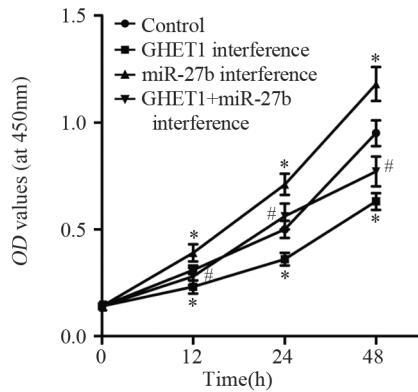
Parameters	Cases (n=50)	Low GHET1 expression group (n(%))	High GHET1 expression group (n(%))	χ^2	P
Age (years)				2.013	0.156
<60	27	11(22)	16(32)		
≥ 60	23	14(28)	9(18)		
Gender				2.053	0.152
Male	21	13(26)	8(16)		
Female	29	12(24)	17(34)		
Tumour size(cm)				2.381	0.123
<5	35	20(40)	15(30)		
≥ 5	15	5(10)	10(20)		
Pathological subtype				0.595	0.440
Adenocarcinoma	42	22(44)	20(40)		
Squamous carcinoma	8	3(6)	5(10)		
Histological grade				1.282	0.258
Well	26	15(30)	11(22)		
Moderate-poor	24	10(20)	14(28)		
TNM stage				17.014	<0.001
I - II	32	23(46)	9(18)		
III - IV	18	2(4)	16(32)		
Lymph node metastasis				8.333	0.004
No	30	20(40)	10(20)		
Yes	20	5(10)	15(30)		



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, compared with the control group.

图3 各组细胞转染效率检测

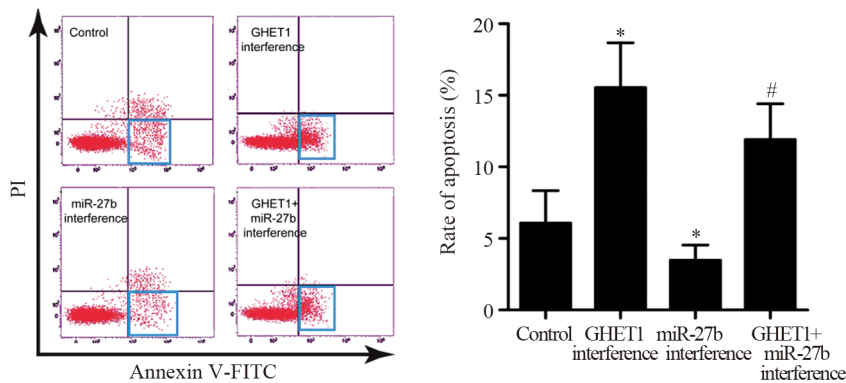
Figure 3 Transfection efficiency of cells in each group



*: $P < 0.05$, compared with the control group at the same time point; #: $P < 0.05$, compared with the GHET1 interference group at the same time point.

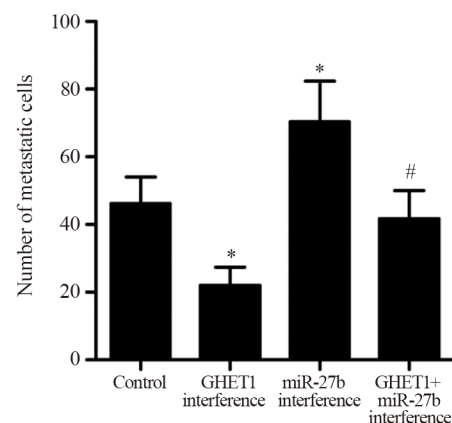
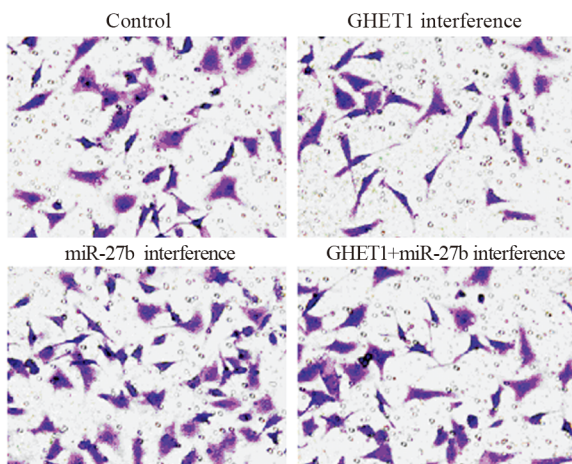
图4 抑制GHET1和miR-27b对SGC-996细胞增殖的影响
Figure 4 Effect of inhibition of GHET1 and miR-27b on proliferation of SGC-996 cells

miR-27b干扰组中细胞凋亡率降低 ($P=0.046$)。与GHET1干扰组比较, GHET1+miR-27b干扰组中细胞凋亡率降低 ($P=0.015$), 见图5。该结果表明, 抑制GHET1增加SGC-996细胞凋亡, 而抑制miR-27b降低SGC-996细胞凋亡, 并且抑制



*: $P < 0.05$, compared with the control group; #: $P < 0.05$, compared with the GHET1 interference group. Blue boxes represented the apoptotic cells.

图5 抑制GHET1和miR-27b对SGC-996细胞凋亡的影响
Figure 5 Effect of inhibition of GHET1 and miR-27b on apoptosis of SGC-996 cells



*: $P < 0.05$, compared with the control group; #: $P < 0.05$, compared with the GHET1 interference group.

图6 抑制GHET1和miR-27b对SGC-996细胞转移的影响 (×400)
Figure 6 Effect of inhibition of GHET1 and miR-27b on metastasis of SGC-996 cells (×400)

miR-27b可以逆转抑制GHET1对SGC-996细胞凋亡的影响。

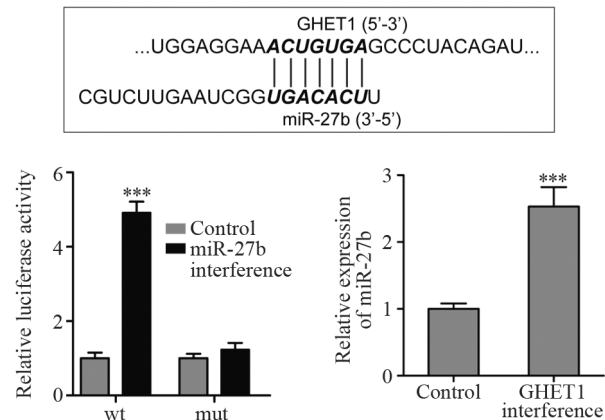
2.6 抑制GHET1和miR-27b对SGC-996细胞转移的影响

Transwell试验结果显示, 与对照组比较, GHET1干扰组中细胞转移数量降低 ($P=0.033$), miR-27b干扰组中细胞转移数量升高 ($P=0.027$)。与GHET1干扰组比较, GHET1+miR-27b干扰组中细胞转移数量升高 ($P=0.031$), 见图6。该结果表明, 抑制GHET1降低SGC-996细胞转移, 而抑制miR-27b促进SGC-996细胞转移, 并且抑制miR-27b可以逆转抑制GHET1对SGC-996细胞转移的影响。

2.7 GHET1对miR-27b的调控作用

生物信息学分析结果显示, GHET1中“ACUGUGA”序列与miR-27b中“UGACACU”序列完全互补配对; 荧光素酶报告基因试验结果显示, 与对照组比较, miR-27b干扰组中GHET1-wt报告载体的相对荧光素酶活性增加 ($P < 0.001$), GHET1-mut报告载体的相对荧光素酶活性无明显改变 ($P > 0.05$); 实时荧光定量PCR结果显示,

对照组和GHET1干扰组中miR-27b的相对表达水平分别为 1.0 ± 0.08 和 2.53 ± 0.29 , 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 见图7。该结果表明, GHET1可以海绵吸附miR-27b并抑制其表达。



***: $P < 0.001$, compared with the control group.

图7 GHET1对miR-27b的调控作用

Figure 7 Regulation of GHET1 on miR-27b

3 讨论

近年来, 靶向表观遗传因子是治疗疾病的一种新思路, 尤其在恶性肿瘤中具有较大潜力。越来越多的证据显示, lncRNAs作为一类表观遗传因子在胆囊癌中异常表达并影响肿瘤进展, 了解其作用机制将为该病的治疗提供新的分子靶点^[6-7]。例如, Zhang等^[8]报道H19在胆囊癌中表达上调, 过表达H19可促进胆囊癌细胞增殖和转移。Lu等^[9]发现小核宿主基因1 (small nucleolar RNA host gene 1, SNHG1) 在胆囊癌中呈现高表达, 抑制SNHG1可降低胆囊癌细胞增殖和转移。Gao等^[10]通过一系列细胞实验证实沉默叉头框蛋白D2相邻相反链RNA 1 (FOXD2 adjacent opposite strand RNA 1, FOXD2-AS1) 可以使胆囊癌进展受到一定的抑制。此外, TTN反义RNA1 (TTN antisense RNA 1, TTN-AS1) 被报道在胆囊癌进展过程中发挥促癌因子作用^[11]。GHET1定位于人染色体7q36.1位置, 长度为1 903 nt。作为胃癌中研究最多的lncRNA之一, GHET1与细胞增殖、细胞周期、转移以及多重耐药密切相关^[12-13]。本研究发现, GHET1促进胆囊癌细胞增殖和转移并抑制细胞凋亡, 有助于进一步完善GHET1在肿瘤中的功能注释。

本研究首先分析GHET1在50例胆囊癌样本中的表达, 发现癌组织中该基因的表达高于癌旁组织, 与其他肿瘤样本中的表达基本一致^[4]。随后通过分析GHET1表达与胆囊癌患者预后的关系,

发现高GHET1表达预示不良预后, 提示GHET1可能用于监测胆囊癌预后, 但仍需要大样本、多中心试验验证。此外, 还发现GHET1表达与TNM分期和淋巴结转移相关。该结果与已发表的Meta分析结果相符^[14]。

GHET1相较其他的lncRNA表现出高稳定性和特异性, 在肿瘤治疗方面显示出较大的潜力。通过MTT法、流式细胞术以及Transwell试验, 本研究发现抑制GHET1可降低SGC-996细胞增殖和转移, 并增加细胞凋亡。该结果与Liu等^[15]和Han等^[16]结果一致, 初步揭示GHET1在胆囊癌进展中发挥促癌因子作用。后续研究将在其他的胆囊癌细胞株如GBC-SD和NOZ中验证该结果。

作为一种研究较多的miRNA, miR-27b在多种肿瘤中参与调控细胞生物学行为。例如, Bao等^[17]报道miR-27b通过激活Hippo信号通路抑制胃癌细胞转移和上皮-间充质转化。Li等^[18]发现miR-27b靶向Engrailed同源盒蛋白2 (engrailed homeobox 2, EN2) 抑制膀胱癌细胞增殖和侵袭。Miao等^[19]发现miR-27b通过调控Yes相关蛋白1 (Yes1 associated transcriptional regulator, YAP1) 抑制胶质瘤细胞增殖和迁移并促进细胞凋亡。本研究发现miR-27b在胆囊癌组织的表达低于癌旁组织, 与其他肿瘤中报道的结果一致^[5]。随后一系列体外细胞实验结果证实, 抑制miR-27b促进SGC-996细胞增殖和转移并抑制细胞凋亡。由此初步表明, miR-27b在胆囊癌进展中发挥抑癌因子作用。需要注意的是, 该结果需在GBC-SD和NOZ细胞株中进一步验证。

研究表明, lncRNAs主要通过海绵吸附下游miRNAs而发挥转录调节作用^[20]。鉴于GHET1与miR-27b在胆囊癌进展中的作用截然相反, 且胆囊癌中GHET1与miR-27b表达呈负相关。另外, 生物信息学预测显示, GHET1中“ACUGUGA”序列可以与miR-27b中“UGACACU”序列特异性结合。基于以上证据, 我们推测miR-27b可能受到GHET1直接调控。随后经荧光素酶报告基因试验证实, GHET1可以通过海绵吸附方式下调miR-27b表达。为了明确GHET1是否通过靶向miR-27b影响胆囊癌进展, 我们在SGC-996细胞中同时抑制GHET1和miR-27b。结果发现, 细胞增殖和转移较单独抑制GHET1增加, 而细胞凋亡较单独抑制GHET1降低, 表明抑制miR-27b可以逆转抑制GHET1对SGC-996细胞增殖、转移以及凋亡的影响。后续将通过实验在胆囊癌细胞中上调GHET1的同时上调miR-27b, 观察细胞增殖、转移以及凋亡的改变。

同时在动物模型中验证GHET1/miR-27b轴对体内胆囊癌生长与转移的影响。如果体内与体外功能一致,将来研发靶向GHET1的小分子药物或许可以起到有效的抗癌作用。

综上所述, GHET1在胆囊癌中表达上调, GHET1表达与TNM分期和淋巴结转移相关, 高GHET1表达预示不良预后。GHET1靶向miR-27b促进胆囊癌细胞增殖和转移并抑制细胞凋亡, 表明GHET1/miR-27b轴在胆囊癌进展中具有一定的作用。

利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Halaseh SA, Halaseh S, Shakman R. A Review of the Etiology and Epidemiology of Gallbladder Cancer: What You Need to Know[J]. Cureus, 2022, 14(8): e28260.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, *et al.* Cancer Statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33.
- [3] Zhu X, Shi C, Hou C. AFAP1-AS1/Hsa-miR-15a-5p/Bcl-2 Axis is a Potential Regulator of Cancer Cell Proliferation and Apoptosis in Gallbladder Carcinoma[J]. Nutr Cancer, 2022, 74(9): 3363-3374.
- [4] Jiang YF, Zhang HY, Ke J, *et al.* Overexpression of LncRNA GHET1 predicts an unfavourable survival and clinical parameters of patients in various cancers[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(8): 4891-4899.
- [5] Martino E, Balestrieri A, Mele L, *et al.* Milk Exosomal miR-27b Worsen Endoplasmic Reticulum Stress Mediated Colorectal Cancer Cell Death[J]. Nutrients, 2022, 14(23): 5081.
- [6] Rana V, Parama D, Khatoon E, *et al.* Reiterating the Emergence of Noncoding RNAs as Regulators of the Critical Hallmarks of Gall Bladder Cancer[J]. Biomolecules, 2021, 11(12): 1847.
- [7] Yang M, Lu H, Liu J, *et al.* lncRNAfunc: a knowledgebase of lncRNA function in human cancer[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(D1): D1295-D1306.
- [8] Zhang Y, Li H, Lv C, *et al.* HHLA2 promotes tumor progression by long non-coding RNA H19 in human gallbladder cancer[J]. Int J Oncol, 2022, 61(3): 112.
- [9] Lu X, Hu K, Tan Q, *et al.* Silencing SNHG1 Suppresses Viability, Proliferation and Invasion of Gallbladder Carcinoma Cells via Targeting miR-194-5p[J]. Ann Clin Lab Sci, 2022, 52(5): 707-720.
- [10] Gao J, Dai C, Yu X, *et al.* Silencing of long non-coding RNA FOXD2-AS1 inhibits the progression of gallbladder cancer by mediating methylation of MLH1[J]. Gene Ther, 2021, 28(6): 306-318.
- [11] Lin Z, Li Y, Shao R, *et al.* LncRNA TTN-AS1 acts as a tumor promoter in gallbladder carcinoma by regulating miR-107/HMGA1 axis[J]. World J Surg Oncol, 2021, 19(1): 163.
- [12] Liu H, Wu Y. Long non-coding RNA gastric carcinoma highly expressed transcript 1 promotes cell proliferation and invasion in human head and neck cancer[J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 6941-6946.
- [13] Li B, Xie D, Zhang H. Long non-coding RNA GHET1 contributes to chemotherapeutic resistance to Gemcitabine in bladder cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2019, 84(1): 187-194.
- [14] Poursheikhani A, Nokhandani N, Yousefi H, *et al.* Clinicopathological Significance of Long Non-Coding RNA GHET1 in Human Cancers: A Meta-Analysis[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2020, 21(14): 1422-1432.
- [15] Liu Z, Luo S, Wu M, *et al.* LncRNA GHET1 promotes cervical cancer progression through regulating AKT/mTOR and Wnt/beta-catenin signaling pathways[J]. Biosci Rep, 2020, 40(1): BSR20191265.
- [16] Han M, Wang Y, Gu Y, *et al.* lncRNA GHET1 knockdown suppresses breast cancer activity *in vitro* and *in vivo*[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(1): 31-44.
- [17] Bao CH, Guo L. miR-27b-3p Inhibits Invasion, Migration and Epithelial-mesenchymal Transition in Gastric Cancer by Targeting RUNX1 and Activation of the Hippo Signaling Pathway[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2022, 22(5): 864-873.
- [18] Li Y, Duan Q, Gan L, *et al.* microRNA-27b inhibits cell proliferation and invasion in bladder cancer by targeting engrailed-2[J]. Biosci Rep, 2021, 41(1): BSR20201000.
- [19] Miao W, Li N, Gu B, *et al.* MiR-27b-3p suppresses glioma development via targeting YAP1[J]. Biochem Cell Biol, 2020, 98(4): 466-473.
- [20] Lin X, Zhuang S, Chen X, *et al.* lncRNA ITGB8-AS1 functions as a ceRNA to promote colorectal cancer growth and migration through integrin-mediated focal adhesion signaling[J]. Mol Ther, 2022, 30(2): 688-702.

[编辑: 尤婷婷; 校对: 邱颖慧]

作者贡献:

阳镇、李文川: 实验实施、数据整合和分析、论文撰写与修改

周宁: 选题与实验设计、论文审阅校正