

严威, 靳情, 孙锐, 等. LINC00662 通过 miR-144/COX-2 调控胶质瘤细胞替莫唑胺耐药性的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 46-53.

Yan W, Jin Q, Sun R, et al. Mechanism of LINC00662 regulating temozolomide resistance of glioma cells via miR-144/COX-2 signaling [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 46-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.006

# LINC00662 通过 miR-144/COX-2 调控胶质瘤细胞替莫唑胺耐药性的作用研究

严威<sup>1</sup>, 靳情<sup>2</sup>, 孙锐<sup>3</sup>, 水波<sup>4</sup>, 余涵<sup>1\*</sup>, 段鹏<sup>1\*</sup>

(1.湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院,湖北 襄阳 441000;2.襄阳市中医医院,湖北 襄阳 441000;  
3.武汉市第四医院,武汉 430033;4.襄阳市中心血站,湖北 襄阳 441000)

**【摘要】** 目的 探究 LINC00662 通过 miR-144/COX-2 轴调节胶质瘤细胞耐药性的机制。方法 qRT-PCR 检测胶质瘤组织和癌旁正常组织、U251 细胞和 U251/替莫唑胺(TMZ)细胞中 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 表达水平;双荧光素酶报告系统评估 LINC00662、miR-144 和 COX-2 的调控关系。设置空白对照组、敲低 LINC00662 阴性对照 (si-NC) 组、敲低 LINC00662 组、同时敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组。CCK-8 和 Edu 法分析细胞增殖情况;流式细胞术定量检测细胞凋亡;Western blot 分析靶蛋白表达水平。**结果** 与癌旁正常组织相比,胶质瘤组织中 LINC00662 和 COX-2 mRNA 表达显著上调,miR-144 表达下调 ( $P < 0.05$ );与 U251 细胞相比,U251/TMZ 细胞中 LINC00662 和 COX-2 mRNA 表达显著上调,miR-144 表达下调 ( $P < 0.05$ )。双荧光素酶报告实验证实 LINC00662 靶向结合 miR-144,miR-144 靶向结合 COX-2。与 si-NC 组相比,敲低 LINC00662 组 U251/TMZ 细胞增殖能力显著降低,凋亡率升高 ( $P < 0.05$ );COX-2、PCNA、MRP1 和 Bcl-2 蛋白显著下调,Bax 蛋白上调 ( $P < 0.05$ );抑制 miR-144 表达可在一定程度上逆转 LINC00662 敲低对 U251/TMZ 细胞增殖、凋亡的影响 ( $P < 0.05$ )。**结论** LINC00662 通过 miR-144/COX-2 信号可调节胶质瘤细胞增殖、凋亡,改变胶质瘤细胞 TMZ 耐药性。

**【关键词】** 胶质瘤细胞;LINC00662;miR-144;COX-2;替莫唑胺耐药性

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0046-08

## Mechanism of LINC00662 regulating temozolomide resistance of glioma cells via miR-144/COX-2 signaling

YAN Wei<sup>1</sup>, JIN Qing<sup>2</sup>, SUN Rui<sup>3</sup>, SHUI Bo<sup>4</sup>, YU Han<sup>1\*</sup>, DUAN Peng<sup>1\*</sup>

(1. Xiangyang First People's Hospital affiliated to Hubei Medical College, Xiangyang 441000, China.

2. Xiangyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiangyang 441000. 3. Wuhan Fourth Hospital, Wuhan 430033.

4. Xiangyang Blood center, Xiangyang 441000)

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of LINC00662 in regulation of temozolomide resistance of glioma cells through miR-144/COX-2 signaling. **Methods** qRT-PCR were used to measure the mRNA expression levels of

**【基金项目】**湖北省教育厅项目(Q20212105);襄阳市科学技术局项目(2021YL29,2021ZD12);襄阳市第一人民医院科技创新项目(XYY2021M02,XYY2021Q05)。

**【作者简介】**严威(1982—),男,硕士,主管检验师,研究方向:临床检验和输血。E-mail:a249788411@163.com

**【通信作者】**余涵(1989—),男,博士,主治医师,研究方向:肿瘤发生机制及治疗。E-mail:yuhanqh@163.com

段鹏(1985—),男,博士,副教授,研究方向:细胞生物学。E-mail:meduanpeng@163.com

\* 共同通信作者

LINC00662, miR-144, and COX-2 in glioma tissues, normal tissue adjacent to cancer, U251 cells, and U251/temozolomide (TMZ) cells. The dual-luciferase reporter system were used to assess the regulatory relationship of LINC00662, miR-144, and COX-2. The five groups were a blank control, knockdown LINC00662 negative control (si-NC), knockdown LINC00662, and simultaneous knockdown of LINC00662 and inhibition of miR-144 expression. Cell proliferation were analyzed by CCK-8 and Edu assays. Apoptosis was evaluated by flow cytometry. Expression levels of target proteins were analyzed by Western blot. **Results** Compared with adjacent normal tissue, the mRNA expression levels of LINC00662 and COX-2 were significantly upregulated and the expression level of miR-144 was downregulated in glioma tissues ( $P < 0.05$ ). Compared with U251 cells, the mRNA expression levels of LINC00662 and COX-2 were significantly upregulated and the expression level of miR-144 was downregulated in U251/TMZ cells. Dual-luciferase reporter assays showed that LINC00662 targeted miR-144, and miR-144 targeted COX-2. Compared with the si-NC group, cell proliferation of the knockdown LINC00662 group was significantly decreased, the apoptosis rate of the knockdown LINC00662 group was increased ( $P < 0.05$ ), COX-2, PCNA, MRP1 and Bcl-2 protein expression levels in the knockdown LINC00662 group were significantly downregulated, and the Bax protein expression level in the knockdown LINC00662 group was upregulated ( $P < 0.05$ ). Inhibiting miR-144 expression reversed the effects of LINC00662 knockdown on U251/TMZ cell proliferation and apoptosis ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** LINC00662 regulates the proliferation and apoptosis of glioma cells through miR-144/COX-2 signaling and is closely related to temozolomide resistance of glioblastoma cells.

**【Keywords】** glioma cells; LINC00662; miR-144; COX-2; temozolomide resistance

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

胶质瘤是成人中最具侵袭性的原发性脑肿瘤之一,具有广泛的侵袭性和对传统治疗的抵抗力<sup>[1]</sup>。目前,手术切除后基于替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 的化疗是胶质瘤患者最常用的治疗策略之一,而对 TMZ 产生耐药性是目前胶质瘤治疗的主要障碍<sup>[2]</sup>。因此,阐明 TMZ 抗性的分子机制可为胶质瘤治疗提供潜在新分子靶点。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的 RNA 分子,无编码功能性蛋白质能力<sup>[3]</sup>。最近,一些证据表明, lncRNA 在胶质瘤发生发展中发挥重要作用,如 lncRNA HOXA-AS3 在胶质瘤细胞中显著高表达,且与不良预后相关<sup>[4]</sup>; lnc-TALC 可改善胶质瘤细胞对 TMZ 的耐药性<sup>[5]</sup>。基于 lncRNA 的基因组特征可为胶质瘤 TMZ 抗性提供治疗策略。相关研究发现 LINC00662 在胶质瘤中充当致癌基因,与预后相关,可加速肿瘤细胞的生长<sup>[6-7]</sup>。然而,关于 LINC00662 是否介导胶质瘤中的 TMZ 抗性机制仍未可知。

近期研究表明, lncRNA 通过调控微小 RNA (microRNA, miRNA) 和靶基因来调控肿瘤的发生发展<sup>[8]</sup>。且已有研究证实, miR-144 可通过靶向调控靶基因抑制胶质瘤进展,并提高对 TMZ 的敏感性<sup>[9]</sup>。此外,环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2, 又称 PTGS2) 是一种炎症相关酶,与胶质瘤的发生发展相关<sup>[10]</sup>。Yao 等<sup>[11]</sup>报道 COX-2 是 miR-144 下

游靶基因,在胃癌中发挥促癌作用。因此,本研究通过探讨 LINC00662 是否通过调控 miR-144/COX-2 轴调节胶质瘤细胞 TMZ 耐药性,以期为胶质瘤的治疗提供新的见解。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 临床组织

本研究一共收集 30 份人胶质瘤组织样本及癌旁正常组织样本 (均采集同一患者),其中男性 16 例,女性 14 例,年龄 35~55 岁。患者于 2018 年 3 月~2020 年 12 月期间接受手术并签署知情同意书。手术切除后立即将样品冷冻在液氮中。本研究经湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院伦理委员会批准 (XYYYE20220012)。

#### 1.1.2 细胞

U251 细胞、U251/TMZ 细胞购自厦门 IMMOCELL,货号:IM-H421、IMD-007。

### 1.2 主要试剂与仪器

Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 购自赛默飞世尔科技有限公司,货号:30030; TRIzol 提取试剂、Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen,货号:15596018、11668027; One Step PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa,货号:RR064B; CCK-8 细胞增殖检测试剂盒和双荧光素酶报告基因检测试

剂盒购自南京 Vazyme, 货号: A311-01 和 DD1205-01; Annexin V-Alexa Fluor 488/碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒购自上海 YEASEN, 货号: 40305ES20; Click-iK Edu 试剂盒 (红色荧光) 购自北京 Biorigin, 货号: BN16017; 高效 RIPA 裂解液购自北京 BIOSIC, 货号: EX6010; 一抗 COX-2、多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance-related protein 1, MRP1)、PCNA、Bax、Bcl-2 和 GAPDH 均购自英国 Abcam, 货号: ab179800、ab233383、ab18197、ab182734、ab182858 和 ab9485。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养

U251 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM, 于 37°C、含 5% CO<sub>2</sub> 的增湿培养箱中培养。U251/TMZ 细胞根据说明书在以上培养条件基础上, 添加 TMZ 16 μg/mL 培养。

#### 1.3.2 细胞分组

以 U251/TMZ 细胞为研究对象, 设置空白对照 (Control) 组、敲低 LINC00662 阴性对照 (si-NC) 组、敲低 LINC00662 (si-LINC00662) 组、敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照 (si-LINC00662 + miR-NC inhibitor) 组、敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达 (si-LINC00662 + miR-144 inhibitor) 组。Control 组正常培养; si-NC 组转染 si-NC; si-LINC00662 组转染 si-LINC00662; si-LINC00662 + miR-NC inhibitor 组转染 si-LINC00662 和 miR-NC inhibitor; si-LINC00662 + miR-144 inhibitor 组转染 si-LINC00662 和 miR-144 inhibitor。均按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂方法操作, 转染后培养 48 h。

#### 1.3.3 qRT-PCR 检测组织和细胞中靶分子表达水平

用 TRIzol 提取来自以上各组织和细胞的总 RNA, 并将总 RNA 逆转录为 cDNA, 然后以 cDNA 为模板, 添加相应的引物和荧光定量试剂盒的试剂进行 qRT-PCR 检测, 使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因相对表达水平。U6 和 GAPDH 用于标准化 miR-144、LINC00662 和 COX-2 mRNA 表达。

引物序列如下: LINC00662 (正向: 5'-TGGACATCTGTCTGGAGG-3', 反向: 5'-GGCTGAGGCATAAGAATCG-3'); miR-144 (正向: 5'-GCCCTACAGTATAGATGATGTA-3', 反向: 5'-GTGCAGGTCGAGGT-3'); COX-2 mRNA (正向: 5'-TCGCTGTGCCTGATGATTG-3', 反向: 5'-

TCGCTTATGATCTGTCTTG-3'); GAPDH (正向: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 反向: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCACT-3'); U6 (正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向: 5'-AACGCTTTCACGAATTTGCCGT-3')。

#### 1.3.4 双荧光素酶报告基因检测

StarBase v3.0 用于预测 LINC00662 与 miR-144 的结合位点, Target Scan7.2 用于预测 miR-144 与 COX-2 的 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR) 之间的互补序列。将 miR-144 和 LINC00662 或 COX-2 之间的共同片段克隆并插入到 pmirGLO 报告载体中, 形成 WT-LINC00662 和 WT-COX-2。以相同的方式构建相对突变体 MUT-LINC00662 和 MUT-COX-2。报告基因分别与 miR-144 mimic 或 miR-NC mimic 共转染 U251/TMZ 细胞, 利用双荧光素酶报告基因检测试剂盒评估荧光素酶活性。

#### 1.3.5 CCK-8 检测各组 U251/TMZ 细胞增殖活力

将稳定转染的各组细胞接种到 96 孔板中, 培养 24 h 后, 与含 10% CCK-8 新鲜培养基溶液共同孵育 2 h, 使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值 (A 值)。

#### 1.3.6 Edu 检测各组 U251/TMZ 细胞增殖情况

将上述转染后的各组细胞接种到 24 孔板中, 培养 24 h 后, 每孔中添加 10 μmol Edu 溶液, 再次培养 2 h 后 4% 甲醛固定 30 min, 随后将细胞用 Hoechst 33342 染色 30 min, 具体操作方法参照 Click-iT Edu 试剂盒说明书。使用荧光显微镜进行观察, Image-Pro Plus 软件对 Edu 阳性细胞 (红色细胞) 进行计数。Edu 阳性细胞率 = Edu 阳性细胞与总 Hoechst 33342 阳性细胞 (蓝色细胞) 的比率。

#### 1.3.7 流式细胞仪检测各组 U251/TMZ 细胞凋亡

收集按照上述方法转染的各组细胞, 根据 Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行 Annexin V-Alexa Fluor 488 和 PI 染色, 通过 FACS 细胞术分析细胞凋亡率。

#### 1.3.8 Western blot 检测各组 U251/TMZ 细胞中靶蛋白水平

使用含有蛋白酶体抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上提取按照上述方法培养的各组细胞总蛋白。将蛋白通过 10% SDS-PAGE 电泳分离并转移到 PVDF 膜上。在室温下使用含有 0.1% Tween-20 的 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 然后使用 COX-2、MRP1、PCNA、Bax 和 Bcl-2 特异性一抗 4°C 过夜孵育。洗膜后使用 HRP 标记的 IgG 二抗孵育 2 h, 随后通过化学发光

观察。通过 Image J 软件分析蛋白表达并标准化为 GAPDH。

### 1.4 统计学方法

数值变量资料统计描述为平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。使用单因素方差分析或 *t* 检验进行统计学分析。以双侧  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。所有统计分析均使用 SPSS 25.0 软件。

## 2 结果

### 2.1 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 在胶质瘤组织中的表达水平

与癌旁正常组织比较,胶质瘤组织中 LINC00662 水平和 COX-2 mRNA 表达均明显升高,miR-144 表达均降低( $P < 0.05$ ) (见表 1)。

### 2.2 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 在靶细胞中表达的水平

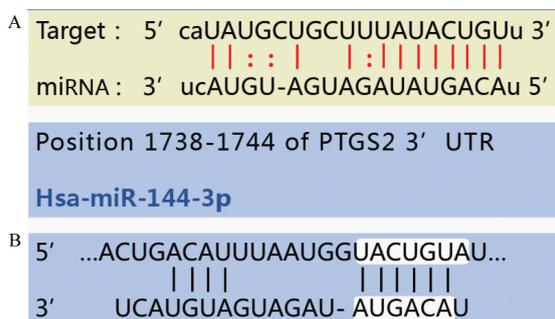
与 U251 细胞比较,U251/TMZ 细胞中 LINC00662 和 COX-2 mRNA 表达均显著升高,miR-144 表达水平降低( $P < 0.05$ ) (见表 2)。

### 2.3 细胞中 LINC00662、miR-144 和 COX-2 之间的调控关系

通过网站预测发现,LINC00662 与 miR-144 之间、miR-144 和 COX-2 的 3' UTR 之间存在结合位点(见图 1)。双荧光素酶实验结果显示,与 miR-NC mimic 和 WT-LINC00662 共转染的细胞比较,miR-144 mimic 和 WT-LINC00662 共转染到细胞中可显

著降低相对荧光素酶活性( $P < 0.05$ );此外,与 miR-NC mimic 和 WT-COX-2 共转染的细胞比较,miR-144 mimic 和 WT-COX-2 共转染到细胞中可显著降低相对荧光素酶活性( $P < 0.05$ ) (见表 3)。

与 si-NC 组比较,si-LINC00662 组 U251/TMZ 细胞中 LINC00662 和 COX-2 mRNA 表达明显降低,miR-144 表达增高( $P < 0.05$ )。与 si-LINC00662 + miR-NC inhibitor 组比较,si-LINC00662 + miR-144 inhibitor 组 LINC00662 表达水平无显著变化( $P > 0.05$ ),miR-144 表达降低( $P < 0.05$ ),COX-2 mRNA 表达增高( $P < 0.05$ ) (见表 4)。



注:A:LINC00662 与 miR-144 的结合位点预测;B:miR-144 与 COX-2 的结合位点预测。

图 1 结合位点的预测

Note. A, Putative binding sites of VLINC00662 and miR-144. B, Putative binding sites of miR-144 and COX-2.

Figure 1 Predicted binding sites

表 1 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 在组织中的表达水平( $n = 30$ )

Table 1 Expression level of LINC00662, miR-144 and COX-2 mRNA in tissues

组织 Tissues	LINC00662	miR-144	COX-2 mRNA
癌旁正常组织 Normal tissues adjacent to cancer	1.00±0.08	1.03±0.09	1.04±0.11
胶质瘤组织 Glioma tissues	3.15±0.30*	0.36±0.04*	2.94±0.25*

注:与癌旁正常组织相比,\* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal tissues adjacent to cancer, \* $P < 0.05$ .

表 2 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 在细胞中的表达水平( $n = 3$ )

Table 2 Expression level of LINC00662, miR-144 and COX-2 mRNA in cells

细胞 Cells	LINC00662	miR-144	COX-2 mRNA
U251	1.04±0.12	1.08±0.15	1.06±0.13
U251/TMZ	3.09±0.33*	0.42±0.05*	2.88±0.27*

注:与 U251 相比,\* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with U251, \* $P < 0.05$ .

表 3 双荧光素酶活性测定分析 LINC00662 与 miR-144、miR-144 与 COX-2 之间的关系( $n = 3$ )

Table 3 Analysis of the relationship between LINC00662 and miR-144, miR-144 and COX-2 by double luciferase activity assay

组别 Groups	WT-LINC00662	MUT-LINC00662	WT-COX-2	MUT-COX-2
miR-NC mimic	1.08±0.10	1.07±0.11	1.09±0.13	1.08±0.07
miR-144 mimic	0.36±0.05*	0.96±0.09	0.43±0.06*	0.97±0.08

注:与 miR-NC mimic 组相比,\* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with miR-NC mimic group, \* $P < 0.05$ .

## 2.4 各组 U251/TMZ 细胞增殖情况分析

与 si-NC 组比较, si-LINC00662 组 U251/TMZ 细胞增殖活力和 Edu 阳性细胞率均降低 ( $P < 0.05$ ); 与 si-LINC00662 + miR-NC inhibitor 组比较, si-LINC00662+miR-144 inhibitor 组 U251/TMZ 细胞增殖活力和 Edu 阳性细胞率均增高 ( $P < 0.05$ )。(见图 2)

## 2.5 各组 U251/TMZ 细胞凋亡情况分析

与 si-NC 组比较, si-LINC00662 组 U251/TMZ 细胞凋亡率增高 ( $P < 0.05$ ); 与 si-LINC00662+miR-NC

inhibitor 组比较, si-LINC00662 + miR-144 inhibitor 组 U251/TMZ 细胞凋亡率降低 ( $P < 0.05$ )。(见图 3)

## 2.6 各组 U251/TMZ 细胞中靶蛋白水平分析

与 si-NC 组比较, si-LINC00662 组 U251/TMZ 细胞中 COX-2、PCNA、MRP1 和 Bcl-2 蛋白水平均降低, Bax 蛋白水平增高 ( $P < 0.05$ ); 与 si-LINC00662+miR-NC inhibitor 组比较, si-LINC00662 + miR-144 inhibitor 组 U251/TMZ 细胞中 COX-2、PCNA、MRP1 和 Bcl-2 蛋白水平明显增高, Bax 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ ) (见图 4, 表 5)。

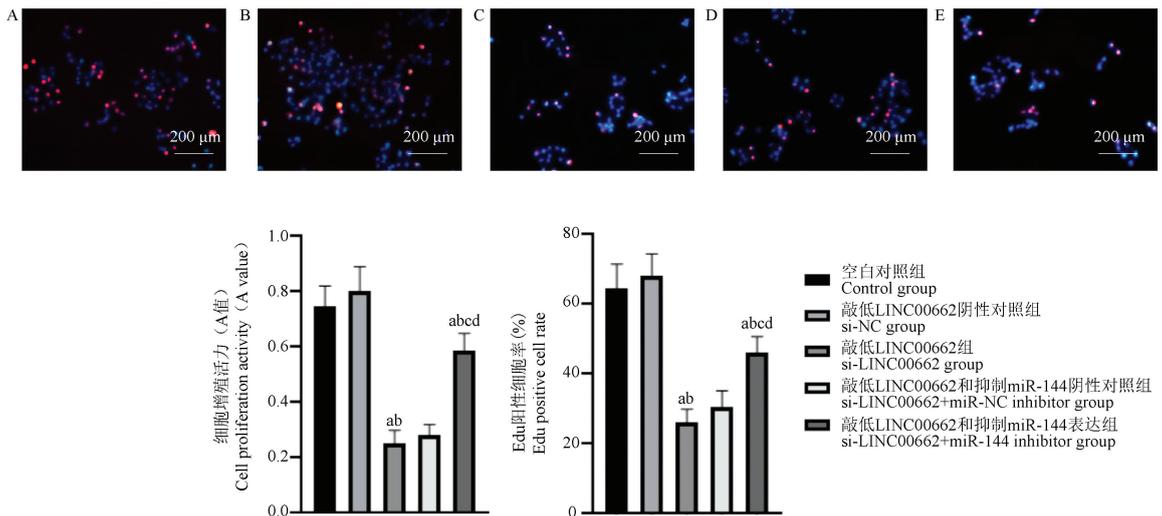
表 4 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 在 U251/TMZ 细胞中的表达水平 ( $n=3$ )

Table 4 Expression of LINC00662, miR-144 and COX-2 mRNA in U251/TMZ cells

组别 Groups	LINC00662	miR-144	COX-2 mRNA
空白对照组 Control group	1.04±0.09	1.07±0.05	1.03±0.07
敲低 LINC00662 阴性对照组 si-NC group	1.07±0.10	1.05±0.09	1.06±0.09
敲低 LINC00662 组 si-LINC00662 group	0.22±0.05 <sup>ab</sup>	2.37±0.20 <sup>ab</sup>	0.48±0.06 <sup>ab</sup>
敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照组 si-LINC00662+miR-NC inhibitor group	0.25±0.04 <sup>ab</sup>	2.45±0.24 <sup>ab</sup>	0.53±0.07 <sup>ab</sup>
敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组 si-LINC00662+miR-144 inhibitor group	0.27±0.03 <sup>abcd</sup>	1.58±0.18 <sup>abcd</sup>	0.80±0.09 <sup>abcd</sup>

注:与空白对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 阴性对照组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662 group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662+miR-NC inhibitor group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

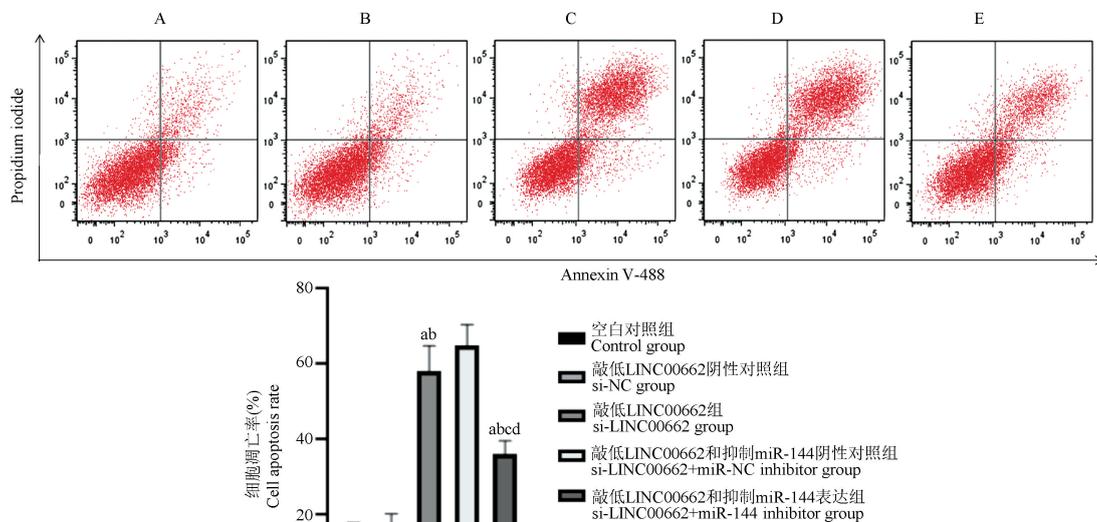


注: A: 空白对照组; B: 敲低 LINC00662 阴性对照组; C: 敲低 LINC00662 组; D: 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照组; E: 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组。与空白对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 阴性对照组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 各组 U251/TMZ 细胞增殖情况

Note. A, Control group. B, si-NC group. C, si-LINC00662 group. D, si-LINC00662+miR-NC inhibitor group. E, si-LINC00662+miR-144 inhibitor group. Compared with Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662 group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662+miR-NC inhibitor group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

Figure 2 Proliferation of U251/TMZ cells in each group



注: A: 空白对照组; B: 敲低 LINC00662 阴性对照组; C: 敲低 LINC00662 组; D: 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照组; E: 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组。与空白对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 阴性对照组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 各组 U251/TMZ 细胞凋亡情况

Note. A, Control group. B, si-NC group. C, si-LINC00662 group. D, si-LINC00662+miR-NC inhibitor group. E, si-LINC00662+miR-144 inhibitor group. Compared with Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662 group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662+miR-NC inhibitor group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

Figure 3 Apoptosis of U251/TMZ cells in each group

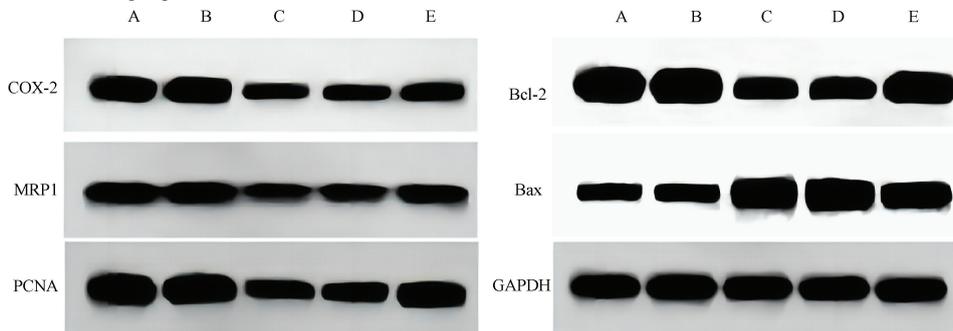
表 5 各组 U251/TMZ 细胞中靶蛋白水平分析 (n=3)

Table 5 Analysis of target protein level in U251/TMZ cells of each group

组别 Groups	COX-2	MRP1	PCNA	Bcl-2	Bax
空白对照组 Control group	0.69±0.08	0.89±0.09	0.99±0.12	1.01±0.14	0.41±0.05
敲低 LINC00662 阴性对照组 si-NC group	0.75±0.09	0.84±0.10	1.08±0.13	0.97±0.12	0.43±0.06
敲低 LINC00662 组 si-LINC00662 group	0.26±0.03 <sup>ab</sup>	0.36±0.05 <sup>ab</sup>	0.44±0.05 <sup>ab</sup>	0.37±0.04 <sup>ab</sup>	1.12±0.15 <sup>ab</sup>
敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照组 si-LINC00662+miR-NC inhibitor group	0.28±0.05 <sup>ab</sup>	0.33±0.04 <sup>ab</sup>	0.48±0.06 <sup>ab</sup>	0.40±0.06 <sup>ab</sup>	1.20±0.13 <sup>ab</sup>
敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组 si-LINC00662+miR-144 inhibitor group	0.47±0.06 <sup>abcd</sup>	0.55±0.06 <sup>abcd</sup>	0.69±0.08 <sup>abcd</sup>	0.72±0.08 <sup>abcd</sup>	0.81±0.09 <sup>abcd</sup>

注: 与空白对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 阴性对照组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662 group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662+miR-NC inhibitor group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .



注: A: 空白对照组; B: 敲低 LINC00662 阴性对照组; C: 敲低 LINC00662 组; D: 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照组; E: 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组。

图 4 各组 U251/TMZ 细胞中靶蛋白表达水平

Note. A, Control group. B, si-NC group. C, si-LINC00662 group. D, si-LINC00662+miR-NC inhibitor group. E, si-LINC00662+miR-144 inhibitor group.

Figure 4 Expression level of target protein in U251/TMZ cells of each group

### 3 讨论

胶质瘤的治疗主要是以手术加放、化疗为主,然而,其治疗效果并不理想,复发率和死亡率相对较高<sup>[12]</sup>。TMZ 具有良好的抗癌作用,能很好地改善脑胶质瘤患者的临床症状,并显著缩小肿瘤体积,基于 TMZ 的化疗是当前胶质瘤最广泛使用的治疗方法之一<sup>[13]</sup>。然而,亦有研究发现,胶质瘤细胞对 TMZ 的抵抗力正在增强<sup>[14-15]</sup>。因此,有必要对胶质瘤的 TMZ 耐药机制进行探究。

已有大量研究表明,肿瘤组织中异常表达的 LncRNA 可作为预测肿瘤预后的分子标志物<sup>[8,16-17]</sup>。Wei 等<sup>[18]</sup>研究表明,LINC00662 在宫颈癌组织和细胞中显著高表达,可促进宫颈癌细胞的进展和放射抗性。同样,本研究发现 LINC00662 在胶质瘤组织中高表达,与前人研究结果相一致<sup>[6-7]</sup>。LncRNA 与胶质瘤等肿瘤的耐药性有关,如 LncRNA DILA1 可通过抑制细胞周期蛋白 D1 降解抑制乳腺癌细胞生长,并恢复对他莫昔芬的敏感性<sup>[19]</sup>; LncRNA SNHG12 可作为 miR-129-5p 的海绵调控 MAPK/ERK 通路激活进而使胶质母细胞瘤具有 TMZ 抗性<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,LINC00662 在耐药细胞株 U251/TMZ 中表达显著高于 U251 细胞,在 U251/TMZ 细胞中敲低其表达,可显著降低细胞增殖活力、提高细胞凋亡能力,提示敲低 LINC00662 可增强胶质瘤对 TMZ 的敏感性。

LncRNA 可作为竞争性内源性 RNA 靶向 miRNA 来调节 miRNA 靶基因的表达<sup>[16]</sup>。据报道,LINC00662 可作为竞争性内源性 RNA 靶向 miR-34a-5p/凝集素甘露糖结合 2 样 (LMAN2L) 或 miR-107/高迁移率族框 1 蛋白 (HMGB1) 轴来调节胶质瘤的进展<sup>[6-7]</sup>。因此,笔者通过 StarBase v3.0 网站预测了 LINC00662 的靶基因,发现并验证了 LINC00662 和 miR-144 之间的靶向关系。因此,笔者继续通过 Target Scan7.2 网站预测并证实了 miR-144 和 COX-2 之间的靶向关系,与以往报道结果相一致<sup>[11]</sup>。另有研究证实,COX-2 在胶质瘤组织中表达上调,其过表达可促进胶质瘤的发生和发展<sup>[21]</sup>。本研究发现敲低 LINC00662 可显著下调 miR-144 表达,上调 COX-2 表达,提示 LINC00662 可作为 miR-144 竞争性内源性 RNA 来调节 COX-2 的表达。此外,本研究显示敲低 LINC00662 可引起细胞活力降低和凋亡率升高,同时,该现象在抑制 miR-144 表达

的 U251/TMZ 细胞中被逆转,提示 LINC00662 促进胶质瘤细胞对 TMZ 耐药,且 miR-144/COX-2 信号参与该过程。

耐药性是目前肿瘤化疗的主要障碍,其主要原因是一些外排的转运蛋白如 MRP1 的过度表达<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,敲低 LINC00662 可显著降低 U251/TMZ 细胞 MRP1 表达,再次证明了敲低 LINC00662 增强了胶质瘤对化疗药物的敏感性,即降低了胶质瘤的 TMZ 耐药性。此外,PCNA 是一种直接参与 DNA 合成的核蛋白,其表达水平增加表明细胞增殖能力提高<sup>[23]</sup>。Bcl-2 和 Bax 是凋亡相关蛋白质,Bcl-2 通过与线粒体外膜上的受体结合,有助于维持线粒体膜的完整性,充当细胞凋亡的抑制剂;而 Bax 起促进细胞凋亡的作用,若细胞暴露于凋亡诱导剂,Bax 就会从细胞质移动到线粒体膜上并改变外膜的通透性,从而诱导释放细胞色素 c 和其他凋亡分子,最终导致 DNA 断裂<sup>[24]</sup>。本研究结果发现敲低 LINC00662 可影响 MRP1、PCNA、Bcl-2 和 Bax 表达,下调 miR-144 表达可在一定程度上逆转敲低 LINC00662 对 MRP1、PCNA、Bcl-2 和 Bax 的影响,进一步提示 LINC00662 靶向调控 miR-144,参与调节胶质瘤细胞的 TMZ 耐药性。

综上所述,LINC00662 可通过 miR-144/COX-2 信号,调节 U251/TMZ 细胞增殖和凋亡,进而影响胶质瘤细胞的 TMZ 耐药性。这些结果为 LINC00662/miR-144/COX-2 调控网络在胶质瘤发展中的作用提供了新的理论支持。但由于本研究对象的单一性,有必要进一步在多个细胞系和动物模型中对 LINC00662 在胶质瘤中的耐药机制进行探究,这将为胶质瘤的治疗提供进一步的证据。

#### 参考文献:

- [1] 郑杰灵,袁亚维. 脑胶质瘤中链非编码 RNA TCONS\_00008552 促进放疗抵抗、侵袭转移的机制 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(11): 1748-1752.
- [2] Sorribes IC, Handelman SK, Jain HV. Mitigating temozolomide resistance in glioblastoma via DNA damage-repair inhibition [J]. J R Soc Interface, 2020, 17(162): 20190722.
- [3] Lee H, Zhang Z, Krause HM. Long noncoding RNAs and repetitive elements: junk or intimate evolutionary partners? [J]. Trends Genet, 2019, 35(12): 892-902.
- [4] Chen W, Li Q, Zhang G, et al. LncRNA HOXA-AS3 promotes the malignancy of glioblastoma through regulating miR-455-5p/USP3 axis [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(20): 11755-11767.
- [5] Wu P, Cai J, Chen Q, et al. Lnc-TALC promotes O<sup>6</sup>-

- methylguanine-DNA methyltransferase expression via regulating the c-Met pathway by competitively binding with miR-20b-3p [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2045.
- [ 6 ] Wu J, Guo X, Xu D, et al. LINC00662 sponges miR-107 accelerating the invasiveness and proliferation of glioma cells [J]. J Cancer, 2020, 11(19): 5700-5712.
- [ 7 ] Geng Y, Wu Y, Xu C, et al. Long non-coding RNA LINC00662 regulated proliferation and migration by targeting miR-34a-5p/LMAN2L axis in glioma [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 10161-10172.
- [ 8 ] 刘艳, 许路, 邵阿末, 等. miR-186 通过负调控 Smad6 对胶质瘤细胞迁移和上皮间质转化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 25-31.
- [ 9 ] Liu ZQ, Ren JJ, Zhao JL, et al. microRNA-144 represses gliomas progression and elevates susceptibility to Temozolomide by targeting CAV2 and FGF7 [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 4155.
- [ 10 ] Palumbo P, Lombardi F, Augello FR, et al. Biological effects of selective COX-2 inhibitor NS398 on human glioblastoma cell lines [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 167.
- [ 11 ] Yao Q, Gu A, Wang Z, et al. microRNA-144 functions as a tumor suppressor in gastric cancer by targeting cyclooxygenase-2 [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(3): 3088-3095.
- [ 12 ] 何超, 周玉玲, 王荣, 等. 多靶点抑制剂西奥罗尼增强人胶质瘤细胞放射敏感性的机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(9): 1537-1544.
- [ 13 ] 张静, 周永刚, 舒俊斌, 等. miR-130b 在胶质瘤对替莫唑胺耐药中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(4): 597-605.
- [ 14 ] 李秀英, 张勇, 冯旭东, 等. 调强放疗联合替莫唑胺对高级别脑胶质瘤术后患者免疫功能和生活质量的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(16): 3187-3191.
- [ 15 ] Franco-Molina MA, Santana-Krřinskaya SE, Madrigal-de-León LM, et al. Evaluation of the cytotoxic and immunogenic potential of temozolamide, panobinostat, and *Lophophora williamsii* extract against C6 glioma cells [J]. EXCLI J, 2021, 20: 614-624.
- [ 16 ] 陈婉斐, 泮慧俐, 李珍珍, 等. 抑制 lncRNA LUCAT1 表达通过靶向调控 miR-204-3p 减轻高糖诱导的心肌 H9c2 细胞损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(10): 1761-1768.
- [ 17 ] Deng H, Zhu B, Dong Z, et al. miR-214-5p targeted by lncRNA DANCER mediates TGF- $\beta$  signaling pathway to accelerate proliferation, migration and inhibit apoptosis of prostate cancer cells [J]. Am J Transl Res, 2021, 13(4): 2224-2240.
- [ 18 ] Wei J, Wang L, Sun Y, et al. LINC00662 contributes to the progression and the radioresistance of cervical cancer by regulating miR-497-5p and CDC25A [J]. Cell Biochem Funct, 2020, 38(8): 1139-1151.
- [ 19 ] Shi Q, Li Y, Li S, et al. lncRNA DILA1 inhibits Cyclin D1 degradation and contributes to tamoxifen resistance in breast cancer [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5513.
- [ 20 ] Lu C, Wei Y, Wang X, et al. DNA-methylation-mediated activating of lncRNA SNHG12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 28.
- [ 21 ] Cui X, Cui N, Pan J, et al. Expression of RhoA and COX-2 and their roles in the occurrence and progression of brain glioma [J]. Pak J Pharm Sci, 2021, 34(1(Special)): 397-401.
- [ 22 ] Nasr R, Lorendeau D, Khonkam R, et al. Molecular analysis of the massive GSH transport mechanism mediated by the human Multidrug Resistant Protein 1/ABCC1 [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 7616.
- [ 23 ] 罗瑞, 秦启忠, 刘敏, 等. rhPGRN 通过 MAPK/PI3K 通路调控自噬和内质网应激并促进细胞增殖 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(6): 1071-1081.
- [ 24 ] 吴艺璇, 彭维艳, 刘露, 等. 淫羊藿苷通过 AMPK 减轻脂肪酸诱导的肾小管上皮细胞线粒体损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(1): 113-121.

[ 收稿日期 ] 2022-09-22