



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.08.007
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.08.007
Chinese Journal of General Surgery, 2022, 31(8):1039-1047.

· 基础研究 ·

长链非编码 RNA MCM3AP-AS1 在胆管癌细胞中的表达及其功能

李博, 赵强子, 黎建军

(武汉科技大学附属普仁医院/武汉市普仁医院 普通外科, 湖北 武汉 430081)

摘要

背景与目的: 长链非编码 RNA MCM3AP-AS1 (MCM3AP-AS1) 在原发性肝癌、乳腺癌及胶质母细胞瘤等多种肿瘤中发挥癌基因功能, 然而 MCM3AP-AS1 在胆管癌中的表达、功能及作用机制尚知之甚少。因此, 本研究观察 MCM3AP-AS1 在胆管癌细胞中的表达及其对细胞增殖和侵袭的影响, 并初步探讨机制。

方法: 采用 qRT-PCR 法检测胆管癌细胞株 (CCLP、RBE、9810、HuCCT1) 及人肝内胆管上皮细胞株 (HIBEC) 中 MCM3AP-AS1 的表达。将胆管癌细胞转染 MCM3AP-AS1 siRNA 后, 以转染无义序列的胆管癌细胞为阴性对照, 分别用 MTT 实验和 Transwell 实验检测细胞增殖与侵袭能力的变化, 用 Western blot 法检测 JAK/STAT3 信号通路与上皮间质转化 (EMT) 相关蛋白表达的变化; 最后, 用 JAK/STAT3 通路激动剂白血病抑制因子 (LIF) 行功能拯救实验验证。

结果: 所有胆管癌细胞系中 MCM3AP-AS1 表达量均明显高于 HIBEC (均 $P < 0.05$)。与阴性对照组比较, CCLP 细胞转染 MCM3AP-AS1 siRNA 后增殖能力与侵袭能力均明显减弱 (均 $P < 0.05$); JAK1/2 与 STAT3 表达量无明显变化 (均 $P > 0.05$), 但 p-JAK1/2 与 p-STAT3 表达量明显降低 (均 $P < 0.05$), 同时, EMT 相关蛋白 E-cadherin 表达升高、vimentin 表达降低 (均 $P < 0.05$)。功能拯救实验结果显示, 同时加入 LIF 后, MCM3AP-AS1 沉默对 CCLP 细胞后的以上作用均被取消, 与阴性对照组间差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

结论: 胆管癌细胞中 MCM3AP-AS1 表达上调, MCM3AP-AS1 可能通过活化 JAK/STAT3 通路与 EMT 过程而促进胆管癌细胞增殖和侵袭。

关键词

胆管肿瘤; RNA, 长链非编码; 细胞增殖; 肿瘤浸润
中图分类号: R735.8

Expression of long non-coding RNA MCM3AP-AS1 in cholangiocarcinoma cells and its function

LI Bo, ZHAO Qiangzi, LI Jianjun

(Department of General Surgery, Puren Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology/Wuhan Puren Hospital, Wuhan 430081, China)

Abstract

Background and Aims: Long non-coding RNA MCM3AP-AS1 (MCM3AP-AS1) plays an oncogene

收稿日期: 2022-02-11; 修订日期: 2022-06-13。

作者简介: 李博, 武汉科技大学附属普仁医院/武汉市普仁医院主治医师, 主要从事普外科肿瘤基础方面的研究。

通信作者: 李博, Email: libosurgeon84@yeah.net

function in various tumors such as primary liver cancer, breast cancer and glioblastoma. However, the expression, function and mechanism of MCM3AP-AS1 in cholangiocarcinoma are still poorly understood. Therefore, this study was conducted to observe the expression of MCM3AP-AS1 in cholangiocarcinoma cells and its effect on cell proliferation and invasion, and preliminarily investigate the underlying mechanism.

Methods: The expressions of MCM3AP-AS1 in cholangiocarcinoma cell lines (CCLP, RBE, 9810, HuCCT1) and human intrahepatic bile duct epithelial cell line (HIBEC) were detected by qRT-PCR. In cholangiocarcinoma cells after transfection with MCM3AP-AS1 siRNA, using cholangiocarcinoma cells transfected with scrambled sequences as negative control, the changes in proliferative and invasion abilities were determined by MTT assay and Transwell assay, and the changes in expressions of the proteins associated with the JAK/STAT3 signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition (EMT) process were determined by Western blot. Finally, functional rescue experiment was performed using the JAK/STAT3 pathway agonist leukemia inhibitory factor (LIF) for validation.

Results: The expressions of MCM3AP-AS1 in all cholangiocarcinoma cell lines were significantly higher than that in HIBEC (all $P < 0.05$). In CCLP cells after transfection with MCM3AP-AS1 siRNA compared with negative control, the proliferative and invasion abilities were significantly decreased (both $P < 0.05$); the expression levels of JAK1/2 and STAT3 showed no significant changes (both $P > 0.05$), but the expression levels of p-JAK1/2 and p-STAT3 were significantly decreased (both $P < 0.05$), and meanwhile, the expression of EMT-related protein E-cadherin was increased and vimentin was decreased (both $P < 0.05$). The results of functional rescue experiment showed that the effects of MCM3AP-AS1 silencing on CCLP cells were all abolished by simultaneous addition of LIF, and all parameters had no significant differences with those in negative control group (all $P > 0.05$).

Conclusion: The expression MCM3AP-AS1 is up-regulated in cholangiocarcinoma cells, and it promotes the cell proliferation and invasion of the cholangiocarcinoma cells probably through activating the JAK/STAT3 signaling pathway and EMT process.

Key words

Bile Duct Neoplasms; RNA, Long Noncoding; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.8

胆管癌是一种起源于胆管上皮细胞的癌症，根据解剖位置可分为肝内、肝外和肝门部胆管癌^[1]。尽管胆管癌是一种少见的癌症，但近几十年来，其发病率和病死率在全球范围内迅速增加^[2]。胆管癌恶性程度高，手术是唯一有效的治疗方法，但只有15%的胆管癌患者接受手术治疗^[3]。胆管癌患者确诊后的总生存时间仅6~24个月，胆管癌患者术后中位生存时间为27~36个月^[4]。鉴于此，探讨胆管癌发病的分子机制对明确诊断及改善预后尤为重要^[5]。长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一种长度大于200个核苷酸不编码蛋白质的RNA，其是癌症细胞增殖、迁移、侵

袭、凋亡、自噬和耐药性等细胞生物学过程中的关键调控因子^[6-7]。lncRNA MCM3AP-AS1 (MCM3AP-AS1) 是最新发现的lncRNA。在原发性肝细胞癌^[8]、乳腺癌^[9]中上调表达，并调控癌细胞增殖和侵袭等过程。尽管如此，MCM3AP-AS1在胆管癌中的表达、功能及作用机制尚知之甚少。本研究旨在胆管癌细胞系中研究MCM3AP-AS1的表达及对细胞增殖和侵袭的影响，并探讨其余Janus激酶 (Janus kinase, JAK) /信号转导子和转录活化子3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路以及上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的关系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

胆管癌细胞株 (CCLP、RBE、9810、HuCCT1) 及人肝内胆管上皮细胞株 HIBEC (普诺赛公司, 中国武汉)、RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司, 美国)、TRIzol 试剂 (Thermo Fisher Scientific 公司)、Nano Drop ND-1000 紫外/可见光度计 (Thermo Fisher Scientific 公司)、蛋白印迹试剂盒 (上海碧云天生物公司)、MTT 细胞增殖试剂盒 (日本 Dojindo 公司)、Transwell 试剂盒 (中国 Corning 公司)、E-cadherin 一抗 (美国 Santa Cruz 公司)、vimentin 一抗 (美国 cell signaling 公司)、STAT3 及 p-STAT3 一抗 (美国 BD 公司)、JAK1/2 及 p-JAK1/2 一抗 (美国 abcam 公司)、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 购自美国 Sigma 公司、GAPDH 一抗 (武汉博士德生物公司)、羊抗兔二抗 (武汉博士德生物公司)、Lipofectamine™3000 转染试剂购自美国 Thermo Scientific 公司、qRT-PCR SuperMix 试剂盒购自碧云天生物公司。MCM3AP-AS1 引物序列由上海生物工程技术有限公司设计并合成, 针对 MCM3AP-AS1 设计的短干扰 RNA (siRNA) 和其阴性对照序列 (MCM3AP-AS1 无义序列) 均由上海生物工程技术有限公司提供, 序列正向: 5'-CCC TCA GGT GAC TAC AGA T-3', 反向: 5'-GCA ACA TGC TTC ACT GTCT-3'。MCM3AP-AS1 对照无义序列为 5'-GAG CAG ATA GCT GAA GAG AGA-3'。

1.2 细胞培养及分组

胆管癌细胞株 (CCLP、RBE、9810、HuCCT1) 及 HIBEC 均培养于含胎牛血清的培养基中, 并在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。对 CCLP 细胞系添加 5 μL Lipofectamine™ 3000 转染试剂, 分别转染 MCM3AP-AS1 短干扰 RNA (siRNA) 和阴性对照序列 (MCM3AP-AS1 无义序列), 并分成 MCM3AP-AS1 沉默组和阴性对照组, 培养 6 h 后, 测定转染效率。后期功能拯救实验中, 在 MCM3AP-AS1 沉默组中加入 JAK/STAT3 通路激动剂 LIF, CCLP 细胞依此分为 3 组: 阴性对照组、MCM3AP-AS1 沉默组和 MCM3AP-AS1 沉默+LIF 组。

1.3 RNA 提取和 qRT-PCR

采用 TRIzol 试剂盒分别从各组细胞中提取总

RNA。Nano Drop ND-1000 紫外/可见光度计用于评估 RNA 纯度。使用实时 PCR 仪器测定各组 MCM3AP-AS1 相对表达量。MCM3AP-AS1 qRT-PCR 引物序列正向: 5'-CAC ACG CAT GGA AAA CCC AG-3', 反向: 5'-GAG GAC CTG AGC TGT AAG CC-3', 内参 GAPDH 引物序列正向: 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3', 反向: 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAG-3'。2^{-ΔΔCT} 法用于计算 MCM3AP-AS1 相对表达量, 每次实验重复 3 次, 取平均值。

1.4 MTT 法检测细胞增殖

MTT 实验用于评估细胞增殖能力, 先将 MCM3AP-AS1 沉默组和阴性对照组培养于 96 孔板中 (3×10³/孔), 然后在 0、24、48、72 h 后加入 100 μL MTT 试剂, 在 DYNEX MUM 酶标仪下测定每组在 490 nm 处的吸光度值 (A_{490 nm})。后期拯救实验中, 在 MCM3AP-AS1 沉默组、阴性对照组及 MCM3AP-AS1 沉默+LIF 组中分别加入 100 μL MTT 试剂, 并测定 A_{490 nm} 值。绘制细胞增殖曲线。

1.5 Transwell 实验测定细胞侵袭能力

细胞侵袭能力评估采用 Transwell 实验, 实验前将 20 μL 混合液 (1:8 matrigel 胶:培养基) 添加至上室, 在 37℃ 下保持 30 min, 然后将 200 μL 无 FBS 培养基的 4×10⁴ 个细胞填于上室, 700 μL 10% FBS 培养基填于下室, 然后按每组 1×10⁵ 个细胞加入上室, 37℃ 孵育 48 h 后, 结晶紫染色并在倒置显微镜下计数穿膜细胞数, 每次实验重复 3 次, 取均值。

1.6 Western blot 测定蛋白表达量

将 MCM3AP-AS1 沉默组和阴性对照组细胞培养至对数期后, 裂解细胞并加入蛋白酶抑制剂, 将蛋白沸水中高温变性, 测定蛋白浓度, 并按 60 μg/孔蛋白样品上样电泳, 恒压 80 V 30 min, 100 V 2 h, 溴酚蓝跑到底即可。随后, 切胶并转膜至 PVDF 膜。在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 在 4℃ 下分别与 E-cadherin 一抗 (1:300)、vimentin 一抗 (1:200)、STAT3 及 p-STAT3 一抗 (1:400)、JAK1/2 及 p-JAK1/2 一抗 (1:300)、GAPDH 一抗 (1:400) 在 4℃ 下孵育过夜, 用 TBST 缓冲液漂洗 10 min, 漂洗 3 次。加入羊抗鼠二抗 (1:900) 在室温下孵

育1 h, 随后用TBST缓冲液漂洗10 min, 漂洗3次。加ECL液至PVDF膜上, 在暗室下曝光, 用Image J软件计算目标条带的灰度值, 目的蛋白表达量=目的条带灰度值/GAPDH条带灰度值。

1.7 统计学处理

使用Prism Graphpad 8.0软件进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间的比较采用单因素方差分析, 在有统计学意义的基础上, 两组间的比较采用LSD-T检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MCM3AP-AS1在胆管癌细胞系中上调表达

qRT-PCR结果示, 胆管癌细胞系CCLP、RBE、9810及HuCCT1中MCM3AP-AS1表达量分别为 7.1 ± 0.4 、 6.8 ± 0.4 、 6.6 ± 0.2 及 6.4 ± 0.3 , HIBEC中MCM3AP-AS1表达量为 1.5 ± 0.2 , 胆管癌细胞系CCLP、RBE、9810及HuCCT1中MCM3AP-AS1表达量高于HIBEC(均 $P < 0.05$)(图1), 本研究采用胆管癌细胞系CCLP行后续功能实验。

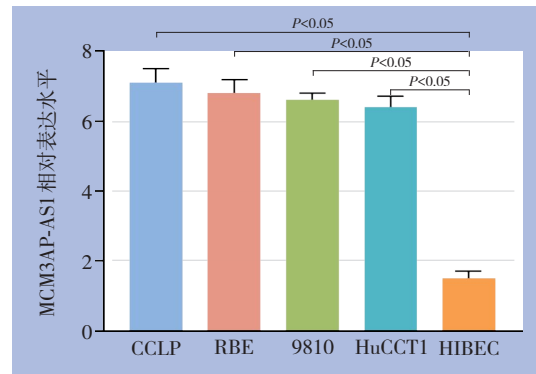


图1 MCM3AP-AS1在胆管癌细胞系和正常肝内胆管上皮细胞系中的表达比较

Figure 1 Comparison of the expressions of MCM3AP-AS1 in cholangiocarcinoma cell lines and normal intrahepatic bile duct epithelial cell line

2.2 下调MCM3AP-AS1表达对胆管癌细胞增殖的影响

qRT-PCR结果显示, CCLP细胞系转染siRNA-MCM3AP-AS1后, MCM3AP-AS1沉默组的MCM3AP-AS1表达量低于阴性对照组(1.8 ± 0.1 vs. 7.1 ± 0.3 , $P < 0.05$), 提示转染成功, 可行后续实验(图2A)。MTT实验结果显示, 下调MCM3AP-AS1表达后, MCM3AP-AS1沉默组在转染后24、48、72 h, A490 nm值低于阴性对照组(均 $P < 0.05$)(图2B)。

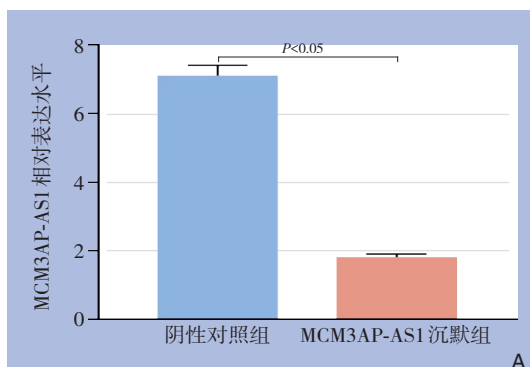
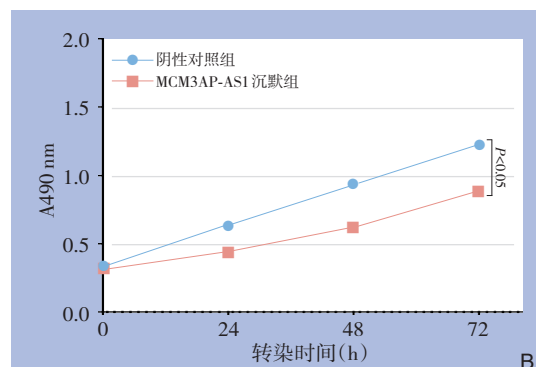


图2 下调MCM3AP-AS1表达对胆管癌细胞增殖的影响

A: MCM3AP-AS1沉默效率测定; B: 阴性对照组与MCM3AP-AS1沉默组增殖曲线比较

Figure 2 The effect of down-regulation of MCM3AP-AS1 expression on the proliferation of cholangiocarcinoma cells

A: MCM3AP-AS1 silencing efficiency assay; B: Comparison of the proliferation curves between negative control group and MCM3AP-AS1 silencing group



2.3 下调 MCM3AP-AS1 表达对胆管癌细胞侵袭的影响

Transwell 实验结果显示, MCM3AP-AS1 沉默组

的侵袭细胞数为 140.3 ± 10.2 , 阴性对照组侵袭细胞数为 270.3 ± 11.4 , MCM3AP-AS1 沉默组的侵袭细胞数少于阴性对照组 ($P < 0.05$) (图3)。

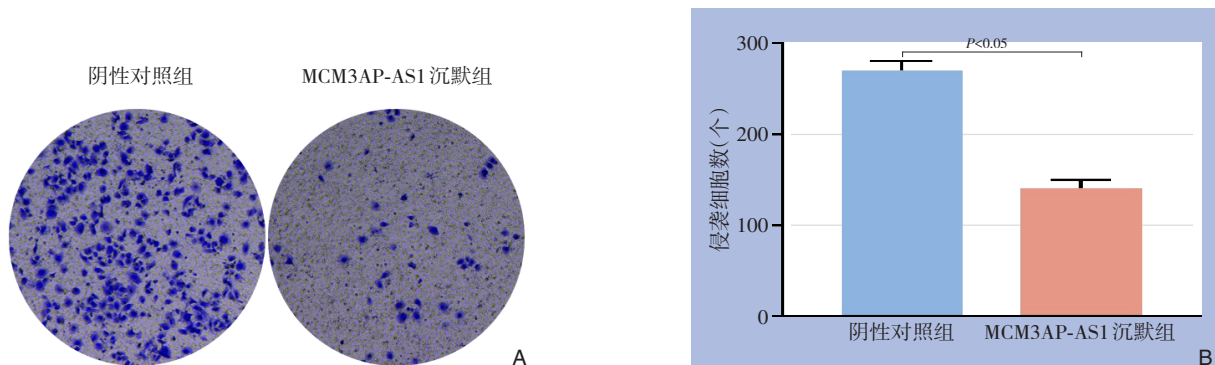


图3 下调 MCM3AP-AS1 表达对胆管癌细胞侵袭的影响 A: MCM3AP-AS1 沉默组与阴性对照组的 Transwell 实验比较; B: MCM3AP-AS1 沉默组与阴性对照组侵袭细胞数比较

Figure 3 The effect of down-regulation of MCM3AP-AS1 expression on the invasion of cholangiocarcinoma cells

A: Comparison of Transwell assay between MCM3AP-AS1 silencing group and negative control group; B: Comparison of the number of invasive cells between MCM3AP-AS1 silencing group and negative control group

2.4 下调 MCM3AP-AS1 表达对胆管癌细胞 JAK/STAT 信号通路及 EMT 蛋白的影响

Western blot 结果显示, MCM3AP-AS1 沉默组 STAT3 表达量与阴性对照组差异无统计学意义 (1.32 ± 0.11 vs. 1.32 ± 0.12 , $P > 0.05$), MCM3AP-AS1 沉默组 p-STAT3 表达量低于阴性对照组 (0.51 ± 0.07 vs. 1.80 ± 0.12 , $P < 0.05$)。MCM3AP-AS1 沉默组 JAK1/2 表达量与阴性对照组差异无统计学意义

(1.27 ± 0.16 vs. 1.22 ± 0.13 , $P > 0.05$), MCM3AP-AS1 沉默组 p-JAK1/2 表达量低于阴性对照组 (0.64 ± 0.08 vs. 1.91 ± 0.19 , $P < 0.05$)。MCM3AP-AS1 沉默组 E-cadherin 表达量高于阴性对照组 (1.81 ± 0.04 vs. 0.42 ± 0.03 , $P < 0.05$), MCM3AP-AS1 沉默组 vimentin 表达量低于阴性对照组 (0.61 ± 0.07 vs. 1.41 ± 0.17 , $P < 0.05$) (图4)。

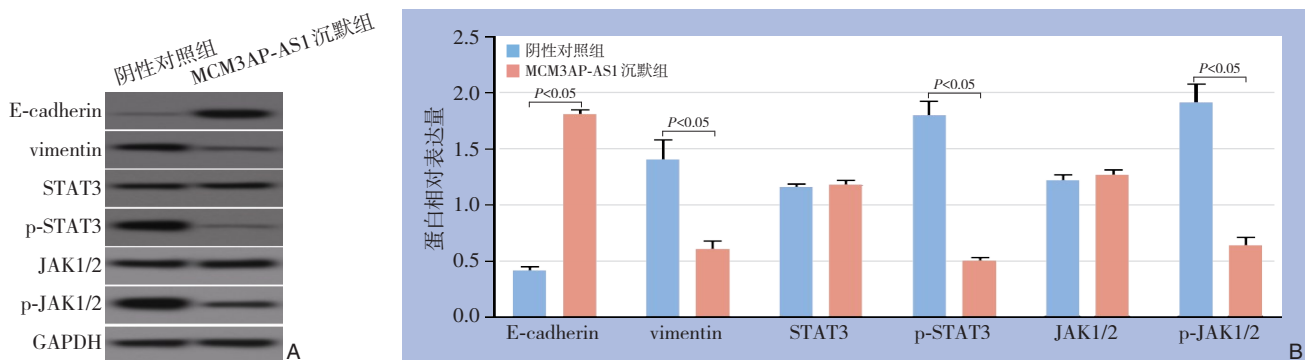


图4 下调 MCM3AP-AS1 表达对胆管癌细胞 JAK/STAT 信号通路及 EMT 相关蛋白的影响 A: Western blot 结果; B: 蛋白表达量比较

Figure 4 The effect of down-regulation of MCM3AP-AS1 on expressions of proteins associated with the JAK/STAT3 signaling pathway and EMT process in cholangiocarcinoma cells A: Western blot results; B: Comparison of the protein expression levels

2.5 JAK/STAT3 通路激动剂 LIF 拯救实验对胆管癌细胞增殖的影响

MTT 实验示, 转染后 24、48、72 h, 阴性对照组和 MCM3AP-AS1 沉默+LIF 组 A490 nm 值差异无统计学意义 (均 $P>0.05$), MCM3AP-AS1 沉默组 A490 nm 值低于阴性对照组 (均 $P<0.05$) (图 5)。

2.6 JAK/STAT3 通路激动剂 LIF 拯救实验对胆管癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 实验示, 阴性对照组和 MCM3AP-AS1 沉默+LIF 组侵袭细胞数差异无统计学意义 [(270.4 ± 10.8) 个 vs. (265.4 ± 11.6) 个, $P>0.05$], MCM3AP-AS1 沉默组侵袭细胞数少于阴性对照组 [(141.5 ±

12.5) 个 vs. (270.4 ± 10.8) 个, $P<0.05$] (图 6)。

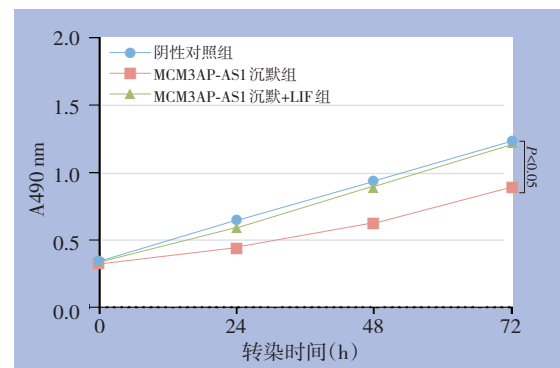


图 5 各组不同时间点增殖能力的比较

Figure 5 Comparison of proliferation abilities of three groups at different time points

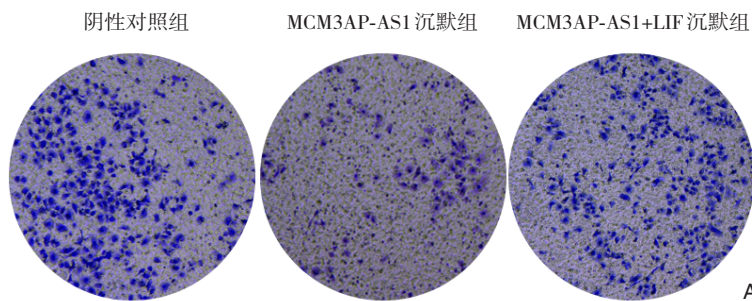
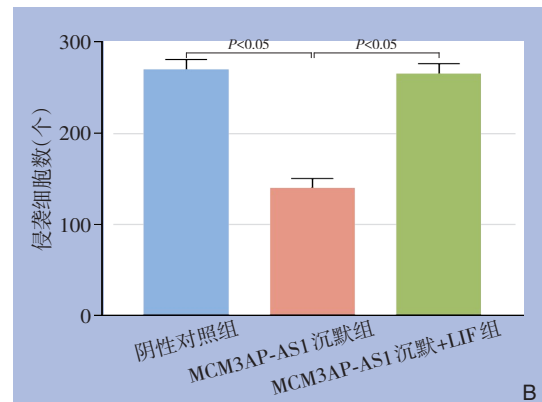


图 6 各组侵袭能力的比较 A: 各组 Transwell 实验结果比较; B: 各组侵袭细胞数比较

Figure 6 Comparison of the invasion abilities among the three groups A: Comparison of the results of Transwell assay among the three groups; B: Comparison of the numbers of invasive cells among the three groups



3 讨论

胆管癌是起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤, 具有症状隐匿、恶性程度高的特点, 确诊时常处于中晚期, 除手术治疗外, 其他治疗方式疗效有限, 预后差^[10-12]。现代肿瘤学发现, 肿瘤的发生及进展涉及一系列关键分子的异常表达, 包括 lncRNA CBR3-AS1^[13]、lncRNA MCM3AP-AS1、lncRNA RP1-85F18.6^[14]等。

MCM3AP-AS1 基因定位于人染色体 6p22.3 位点上。文献报道 MCM3AP-AS1 在多种肿瘤中起促癌基因的作用, 在原发性肝癌^[8]中 MCM3AP-AS1 表达水平上调, 且可通过调控 miR-194-5p/FOXA1 轴而促进癌症发生和进展; MCM3AP-AS1 在乳腺癌^[9]中上调表达, 并通过调节 miR-28-5p/CENPF 轴促进癌细胞增殖和侵袭; 在胶质母细胞瘤^[15]中发现癌

组织和体外培养的癌细胞系中 MCM3AP-AS1 表达水平上调。本研究发现胆管癌细胞系中 MCM3AP-AS1 中表达水平显著高于 HIBEC, 这与文献^[8-9]报道结果类似。进一步通过 RNA 干扰技术沉默胆管癌细胞系中 MCM3AP-AS1 表达水平, 细胞功能实验发现 MCM3AP-AS1 表达下调后, 胆管癌细胞增殖和侵袭能力受到显著抑制, 上述结果显示下调 MCM3AP-AS1 表达水平可显著抑制胆管癌细胞的恶性行为。在甲状腺乳头状癌^[16]中采用 RNA 干扰技术沉默 MCM3AP-AS1 表达水平后, 体外培养的甲状腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力显著下降, 癌细胞凋亡比例增加。在胰腺癌^[17]中, 癌组织和癌细胞系中 MCM3AP-AS1 表达水平上调, 同时沉默 MCM3AP-AS1 表达后胰腺癌细胞增殖和侵袭能力下降, 且凋亡水平增加, 其机制是 MCM3AP-AS1 通过调控 miR-138-5p 降低 FOXK1 基因表达水平。在卵巢上皮细

胞癌^[18]中MCM3AP-AS1表达水平上调后可通过调节miR-143-3p/TAK1轴而促进癌症进展。综合文献报道和本研究结果,提示MCM3AP-AS1在多种不同类型癌症中发挥癌基因功能,下调MCM3AP-AS1表达可显著抑制癌细胞增殖和侵袭。

胆管癌细胞增殖和侵袭与细胞内信号通路激活密切相关^[19],目前已知JAK/STAT3信号转导级联反应与胆管癌恶性进展密切相关,特别是STAT3作为一种转录因子,可调节转移相关基因(如血管内皮生长因子)、细胞间黏附分子1和基质金属蛋白酶9表达,加速癌症侵袭和转移^[20-21]。JAK/STAT3信号通路是细胞因子信号传导的下游通路,调控细胞发育、增殖、凋亡及侵袭,是包括胆管癌在内的多种肿瘤发生和进展的关键信号通路^[22-23]。文献^[24]报道在胆管癌中膜联蛋白10可促进EMT和激活STAT3,进而促进癌症进展。在胆管癌中miR-490-3p也可通过抑制STAT3/VEGFA信号通路活性而抑制细胞增殖和血管生成^[25]。事实上,lncRNA和JAK/STAT3关系密切,在结直肠癌^[26]中下调lncRNA ITIH4-AS1可抑制JAK/STAT3信号通路从而抑制细胞增殖和侵袭,且可被JAK/STAT3激动剂LIF所拯救。在宫颈癌^[27]中敲低lncRNA LINC00518可抑制JAK/STAT3信号通路,从而抑制癌细胞增殖和转移。本研究探讨了胆管癌细胞系中MCM3AP-AS1表达与JAK/STAT3信号通路间的关系,结果显示下调MCM3AP-AS1表达后磷酸化JAK1/2和磷酸化-STAT3蛋白表达水平显著降低,当加入LIF后,可部分恢复下调MCM3AP-AS1表达对胆管癌细胞增殖和侵袭的抑制作用,这与结直肠癌及宫颈癌中的结果类似。

JAK/STAT3与EMT过程有着密切的调控关系。在TGF- β 、IL-6等细胞因子的刺激下,JAK-STAT3级联激活,STAT3磷酸化及二聚体化,并进入到细胞核,激活EMT过程的关键转录因子Snail、Zeb1及Twist-1,并最终导致EMT的发生^[28]。目前公认EMT过程在胆管癌发生和进展过程发挥关键作用,EMT过程赋予细胞迁移和侵袭能力,其中EMT过程中间质相关蛋白过度表达是促进胆管癌进展和转移的重要驱动因素,也是反映胆管癌不良预后的重要因素^[29]。文献^[30]报道在非小细胞肺癌中,通过上调MCM3AP-AS1表达可显著促进EMT过程,加速癌细胞增殖和侵袭,抑制凋亡,且这种作用可

通过上调miR-195-5p表达而逆转,即下调MCM3AP-AS1表达后,体外培养的A549细胞EMT过程受到抑制,癌细胞凋亡比例增加。上述结果提示MCM3AP-AS1可调控EMT过程而参与癌细胞恶性行为。本研究结果也发现下调MCM3AP-AS1后可抑制胆管癌EMT过程,即上皮相关蛋白E-cadherin表达水平增加,而间质相关蛋白vimentin表达水平下降,沉默MCM3AP-AS1表达进而抑制胆管癌侵袭过程可能与EMT过程受抑制有关。

由于本研究只是体外研究,不可避免存在一定的不足,首先,MCM3AP-AS1在胆管癌组织中的表达及预后价值值得进一步研究;其次,MCM3AP-AS1在模式动物中的功能也值得深入研究;最后,本研究只在功能上研究了加入LIF后细胞增殖和侵袭功能的改变,未在通路蛋白水平上进一步研究,这仍需进一步深入。

综上所述,MCM3AP-AS1在胆管癌细胞表达上调并发挥致癌基因功能,下调MCM3AP-AS1表达可通过抑制EMT和JAK/STAT3信号通路活性而抑制细胞增殖和侵袭,下调MCM3AP-AS1表达可能有望成为胆管癌治疗的新策略。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Brindley PJ, Bachini M, Ilyas SI, et al. Cholangiocarcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7:65. doi: 10.1038/s41572-021-00300-2.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21654.
- [3] Beal EW, Cloyd JM, Pawlik TM. Surgical treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: current and emerging principles[J]. J Clin Med, 2020, 10(1):104. doi: 10.3390/jcm10010104.
- [4] Hue JJ, Rocha FG, Ammori JB, et al. A comparison of surgical resection and liver transplantation in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma in the era of modern chemotherapy: an analysis of the National Cancer Database[J]. J Surg Oncol, 2021, 123(4):949-956. doi: 10.1002/jso.26370.
- [5] Manzia TM, Parente A, Lenci I, et al. Moving forward in the treatment of cholangiocarcinoma[J]. World J Gastrointest Oncol, 2021, 13(12):1939-1955. doi: 10.4251/wjgo.v13.i12.1939.
- [6] Merdrignac A, Papoutsoglou P, Coulouarn C. Long noncoding RNAs in cholangiocarcinoma[J]. Hepatology, 2021, 73(3): 1213-1226. doi: 10.1002/hep.31534.

- [7] Jiang FR, Ling XF. The advancement of long non-coding RNAs in cholangiocarcinoma development[J]. *J Cancer*, 2019, 10(11):2407–2414. doi: [10.7150/jca.32411](https://doi.org/10.7150/jca.32411).
- [8] Wang YF, Yang L, Chen TX, et al. A novel lncRNA MCM3AP-AS1 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-194-5p/FOXA1 axis[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):28. doi: [10.1186/s12943-019-0957-7](https://doi.org/10.1186/s12943-019-0957-7).
- [9] Chen Q, Xu HC, Zhu J, et al. LncRNA MCM3AP-AS1 promotes breast cancer progression via modulating miR-28-5p/CENPF axis[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2020, 128: 110289. doi: [10.1016/j.biopha.2020.110289](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110289).
- [10] Khan SA, Tavolari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors[J]. *Liver Int*, 2019, 39(Suppl 1):19–31. doi: [10.1111/liv.14095](https://doi.org/10.1111/liv.14095).
- [11] 范焯, 季顾惟, 许正刚, 等. 梯度提升机模型在肝内胆管癌手术预后预测中应用价值研究[J]. *中国实用外科杂志*, 2022, 42(2):172–178. doi: [10.19538/j.cjps.issn1005-2208.2022.02.10](https://doi.org/10.19538/j.cjps.issn1005-2208.2022.02.10).
- Fan Y, Ji GW, Xu ZG, et al. Application value of gradient boosting machine model for predicting prognosis after resection of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Chinese Journal of Practical Surgery*, 2022, 42(2): 172–178. doi: [10.19538/j.cjps.issn1005-2208.2022.02.10](https://doi.org/10.19538/j.cjps.issn1005-2208.2022.02.10).
- [12] 陈潇远, 毛凉, 杨翼飞, 等. 5种淋巴结转移分期标准预测肝门部胆管癌预后的应用价值[J]. *中华消化外科杂志*, 2021, 20(1):110–117. doi: [10.3760/cma.j.cn115610-20201208-00767](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn115610-20201208-00767).
- Chen XY, Mao L, Yang YF, et al. Application value of five lymph node staging methods in predicting prognosis of perihilar cholangiocarcinoma[J]. *Chinese Journal of Digestive Surgery*, 2021, 20(1): 110–117. doi: [10.3760/cma.j.cn115610-20201208-00767](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn115610-20201208-00767).
- [13] 吕波, 朱新锋, 蔡常春, 等. 长链非编码RNA CBR3-AS1在胆管癌中的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2020, 28(8):960–966. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2019.08.008](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2019.08.008).
- Lu B, Zhu XF, Cai CC, et al. Expression of long non-coding RNA CBR3-AS1 in cholangiocarcinoma and its clinical significance[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2020, 28(8): 960–966. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2019.08.008](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2019.08.008).
- [14] 程虎, 刘名奎. 长链非编码RNA RP1-85F18.6在乳腺癌细胞中的表达及其对增殖和细胞周期的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2020, 29(5):549–555. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2020.05.005](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2020.05.005).
- Cheng H, Liu MK. Expression of long non-coding RNA RP1-85F18.6 in breast cancer cells and its influence on proliferation and cell cycle control[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2020, 29(5):549–555. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2020.05.005](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2020.05.005).
- [15] Yang CQ, Zheng J, Xue YX, et al. The effect of MCM3AP-AS1/miR-211/KLF5/AGGF1 axis regulating glioblastoma angiogenesis[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10:437. doi: [10.3389/fnmol.2017.00437](https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00437).
- [16] Liang MH, Jia JL, Chen LL, et al. LncRNA MCM3AP-AS1 promotes proliferation and invasion through regulating miR-211-5p/SPARC axis in papillary thyroid cancer[J]. *Endocrine*, 2019, 65(2): 318–326. doi: [10.1007/s12020-019-01939-4](https://doi.org/10.1007/s12020-019-01939-4).
- [17] Yang M, Sun SJ, Guo Y, et al. Long non-coding RNA MCM3AP-AS1 promotes growth and migration through modulating FOXK1 by sponging miR-138-5p in pancreatic cancer[J]. *Mol Med*, 2019, 25(1):55. doi: [10.1186/s10020-019-0121-2](https://doi.org/10.1186/s10020-019-0121-2).
- [18] Wen J, Han SM, Cui M, et al. Long non-coding RNA MCM3AP-AS1 drives ovarian cancer progression via the microRNA-143-3p/TAK1 axis[J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(4): 1375–1384. doi: [10.3892/or.2020.7694](https://doi.org/10.3892/or.2020.7694).
- [19] Ntanasis-Stathopoulos I, Tsilimigras DI, Gavriatopoulou M, et al. Cholangiocarcinoma: investigations into pathway-targeted therapies[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2020, 20(9): 765–773. doi: [10.1080/14737140.2020.1807333](https://doi.org/10.1080/14737140.2020.1807333).
- [20] Zhou ZJ, Wang PC, Sun RQ, et al. Tumor-associated neutrophils and macrophages interaction contributes to intrahepatic cholangiocarcinoma progression by activating STAT3[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(3): e001946. doi: [10.1136/jitc-2020-001946](https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001946).
- [21] Ke FY, Wang Z, Song XL, et al. Cryptotanshinone induces cell cycle arrest and apoptosis through the JAK2/STAT3 and PI3K/Akt/NFκB pathways in cholangiocarcinoma cells[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11:1753–1766. doi: [10.2147/DDDT.S132488](https://doi.org/10.2147/DDDT.S132488).
- [22] Yang XW, Li L, Hou GJ, et al. STAT3 overexpression promotes metastasis in intrahepatic cholangiocarcinoma and correlates negatively with surgical outcome[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5):7710–7721. doi: [10.18632/oncotarget.13846](https://doi.org/10.18632/oncotarget.13846).
- [23] Han P, Shang J, Chen DL, et al. Baicalein mediates anticancer effect on cholangiocarcinoma through co-targeting the AKT/NF-κB and STAT3 signaling pathway[J]. *Process Biochem*, 2021, 102:304–314. doi: [10.1016/j.procbio.2021.01.017](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.01.017).
- [24] Sun RQ, Liu ZL, Qiu B, et al. Annexin10 promotes extrahepatic cholangiocarcinoma metastasis by facilitating EMT via PLA2G4A/PGE2/STAT3 pathway[J]. *EBioMedicine*, 2019, 47: 142–155. doi: [10.1016/j.ebiom.2019.08.062](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.062).
- [25] Leng KM, Xu Y, Kang PC, et al. Akirin2 is modulated by miR-490-3p and facilitates angiogenesis in cholangiocarcinoma through the IL-6/STAT3/VEGFA signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(4):262. doi: [10.1038/s41419-019-1506-4](https://doi.org/10.1038/s41419-019-1506-4).
- [26] Liang CJ, Zhao TJ, Li HJ, et al. Long non-coding RNA ITIH4-AS1 accelerates the proliferation and metastasis of colorectal cancer by activating JAK/STAT3 signaling[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019,

- 18:183-193. doi: [10.1016/j.omtn.2019.08.009](https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.08.009).
- [27] Wang DW, You D, Dong J, et al. Knockdown of long non-coding RNA LINC00518 inhibits cervical cancer proliferation and metastasis by modulating JAK/STAT3 signaling[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(2): 496-506. doi: [10.26355/eurrev_201901_16861](https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16861).
- [28] Gong CJ, Shen J, Fang ZJ, et al. Abnormally expressed JunB transactivated by IL-6/STAT3 signaling promotes uveal melanoma aggressiveness via epithelial-mesenchymal transition[J]. Biosci Rep, 2018, 38(4):BSR20180532. doi: [10.1042/BSR20180532](https://doi.org/10.1042/BSR20180532).
- [29] Liu Q, Rao X, Cai HX, et al. Expression of EMT-related factors in intrahepatic cholangiolithiasis associated cholangiocarcinoma and its clinical significance[J]. J Cancer Ther, 2021, 12(6): 337-345. doi: [10.4236/jct.2021.126030](https://doi.org/10.4236/jct.2021.126030).
- [30] Shen DJ, Li JQ, Tao KY, et al. Long non-coding RNA MCM3AP antisense RNA 1 promotes non-small cell lung cancer progression through targeting microRNA-195-5p[J]. Bioengineered, 2021, 12(1):3525-3538. doi: [10.1080/21655979.2021.1950282](https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1950282).

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:李博,赵强子,黎建军.长链非编码RNA MCM3AP-AS1在胆管癌细胞中的表达及其功能[J].中国普通外科杂志,2022,31(8):1039-1047. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2022.08.007](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.08.007)

Cite this article as: Li B, Zhao QZ, Li JJ. Expression of long non-coding RNA MCM3AP-AS1 in cholangiocarcinoma cells and its function[J]. Chin J Gen Surg, 2022, 31(8):1039-1047. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2022.08.007](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.08.007)

欢迎订阅《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》是国内外公开发行的国家级期刊[ISSN 1005-6947 (Print) /ISSN 2096-9252 (Online) /CN 43-1213/R], 面向广大从事临床、教学、科研的普外及相关领域工作者, 以实用性为主, 及时报道普通外科领域的新进展、新观点、新技术、新成果、实用性临床研究及临床经验, 是国内普外学科的权威刊物之一。办刊宗旨是: 传递学术信息, 加强相互交流; 提高学术水平, 促进学科发展; 注重临床研究, 服务临床实践。

本刊由中华人民共和国教育部主管, 中南大学、中南大学湘雅医院主办。主编中南大学湘雅医院王志明教授, 顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴咸中、汪忠镐、郑树森、黎介寿、赵玉沛、夏家辉等多位国内外著名普通外科专家担任, 编辑委员会由百余名国内外普通外科资深专家学者和三百余名中青年编委组成。开设栏目有指南与共识、述评、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、文献综述、误诊误治与分析、手术经验与技巧、国内外学术动态、病案报告。本刊已被多个国内外重要检索系统和大型数据库收录, 如: 美国化学文摘(CA)、俄罗斯文摘(AJ)、日本科学技术振兴集团(中国)数据库(JSTChina)、中国科学引文数据库(CSCD)、中文核心期刊要目总览(中文核心期刊)、中国科技论文与引文数据库(中国科技论文统计源期刊)、中国核心学术期刊(RCCSE)、中国学术期刊(光盘版)、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)、中国期刊网全文数据库(CNKI)、中文科技期刊数据库、中文科技资料目录(医药卫生)、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、万方数据-数字化期刊群、中国学术期刊影响因子年报统计源期刊、中国生物医学文献检索系统(CBM-disc 光盘版、网络版)等。期刊总被引频次、影响因子及综合评分已稳居同类期刊前列。在科技期刊评优评奖活动中多次获奖; 继2017年10月获“第4届中国精品科技期刊”之后, 2020年12月再次入选“第5届中国精品科技期刊”; 入选《世界期刊影响力指数(WJCI)报告》(2019、2020版), 2020年入选中国科协我国高质量科技期刊(临床医学)分级目录。多次获奖后又被评为“2020年度中国高校百佳科技期刊”, 2021年获湖南省委宣传部、湖南省科技厅“培育世界一流湘版科技期刊建设工程项目(梯队期刊)”资助, 标志着《中国普通外科杂志》学术水平和杂志影响力均处于我国科技期刊的第一方阵。

本刊已全面采用远程投稿、审稿、采编系统, 出版周期短, 时效性强。欢迎订阅、赐稿。

《中国普通外科杂志》为月刊, 国际标准开本(A4幅面), 每期140页, 每月25日出版。内芯采用彩色印刷, 封面美观大方。定价30.0元/册, 全年360元。国内邮发代号: 42-121; 国际代码: M-6436。编辑部可办理邮购。

本刊编辑部全体人员, 向长期以来关心、支持、订阅本刊的广大作者、读者致以诚挚的谢意!

编辑部地址: 湖南省长沙市湘雅路87号(湘雅医院内) 邮政编码: 410008

电话(传真): 0731-84327400 网址: <http://www.zpwz.net>

Email: pw84327400@vip.126.com

中国普通外科杂志编辑部