doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.08.001
View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.08.001

·论著·

# 过表达 lncRNA-p21 通过介导 Wnt/β-catenin 信号通路抑制胃癌 MGC-803 细胞的生长与转移

裴洪利[1]，白尚星[2]

(1. 沈阳市第七人民医院检验科，沈阳 110003；2. 沈阳市第六人民医院检验科，沈阳 110006)

[摘　要]　**目的：**探讨lncRNA-p21在调控胃癌MGC-803细胞生长与转移作用中的作用及Wnt/β-catenin信号通路在其中的功能。**方法：**在人胃癌MGC-803细胞中转染慢病毒以过表达lncRNA-p21。观察细胞形态、细胞增殖以及体内外迁移和侵袭能力，检测Wnt/β-catenin信号通路是否参与lncRNA-p21介导的抑制胃癌细胞增殖和生长作用。最后使用LiCl对Wnt/β-catenin信号通路进行验证。**结果：**LncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞发生了形态学的改变，表现为由纺锤状或星状形态变为较圆的低侵袭状态。LncRNA-p21在体内外均抑制了胃癌MGC-803细胞增殖和生长，体外实验表现为lncRNA-p21过表达减弱了胃癌MGC-803细胞迁移和侵袭能力。LiCl实验验证了Wnt/β-catenin信号通路介导了lncRNA-p21对胃癌MGC-803细胞增殖、迁移与侵袭的抑制作用。**结论：**LncRNA-p21可在体内外显著抑制胃癌MGC-803细胞的生长与转移，且该抑制作用可能通过抑制Wnt/β-catenin信号通路介导。

[关键词]　lncRNA-p21；Wnt/β-catenin；信号通路；胃癌；转移

# Over-expression of lncRNA-p21 inhibits the growth and metastasis of gastric cancer MGC-803 cells by mediating Wnt/beta-catenin signaling pathway

PEI Hongli[1], BAI Shangxing[2]

*(1. Department of Laboratory, Seventh People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110003; 2. Department of Laboratory, Sixth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110006, China)*

**Abstract**　**Objective:** To investigate the role of lncRNA-p21 in regulating growth and metastasis in gastric cancer MGC-803 cells and the mediation of Wnt/β-catenin signaling pathway. **Methods:** Lentivirus was transfected into gastric cancer MGC-803 cells to overexpress lncRNA-p21. The cell morphology, proliferation, migration and invasion ability in vitro and in vivo were observed. Whether or not Wnt/β-catenin signaling pathway involving in the inhibition of proliferation and growth of gastric cancer cells mediated by LncRNA-p21 was detected. Finally, we

收稿日期 (Date of reception)：2018-12-24
通信作者 (Corresponding author)：裴洪利，Email: 1790222693@qq.com
基金项目 (Foundation item)：沈阳市科学技术研究与发展计划项目 (20147060)。This work was supported by Shenyang Science and Technology Research and Development Plan Project, China (20147060).

used lithium chloride to validate the Wnt/β-catenin signaling pathway. **Results:** Over-expression of lncRNA-p21 changed morphologically from spindle or stellate to round, low invasive state in gastric cancer MGC-803 cells. LncRNA-p21 inhibited the proliferation and growth of gastric cancer MGC-803 cells in vitro and in vivo. In vitro, over-expression of lncRNA-p21 weakened the migration and invasion ability of gastric cancer MGC-803 cells. Wnt/β-catenin signaling pathway mediated the inhibitory effect of lncRNA-p21 on proliferation, migration and invasion of gastric cancer MGC-803 cells. LiCl experiments demonstrated that Wnt/β-catenin signaling pathway mediated the inhibition of LncRNA-p21 on proliferation, migration and invasion of gastric cancer MGC-803 cells. **Conclusion:** LncRNA-p21 can significantly inhibit the growth and metastasis of gastric cancer MGC-803 cells in vitro and in vivo, and the inhibition may be mediated by inhibiting Wnt/β-catenin signaling pathway.

**Keywords** lncRNA-p21; Wnt/β-catenin; signaling pathway; gastric cancer; metastasis

胃癌起源于胃黏膜上皮细胞，其发病率居世界第5位，在中国居第2位[1]。胃癌的发生和发展是基因和环境因素共同参与的一个多步骤、多因素的生理过程[2]。近年来，随着分子生物学，特别是基因克隆技术的快速发展，研究[3-4]发现胃癌的发生涉及多种分子和生物学事件，潜在的生物标志物的鉴定将有助于胃癌的治疗。长非编码RNA(long-non coding RNAs，lncRNAs)是指长度超过200个核苷酸的内源性非蛋白编码转录本[5]。LncRNA可通过靶向该过程的不同方面，如基因转录和RNA处理，调节基因的表达，并参与多种肿瘤的发展[6]。越来越多的证据[7-8]表明：LncRNA参与胃癌的发生和发展。LncRNA在肿瘤发生中具有多种功能，如调节胃癌细胞增殖、迁移、转移能力，并且在一定程度上可以指示预后[7]。然而，lncRNA-p21是否具有抑制胃癌细胞的肿瘤抑制潜能尚不清楚。本研究探讨lncRNA-p21通过调节Wnt/β-catenin信号通路并最终影响胃癌MGC-803细胞的增殖侵袭作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用的裸鼠购买自北京维通利华实验动物技术有限公司。RPMI-1640培养基购买自美国Invitrogen公司；胎牛血清、链霉素、多聚甲醛和β-actin抗体购买自美国Sigma公司；Transwell小室和基底膜Matrigel购买自美国Corning公司；涂层基质购买自美国BD公司；Triton X-100和兔抗β-catenin抗体购买自美国CST公司；含DAPI封片剂购买自美国Vector公司；RIPA裂解缓冲液和CCK-8试剂购买自江苏碧云天生物科技公司。

### 1.2 细胞培养

人胃癌细胞系MGC-803购自上海中科院细胞库，在含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养，然后将培养基置于37 ℃的培养箱(5% $CO_2$，95%湿度)。细胞以单层的形式生长，当细胞达到90%的汇合率时，再传代。将培养基丢弃后，用PBS洗涤细胞2次，用0.25%胰蛋白酶消化。当细胞间隙增大时，吸弃胰蛋白酶，加入新的培养基制备单细胞悬液。

### 1.3 转染细胞系

使用慢病毒转染的方法将过表达lncRNA-p21的重组质粒和对照质粒分别转入MGC-803胃癌细胞株中，经新霉素筛选出lncRNA-p21稳定过表达的胃癌细胞株，用定量PCR的方法检测lncRNA-p21在胃癌细胞中的过表达情况。

### 1.4 Transwell 实验

Transwell细胞侵袭和迁移检测采用Transwell内室分析法。按照指定实验处理的细胞用无血清培养基制备成1×$10^6$细胞/mL的细胞悬液，并取100 μL接种于Transwell小室上膜(Transwell细胞迁移实验小室上膜不铺基底膜Matrigel，Transwell细胞侵袭实验小室上膜铺设基底膜Matrigel)，下膜加入600 μL含有10%血清的培养基，细胞穿膜24 h，取出小室，擦除小室上膜细胞，小室下膜细胞用0.1%结晶紫染色，用正置显微镜拍照，并选择5个随机视野进行计数。

### 1.5 CCK-8 实验

采用CCK-8法检测细胞增殖。以5×$10^3$个细胞接种至96孔板，按照指定实验处理细胞，待细

胞达到处理时间终点时，除去旧培养基。每孔再加入100 μL新的培养基，同时加入10 μL CCK-8试剂，37 ℃细胞培养箱中继续孵育2 h。孵育结束后，取96孔板至于多功能酶标仪在450 nm波长处检测各个样品吸光度OD值。

### 1.6 体外成瘤实验

将1×10$^7$个稳定过表达lncRNA-p21的MGC-803胃癌细胞和含有对照质粒的MGC-803胃癌细胞分别注入裸鼠腋下部位皮下组织，定期测量移植瘤在裸鼠上的体积大小，饲养30 d后取出瘤组织测量移植瘤的重量。

### 1.7 免疫荧光分析

收集按照指定实验处理的细胞，用4%多聚甲醛固定30 min后，用0.5%的Triton X-100通透1 min，用5%驴血清室温条件下封闭细胞30 min。用兔抗β-catenin (1:500稀释) 抗体孵育过夜。次日PBS冲洗3次后，使用抗兔属荧光二抗在室温下孵育1 h，洗净后使用含DAPI封片剂对细胞核封片，最后使用共焦显微镜(日本Nikon公司)拍照成像。

### 1.8 蛋白质印迹法

收集按照指定实验处理的细胞，使用RIPA裂解缓冲液提取细胞内总蛋白。蛋白经定量后，每样品取20 μg蛋白，经过高温变性后，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离。把分离的蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。使用5%脱脂奶粉封闭PVDF膜30 min，再使用β-catenin(1:2 000稀释)抗体孵育过夜。次日，用TBST洗膜后，孵育二抗1 h，再次TBST洗膜后，采用化学发光显色成像，并用IPP软件进行半定量分析。

### 1.9 统计学处理

使用Graphpad Prism7.0软件对数据进行分析。方差分析后进行单因素方差分析或非配对*t*检验。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。$P<0.05$为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LncRNA-p21 过表达改变胃癌 MGC-803 细胞的形态学特征

观察过表达lncRNA-p21对胃癌MGC-803细胞形态的影响，发现lncRNA-p21过表达胃癌MGC-803细胞发生了形态学改变，表现为由纺锤状或星状形态变为较圆的低侵袭状态(图1)。

### 2.2 LncRNA-p21 过表达减弱胃癌 MGC-803 细胞迁移和侵袭能力

Transwell实验结果显示：lncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞的迁移能力显著降低(图2A，2B)；lncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞的侵袭能力也显著降低(图2C，2D)。

### 2.3 LncRNA-p21 过表达在体内外抑制胃癌细胞生长

CCK-8法检测发现lncRNA-p21过表达在体外抑制胃癌MGC-803细胞增殖(图3A)。体内肿瘤形成试验表明：lncRNA-p21的过表达明显抑制胃癌肿瘤生长(图3B)，体内成瘤体积明显减小(图3C)，成瘤的肿瘤组织肿瘤显著降低(图3D)。

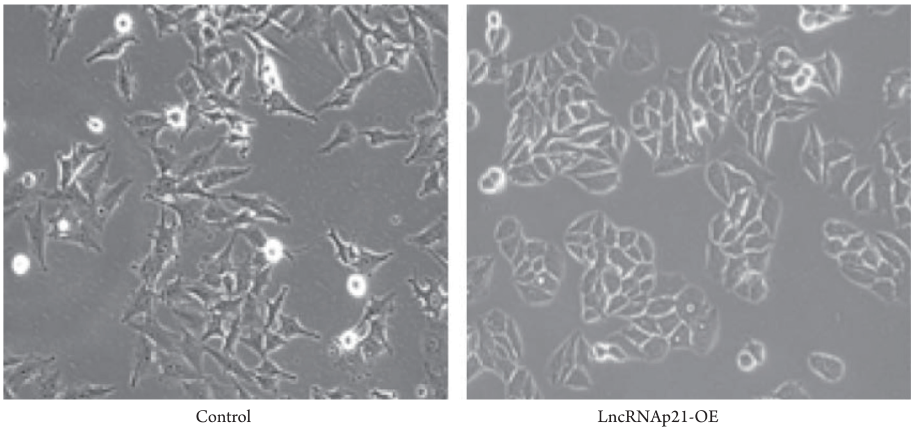


**图1 LncRNA-p21过表达改变了胃癌MGC-803细胞的形态学特征(×400)**

**Figure 1 Over-expression of lncRNA-p21 alters the morphological characteristics of gastric cancer MGC-803 cells (×400)**

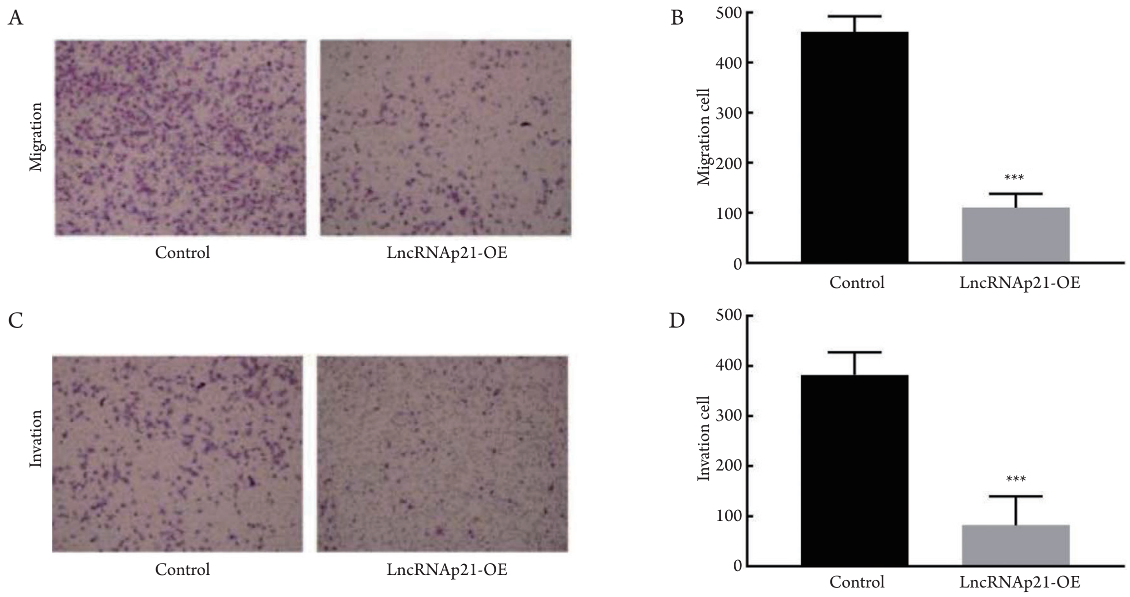


**图2 LncRNA-p21过表达对胃癌MGC-803细胞的迁移和侵袭能力的影响**

**Figure 2 Effect of over-expression of lncRNA-p21 on the migration and invasion in gastric cancer MGC-803 cells**

(A，B) LncRNA-p21过表达对胃癌MGC-803细胞迁移的影响；(A) 代表性的Transwell细胞迁移图片(×200)，(B) 迁移数目的统计结果；(C，D) LncRNA-p21过表达对胃癌MGC-803细胞侵袭的影响，(C) 代表性的Transwell细胞侵袭图片(×200)；(D) 侵袭移数目的统计结果。*n*=7，与对照组相比，****P*<0.001。

(A, B) Effect of over-expression of lncRNA-p21 on migration in gastric cancer MGC-803 cells, (A) Transwell images of migration (×200); (B) Statistical results of the number of migration; (C, D) Effect of over-expression of LncRNA-p21 on invasion in gastric cancer MGC-803 cells; (C) Transwell images of invasion (×200), (D) Statistical results of the number of invasion. *n*=7, ****P*<0.001 vs control group.

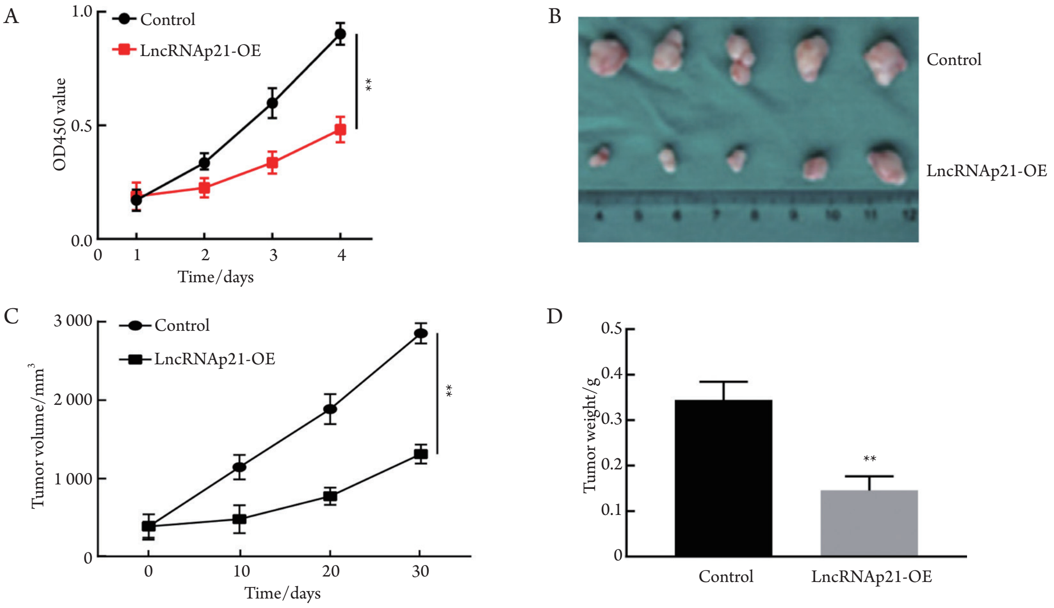


**图3 LncRNA-p21过表达在体内外抑制胃癌细胞生长**

**Figure 3 Over-expression of lncRNA-p21 inhibits the growth of gastric cancer cells in vivo and in vitro**

(A) LncRNA-p21过表达在体外抑制胃癌MGC-803细胞增殖；(B-D) LncRNA-p21过表达在体内抑制胃癌细胞生长，(B) 肿瘤块图片；(C) 肿瘤块体积的统计结果；(D) 肿瘤块重量统计的统计结果。*n*=5，与对照组相比，***P*<0.01。

(A) Over-expression of LncRNA-p21 inhibited the proliferation of gastric cancer cells in vitro; (B-D) Over-expression of LncRNA-p21 inhibited the growth of gastric cancer cells in vivo, (B) Images of tumor mass, (C) Statistical results of the volume of tumor mass; (D) Statistical results of the weight of tumor mass. *n*=5, ***P*<0.01 vs control group.

### 2.4 LncRNA-p21 过表达抑制 Wnt/β-catenin 信号通路活性

免疫荧光染色发现：lncRNA-p21过表达抑制β-catenin在MGC-803细胞中蓄积(图4A，4B)。蛋白质印迹法发现lncRNA-p21过表达抑制胃癌MGC-803细胞β-catenin表达(图4C，4D)。

### 2.5 Wnt/β-catenin 信号通路介导 LncRNA-p21 对胃癌 MGC-803 细胞迁移的抑制作用

蛋白质印迹法显示：LiCl可显著激活lncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞的Wnt/β-catenin通路，β-catenin表达量上升(图5A，5B)。随后采用CCK-8实验显示：LiCl显著增强lncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞的增殖(图5C)。进一步采用Transwell实验检测LiCl处理对lncRNA-p21过表达胃癌MGC-803细胞的迁移和侵袭的影响，结果显示：LiCl处理显著增强的lncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞的迁移(图5C，5D)和侵袭能力(图5F，5G)。

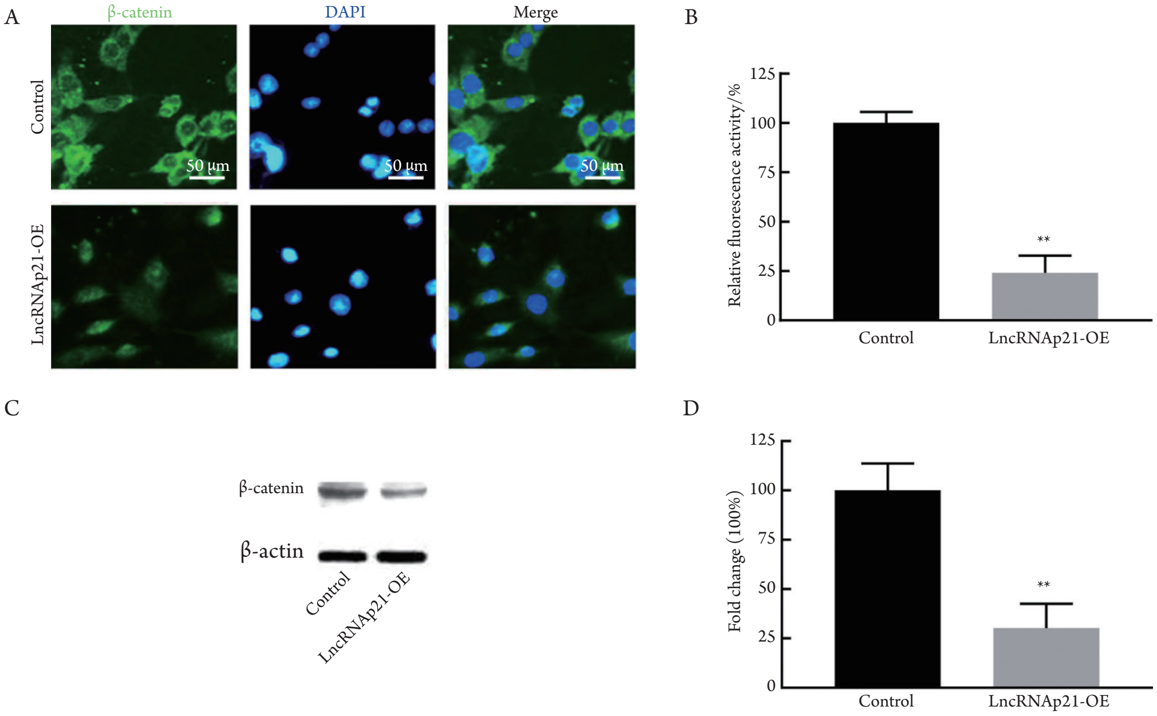


**图4 LncRNA-p21过表达对胃癌MGC-803细胞Wnt/β-catenin信号通路的影响**

**Figure 4 Effect of over-expression of lncRNA-p21 on Wnt/beta-catenin signaling pathway in gastric cancer MGC-803 cells**

(A，B) LncRNA-p21过表达抑制MGC-803细胞中β-catenin蓄积；(A) β-catenin免疫荧光染色；(B) β-catenin荧光活性的统计结果；(C，D) LncRNA-p21过表达抑制MGC-803细胞中β-catenin蛋白表达；(C) 蛋白质印迹法检测β-catenin蛋白表达；(D) β-catenin蛋白表达的统计结果。$n$=7，与对照组相比，**$P$<0.01。

(A, B) Over-expression of LncRNA-p21 inhibited the accumulation of β-catenin in MGC-803 cells; (A) Immunofluorescence of β-catenin; (B) Statistical results of the fluorescence activity of β-catenin; (C, D) Over-expression of lncRNA-p21 inhibited the expression of β-catenin in MGC-803 cells; (C) Western blot detect β-catenin expression; (D) Statistical results of the expression of β-catenin. $n$=7, **$P$<0.01 vs control group.

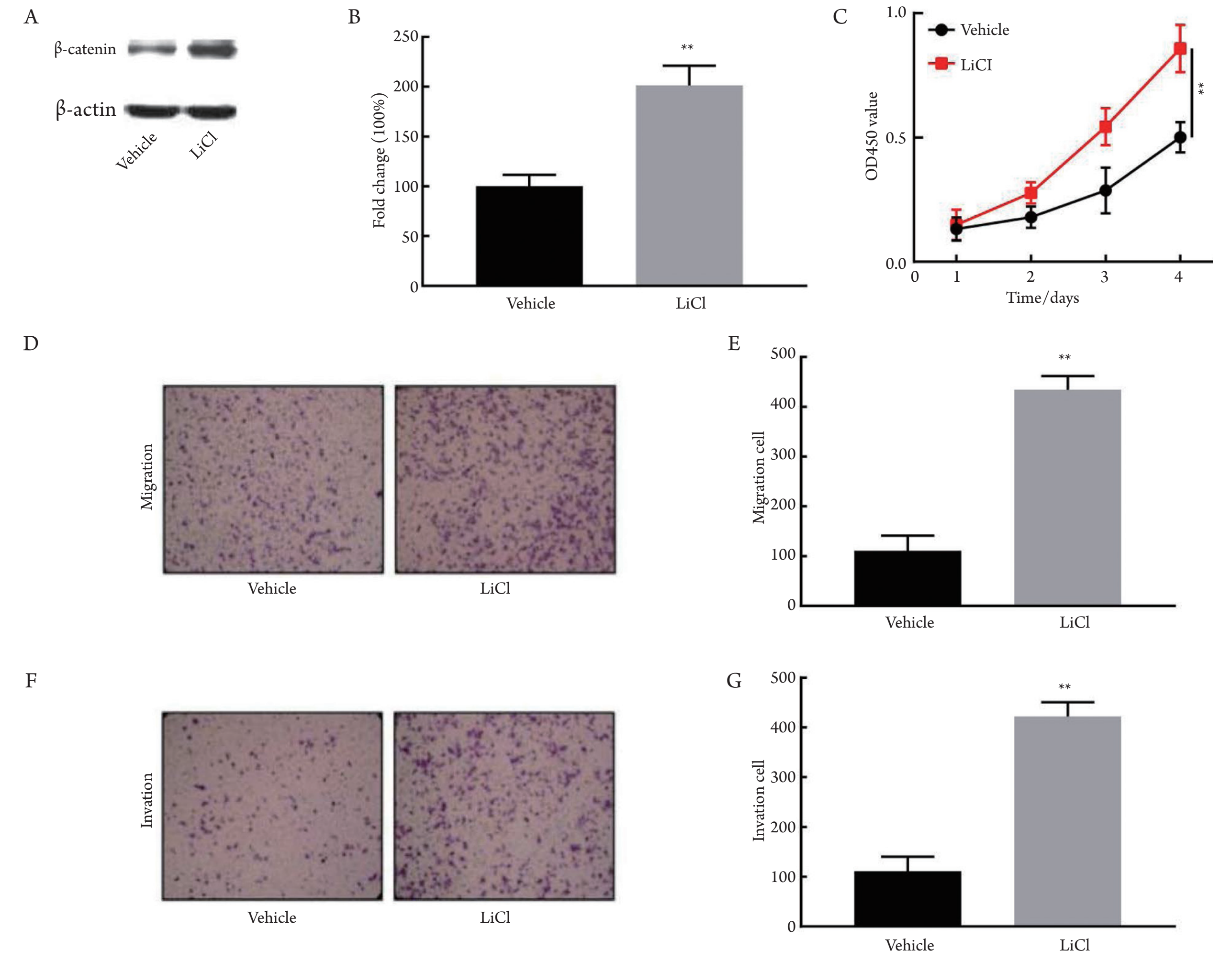


**图5 Wnt/β-catenin信号通路介导了lncRNA-p21对胃癌MGC-803细胞增殖、迁移与侵袭的抑制作用**

**Figure 5 Wnt/β-catenin signaling pathway mediates the inhibitory effect of LncRNA-p21 on proliferation, migration, and invasion in gastric cancer MGC-803 cells**

(A，B) LiCl促进LncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞的β-catenin的表达；(A) 蛋白质印迹法检测β-catenin蛋白表达；(B) β-catenin蛋白表达的统计结果；(C) LiCl促进LncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞增殖；(D，E) LiCl促进LncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞的迁移，(D) Transwell细胞迁移（×200)；(E) 迁移数目的统计结果；(F，G) LiCl促进LncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞的侵袭；(F) 代表性的Transwell细胞侵袭图片(×200)；(G) 侵袭移数目的统计结果。*n*=7，***P*<0.001。

(A,B) LiCl promoted the expression of β-catenin in lncRNA-p21-overexpressed gastric cancer MGC-803 cells; (A) β-catenin expression detected by Western blot; (B) Statistical results of the expression of β-catenin; (C) LiCl promoted the proliferation of lncRNA-p21-overexpressed gastric cancer MGC-803 cells; (D, E) LiCl promoted the migration of LncRNA-p21-overexpressed gastric cancer MGC-803 cells; (D) Transwell images of migration (×200); (E) Statistical results of the number of migration; (F, G) LiCl promoted the invasion of lncRNA-p21-overexpressed gastric cancer MGC-803 cells; (F) Transwell images of invasion (×200); (G) Statistical results of the number of invasion. *n*=7, ***P*<0.001 vs control group.

## 3 讨论

胃癌是世界范围内尤其是中国常见的恶性肿瘤[9]。尽管对胃癌的治疗有多种措施，但胃癌病死率仍居高不下，迫切需要新的生物标志物和治疗手段的出现以提高治疗效果[10]。近年来，越来越多的研究[5,11-12]证实lncRNA参与肿瘤生长信号调节。LncRNA-p21在多种肿瘤中显示出抗癌能力，lncRNA-p21可以激活肝细胞癌细胞的内质网应激过程，从而抑制肝细胞癌细胞的增殖[13]，并且可以减弱索拉非尼的耐药性[14]。前列腺癌细胞中lncRNA-p21的过表达诱导p53介导的细胞凋亡[15]。本研究体外实验发现：LncRNA-p21过表达抑制胃癌MGC-803细胞增殖、迁移和侵袭；在裸鼠成瘤实

验中，lncRNA-p21过表达明显抑制胃癌肿瘤生长。

Wnt蛋白是一类分泌、糖基化和棕榈酰化肽，可调节细胞分裂、迁移和形态完整性[16]。Wnt/β-catenin信号通路的异常激活已被证明在多种类型的人类癌症的发展过程中起重要的调节作用[17]。Wnt/β-catenin信号通路包括β-catenin，Axin和APC可在胃癌患者中观察到激活突变[18]。本实验发现：lncRNA-p21过表达可以抑制Wnt/β-catenin信号活性；而Wnt/β-catenin信号激动剂LiCl可激活lncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞的Wnt/β-catenin信号活性，促进lncRNA-p21过表达的胃癌MGC-803细胞增殖、迁移和侵袭，表明Wnt/β-catenin信号通路介导了LncRNA-p21对胃癌MGC-803细胞的增殖、迁移侵和袭的抑制作用。

综上所述，Wnt/β-catenin信号转导参与胃癌进展，而lncRNA-p21可通过抑制Wnt/β-catenin信号转导发挥抑制胃癌MGC-803细胞增殖、迁移和侵袭的作用。这些发现为胃癌患者诊治提供了一个新的生物标志物和治疗策略。

## 参考文献


1. Choi E, Lee S, Nhung BC, et al. Cancer mortality-to-incidence ratio as an indicator of cancer management outcomes in Organization for Economic Cooperation and Development countries[J]. Epidemiol Health, 2017, 39: e2017006.
2. Panarese I, De Vita F, Ronchi A, et al. Predictive biomarkers along gastric cancer pathogenetic pathways[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2017, 17(5): 417-425.
3. Abbas M, Habib M, Naveed M, et al. The relevance of gastric cancer biomarkers in prognosis and pre- and post-chemotherapy in clinical practice[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 1082-1090.
4. Seeruttun SR, Cheung WY, Wang W, et al. Identification of molecular biomarkers for the diagnosis of gastric cancer and lymph-node metastasis[J]. Gastroenterol Rep (Oxf), 2019, 7(1): 57-66.
5. Xie M, Ma T, Xue J, et al. The long intergenic non-protein coding RNA 707 promotes proliferation and metastasis of gastric cancer by interacting with mRNA stabilizing protein HuR[J]. Cancer Lett, 2019, 443: 67-79.
6. Xu J, Bai J, Zhang X, et al. A comprehensive overview of lncRNA annotation resources[J]. Brief Bioinform, 2017, 18(2): 236-249.
7. Gu Y, Chen T, Li G, et al. LncRNAs: emerging biomarkers in gastric cancer[J]. Future Oncol, 2015, 11(17): 2427-2441.
8. Hao NB, He YF, Li XQ, et al. The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer[J].Oncotarget, 2017, 8(46): 81572-81582.
9. Rahman R, Asombang AW, Ibdah JA. Characteristics of gastric cancer in Asia[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(16): 4483-4490.
10. Okugawa Y, Toiyama Y, Shigeyasu K, et al. Enhanced AZIN1 RNA editing and overexpression of its regulatory enzyme ADAR1 are important prognostic biomarkers in gastric cancer[J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 366.
11. 王昱文, 成秉林, 张淑君. lncRNA的生物标记作用及MEG3在肿瘤中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(2): 308-311.
WANG Yuwen, CHENG Binglin, ZHANG Shujun. Research progress of the role of lncRNA as biomarkers and MEG3 in tumors[J]. Journal of Modern Oncology, 2017, 25(2): 308-311.
12. Liu XM, Yang B, Han J. Increased long noncoding RNA LINP1 expression and its prognostic significance in human breast cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(24): 8749-8754.
13. Yang N, Fu Y, Zhang H, et al. LincRNA-p21 activates endoplasmic reticulum stress and inhibits hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 29(6): 28151-28163.
14. Tang S, Tan G, Jiang X, et al. An artificial lncRNA targeting multiple miRNAs overcomes sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(45): 73257-73269.
15. Wang X, Ruan Y, Wang X, et al. Long intragenic non-coding RNA lincRNA-p21 suppresses development of human prostate cancer[J]. Cell Prolif, 2017, 50(2): e12318.
16. 庄瑜, 刘俊, 肖明第. Wnt蛋白: 从合成到分泌[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(14): 2769-2772.
ZHUANG Yu, LIU Jun, XIAO Mingdi. Wnt: from synthesis to secretion[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(14): 2769-2772.
17. 杜彦艳, 刘鑫, 单保恩. Wnt/β-catenin信号转导通路与肿瘤关系的研究进展[J]. 肿瘤, 2009, 29(8): 803-806.
DU Yanyan, LIU Xin, SHAN Bao’en. Research progress on the relationship between Wnt/β-catenin signal transduction pathway and tumor[J]. Tumor, 2009, 29(8): 803-806.
18. Tajima Y, Murakami T, Saito T, et al. Distinct involvement of the sonic hedgehog signaling pathway in gastric adenocarcinoma of fundic gland type and conventional gastric adenocarcinoma[J]. Digestion, 2017, 96(2): 81-91.


**本文引用：**裴洪利, 白尚星. 过表达lncRNA-p21通过介导Wnt/β-catenin信号通路抑制胃癌MGC-803细胞的生长与转移[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(8): 1615-1621. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.08.001

***Cite this article as:*** PEI Hongli, BAI Shangxing. Over-expression of lncRNA-p21 inhibits the growth and metastasis of gastric cancer MGC-803 cells by mediating Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(8): 1615-1621. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.08.001