

分类号：
学号：20212014039

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



LncRNA PVT1/EIF4A1 在体内外协同促进胃癌 迁移侵袭的作用研究

学位申请人	黄景鸿
指导教师	李冬妹 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	免疫学
研究方向	蛋白质功能与疾病
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子

2024年5月

分类号：
学号：20212014039

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



LncRNA PVT1/EIF4A1 在体内外协同促进胃癌 迁移侵袭的作用研究

学位申请人	黄景鸿
指导教师	李冬妹 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	免疫学
研究方向	蛋白质功能与疾病
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子

2024年5月

**Study on the Synergistic Effect of LncRNA PVT1 / EIF4A1 on the
Migration and Invasion of Gastric Cancer in Vitro and in Vivo**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Huang Jinghong

(Immunology)

Dissertation Supervisor: Prof. Li Dongmei

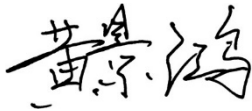
May, 2024

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：




时间：2024年5月8日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：



时间：2024年5月8日

导师签名：



时间：2024年5月8日

摘要

目的：胃癌死亡率在世界肿瘤死亡率中排名第四，癌细胞转移是造成患者死亡的重要原因。课题组前期研究发现：人浆细胞瘤变异体易位 1 (Plasmacytoma variant translocation 1, PVT1) 可与真核翻译起始因子 4A1 (Eukaryotic translation initiation factor 4A1, EIF4A1) 相互结合从而影响胃癌细胞的增殖、迁移能力。TGF- β /Smad 信号通路是促进癌症的侵袭及转移的重要通路。提出假说：PVT1 可能作为 RNA 伴侣激活 EIF4A1 的翻译起始活性，增加 TGF- β /EMT/MMPs 等转移相关蛋白的表达。方法：采集胃腺癌和印戒细胞癌石蜡样本 225 例及癌旁对照样本 132 例，同时收集患者临床信息。采用 RNA scope 和免疫组化在相同切片中检测 PVT1 与 EIF4A1 的表达、结合和定位情况，分析 PVT1 与 EIF4A1 的表达与患者病理特征的相关性。

在胃癌细胞 NCI-N87、MGC-803、BGC-823、SGC-7901 和对照永生化胃粘膜细胞系 GES-1 中，检测 PVT1 和 EIF4A1 的表达水平。在本底表达低的细胞系中采用慢病毒感染单独或共同过表达 PVT1 与 EIF4A1，在本底表达高的细胞系中单独或共同干扰 PVT1 与 EIF4A1 的表达。以上细胞均构建稳转细胞系后，检测 PVT1 和 EIF4A1 的表达变化。

通过 MTT、平板克隆、Transwell 和划痕实验检测单独或共同过表达 PVT1 与 EIF4A1 后胃癌细胞的增殖与迁移能力。检测单独或共同过表达/干扰 PVT1 与 EIF4A1 后胃癌细胞内 TGF- β 、p-Smad2、p-Smad3 和 EMT 标志蛋白 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail，以及基质金属蛋白酶 MMP2、MMP9 的表达水平。

选取 SPF 级 4 周龄 Balb/c 雌性裸鼠 40 只，将 Balb/c 裸鼠分为单独过表达 PVT1 组 (n=5)，单独过表达 EIF4A1 组 (n=5)、共同过表达组 (n=5)、过表达对照组 (n=5)；单独干扰 PVT1 组 (n=5)、单独干扰 EIF4A1 组 (n=5)、共同干扰组 (n=5)、干扰对照组 (n=5) 共 8 组。每只分别进行尾静脉注射稳转单独或共同过表达/干扰或对照胃癌细胞 1×10^6 个。连续喂养 8 周，每周检测小鼠体重。喂养 8 周后牺牲裸鼠，固定转移瘤组织后 H&E 染色查看转移瘤组织大小。免疫组化检测转移瘤组织中 EIF4A1、p-Smad3、EMT 标志蛋白 E-cadherin、N-cadherin 以及 MMP9 的表达水平。

为确定 PVT1 是否可以纵向调控 EIF4A1 的表达，通过免疫荧光和 Western blot 实验检测单独过表达/干扰 PVT1 的胃癌细胞中 EIF4A1 的表达情况。随后构建 *EIF4A1* 启动子区载体，双荧光素酶报告基因实验检测 PVT1 对 *EIF4A1* 启动子区域的调节作用。

结果：胃腺癌及印戒细胞癌中 PVT1 和 EIF4A1 表达情况均高于正常癌旁对照组织，且 PVT1 和 EIF4A1 的表达情况与肿瘤类型、分化程度、肿瘤深度、淋巴结及远处转移呈正相关 ($P < 0.05$)；PVT1 表达量与 EIF4A1 表达量相关 ($P < 0.05$)。

检测四种胃癌细胞 NCI-N87、MGC-803、BGC-823、SGC-7901 及对照永生化胃粘膜细胞 GES-

1 中 PVT1 和 EIF4A1 的表达情况, 在 SGC-7901 细胞中 PVT1 与 EIF4A1 的本底表达较低, 在 MGC-803 中 PVT1 与 EIF4A1 的本底表达较高 ($P<0.05$)。故采用 SGC-7901 细胞开展过表达实验, MGC-803 细胞开展干扰表达实验。检测过表达及干扰稳转细胞系中 PVT1/EIF4A1 表达情况, 单独和共同过表达组 PVT1/EIF4A1 表达量均高于对照组 ($P<0.05$); 单独和共同干扰组 PVT1/EIF4A1 表达均低于对照组 ($P<0.05$)。

MTT 实验检测发现共同过表达组 OD 值高于单独过表达组和对照组; 平板克隆形成实验显示共同过表达 PVT1 与 EIF4A1 组平板克隆形成数为 492 ± 8.72 , 单独过表达 PVT1 组平板克隆形成数为 251 ± 1.53 , 单独过表达 EIF4A1 组平板克隆形成数为 228 ± 1.52 , 对照组平板克隆形成数为 205 ± 2.08 。Transwell 结果显示共同过表达组迁移细胞数为 308 ± 29.10 , 单独过表达 PVT1 组迁移细胞数为 222 ± 14.42 , 单独过表达 EIF4A1 组迁移细胞数为 206 ± 10.58 , 对照组迁移细胞数为 169 ± 18.04 。划痕实验结果显示共同过表达组伤痕愈合速率高于单独过表达组和对照组, 以上差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。

Western blot 检测单独或共同过表达/干扰 PVT1 与 EIF4A1 后胃癌细胞内 TGF- β 信号通路相关蛋白和 EMT 标志蛋白, 以及基质金属蛋白酶表达水平。结果提示, 与单独过表达 PVT1/EIF4A1 组和对照组相比, 共同过表达组 E-cadherin 的表达量低于单独过表达组和对照组, 共同过表达组 c-myc、TGF- β 、p-Smad2、p-Smad3、Snail、N-cadherin、Vimentin、MMP2 和 MMP9 的表达量高于单独过表达组和对照组 ($P<0.05$); 与单独干扰 PVT1/EIF4A1 组和对照组相比, 共同干扰组 E-cadherin 的表达量高于单独干扰组和对照组, 共同干扰组 c-myc、TGF- β 、p-Smad2、p-Smad3、Snail、N-cadherin、Vimentin、MMP2 和 MMP9 的表达量低于单独干扰组和对照组 ($P<0.05$)。

向 Balb/c 雌性裸鼠注射稳转单独或共同过表达/干扰或对照胃癌细胞, 注射八周后, 与对照组小鼠相比, 共同过表达组小鼠肿瘤转移灶显著增大, EIF4A1、p-Smad3、MMP9 和 N-cadherin 表达量显著增高, E-cadherin 表达量降低; 共同干扰组小鼠肿瘤转移灶显著减小, 且 EIF4A1、p-Smad3、MMP9 和 N-cadherin 表达量显著降低, E-cadherin 表达量增高。

最后, 与对照组相比, 单独过表达 PVT1 后 SGC-7901 细胞的 EIF4A1 表达量显著增高; 单独干扰 PVT1 后 MGC-803 细胞的 EIF4A1 表达量显著降低 ($P<0.05$)。构建 EIF4A1 启动子区全长及以 500 bp 长度的截断体荧光素酶表达载体, 对 HEK-293T 细胞转染 PVT1 过表达质粒和 EIF4A1 启动子区荧光素酶表达载体 48 h 后, 与对照组相比, 过表达 PVT1 显著增加 EIF4A1 启动子区全长及 1500 bp-2000 bp 区域截断体荧光素酶的表达 ($P<0.05$)。

结论: LncRNA PVT1 与 EIF4A1 在胃癌组织中表达均上调, PVT1 表达情况与 EIF4A1 相关, 且 PVT1/EIF4A1 与患者转移、病理分型、分期、分级等病理特征相关。PVT1 作为 RNA 伴侣, 激活 EIF4A1 翻译起始因子活性, 增加 TGF- β /Smad/MMPs 和 EMT 等转移相关蛋白表达促进胃癌转移。

关键词: 胃癌; PVT1; EIF4A1; TGF- β /Smad; EMT

论文类型: A (基础研究)

Abstract

Objective: The mortality rate of gastric cancer ranks forth in the world's tumor mortality rate, and cancer cell metastasis is an important cause of patient death. The preliminary research of the research group found that plasma tumor variant translation 1 (PVT1) can bind with eukaryotic translation initiation factor 4A1 (EIF4A1) to affect the proliferation and migration ability of gastric cancer cells. TGF- β /Smad signaling pathway is an important pathway that promotes cancer invasion and metastasis. Proposing hypothesis: PVT1 may act as a RNA partner to activate the translation initiation activity of EIF4A1, increasing the expression of transfer related proteins such as TGF- β /EMT/MMPs.

Methods: Collect 225 paraffin samples of gastric adenocarcinoma and signet ring cell carcinoma, as well as 132 adjacent control samples, and collect clinical information of patients. RNA scope and immunohistochemistry was used to detect the expression, binding, and localization of PVT1 and EIF4A1 in the same section, and to analyze the correlation between the expression of PVT1 and EIF4A1 and the pathological characteristics of patients.

The expression levels of PVT1 and EIF4A1 were detected in gastric cancer cells NCI-N87, MGC-803, BGC-823, SGC-7901, and immortalized gastric mucosal cell line GES-1. Overexpression of PVT1 and EIF4A1 by lentivirus infection individual or in-combination in low background expression cell lines. Individually or jointly knocks down PVT1 and EIF4A1 in cell lines with high background expression. After constructing stable transgenic cell lines, the expression changes of PVT1 and EIF4A1 were detected.

Detection of proliferation and migration ability of gastric cancer cells overexpressing PVT1 and EIF4A1 individual or in-combination through MTT, plate cloning, Transwell, and scratch assays Detection of the expression levels of TGF- β , p-Smad2, p-Smad3, Snail, EMT marker proteins E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, , as well as matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 in gastric cancer cells after individually or co-overexpression/knockdown of PVT1 and EIF4A1.

Forty 4-weeks-old Balb/c female nude mice of SPF grade were selected and divided into an individual overexpression group of PVT1 (n=5), an individual overexpression group of EIF4A1 (n=5), a co-overexpression group (n=5), and an overexpression control group (n=5); an individual knock down group of PVT1 (n=5), an individual knock down group of EIF4A1 (n=5), co-knockdown group (n=5), and knockdown control group (n=5). There are a total of 8 groups. Each mouse was injected into the tail vein separately to stabilize the overexpression/interference or control of 1×10^6 gastric cancer cells, either individually or jointly. Feed the mice continuously for 8 weeks and measure their weight weekly. Sacrifice nude mice after feeding for 8 weeks, fix the metastatic tumor tissue, and observe the size of the metastatic tumor tissue by H&E staining. Immunohistochemical detection of the expression levels of EIF4A1, p-Smad3, EMT marker

proteins E-cadherin, N-cadherin, and MMP9 in metastatic tumor tissues.

To determine whether PVT1 can longitudinally regulate the expression of EIF4A1, immunofluorescence assay and Western blot assay were used to detect the expression of EIF4A1 in gastric cancer cells overexpressing/knocking down PVT1 individual. Subsequently, the *EIF4A1* promoter region vector was constructed, and the dual luciferase reporter gene experiment was performed to detect the regulatory effect of PVT1 on the *EIF4A1* promoter region.

Results: The expression levels of PVT1 and EIF4A1 in gastric adenocarcinoma and signet ring cell carcinoma were higher than those in normal adjacent control tissues, and the expression levels of PVT1 and EIF4A1 were positively correlated with the cancer type, differentiation degree, tumor depth, lymph nodes, and distant metastasis ($P < 0.05$). The expression level of PVT1 is correlated with the expression level of EIF4A1 ($P < 0.05$).

Detect the expression of PVT1 and EIF4A1 in four types of gastric cancer cells NCI-N87, MGC-803, BGC-823, SGC-7901, and eternal gastric mucosal cells GES-1. The background expression of PVT1 and EIF4A1 is lower in SGC-7901 cells ($P < 0.05$), while the background expression of PVT1 and EIF4A1 is higher in MGC-803 cells ($P < 0.05$) Therefore, SGC-7901 cells were used for overexpression experiments, while MGC-803 cells were used for knockdown expression experiments. Detecting the expression of PVT1/EIF4A1 in overexpressed and knockdown stable transgenic cell lines, the expression levels of PVT1/EIF4A1 in both individual and co-overexpressing groups were higher than those in the NC group ($P < 0.05$), and the expression of PVT1/EIF4A1 in both individual and co-knockdown groups was lower than that in the NC group ($P < 0.05$).

MTT experiment detection found that the OD value of the co-overexpression group was higher than that of the individual overexpression group and the control group Plate cloning experiment shows that the number of plate clones formed in the co-overexpression group of PVT1 and EIF4A1 was 492 ± 8.72 , the number of plate clones formed in the individual overexpression group of PVT1 was 251 ± 1.53 , the number of plate clones formed in the individual overexpression group of EIF4A1 was 228 ± 1.52 , and the number of plate clones formed in the control group was 205 ± 2.08 . The transwell results showed that the number of migrating cells in the co-overexpression group was 308 ± 29.10 , the number of migrating cells in the individual overexpression PVT1 group was 222 ± 14.42 , the number of migrating cells in the individual overexpression EIF4A1 group was 206 ± 10.58 , and the number of migrating cells in the control group was 169 ± 18.04 . The scratch experiment results showed that the wound healing rate of the co-overexpression group was higher than that of the individual overexpression group and the control group. The above differences are all statistically significant ($P < 0.05$).

Western blot was used to detect the expression levels of TGF- β signaling pathway related proteins, EMT

marker proteins, as well as matrix metalloproteinases in gastric cancer cells after individual or co-overexpression/knockdown of PVT1 and EIF4A1. Compared with the PVT1/EIF4A1 individual overexpression group and the control group, the expression level of E-cadherin in the co-overexpression group was lower. The co-overexpression group had higher levels of c-myc, TGF- β , p-Smad2/3, Snail, N-cadherin, Vimentin, MMP2 and MMP9 were higher in the individual overexpression group and the control group ($P < 0.05$). Compared with the PVT1/EIF4A1 individual knockdown group and the control group, the expression level of E-cadherin in the co-knockdown group was higher. The co-knockdown group had lower levels of c-myc, TGF- β , p-Smad2/3, Snail, N-cadherin, Vimentin, MMP2 and MMP9 were than those of the individual knockdown group and control group ($P < 0.05$).

Injecting stable co-overexpressing/interfering or control gastric cancer cells into Balb/c female nude mice. After eight weeks of injection, Compared with the control group mice, the co-overexpression group mice showed significantly increased tumor metastasis, significantly increased expression levels of EIF4A1, p-Smad3, MMP9, and N-cadherin, and decreased expression levels of E-cadherin; The co-knockdown group mice showed a significant reduction in tumor metastasis, and the expression levels of EIF4A1, p-Smad3, MMP9, and N-cadherin were significantly reduced, while the expression levels of E-cadherin were increased.

Finally, compared with the control group, overexpression of PVT1 individual significantly increased the expression level of EIF4A1 in SGC-7901 cells; Knocking down PVT1 individual significantly reduced the expression of EIF4A1 in MGC-803 cells ($P < 0.05$). Construction of *EIF4A1* promoter region full-length and 500 bp truncated luciferase expression vector, transfection of HEK-293T cells with PVT1 overexpression plasmid and EIF4A1 promoter region luciferase expression vector for 48 hours, compared with the control group, overexpression of PVT1 significantly increased the expression of EIF4A1 promoter region full-length and 1500 bp-2000 bp truncated luciferase ($P < 0.05$).

Conclusion: The expression of lncRNA PVT1 and EIF4A1 is upregulated in gastric cancer tissue, and the expression of PVT1 is related to EIF4A1. PVT1/EIF4A1 is also related to pathological features such as metastasis, pathological classification, staging, and grading in patients. PVT1 acts as an RNA partner, activating EIF4A1 translation initiation factor activity and increasing expression of metastasis related proteins such as TGF- β /Smad/MMPs and EMT to promoting gastric cancer metastasis.

Key words: Gastric Cancer; PVT1; EIF4A1; TGF- β /Smad; EMT

Paper type: A (Basic Research)

目 录

摘 要.....	I
Abstract	III
目 录.....	VI
中英文缩略词对照表.....	IX
1 前言.....	1
2 材料与amp;方法.....	4
2.1 实验材料.....	4
2.1.1 主要试剂和耗材.....	4
2.1.2 主要仪器设备.....	5
2.2 实验方法.....	6
2.2.1 免疫组织化学染色法.....	6
2.2.2 细胞培养.....	10
2.2.3 质粒提取.....	13
2.2.4 质粒转染.....	14
2.2.5 慢病毒感染.....	14
2.2.6 提取细胞内总 RNA.....	15
2.2.7 逆转录.....	16
2.2.8 实时荧光定量 PCR 反应（real-time PCR）.....	16
2.2.9 蛋白提取.....	16
2.2.10 Western Blot.....	17
2.2.11 MTT 实验.....	18
2.2.12 克隆形成实验.....	18
2.2.13 Transwell 实验.....	19
2.2.14 细胞划痕实验.....	19
2.2.15 细胞免疫荧光实验.....	20
2.2.16 双荧光素酶报告基因实验.....	20
2.2.17 动物转移瘤模型建立.....	21
2.2.18 牺牲裸鼠后转移瘤组织固定.....	21
2.2.19 制备转移瘤组织石蜡切片.....	21

2.2.20 转移瘤组织 H&E 染色.....	22
2.2.21 统计学处理.....	22
3 结果.....	24
3.1 胃癌组织中 PVT1 与 EIF4A1 的表达情况及相关性.....	24
3.1.1 胃癌组织及癌旁对照组织中 PVT1 及 EIF4A1 的表达情况.....	24
3.1.2 胃癌组织中 PVT1/EIF4A1 与患者转移、病理分型、分期、分级等病理特征相关.....	25
3.2 胃癌细胞中 PVT1 和 EIF4A1 存在共定位.....	26
3.3 胃癌细胞本底 PVT1 及 EIF4A1 表达检测并构建稳转细胞系.....	27
3.3.1 胃癌细胞及正常胃黏膜细胞本底 PVT1 及 EIF4A1 表达检测.....	27
3.3.2 慢病毒感染细胞构建过表达 PVT1 及 EIF4A1 稳转细胞系并检测效率... ..	28
3.3.3 PVT1 及 EIF4A1 干扰表达稳转细胞系构建及效率检测.....	29
3.4 PVT1 协同 EIF4A1 激活 TGF- β /Smad 通路上调胃癌细胞 EMT 和 MMP2/9 表达, 促进增殖与迁移能力.....	30
3.4.1 单独或共同过表达 PVT1/EIF4A1 后促进胃癌细胞增殖与迁移能力.....	30
3.4.2 过表达 PVT1/EIF4A1 后激活 TGF- β /Smad 通路促进胃癌细胞 EMT 和 MMP2/9 表达.....	32
3.4.3 干扰 PVT1/EIF4A1 后抑制 TGF- β /Smad 通路减弱胃癌细胞 EMT 和 MMP2/9 表达.....	33
3.5 PVT1 协同 EIF4A1 激活 TGF- β /Smad 通路促进胃癌细胞 EMT 和 MMP9 表达, 增强裸鼠胃癌转移瘤形成.....	35
3.5.1 胃癌细胞内过表达 PVT1/EIF4A1 后促进裸鼠体内胃癌转移瘤形成.....	35
3.5.2 胃癌细胞内干扰 PVT1/EIF4A1 后抑制裸鼠体内胃癌转移瘤形成.....	37
3.5.3 过表达 PVT1/EIF4A1 后激活 TGF- β /Smad 通路促进胃癌细胞在裸鼠体内 EMT 和 MMP9 表达.....	38
3.5.4 干扰 PVT1/EIF4A1 后抑制 TGF- β /Smad 通路, 从而抑制胃癌细胞在裸鼠体内 EMT 和 MMP9 表达.....	39
3.6 PVT1 可通过结合 <i>EIF4A1</i> 启动子区 1500 bp-2000 bp 区域促进胃癌细胞内 EIF4A1 表达.....	40
3.6.1 PVT1 可促进胃癌细胞内 EIF4A1 表达.....	40
3.6.2 PVT1 可调节 <i>EIF4A1</i> 启动子区 1500 bp-2000 bp 区域.....	42
4 讨论.....	44
5 结论.....	48

6 综述.....	49
参考文献.....	56
致 谢.....	63
作者简介.....	64

中英文缩略词对照表

缩写	英文全称	中文全称
AP	Alkaline Phosphatase	碱性磷酸酯酶
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	培养基
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
EIF4A1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1	真核翻译起始因子 4A1
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	上皮间充质转化
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization	荧光原位杂交
H&E	Hematoxylin And Eosin Stains	苏木精和伊红染色法
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学染色法
MTT	Methyl Thiazolyl Tetrazolium	噻唑蓝
miRNA	MicroRNA	微小 RNA
MMP	Matrix Metalloproteinase	基质金属蛋白酶
PVT1	Plasmacytoma Variant Translocation 1	人浆细胞瘤转化迁移基因 1
PMSF	Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride	苯甲磺酰氟
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR	实时荧光定量 PCR
shRNA	Short Hairpin RNA	短发卡 RNA
Smad	Drosophila Mothers Against Decapentaple- gic Protein	果蝇母亲对抗脑麻痹蛋白
TGF- β	Transforming Growth Factor- β	转化生长因子 β
WB	Western Blot	蛋白质免疫印迹

1 前言

胃癌 (Gastric cancer, GC) 是世界上第四大癌症死亡原因, 每年有 77 万人死亡^[1]。胃癌的高死亡率和高发病率是多种因素共同作用的结果。首先, 直到晚期才有明显的症状, 因此, 如果不通过内窥镜进行常规筛查, 很难在早期诊断^[2]。其次, 胃癌在生物学、组织学和存活率方面是异质性的, 疾病的多样性和复杂性限制了对胃癌肿瘤发生、肿瘤进展和转移的分子机制的清楚了解。近年来, 多种类型的非编码 RNA (Non coding RNA, ncRNAs) 的发现及其在癌症中的关键作用得到了越来越多的关注^[3]。

NcRNAs 根据其长度大致分为两类, 即长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, lncRNA, 长于 200 个核苷酸) 和短链非编码 RNA (Small non-coding RNA, sncRNA, 短于 200 个核苷酸)^[4], sncRNAs 又分为 miRNAs (微小 RNAs)、piRNAs (piwi 相互作用的 RNAs)、siRNAs (小干扰 RNAs)、snRNAs (小核 RNAs) 等^[5]。越来越多的证据表明, ncRNAs 在多种细胞和生理过程中发挥作用, 包括基因表达调控、染色质重塑、细胞分化和胚胎发育^[6], 据报道, ncRNAs 的失调与多种人类癌症有关^[7]。

LncRNAs 被定义为长度超过 200 个核苷酸的转录本^[8], lncRNAs 是人类基因组中最大和最多样化的非编码转录本, 含有多达 60,000 个 lncRNA 基因^[9]。LncRNAs 通过不同的机制在表观遗传、转录和转录后水平调控基因表达^[10], 功能性的 lncRNAs 的分子机制一般包括: (1) LncRNAs 与转录因子相互作用, 调节靶基因的表达; (2) 它们充当信号或支架, 将染色质修饰的复合体招募到基因组位置; (3) 它们参与核糖核蛋白复合体的形成; (4) 它们与互补的 mRNAs 相互作用, 调节其代谢, 包括剪接、翻译和降解; (5) 它们与蛋白质结合, 调节其定位或活性; (6) 它们作为 ceRNA (竞争内源 RNA) 海绵结合靶向 miRNAs。在动态平衡和病理条件下, lncRNAs 在许多生物过程中都扮演着重要的角色^[3]。据报道, 失调的 lncRNAs 与许多人类癌症的进展有关^[11]。

位于 8 号染色体 *c-Myc* 基因下游的 lncRNA 浆细胞瘤变异体易位 1 (Plasmacytoma variant translocation 1, PVT1) 是由 Guan 等人首次提出的^[12]。近年来, 在包括非小细胞肺癌^[13]、鼻咽癌^[14]、胃癌^[15]在内的多种人类恶性肿瘤中发现了 PVT1 的异常表达。PVT1 在多种肿瘤中常见的机制是直接调节 RNA 和蛋白质的表达促进肿瘤的发生和发展^[16]。如: PVT1 可招募 EZH2 下调肝癌细胞 miR-214 和 p53 的表达^[17]。此外, PVT1 还充当了调控下游基因和途径的支架。例如, 在鼻咽癌中, PVT1 通过招募 KAT2A 促进 H3K9 乙酰化^[14], 而在胃癌中, 我们的前期研究结果发现: PVT1 可以通过与真核翻译起始因子 4A1 (Eukaryotic translation initiation factor 4A1, EIF4A1) 相互结合进而影响

胃癌细胞的增殖与迁移能力。

癌症细胞的特征是蛋白质合成的速率异常，从而极大地促进了转化重编程，最终导致原癌基因编码蛋白的异常增多以及癌症的化疗耐药，癌症细胞中的翻译起始程序在肿瘤进展和转移中保持其恶性能力，而大多数蛋白质合成的速率减缓步骤发生在起始阶段^[18]。翻译能力的下调，特别是通过抑制翻译起始，将导致肿瘤迁移和侵袭性的降低^[19]。真核翻译起始因子（Eukaryotic translation initiation factor, EIF）在这些过程中具有多种功能：它们可以作为 RNA 伴侣、ATP 依赖性 RNA 解旋酶、作为 RNA-蛋白复合体酶介导 RNA-蛋白复合体的结合和解离，也可以作为翻译的共激活剂或共阻遏剂^[20]。

真核生物翻译起始因子 4A 家族的成员是翻译起始过程所必需的，它们是死盒（Dead-box）家族成员的原型。死盒家族起到 RNA 解旋酶的作用，解开 RNA，将由氢键结合的碱基配对 RNA 链彼此分离，并去除 RNA 中的二级结构，使它们可以被 RNA 酶连接，这一变化依赖于 ATP 的能量供应^[21]。EIF4A 家族包括以下亚型：EIF4A1、EIF4A2 和 EIF4A3^[22]。一般情况下，EIF4A1 和 EIF4A2 主要位于细胞质中，并且 EIF4A1 相对于 EIF4A2 在细胞质中表达更丰富，而 EIF4A3 主要位于细胞核中^[23]。EIF4A1 和 EIF4A2 主要参与 mRNA 翻译的启动，而 EIF4A3 蛋白主要在 mRNA 代谢中发挥作用，包括 mRNA 的定位、输出以及 mRNA 剪接与翻译的偶联^[24]。作为一种重要的翻译起始因子，EIF4A1 装载所有的 mRNA 并与核糖体结合。最近的研究表明：EIF4A1 作为 ATP 依赖性 RNA 解旋酶具有低活性，它的解旋功能很大程度上取决于其结合伴侣的刺激，而单链 RNA 的结合可以很大程度上刺激 EIF4A1 的活性^[25]。EIF4A1 在癌症的发生、发展和上皮-间质转化过程中起着重要作用，最近的研究表明，在胃癌、结直肠癌、宫颈癌、乳腺癌和黑色素瘤等癌症中，EIF4A1 的表达异常^[26-29]。然而其具体机制尚不明确。在本研究中，我们主要探究 PVT1 与 EIF4A1 相互结合后通过哪些机制影响胃癌的发生发展。

我们通过以下研究探究 PVT1 与 EIF4A1 在胃癌发生发展中的作用机制：首先收集胃癌石蜡样本及癌旁对照样本，同时收集患者性别、年龄、转移和分期分级等临床信息。RNA scope 结合免疫组化实验，在相同切片中检测 PVT1 与 EIF4A1 的表达、结合和定位情况，方差检验分析 PVT1 与 EIF4A1 的表达与患者转移、病理分型、分期、分级等病理特征的相关性。

其次检测 PVT1 与 EIF4A1 在胃癌细胞中的表达情况。在本底表达高的细胞系中单独或共同干扰 PVT1 与 EIF4A1，在本底表达低的细胞系中单独或共同过表达 PVT1 与 EIF4A1。MTT、平板克隆实验、Transwell 实验和划痕实验检测单独或共同过表达 PVT1 与 EIF4A1 后胃癌细胞的增殖与迁移能力。Western blot 实验检测单独或共同过表达/干扰 PVT1 与 EIF4A1 后胃癌细胞内 TGF- β 、p-Smad2/3、EMT 标志蛋白 N-cadherin、

Vimentin、E-cadherin、Snail, 以及 MMP2、MMP9 的表达水平。

选取 SPF 级 4 周龄 Balb/c 雌性裸鼠 40 只, 将 Balb/c 裸鼠分为单独过表达 PVT1 组 (n=5), 单独过表达 EIF4A1 组 (n=5)、共同过表达组 (n=5)、过表达对照组 (n=5); 单独干扰 PVT1 组 (n=5)、单独干扰 EIF4A1 组 (n=5)、共同干扰组 (n=5)、干扰对照组 (n=5) 共 8 组。每只分别进行尾静脉注射单独或共同过表达/干扰或对照胃癌细胞 1×10^6 个。连续喂养 8 周, 每周检测小鼠体重。喂养 8 周后牺牲裸鼠, H&E 染色后查看转移瘤组织大小, 免疫组化技术检测石蜡组织中 EIF4A1 及 p-Smad3、EMT 标志蛋白 E-cadherin、N-cadherin 以及基质金属蛋白酶 MMP9 的表达水平。

最后利用免疫荧光实验和 Western blot 实验检测单独过表达/干扰 PVT1 的胃癌细胞中 EIF4A1 的表达情况。随后构建 *EIF4A1* 启动子区全长以及以 500bp 为单位的截断载体, PVT1 对 *EIF4A1* 启动子区域的调节作用通过双荧光素酶报告基因实验检测。为确定胃癌治疗核心靶点提供理论依据, 为改善患者预后提供新的线索。