

LncRNA PVT1 调节 SOCS2 表达对胆管癌细胞增殖的影响

张铁钊 曹喜东 张力勇 羿海钊 陈凯 李剑 白子誉 于爱军*

承德医学院附属医院外一科

DOI:10.12238/bmtr.v7i2.13415

[摘要] 目的:本研究旨在探究长链非编码RNA淋巴瘤易位变体1(lncRNA PVT1)和细胞因子信号抑制因子2(SOCS2)在胆管癌(CCA)细胞增殖和迁移中的作用,从而为CCA的发病机制提供新的理论见解。方法:收集2021年10月至2023年11月期间在承德医学院附属医院经手术确诊并经病理诊断的20例胆管癌患者的癌组织及癌旁组织样本。培养正常胆管上皮细胞(HIBEC)和胆管癌细胞系(RBE、HCCC9810、HUCCT1)。采用实时定量逆转录PCR(qRT-PCR)检测lncRNA PVT1的表达。将小干扰RNA(siRNA)转染入HUCCT1细胞以下调lncRNA PVT1的表达。通过细胞计数试剂盒8(CCK-8)检测细胞增殖情况,采用蛋白质印迹法(WB)分析胆管癌组织和细胞中SOCS2的表达水平,以及lncRNA PVT1敲低前后的情况。结果:qRT-PCR显示,CCA组织中 lncRNA PVT1的表达显著高于相邻组织($P < 0.05$)。在细胞系中,HUCCT1细胞中lncRNA PVT1的表达最高(与HIBEC相比, $P < 0.0001$),且siRNA-PVT1-3的敲低效果最为显著($P < 0.0001$)。lncRNA PVT1的敲低显著降低了HUCCT1细胞的增殖($P < 0.01$)和迁移($P < 0.0001$)。WB 结果表明,CCA组织中SOCS2的表达低于正常组织($P < 0.05$),而敲低lncRNA PVT1后,SOCS2的表达得以恢复($P < 0.0001$)。结论:lncRNA PVT1在CCA中表达上调,通过抑制SOCS2促进肿瘤进展。沉默lncRNA PVT1可恢复SOCS2的表达,从而抑制CCA细胞的增殖。

[关键词] 胆管癌; 非编码RNA; lncRNA PVT1; SOCS2; 增殖

中图分类号: R979.1 **文献标识码:** A

Effect of lncRNA PVT1 regulating SOCS2 expression on proliferation of cholangiocarcinoma cells

Tiezhao Zhang Xidong Cao Liyong Zhang Haizhao Yi Kai Chen Jian Li Ziyu Bai Aijun Yu*

The First Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Chengde Medical University

[Abstract] Objective: This study aims to investigate the roles of long non-coding RNA plasmacytoma variant translocation 1 (lncRNA PVT1) and cytokine signaling suppressor 2 (SOCS2) in the proliferation and migration of cholangiocarcinoma (CCA) cells, thereby providing novel theoretical insights into the pathogenesis of CCA. Methods: Cancer and adjacent tissue samples were collected from 20 CCA patients surgically confirmed and pathologically diagnosed at Chengde Medical University Affiliated Hospital between October 2021 and November 2023. Normal bile duct epithelial cells (HIBEC) and CCA cell lines (RBE, HCCC9810, HUCCT1) were cultured. lncRNA PVT1 expression was quantified using real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). Small interfering RNA (siRNA) was transfected into HUCCT1 cells to downregulate lncRNA PVT1. Cellular proliferation was assessed via Cell Counting Kit-8 (CCK-8), Western blotting (WB) analyzed SOCS2 expression in CCA tissues and cells before and after lncRNA PVT1 knockdown. Results: qRT-PCR revealed significantly elevated lncRNA PVT1 expression in CCA tissues compared to adjacent tissues ($P < 0.05$). Among cell lines, HUCCT1 exhibited the highest lncRNA PVT1 expression ($P < 0.0001$ vs. HIBEC), and siRNA-PVT1-3 achieved the most effective knockdown ($P < 0.0001$). lncRNA PVT1 knockdown markedly reduced HUCCT1 proliferation ($P < 0.01$) and migration ($P < 0.0001$). WB demonstrated decreased SOCS2 expression in CCA tissues versus normal tissues ($P < 0.05$), which was reversed following lncRNA PVT1 knockdown ($P < 0.0001$). Conclusion: lncRNA PVT1 is upregulated in CCA and promotes tumor progression

by suppressing SOCS2. Silencing lncRNA PVT1 restores SOCS2 expression, thereby inhibiting CCA cell proliferation.

[Key words] cholangiocarcinoma; non coding RNA; lncRNA PVT1; SOCS2; proliferation

胆管癌(CCA)是一种起源于胆道系统的高度侵袭性恶性肿瘤,其特点是起病隐匿、早期诊断困难且预后不良^[1]。近年来,其发病率和死亡率呈上升趋势^[2]。尽管手术切除仍是最有效的治疗方法,但由于早期临床症状不明显且缺乏可靠的生物标志物,往往导致诊断延迟,大多数患者就诊时已处于晚期,错过了最佳治疗时机^[3]。长链非编码 RNA(lncRNA)是指长度超过200个核苷酸(nt)的非编码转录本,通过染色质修饰、转录调控和转录后机制调节基因表达,在肿瘤发生中发挥着关键作用^[4]。位于原癌基因Myc下游50kb处的浆细胞瘤变异转位1(PVT1) lncRNA与癌症进展密切相关^[5]。细胞因子信号抑制因子2(SOCS2)是SOCS蛋白家族的一员,通过抑制致癌通路发挥肿瘤抑制作用。尽管已有文献报道SOCS2在乳腺癌中表达下调^[6],但其在胆管癌(CCA)中的作用尚未得到研究。本研究旨在探究长链非编码RNA PVT1通过调控SOCS2促进胆管癌细胞增殖的机制。

1 材料与方法

1.1细胞系及组织样本来源

实验所需细胞系:正常胆管上皮细胞(HIBEC),CCA细胞(RBE、HCCC9810和HUCCT1)。其中HIBEC和RBE购买于武汉普诺赛生命科技公司,HCCC9810和HUCCT1购买于北京珠联合璧生物科技公司。CCA及癌旁组织:本研究经过我院伦理委员会批准(LL2021018),收集了承德医学院附属医院在2021年10月至2023年11月间,经过手术及病理确认的20名胆管癌(CCA)患者的癌及癌旁组织样本,患者术前均未接受放射或化学治疗。已取得病人或家属知情同意,并签署知情同意书。

1.2细胞培养

将实验所需细胞系分别置入含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,标记信息后放入37℃、5%CO2培养箱中培养。

1.3细胞转染

按照每孔(2-3)×105细胞铺到六孔板中,24h后细胞密度达到60%,进行转染。将Lipofectamine3000, siRNA或NC分别加入转染专用培养基中,静置后混匀,6孔板换液,培养箱中经过48h的培养,收集细胞。siRNA由广州锐博生物科技有限公司合成,序列见表1。

表1 siRNA序列表

产品名称	靶序列(5'-3')
si-h-PVT1_001	GTGACCTTGGCACATACAG
si-h-PVT1_002	GAGCTGGAGCAAGATGT
si-h-PVT1_003	GGCACTTCCAGTGGATT
Negative control	UUCUCCGAAAGUUCACGU
	ACGUGACACGUUCGAGAATT
Homo GAPDH	GUAUGACAACAGCCUACGTT
	CUUGAGGCUUGUACUAUACT

1.4实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)

收集组织或细胞,提取总RNA,使用PCR扩增仪将其逆转录为cDNA,以cDNA为模版进行qPCR扩增反应。预变性95℃10min(Taq酶激活),变性90℃5sec,退火60℃20sec,延伸72℃10sec,共40-45个循环。实验对照基因为标准内参基因GAPDH。引物见表2。

表2 qRT-PCR 引物序列

产品名称	正义链(5'-3')
lncRNA PVT1_F	TCTGGGAATAACGCTGGTG
lncRNA PVT1_R	CTTTTAGTATCCTGAAATGTGCG
GAPDH F	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
GAPDH R	ACCACTCTGTTGCTGTAGCCAA

1.5 CCK-8法

细胞对数期消化重悬后铺板,培养24小时至60%-70%密度转染。12小时后消化计数,每孔接种2×103细胞于96孔板,加PBS防蒸发。12小时后吸去旧培养基,加入100 μl含10% CCK-8培养基。分别于0, 24, 48, 72, 96小时检测450nm吸光度。

1.6 Western Blotting实验

应用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取总蛋白,BCA法测蛋白浓度。计算浓度和上样量,混合后加热冷却,配制蛋白样品。安装胶,加入样品,恒压电泳,转移至PVDF膜上,洗膜10min,快速封闭液封闭5min,加入一抗,使其浸泡,4℃冰箱过夜。TBST洗膜,加入二抗,室温孵育1小时。加入显影液后,用显影仪显影拍照。以β-actin作为内参。

1.7统计学方法

将实验结果收集,每项实验重复至少三次,并使用Graphpad Prism10.0进行作图及统计学分析。使用单因素方差分析t检验进行数据分析,以均值±标准差进行统计,P<0.05时被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 PVT1在CCA组织和细胞中表达上调

我们将收集到的20例CCA患者的癌及癌旁组织标本进行qRT-PCR检测,结果显示lncRNA PVT1在CCA组织中表达上调(图1A, P<0.05)。将正常胆管上皮细胞(HIBEC)和3种CCA细胞(RBE、HCCC9810、HUCCT1)qRT-PCR实验,结果显示lncRNA PVT1在CCA细胞中的表达水平明显高于正常胆管上皮细胞,且HUCCT1细胞尤为显著(图1B, P<0.0001),因此,后续实验选用HUCCT1细胞。

2.2敲低lncRNA PVT1抑制HUCCT1的增殖能力

为检测lncRNA PVT1对CCA细胞增殖能力的影响,我们合成了si-PVT1序列,si-PVT1-3序列对lncRNA PVT1的敲低效果最为

显著(图2A, $P < 0.0001$)。接下来, 将si-PVT1-3及NC分别转染到HUCCT1细胞中, 用CCK-8法分析转染后的HUCCT1细胞增殖能力的变化。结果显示, 与NC组相比, lncRNA PVT1敲低后细胞活力明显下降, HUCCT1细胞的增殖活性受到了抑制(图2B)。

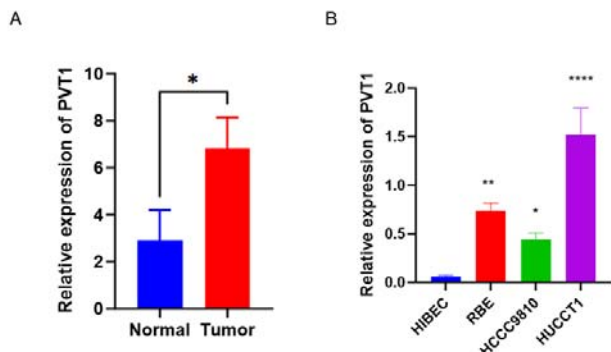


图1 lncRNA PVT1在CCA组织及细胞中表达均呈上升趋势

A: 采用qRT-PCR检测组织中lncRNA PVT1的表达B: 采用qRT-PCR分析lncRNA PVT1在HIBEC、RBE、HCCC9810及HUCCT1细胞系中的表达* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

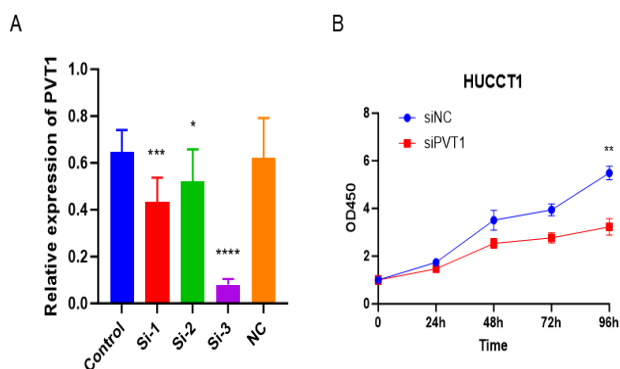


图2 敲低lncRNA PVT1抑制CCA细胞的增殖能力A: 通过qRT-PCR检测三种siRNA的敲低效率B: 通过CCK8观察细胞的增殖能力的变化* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

2.3 SOCS2在胆管癌中低表达

为验证SOCS2在HUCCT1细胞中的表达水平, 我们进行了WB实验。结果表明, SOCS2在HUCCT1细胞中低表达(图3A, $P < 0.05$)。随后, 将si-PVT1和阴性对照组(si-NC)转染到HUCCT1细胞中, 48小时后提取细胞总蛋白制备成样品进行实验。结果显示, 敲低lncRNA PVT1增加了SOCS2的表达(图3B, $P < 0.0001$)。

3 讨论

CCA是一种肝胆系统常见的具有高度侵袭性的恶性肿瘤, 占消化系统肿瘤的3%^[7], 但5年生存率仍低于5%。众多研究揭示, 全球范围内CCA的发病率呈现上升趋势, 并且预后较差。迫切需要发现新的早期诊断标志物及其作用靶点, 以期CCA的早期诊断、治疗和不良预后的改善提供重要支撑。lncRNA可通过表观遗传修饰、与microRNA(miRNA)和蛋白质的相互作用以及作为miRNA前体或假基因等调节基因表达, 影响细胞增殖、迁移、侵

袭等生命过程。lncRNA与肿瘤侵袭和转移密切相关, 如SNHG6在结直肠癌(CRC)组织和癌细胞系中大量过表达, 作为调节关键枢纽, 海绵化miRNA并上调其靶标mRNA的表达; 并与TGF- β /Smad和Wnt/ β -catenin等细胞通路相互作用, 促进了肿瘤细胞的侵袭和转移^[8]。

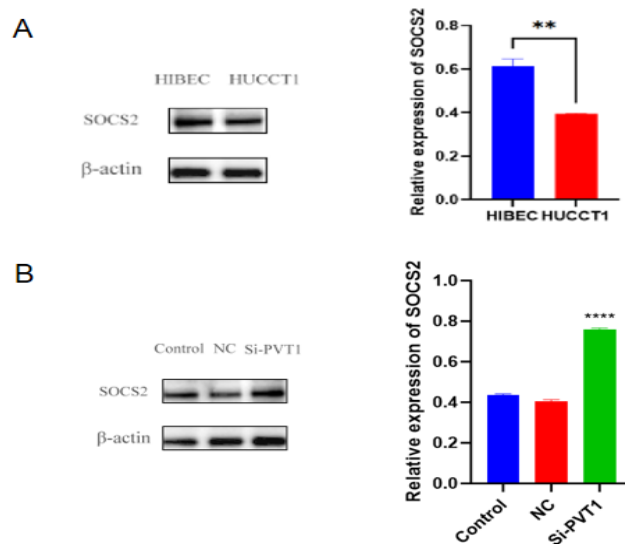


图3 WB实验验证SOCS2表达水平

A: SOCS2在HUCCT1细胞中表达下调B: lncRNA PVT1基因的下调促进了SOCS2的表达** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

lncRNA PVT1在肾癌、卵巢癌、乳腺癌等多种类型的肿瘤中高度表达, 与不良预后相关。我们通过qRT-PCR进行验证发现lncRNA PVT1在CCA组织及细胞中的表达水平均呈上调趋势, 表明lncRNA PVT1可能在CCA进展的分子机制中起着至关重要的作用。CCK-8测定结果证明, 敲除lncRNA PVT1导致HUCCT1细胞增殖显著减少。细胞活力降低表明lncRNA PVT1可能参与促进细胞生长, 通过增强细胞周期进程或抑制凋亡的途径。划痕和Transwell试验证明, 敲除lncRNA PVT1后HUCCT1细胞的迁移能力受损, 这表明lncRNA PVT1可能促进CCA细胞侵袭的特性。有研究表明, lncRNA PVT1通过与表观遗传修饰复合物(PRC2)结合, 可以调节血管生成素样4(ANGPTL4)启动子的组蛋白甲基化, 从而促进胆管癌细胞增殖和侵袭^[9]。由此可见, lncRNA PVT1是参与CCA发生发展的一个重要的致癌基因。此外, lncRNA PVT1也可直接与RNA结合蛋白相互作用, 在肿瘤中发挥相应的作用。

SOCS2主要作为细胞因子信号转导的负反馈调节因子。SOCS2的结构包括一个保守的SH2结构域和一个SOCS盒, SH2结构域能够与磷酸化的酪氨酸残基结合, 从而抑制细胞因子受体的信号传导, 而SOCS盒则具有E3泛素连接酶的功能, 能够促进靶蛋白的泛素化降解^[10]。研究表明, SOCS2在多种肿瘤中表现出下调, 提示其在肿瘤抑制中的重要作用。SOCS2的下调可能导致细胞增殖和迁移能力的增强, 从而促进肿瘤的发展。本研究通过WB实验发现, 与正常胆管上皮细胞相比, SOCS2在HUCCT1中的表达量显著降低。为了进一步探究lncRNA PVT1调控SOCS2的具体机制,

敲低lncRNA PVT1后使用WB实验检测SOCS2的表达,结果显示SOCS2的表达量显著增加。因此,lncRNA PVT1与SOCS2结合并影响其表达,二者的表达呈负相关,而这也间接证明了SOCS2可能是lncRNA PVT1对CCA产生生物学效应的重要原因。

本研究也有局限性,体内实验验证不足以及lncRNA PVT1调控SOCS2的具体机制尚不清楚,仍需要我們继续探索。

综上所述,本研究确立了lncRNA PVT1和SOCS2表达在CCA发生发展中的重要作用。通过比较生物信息学分析和各种细胞实验检测,阐明了lncRNA PVT1对细胞增殖的影响,揭示了其作为治疗靶点的潜力。lncRNA PVT1通过抑制SOCS2表达加速CCA细胞的增殖,造成肿瘤进展和患者不良预后。早期识别lncRNA PVT1的变化并对其进行干预,将对CCA的早期诊断、改善不良预后以及提高生存率有重要意义。

[基金项目]

河北省自然科学基金资助项目(H2021406047);河北省教育厅在读研究生创新能力培养资助项目(CXZZSS2023145)。

[参考文献]

- [1]HARRISON JM, VISSER BC. Cholangiocarcinoma[J]. Surg Clin North Am,2024,104(10):1281-1293.
- [2]CIOBICA ML,SANDULESCU BA,CHICEA LM,et al.The Constellation of Risk Factors and Paraneoplastic Syndromes in Cholangiocarcinoma: Integrating the Endocrine Panel Amid Tumour-Related Biology(A Narrative Review).Biology (Basel),2024,13(9):662.
- [3]CHEN F,SHENG J,LI X,et al.Tumor-associated macrophages: orchestrators of cholangiocarcinoma progression[J]. Front Immunol,2024,15:1451474.
- [4]YI Q, FENG J, LAN W, et al. CircRNA and lncRNA-encoded

peptide in diseases, an update review[J].Mol Cancer, 2024,23(1):214.

[5]LI R, WANG X, ZHU C, et al. lncRNA PVT1: a novel oncogene in multiple cancers[J].Cell Mol Biol Lett,2022,27(1):84.

[6]HE M, CAI Y, YUAN Z, et al. Upregulation of SOCS2 causes mitochondrial dysfunction and promotes ferroptosis in pancreatic cancer cells[J].Acta Biochim Pol,2023,70(1):163-168.

[7]WANG JL, JI WW, HUANG AL, et al. CEBPA Restrains the Malignant Progression of Breast Cancer by Prompting the Transcription of SOCS2[J]. Mol Biotechnol. Published online May 22, 2024.

[8]ROGALSKA-TARANTA M,ANDERSEN JB.Involvement of Epigenomic Factors in Bile Duct Cancer[J].Semin Liver Dis,2022,42(2):202-211.

[9]JURKIEWICZ M,SZCZEPANIAK A,ZIELIŃSKA M.Long non-coding RNAs-SNHG6 emerge as potential marker in colorectal cancer[J].Biochim Biophys Acta Rev Cancer,2024,1879(1):189056.

[10]RAMACHANDRAN S, MAKUKHIN N,HAUBRICH K,et al.Structure-based design of a phosphotyrosine-masked covalent ligand targeting the E3 ligase SOCS2[J].Nat Commun,2023,14(1):6345.

作者简介:

张铁钊(1996--),男,满族,河北省承德市人,硕士研究生,研究方向:肝胆恶性肿瘤方向。

*通讯作者:

于爱军(1979--),男,满族,河北承德人,硕士研究生,主任医师,研究方向:肝胆恶性肿瘤方向。