长链非编码 RNA linc01376 调控鼻咽癌肿瘤进展机制分析

胡宏霞[1,2,3],杜鸣宇[1],葛宜枝[1],彭　颐[1,2],孙闻悦[1,2],宗　丹[1],何　侠[1]
(1.南京医科大学附属肿瘤医院 & 江苏省肿瘤医院 & 江苏省肿瘤防治研究所,江苏 南京 210009; 2. 南京医科大学第四临床医学院, 江苏 南京 210000; 3. 南京市高淳人民医院,江苏 南京 211300)

摘　要:[目的] 探讨 linc01376 在鼻咽癌组织与细胞内的表达特征, 分析其可能的调控机制。[方法] 采用实时荧光定量(qT-PCR)方法检测鼻咽癌组织和细胞中 linc01376 表达水平;采用 CCK-8 法、克隆平板形成实验、流式细胞学检测、划痕实验、Transwell 侵袭实验等检测细胞增殖、迁移和侵袭能力变化;通过 Western blot 实验测定分子蛋白水平,探索 linc01376 的下游调控机制。[结果] qT-PCR 结果表明,linc01376 在鼻咽癌组织中表达明显高于正常鼻咽组织(20.230±1.815 *vs* 1.281±0.454,P<0.01)。linc01376 表达越高,患者分期越晚(χ^2=7.670,P<0.05),肿瘤负荷越大(χ^2=6.312,P<0.05)。细胞功能学实验显示与对照组相比,沉默 linc01376 明显抑制鼻咽癌细胞的增殖 (5-8F:2.248±0.055 *vs* 1.790±0.041,t=6.675,P<0.01;CNE2:1.502±0.046 *vs* 1.012±0.068,t=5.994,P<0.01)、迁移和侵袭能力 (5-8F:182.00±8.60 *vs* 92.67±6.24,t=11.89,P<0.01;CNE2:166.67±8.18 *vs* 90.67±3.68,t=11.98,P<0.01)。机制研究发现 linc01376 可通过影响 miR-4757 调控下游 IGF1 的表达, 最终激活 AKT/p-AKT 信号通路发挥促进肿瘤进程作用。[结论] linc01376 在鼻咽癌进展中发挥重要调控作用,可能成为鼻咽癌靶向治疗的新靶点。

主题词:linc01376;鼻咽癌;AKT/p-AKT 信号通路;增殖;迁移侵袭
中图分类号:R739.63　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-170X(2022)08-0657-07
doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2022.08.B006

Mechanism of Long Non-coding RNA linc01376 Regulating Tumor Progression of Nasopharyngeal Carcinoma

HU Hong-xia[1,2,3], DU Ming-yu[1], GE Yi-zhi[1], PENG Yi[1,2], SUN Wen-yue[1,2], ZONG Dan[1], HE Xia[1]
(1. *The Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University & Jiangsu Cancer Hospital & Jiangsu Institute of Cancer Research*, *Nanjing* 210009, *China*; 2. *The Fourth School of Clinical Medicine*, *Nanjing Medical University*, *Nanjing* 210000, *China*; 3. *Nanjing Gaochun People's Hospital*, *Nanjing* 211300, *China*)

Abstract: [Objective] To explore the mechanism of long non-coding RNA linc01376 regulating tumor progression of nasopharyngeal carcinoma. [Methods] The expression levels of linc01376 in nasopharyngeal carcinoma tissues and cells were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction(qT-PCR). The proliferation activity, migration and invasion ability in linc01376 silence cells were detected by CCK-8 assay, clone plate formation assay, flow cytometry assay, wound and healing assay and Transwell invasion assay, respectively. Western blot assay was used to detect the expression levels of proteins related to the downstream regulation of linc01376. [Results] qT-PCR results showed that linc01376 expression levels were elevated in nasopharyngeal carcinoma tissues (20.230±1.815 *vs* 1.281±0.454, t=4.270, P<0.01). The expression of linc01376 was associated with the later clinical stage(χ^2=7.670, P<0.05) and the larger tumor size(χ^2=6.312, P<0.05). Cell functional experiments showed that silencing linc01376 inhibited cell proliferation(5-8F: 2.248±0.055 *vs* 1.790±0.041, t=6.675, P<0.01; CNE2: 1.502±0.046 *vs* 1.012±0.068, t=5.994, P<0.01), migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma cells(5-8F: 182.00±8.60 *vs* 92.67±6.24, t=11.89, P<0.01; CNE2: 166.67±8.18 *vs* 90.67±3.68, t=11.98, P<0.01). Mechanism analysis revealed that linc01376 regulated downstream IGF1 expression by influencing miR-4757, and ultimately activated AKT/ p-AKT signaling pathway to promote tumor progression. [Conclusion] Long non-coding RNA linc01376 can promote tumor progression, which may provide a novel therapeutic target for nasopharyngeal cancer.

Subject words: linc01376; nasopharyngeal carcinoma; AKT/p-AKT signaling pathway; proliferation; metastatic invasion

基金项目:国家自然科学基金(81872192);江苏省肿瘤医院院内面上(ZM201913,ZM202022);江苏省肿瘤医院博士后经费(SZL202013)
通信作者:何　侠,E-mail:hexiabm@163.com
收稿日期:2021-11-19;**修回日期**:2022-03-21

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC) 是一种起源于鼻咽黏膜的恶性肿瘤,其发病主要与 EB(Epstein-Barr)病毒感染、遗传和环境等因素有关[1-2]。2018 年我国南方新发鼻咽癌病例约占世界新发病例的 47.7%,所以鼻咽癌也被称为“广东癌”[3]。由于发病部位隐匿及早期症状不明显,临床上大约 70%的鼻咽癌在诊断时已表现为局部晚期或转移性病变[4]。精准放疗技术的提高和放化疗的联合应用,鼻咽癌生存率显著改善,但仍有 20%~30%患者治疗后出现区域复发或远处转移[5]。随着分子生物学的发展,许多具有重要价值的分子标志物被发现,给鼻咽癌的诊断、治疗和预后带来了新的希望[6]。非编码 RNA,特别是长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)的异常表达是鼻咽癌研究的热点[7],研究发现 lncRNA 与鼻咽癌肿瘤进展密切相关。本研究团队长期致力于鼻咽癌相关 lncRNA 领域研究,发现一条功能未知的 lncRNA——linc01376 在鼻咽癌组织芯片中差异高表达,qT-PCR 提示 linc01376 在鼻咽癌组织中的表达明显高于正常鼻咽组织。本研究拟在鼻咽癌细胞水平验证其生物功能,分析其可能具有的对鼻咽癌的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 临床标本

收集江苏省肿瘤医院 2006 年 2 月至 2012 年 12 月 54 例经病理证实为鼻咽癌的患者组织和 10 例经病理证实为正常鼻咽上皮组织的鼻咽组织,所有患者均已签署知情同意书。纳入标准:①患者既往未接受过抗肿瘤治疗;②无其他恶性肿瘤病史;③具有完整的临床随访资料。随访时间以第一天开始接受治疗为起点,以患者死亡或最后一次复查为终点。患者中位年龄 50 岁 (18~76 岁),中位随访时间为 109 d(11~159 d)。采用 AJCC/UICC 第 8 版 TNM 分期标准:Ⅱ期 10 例,Ⅲ期 22 例,Ⅳ期 22 例。所有样品立即在液氮中冷冻,然后在–80 ℃中保存,直到使用。所有参与者均签署知情同意书,本研究经江苏省肿瘤医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂和仪器

人永生化鼻咽上皮细胞系 NP69 及人鼻咽癌细胞株 5-8F、CNE2、SUNE1、5-8F、6-10B (江苏省肿瘤医院放疗实验室保存);胎牛血清及 RPMI1640 (Gibco),0.25%胰酶 (Gibco);Trizol (上海浦飞);linc01376 及 GAPDH 引物 (上海生工);RIPA 蛋白裂解液 (上海碧云天);linc01376 (锐博生物),Anti-GAPDH、Anti-Rabbit IgG、Anti-Mouse IgG (Santa-Cruz);GIEMSA 染色液 (上海鼎国生物技术有限公司);荧光显微镜(奥林巴斯);倒置显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司);PCR 仪 (TAKARA 公司);PVDF 膜(millipore);Celigo(Nexcelom);酶标仪(Tecan infinite);流式细胞仪(Millipore)。

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养

人永生化鼻咽上皮细胞系 NP69 和鼻咽癌细胞系(5-8F、CNE2、SUNE1、6-10B)从江苏省肿瘤医院放疗实验室获得。鼻咽癌细胞在 5% RPMI 1640 培养基中培养,NP69 在含 10%胎牛血清的角质形成细胞/无血清培养基中培养,在含 5% CO_2 的 37 ℃湿润培养箱中培养,正常 1~2 d 传代,以保持细胞对数生长。每次实验使用对数生长期的细胞。

1.3.2 构建 5-8F、CNE2 沉默型

特异性靶向针对的 linc01376 小干扰 RNA (siRNA)、空载对照组 (si-NC) 由锐博生物科技有限公司(中国广州)合成。取对数生长期的 5-8F、CNE2 细胞,取等份适量细胞接种于 6 孔板,待细胞生长至 70%,使用 Lipofectamine2000 转染试剂向不同处理组细胞转染 si-lncRNA 或 si-NC。转染成功,6 h 后更换培养液。随后放置于 CO_2 温箱内继续培养 48 h 后,使用 qT-PCR 检测转染效率。

1.3.3 RNA 提取与 qT-PCR 检测

采用 TRIzol 试剂,将 54 例鼻咽癌组织按步骤研磨,收集培养皿中的细胞,随后按照 RNA 提取试剂盒提取鼻咽癌细胞 RNA。当细胞 RNA 变成沉淀时,使用 DEPC 水溶解,利用 One-drop 软件测 RNA 样品浓度和纯度。取 1 μg RNA 为模板,用反转录试剂盒(TaKaRa,Otsu,Shiga,Japan)根据操作说明书将 RNA 转化为 cDNA。用特异引物进行 qT-PCR,每组设 4 个平行孔。linc01376 上游引物为 5′-ATTCAACGCCTGGAGAAGCTAC-3′,下游引物为 5′-AGGCATCCTAAATGACGCTGAC-3′;内参照 GAPDH 上游引物为 5′ -AAGGCTGTGGGCAAGG-3′,下游引物为 5′-TGGAGGAGTGGGTGTCG-3。随后将反转好的

cDNA 按照操作说明书制成混合液，于 ABI FAST 7500 序列检测系统检测相关基因的表达。采用经典的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对得到的 CT 值数据进行量化。

1.3.4 CCK-8 实验

利用 CCK-8 检测试剂盒分析细胞增殖活性的变化。将 5-8F 和 CNE2 细胞按照分组以每孔 3×10^3 个细胞的密度接种到 96 孔板上，每组 5 个复孔，培养箱继续培养 24 h。待孵育完成后，按照 5% 培养基与 CCK-8 溶液 10:1 比例配置混合液，随后向 96 孔板每孔添加 10 μL 混合液，放置于温箱内继续孵育 1 h，随后使用酶免疫分析仪(Bio-Rad，Hercules，CA，USA)测定 450 nm 处的吸光度(光密度，OD)，设置为 0 h，同样方法测定 24 h、48 h、72 h 的吸光度。

1.3.5 平板克隆形成实验

采用平板克隆形成实验评估细胞增殖能力。转染后的 5-8F 和 CNE2 细胞，以密度为 2×10^2 的细胞悬液接种到 6 孔板中，培养箱中继续培养 14 d。达到时间后，收取温箱内的细胞，首先利用磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗 3 次，随后在 20%甲醇中固定 1 h，在室温下用 0.5%结晶紫染色 30 min，PBS 洗净后。拍照计数代表细胞增殖能力的细胞集落。

1.3.6 划痕实验

将转染的细胞接种到 6 孔板中，培养箱中培养 24 h。当细胞生长到 80%左右时，用 20 μL 无 RNA 酶的枪头均匀划出一道粗细大致相等痕迹。用 PBS 洗去细胞碎片。利用蔡司荧光倒置显微镜观察并记录 0 h 及 24 h 的划痕图像。

1.3.7 Transwell 侵袭转移实验

细胞转染 24 h 后收集并重悬计数。按照密度为 3×10^4 重新接种于 Transwell 小室(Corning，NY，USA)的上室 200 μL 不含 FBS 的培养基中，而小室的下室放置含 500 μL 含 20% FBS 的培养基。将处理好的 Transwell 培养皿小心移至温箱中培养。36 h 后，取出小室，4%多聚甲醛固定 15 min，然后 0.5%结晶紫染色 2 h。最后用 PBS 洗干净，棉签擦除上室的结晶紫，控干后置于显微镜下观察拍照计数。

1.3.8 Western blot

使用 RIPA 溶液裂解处理后的鼻咽癌细胞，提取蛋白质。采用 bicinchoninic acid(BCA)试剂盒对提取的细胞蛋白进行定量分析。选取 10 μg 蛋白质样品，首先利用 SDS-PAGE 进行电泳，随后转膜槽 300 mA 恒流转膜 2 h，最后 5%脱脂牛奶在室温下封闭 PVDF 膜 1 h。利用蒸馏水清洗 PVDF 膜 3 次，与一抗(AKT 1:1 000，p-AKT 1:1 000，PI3K 1:1 000，Bcl-2 1:1 000，$CyclinD_1$ 1:1 000)于 4 ℃冰箱过夜，次日洗去一抗，加入二抗室温下孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。利用 ECL 曝光液曝光仪内曝光。β-actin 作为内参。

1.3.9 流式细胞术

每组设 3 个平行孔，6 孔板中细胞转染后培养至细胞融合度达 85%，终止培养收集细胞。预冷 70%乙醇细胞固定，PBS 洗后重悬，加入 500 μL PI(50 μg/mL，含 100 μg/mL RNase A，0.2% Triton X-100)，4 ℃避光孵育 30 min 后，用流式细胞仪分析细胞周期，重复 3 次。

1.3.10 生物学分析

利用 UCSC 网站(http://genome.ucsc.edu/)键入 LINC01376 分析其上下游基因；利用 DIANA TOOLS 数据库(http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php)内 microT-CDS 栏目键入 miR-4757 分析其可能的靶基因。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 25.0 统计软件包进行统计分析。重复 3 次实验的数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组之间的差异用 Student's t 检验，多组间差异比较采用单因素方差分析。linc01376 表达与鼻咽癌患者临床特征间的关系采用卡方检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 linc01376 在鼻咽癌组织和细胞中高表达

采用 qT-PCR 检测 linc01376 在 54 例鼻咽癌组织及 10 例正常鼻咽上皮组织中的表达，qT-PCR 结果显示与正常对照组相比，linc01376 在鼻咽癌组织中异常高表达 (20.230±1.815 *vs* 1.281±0.454，t=4.270，$P<0.01$) (Figure 1A)。根据 linc01376 中位表达值，将 54 例鼻咽癌组织分为高表达组与低表达组。进一步分析 linc01376 表达与鼻咽癌患者临床病理特征的相关性，结果显示 linc01376 表达与患者的临床分期和肿瘤大小密切相关，linc01376 表达水平越高，患者分期越晚(χ^2=7.670，$P<0.05$)、肿瘤越大(χ^2=

6.312，P<0.05)，但与鼻咽癌患者年龄、性别及淋巴结转移无明显相关性(P>0.05)(Table 1)。

在鼻咽癌细胞系(CNE1、CNE2、SUNE1、5-8F、6-10B) 和正常鼻咽永生化上皮细胞系 NP69 中检测 linc01376 的表达。结果表明 linc01376 在鼻咽癌细胞株中普遍高表达，其中 5-8F、CNE2 的表达水平最高(Figure 1B)，因此选择这两株细胞行进一步的研究。

2.2 linc01376 调控鼻咽癌细胞增殖活性

先利用小干扰 RNA (small interfering RNA，siRNA)构建沉默 linc01376 细胞模型，qT-PCR 结果显示，在 5-8F 与 CNE2 细胞中，siRNAs 均能有效抑制 linc01376 的表达 (5-8F：1.036±0.083 *vs* 0.586±0.111，t=3.260，P<0.05；CNE2：1.060±0.049 *vs* 0.343±0.029，t=12.610，P<0.05)(Figure 2A)。随后，利用 CCK8、克隆平板形成实验检测 linc01376 对细胞增殖作用的影响。CCK8 实验结果表明敲低 linc01376 的表达，5-8F 和 CNE2 细胞的增殖活性受到了明显抑制 (5-8F：2.248±0.055 *vs* 1.790±0.041，t=6.675，P<0.01；CNE2：1.502±0.046 *vs* 1.012±0.068，t=5.994，P<0.01)(Figure 2B)。而在克隆平板形成实验中，对照组的克隆形成数量明显多于沉默 linc01376 处理组，差异具有统计学意义(Figure 2C)。进一步完善 linc01376 对细胞增殖活性调控作用分析，利用流式细胞术检测分析处理后的鼻咽癌细胞周期变化，发现沉默 linc01376 后，细胞处于 S 期数量明显减少，细胞周期阻滞(Figure 2D)。

2.3 linc01376 影响鼻咽癌细胞的迁移与侵袭能力

采用划痕实验和 Transwell 侵袭转移实验分别分析 linc01376 对细胞 5-8F、CNE2 迁移和侵袭能力的影响。划痕实验结果显示，沉默 linc01376 后，细胞划痕愈合能力明显降低，细胞迁移能力受到了抑制(Figure 3A)。Transwell 侵袭转移实验结果显示，沉默 linc01376 的 5-8F 细胞组侵袭细胞的数量 (92.67±6.24) 较对照组 (182.00±8.60)明显减少，差异有统计学意义(P<0.01)。同样在 CNE2 细胞中，发现敲低 linc01376 表达细胞组的侵袭数量为 90.67±3.68，而对照组侵袭细胞的数量为 166.67±8.18，差异有统计学意义 (P<0.001)(Figure 3B)。以上结果提示沉默 linc01376 可明显抑制细胞的迁移与侵袭能力。

2.4 linc01376 影响 IGF1 调控 AKT/p-AKT 信号通路激活

AKT/p-AKT 信号通路是激活鼻咽癌肿瘤进程的关键通路，本研究利用 Western blot 实验分析 linc01376 对此信号通路可能的调控作用。沉默 linc01376 后发现 p-AKT、Bcl-2、$CyclinD_1$ 蛋白表达较对照组均受到了抑制，而 AKT 的表达无明显变化，提示 linc01376 可能作用于激活 AKT/p-AKT 信号通路发挥对鼻咽癌的调控作用(Figure 4A)。

为深入探究 linc01376 调控鼻咽癌侵袭转移进程的可能分子机制，本研究先针对 linc01376 上下游 500 kb 范围内的邻近基因 *NT5C1B-RDH14*、

Table 1 Association of linc01376 expression with clinicopathological features in NPC patients

Feature	N	linc01376		P
		High	Low	
Age(years old)				
≥50	27	14	13	0.785
<50	27	13	14	
Gender				
Female	11	7	4	0.311
Male	43	20	23	
Clinical stage				
Ⅱ~Ⅲ	32	11	21	0.006
Ⅳ	22	16	6	
T classification				
T_1~T_2	21	6	15	0.012
T_3~T_4	33	21	12	
N classification				
N_0~N_1	16	6	10	0.233
N_2~N_3	38	21	17	

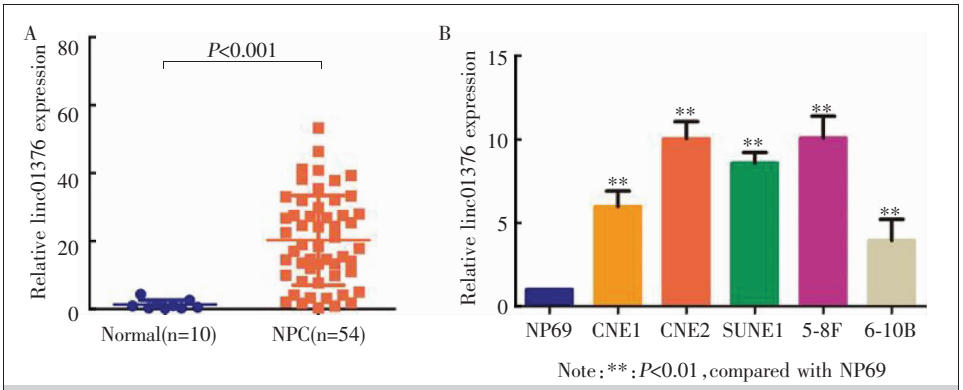
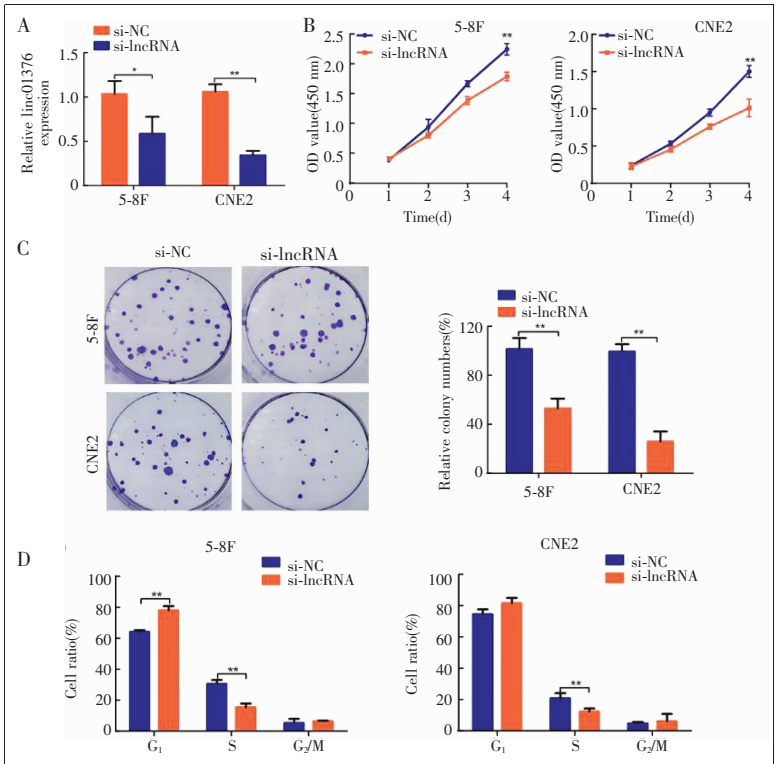
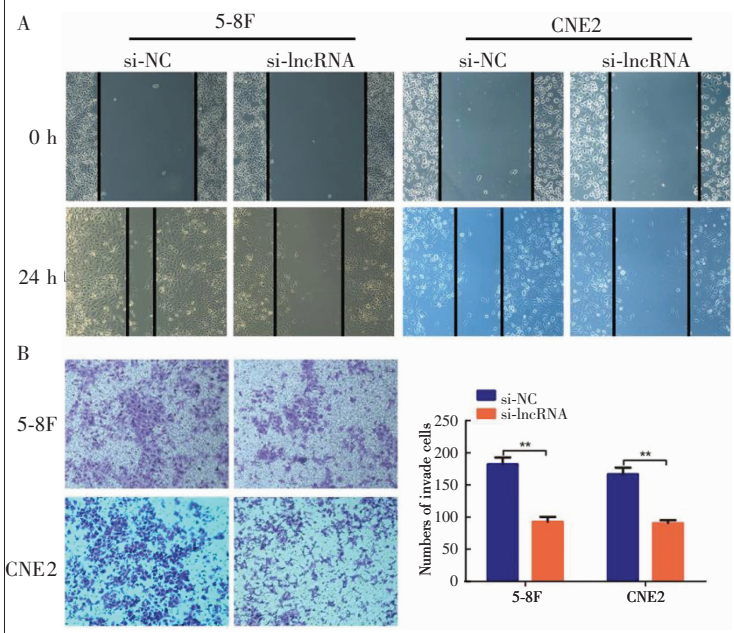


Figure 1 linc01376 is upregulated in NPC tissues and cells



Notes: A: siRNA effectively reduced the expression of linc01376; B: the results of CCK8 assays showed that linc01376 promoted the cell proliferation; C: the data of colony formation assays indicated linc01376 enhanced the cell viability; D: the results of cell cycle showed that knock down of linc01376 increased the cells in G_1 phase. **: $P<0.01$

Figure 2　linc01376 promotes the cell viability of nasopharyngeal carcinoma cells



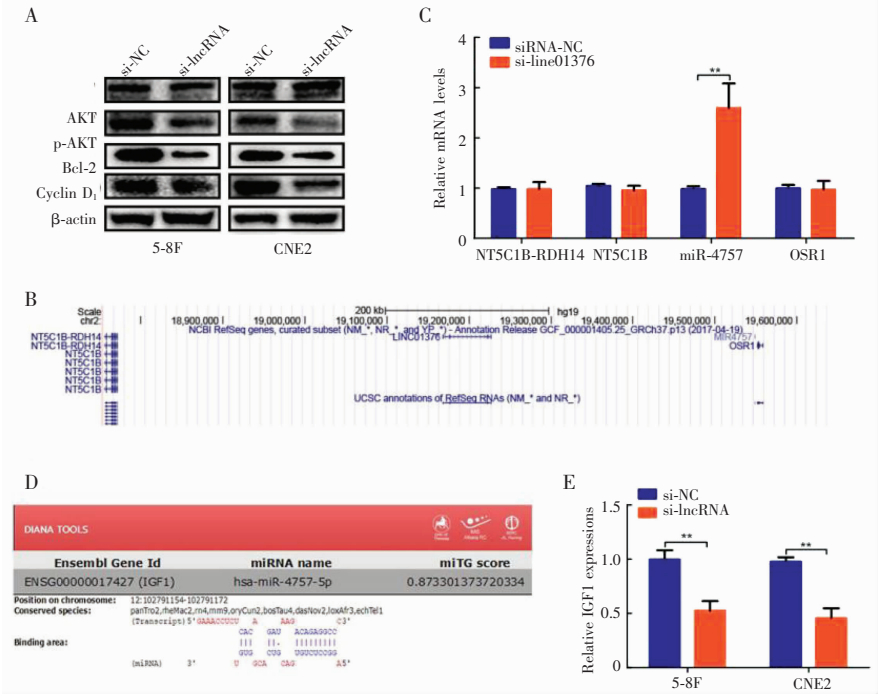
Notes: A: the results of wound-healing assays showed that linc01376 knockdown inhibited the cell migration; B: compared with the control, linc01376 reduction suppressed the cell invasion. **: $P<0.01$

Figure 3　linc01376 promotes the cell invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma

NT5C1B、*miR-4757* 和 *OSR1* 进行 PCR 检测，发现沉默 linc01376 后，miR-4757 表达水平升高(0.980±0.035 *vs* 2.593±0.284，t=5.645，P<0.05)，而另外 3 个基因表达水平无明显变化(Figure 4B~4C)。利用 DIANA TOOLS 数据库软件寻找 miR-4757 的可能靶基因，发现了胰岛素样生长因子 1 (insulin like growth factor 1，IGF1) (Figure 4D)。利用 qT-PCR 实验检测了敲低 linc01376 对 IGF1 表达的影响，结果发现沉默 linc01376 可明显抑制 IGF1 的表达 (5-8F：0.997±0.049 *vs* 0.523±0.052，t=6.14，P<0.05；CNE2：0.977±0.024 *vs* 0.457±0.052，t=9.067，P<0.05) (Figure 4E)。提示 linc01376 可能通过影响 miR-4757 调控了 IGF1 的表达，最终对 AKT/p-AKT 信号通路激活产生了重要作用。

3　讨　论

既往已有大量研究证据表明 lncRNA 在鼻咽癌发生和发展中发挥着重要的调控作用。Meng 等[8] 首次发现 lncRNA CCHE 在鼻咽癌细胞系中表达增高，下调后可抑制鼻咽癌 MEK/ERK/c-MYC 通路，从而抑制鼻咽癌细胞增殖、侵袭转移的过程。而在本实验中，课题组发现了一条尚未被验证过功能的 lncRNA——linc01376。通过查阅数据库分析发现 *linc01376* 的 Gene ID 为 400945，ENSEMBL数据库显示其有 201~205 共 5 个转录本，而转录组测序及 PCR 结果均显示只有 202 号转录本，其长度为 1 949 bp。随后本课题组检测了 54 例鼻咽癌组织，发现 linc01376 在鼻咽癌组织中普遍高表达，其表达水平与患者的临床分期和肿瘤大小密切相关。体外细胞水平检测发现 linc01376 同样在鼻咽癌细胞内呈现明显高表达。进一步的体外实验结果显示沉默 linc01376 可有效抑制鼻咽癌细胞的增殖活性与侵袭能力。以上结果



Notes: A: the results of Western blot analyses indicated that linc01376 knockdown reduced the expressions of p-AKT, Bcl-2 and CyclinD_1; B: UCSC analyses; C: the data of RT-PCR showed that linc01376 downregulation reduced the expression of miR-4757; D: the potential targets of miR-4757; E: the results of RT-PCR analyses showed that linc01376 regulated IGF1 expressions. **: P<0.01

Figure 4 linc01376 activated the AKT/p-AKT signaling pathway via regulating IGF1 expressions

提示 linc01376 与鼻咽癌的肿瘤进程密切相关。

AKT 是一种原癌基因，是 PI3K 下游的直接靶蛋白，活化后可通过调节下游 *mTOR*、*PCNA*、*Caspase3* 等靶基因，经过多种途径促进细胞存活[9-10]，PI3K 与下游的 AKT 结合发生磷酸化，构成 PI3K/AKT 信号通路，该信号通路在多种肿瘤的发生发展中扮演着重要角色，是肿瘤治疗的一个有效靶点，可调控细胞增殖、存活、迁移、转移、血管生成和耐药性等功能[11-14]。有研究显示 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在放射治疗反应中的激活是肿瘤放射抗拒的主要机制[15]。p-AKT 通过磷酸化作用激活或抑制其多种下游靶蛋白，如：Bad、Caspase9、mTOR、P21 等，是重要的抗凋亡调节因子。AKT/p-AKT 通路在细胞增殖、分化、运动和存活等多种细胞过程的调控中起着关键作用。在本研究中，研究团队利用 Western blot 实验分析发现下调 linc01376 可以有效抑制 AKT/p-AKT 通路的激活，表明 linc01376 对鼻咽癌肿瘤进程的调控作用有可能是通过激活 AKT/p-AKT 信号转导实现的。

为进一步分析 linc01376 激活 AKT/p-AKT 的分子机制，考虑到 lncRNA 可以通过顺式作用调控邻近基因的表达[16]，本研究团队利用生物信息学分析了 linc01376 上下游基因的表达变化，发现只有 *miR-4757* 在沉默 linc01376 后表达出现了变化，提示 linc01376 可能对 miR-4757 具有调控作用。miR-4757 是一个全新的 miRNA，尚未有文献对其功能进行阐述，但是通过对其靶基因的分析，我们发现 *IGF1* 可能是其靶基因之一，它是激活 AKT/p-AKT 信号通路的关键因子[17]。IGF1 作为胰岛素样生长因子家族成员，其能够通过激活多种信号通路参与很多肿瘤的发生发展过程[18]。本研究检测了沉默 linc01376 后 IGF1 的表达，结果表明 linc01376 对 IGF1 的表达具有促进作用。但是本研究目前对 linc01376–miR-4757–IGF1 调控轴的探讨尚不完善。首先是 linc01376 是如何对 miR-4757 产生抑制作用？近年来，非编码 RNA 机制研究中普遍认为 lncRNA 可以通过作为“分子海绵”吸附 miRNAs 的表达，进而激活下游靶基因的生物学作用[19-21]。本研究团队也曾对此作用机制开展了很多研究，发现 lncRNA ZNRD1-AS1 在鼻咽癌组织中高表达，其可通过竞争性地结合 miR-335 促进“转移因子”ROCK1 的表达，导致肿瘤细胞发生远处转移[22]。但本研究中通过检索现有数据库，未发现 linc01376 可能结合 miR-4757 的序列证据来提示 linc01376 可能通过其他途径对 miR-4757 产生调控作用，这也是本研究团队接下来研究的重点问题；其次，miR-4757 的生物学功能及其与 IGF1 靶向关系验证，是另外一个需要验证的核心问题。目前尚未有文献阐述 miR-4757 的生物学功能，其在 linc01376–miR-4757–IGF1 的作用轴中，是作为一个介质发挥作用，还是同样作为生物效应分子对细胞的生物学功能产生影响尚未明确。而 miR-4757 与 IGF1 的靶向关系，

本研究只完成了网站预测与 PCR 验证，而证明两者存在结合我们还需要荧光素酶实验及 RNA 免疫共沉淀实验。需要扩大组织样本数量，在鼻咽癌组织层面验证 linc01376–miR-4757–IGF1 作用轴的临床意义，为将来治疗鼻咽癌提供新的靶点。

综上所述，本研究发现 linc01376 在鼻咽癌组织及细胞中异常高表达，其表达水平越高，患者的临床分期越晚，肿瘤越大。体外细胞学实验表明 linc01376 可通过影响 miR-4757 的表达，调控下游靶基因 *IGF1*，最终激活 AKT/p-AKT 信号通路增强鼻咽癌细胞的增殖、迁移与侵袭能力。linc01376 有望成为鼻咽癌分子靶向治疗的新靶点。

参考文献：

[1] Wu L，Li C，Pan L，et al. Nasopharyngeal carcinoma：a review of current updates [J]. Exp Ther Med，2018，15(4)：3687–3692.

[2] Roy Chattopadhyay N，Chakrabarti S，Chatterjee K，et al. Histocompatibility locus antigens regions contribute to the ethnicity bias of Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma in higher-incidence populations [J]. Scand J Immunol，2019，90(4)：e12796.

[3] Bray F，Ferlay J，Soerjomataram I，et al. Global cancer statistics 2018：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin，2018，68(6)：394–424.

[4] Chen YP，Chan ATC，Le QT，et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet，2019，394(10192)：64–80.

[5] Pan JJ，Ng WT，Zong JF，et al. Prognostic nomogram for refining the prognostication of the proposed 8th edition of the AJCC/UICC staging system for nasopharyngeal cancer in the era of intensity-modulated radiotherapy[J]. Cancer，2016，122(21)：3307–3315.

[6] García-Lorenzo J，Farre N，Codina A，et al. Nasopharyngeal carcinoma：30-year experience of a single institution in a non-endemic area[J]. Clin Transl Oncol，2017，19(6)：777–783.

[7] Jiang H，Li J，Zhang B，et al. Intestinal flora disruption and novel biomarkers associated with nasopharyngeal carcinoma[J]. Front Oncol，2019，9：1346.

[8] Meng XJ，Wang JC，Wang AQ，et al. Downregulation of lncRNA CCHE1 inhibits cell proliferation，migration and invasion by suppressing MEK/ERK/c-MYC pathway in nasopharyngeal carcinoma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2020，24(17)：8880–8888.

[9] Xia L，Zhang W，Zhu L，et al. abnormally expressed long non-codingrnas in nasopharyngeal carcinoma：a meta-analysis[J]. Clin Lab，2018，64(4)：585–595.

[10] Akrami H，Mahmoodi F，Havasi S，et al. PlGF knockdown inhibited tumor survival and migration in gastric cancer cell via PI3K/Akt and p38MAPK pathways [J]. Cell Biochem Funct，2016，34(3)：173–180.

[11] Ma X，Hu P，Chen H，et al. Loss of AMIGO2 causes dramatic damage to cardiac preservation after ischemic injury [J]. Cardiol J，2019，26(4)：394–404.

[12] Pascual J，Turner NC. Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer [J]. Ann Oncol，2019，30(7)：1051–1060.

[13] Zhang R，Zhu H，Yuan Y，et al. SPAG6 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis througu the PTEN/PI3K/AKT pathway in Burkitt lymphoma [J]. Oncol Rep，2020，44(5)：2021–2030.

[14] Fruman DA，Chiu H，Hopkins BD，et al. The PI3K pathway in human disease[J]. Cell，2017，170(4)：605–635.

[15] Wanigasooriya K，Tyler R，Barros-Silva JD，et al. Radiosensitising cancer using phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)，protein kinase B (AKT) or mammalian target of rapamycin(mTOR) inhibitors[J]. Cancers(Basel)，2020，12(5)：1278.

[16] Long Y，Wang X，Youmans DT，et al. How do lncRNAs regulate transcription?[J]. Sci Adv，2017，3(9)：eaao2110.

[17] Wang Y，Li M，Guo Y，et al. Key genes affecting the progression of nasopharyngeal carcinoma identified by RNA-sequencing and bioinformatic analysis [J]. Aging(Albany NY)，2021，13(18)：22176–22187.

[18] Xu G，Luo Y，Wu W，et al. The evolution of acquired resistance to $BRAF^{V600E}$ kinase inhibitor is sustained by IGF1-driven tumor vascular remodeling [J]. J Invest Dermatol，2022，42(2)：445–458.

[19] Hansen TB，Jensen TI，Clausen BH，et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature，2013，495：384–388.

[20] Tay Y，Rinn J，Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. Nature，2014，505(7483)：344–352.

[21] Luo H，Xu C，Le W，et al. lncRNA CASC11 promotes cancer cell proliferation in bladder cancer through miRNA-150[J]. J Cell Biochem，2019，120(8)：13487–13493.

[22] Wang Q，Hu X，Du M，et al. ZNRD1-AS1 promotes nasopharyngeal carcinoma cell invasion and metastasis by regulating the miR-335-ROCK1 axis [J]. Onco Targets Ther，2020，13：4779–4790.