

lncRNA 尿路上皮癌胚抗原1对人胃肠道间质瘤细胞失巢凋亡的 调控作用及其机制

赵宇¹, 何小双², 董晓寅¹, 高丰毅¹, 何家康¹

(1. 石河子大学第一附属医院胃肠外科, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 新疆 石河子 832000)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码RNA (lncRNA) 尿路上皮癌胚抗原1 (UCA1) 对人胃肠道间质瘤 (GIST) 细胞失巢凋亡的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 分别于贴壁和失巢状态下培养GIST细胞株GIST-T1并诱导失巢凋亡抵抗的GIST-T1细胞, 采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测2种细胞中lncRNA UCA1表达, Western blotting法检测细胞中自噬标志物微管相关蛋白轻链3 (LC3)-I、LC3-II和p62表达水平, 并计算LC3-II/LC3-I比值。采用敲减lncRNA UCA1或阴性对照慢病毒感染GIST-T1细胞并给予自噬激活剂雷帕霉素 (RAPA) 干预, 将GIST-T1细胞分为对照组、sh-NC组、sh-UCA1组、sh-NC+RAPA组和sh-UCA1+RAPA组, 并对细胞进行失巢诱导。采用流式细胞术检测各组细胞失巢凋亡率, Western blotting法检测各组细胞中LC3-I、LC3-II和p62蛋白表达水平, 细胞计数试剂盒8 (CCK-8) 法检测各组细胞增殖活性, 细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合率, Transwell小室实验检测各组细胞的侵袭细胞数。收集sh-NC组和sh-UCA1组GIST-T1细胞, 分别通过尾静脉注射建立2组裸鼠移植瘤模型, 4周后采用荧光活体成像仪检测2组裸鼠体内肿瘤生长和肝脏转移情况, 测量2组裸鼠肿瘤组织质量。采用TUNEL染色法观察2组裸鼠肿瘤组织中细胞凋亡情况, 免疫组织化学染色法检测2组裸鼠肿瘤组织中LC3B和p62蛋白表达水平。**结果:** 与贴壁培养的GIST-T1细胞比较, 失巢凋亡抵抗的GIST-T1细胞中lncRNA UCA1表达水平明显升高 ($P<0.05$), LC3-II/LC3-I比值明显升高 ($P<0.05$), p62蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。与sh-NC组比较, sh-UCA1组GIST-T1细胞失巢凋亡率明显升高 ($P<0.05$), LC3-II/LC3-I比值明显降低 ($P<0.05$), p62蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), 细胞增殖活性和划痕愈合率明显降低 ($P<0.05$), 侵袭细胞数明显减少 ($P<0.05$); 与sh-UCA1组比较, sh-UCA1+RAPA组GIST-T1细胞失巢凋亡率明显降低 ($P<0.05$), LC3-II/LC3-I比值明显升高 ($P<0.05$), p62蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$), 细胞增殖活性和划痕愈合率明显升高 ($P<0.05$), 侵袭细胞数明显增加 ($P<0.05$)。与sh-NC组比较, sh-UCA1组裸鼠肝组织荧光强度减弱, 肿瘤质量明显降低 ($P<0.05$), 肿瘤组织中细胞凋亡率明显升高 ($P<0.05$), LC3B蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$), p62蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$)。**结论:** lncRNA UCA1在失巢凋亡抵抗的GIST-T1细胞中高表达, 下调其表达可通过降低自噬水平来促进GIST-T1细胞失巢凋亡, 从而抑制细胞生长、迁移和侵袭。

[关键词] 胃肠道间质瘤; 长链非编码RNA; 尿路上皮癌胚抗原1; 失巢凋亡; 自噬

[中图分类号] R735 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2025-05-14 **[录用日期]** 2025-07-23

[基金项目] 新疆生产建设兵团科技局兵团科技计划项目 (2024ZD068); 石河子大学自主资助支持校级科研项目 (ZZZC2023034); 石河子大学第一附属医院青年基金项目 (QN202206)

[作者简介] 赵宇 (1990—), 男, 河南省南阳市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事胃肠外科疾病治疗方面的研究。

[通信作者] 何家康, 副主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: 1551143474@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Regulatory effect of lncRNA urothelial carcinoembryonic antigen 1 on anoikis in human gastrointestinal stromal tumor cells and its mechanism

ZHAO Yu¹, HE Xiaoshuang², DONG Xiaoyin¹, GAO Fengyi¹, HE Jiageng¹

(1. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss the effect of long non-coding RNA (lncRNA) urothelial carcinoembryonic antigen 1 (*UCA1*) on the anoikis of human gastrointestinal stromal tumor (GIST) cells, and to clarify its mechanism of action. **Methods:** The human GIST cell line GIST-T1 was cultured under adherent and anoikis conditions, and the GIST-T1 cells resistant to anoikis were induced. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression level of lncRNA *UCA1* in the two kinds of cells; Western blotting method was used to detect the expression levels of autophagy markers microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-I, LC3-II, and p62 proteins in the cells, and the LC3-II/LC3-I ratio was calculated. The GIST-T1 cells were transfected with lncRNA *UCA1* knockdown or negative control lentivirus and treated with the autophagy activator rapamycin (RAPA). The GIST-T1 cells were divided into control group, sh-NC group, sh-*UCA1* group, sh-NC+RAPA group, and sh-*UCA1*+RAPA group, and the cells were subjected to anoikis induction. Flow cytometry was used to detect the anoikis rates of cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of LC3-I, LC3-II, and p62 proteins in the cells in various groups; cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; cell scratch assay was used to detect the scratch healing rates of the cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the number of invasive cells in various groups. The GIST-T1 cells from sh-NC group and sh-*UCA1* group were collected and injected *via* the tail vein to establish two groups of nude mouse xenograft models, respectively. After 4 weeks, a fluorescence *in vivo* imaging system was used to detect the tumor growth and liver metastasis in the nude mice in two groups, and the tumor tissue mass was measured. TUNEL staining was used to observe cell apoptosis in the tumor tissue of the nude mice in two groups; immunohistochemical staining was used to detect the expression levels of LC3B and p62 proteins in the tumor tissue of the nude mice in two groups. **Results:** Compared with adherently cultured GIST-T1 cells, the expression level of lncRNA *UCA1* in anoikis-resistant GIST-T1 cells was significantly increased ($P<0.05$), the LC3-II/LC3-I ratio was significantly increased ($P<0.05$), and the expression level of p62 protein was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with sh-NC group, the anoikis rate of GIST-T1 cells in sh-*UCA1* group was increased ($P<0.05$), the LC3-II/LC3-I ratio was significantly decreased ($P<0.05$), the expression level of p62 protein was significantly increased ($P<0.05$), the cell proliferation activity and scratch healing rate were significantly decreased ($P<0.05$), and the number of invasive cells was significantly decreased ($P<0.05$); compared with sh-*UCA1* group, the anoikis rate of GIST-T1 cells in sh-*UCA1*+RAPA group was significantly decreased ($P<0.05$), the LC3-II/LC3-I ratio was significantly increased ($P<0.05$), the expression level of p62 protein was significantly decreased ($P<0.05$), the cell proliferation activity and scratch healing rate were significantly increased ($P<0.05$), and the number of invasive cells was significantly increased ($P<0.05$). In the nude mouse xenograft experiment, compared with sh-NC group, the fluorescence intensity in liver tissue of the nude mice in sh-*UCA1* group was weakened, the

tumor mass was significantly decreased ($P < 0.05$), the cell apoptotic rate in tumor tissue was significantly increased ($P < 0.05$), the expression level of LC3B protein was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression level of p62 protein was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** LncRNA *UCA1* is highly expressed in anoikis-resistant GIST-T1 cells, and downregulating its expression can promote anoikis of GIST-T1 cells by reducing the autophagy level, thereby inhibiting cell growth, migration, and invasion.

KEYWORDS Gastrointestinal stromal tumor; Long non-coding RNA; Urothelial carcinoembryonic antigen 1; Anoikis; Autophagy

胃肠道间质瘤 (gastrointestinal stromal tumor, GIST) 是胃肠道间叶常见的恶性肿瘤之一, 好发于胃, 其次为小肠, 严重时可累及整个消化道^[1]。GIST 早期症状缺乏特异性, 可表现为腹痛、消化不良、便血和体质量减轻等, 临床诊断主要通过实验室活检、影像学 and CT 检查。由于 GIST 起病隐秘, 患者确诊时多处于晚期或已发生转移, 增加了其治疗难度^[2]。失巢凋亡是一种细胞脱离细胞外基质或相邻细胞后触发的程序性死亡形式, 在组织发育和维持稳态中起重要作用。研究^[3-4]表明: 失巢凋亡与肿瘤发生发展有密切关联。在肿瘤进程中, 肿瘤细胞可通过调节多种机制抵抗失巢凋亡, 从而使其在脱离原有细胞基质后仍可增殖并迁移到其他部位, 形成转移灶。因此, 失巢凋亡抵抗是肿瘤细胞恶性进展和转移的关键机制之一。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类序列长度大于 200 个核苷酸的 RNA 分子, 虽无蛋白质编码功能, 但在基因表达调控中起重要作用。研究^[5-6]显示: lncRNA 异常表达与多种类型肿瘤的发生和进展有关联, 在肿瘤细胞生长、转移及代谢中发挥调控作用, 并参与肿瘤化疗耐药和失巢凋亡抵抗等过程。尿路上皮癌胚抗原 1 (urothelial carcinoembryonic antigen 1, *UCA1*) 是位于 19 号染色体的 lncRNA, 最早从人膀胱癌细胞系 BLZ-211 中鉴定获得。研究^[7-10]表明: lncRNA *UCA1* 在急性髓系白血病、胰腺癌、胃肠道癌和宫颈癌等多种肿瘤组织中高表达, 并参与调控肿瘤侵袭转移、免疫逃逸和化疗耐药等。然而, lncRNA *UCA1* 是否参与 GIST 的恶性进程, 尤其是其在失巢凋亡介导的肿瘤转移过程中的作用目前尚不明确。本研究首先检测诱导失巢凋亡的 GIST 细胞中 lncRNA *UCA1* 表达水平及其与 GIST 细胞失巢凋亡的相关性, 并进一步通过慢病毒转染技术下调 lncRNA *UCA1* 表达, 观察其对 GIST 细胞失巢凋亡及肿瘤细胞恶性进展的影响。本研究通过探讨 lncRNA *UCA1* 在 GIST 细胞失巢凋亡中的

表达变化及其功能, 旨在阐明 lncRNA 调控 GIST 细胞转移的分子机制, 为 GIST 的诊断及治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 10 只 5 周龄 BALB/c-nu 裸鼠, 体质量 18~20 g, 购自南京集萃药康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (苏) 2023-0009。裸鼠饲养于室温为 24 °C~26 °C、相对湿度为 40%~60% 且 12 h/12 h 明暗交替的环境中, 定期通风换气, 使用无菌饲料饲养, 并自由饮水, 适应 1 周后进行实验。本研究动物实验通过石河子大学第一附属医院伦理委员会审核 (伦理审批号: A2024-017-01)。人 GIST 细胞株 GIST-T1 购自深圳豪地华拓生物科技有限公司。敲减 lncRNA *UCA1* 的慢病毒及阴性对照 (negative control, NC) 慢病毒由广州锐博生物科技有限公司构建。自噬激活剂雷帕霉素 (rapamycin, RAPA) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 杜尔贝科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养基和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, 青-链霉素双抗液购自美国 BI 公司, 聚 (2-羟乙基甲基丙烯酸酯) [poly (2-hydroxyethyl methacrylate), Poly-HEMA] 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, TRIzol 试剂和增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂购自北京天根生化科技有限公司, HiScript III^{RT} SuperMix 反转录试剂盒和 AceQ qPCR SYBR Green 荧光定量试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 放射性免疫沉淀分析缓冲液 (radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA) 裂解液、蛋白浓度测定试剂盒和 3, 3'-二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司, 兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、LC3B 抗体和 p62 抗体购自美国

Abcam公司, 标记山羊抗兔IgG辣根过氧化物的抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, Annexin V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啉(fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, FITC/PI)试剂盒、细胞计数试剂盒8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒、结晶紫和4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自上海碧云天生物技术有限公司, TUNEL试剂盒购自美国Biogradetech公司。Forma Series II 3111型CO₂培养箱购自美国Thermo Fisher公司, CKX53型倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司, CFX Connect型实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪和Mini-PROTEAN Tetra Cell电泳系统购自美国Bio-Rad公司, Tanon 5200型多功能凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司, FACSCanto II型流式细胞仪购自美国BD公司, ELx800型酶标仪购自美国Agilent公司, IVIS Lumina Series III型小动物活体荧光成像系统购自美国PerkinElmer公司, Eclipse C1型荧光显微镜购自日本尼康公司。

1.2 细胞培养、转染和分组 使用DMEM培养基培养GIST-T1细胞, 添加10%胎牛血清和1%青-链霉素双抗液, 于37℃、5%CO₂培养箱中进行常规贴壁培养。将Poly-HEMA配制成10 g·L⁻¹乙醇溶液, 充分溶解后过滤除菌, 向6孔细胞培养板中每孔加入1 mL Poly-HEMA溶液, 室温静置过夜。将GIST-T1细胞接种于Poly-HEMA包被的低吸附6孔细胞培养板中, 每孔细胞数为1×10⁴个, 置于37℃、5%CO₂培养箱进行失巢凋亡诱导。隔日换液, 持续培养14 d, 收集悬浮细胞, 获得失巢凋亡抵抗的GIST-T1细胞。选取对数生长期的GIST-T1细胞接种于6孔细胞培养板中, 每孔细胞数为2×10⁵个, 待融合度为60%~70%时进行转染。将敲低lncRNA *UCA1*的慢病毒和lncRNA NC慢病毒分别加入到细胞中混匀, 感染复数设为20, 于37℃、5%CO₂培养箱中孵育6 h后换用新鲜培养液培养。转染72 h后, 培养基中加入0.2 mg·L⁻¹嘌呤霉素, 筛选稳定表达的细胞株。GIST-T1细胞分为对照组(不转染且未经RAPA处理)、sh-NC组(转染lncRNA NC的慢病毒)、sh-*UCA1*组(转染敲低lncRNA *UCA1*的慢病毒)、sh-NC+RAPA组(转染lncRNA NC慢病毒, 并用10 μmol·L⁻¹ RAPA

处理24 h)和sh-*UCA1*+RAPA组(转染敲低lncRNA *UCA1*的慢病毒, 并用10 μmol·L⁻¹ RAPA处理24 h)。收集处理后的各组细胞, 接种于Poly-HEMA包被的低吸附6孔细胞培养板中培养48 h。

1.3 RT-qPCR法检测各组细胞中lncRNA *UCA1*表达水平 收集贴壁培养细胞、失巢凋亡抵抗细胞和转染后各组GIST-T1细胞, 加入适量TRIzol试剂提取总RNA, 鉴定RNA样本的纯度和含量。根据试剂盒说明书, 将总RNA逆转录合成为cDNA。使用CFX Connect RT-qPCR系统进行反应, 根据AceQ qPCR SYBR Green预混液配置反应体系, 扩增lncRNA *UCA1*。反应条件: 95℃、5 min; 95℃、10 s, 60℃、30 s, 40个循环。实验重复3次。以*GAPDH*作为内参, 采用2^{-ΔΔCt}法计算各组细胞中lncRNA *UCA1*表达水平。引物序列: lncRNA *UCA1*上游引物5'-CTCTCCTATCTCCCTTCACTGA-3', lncRNA *UCA1*下游引物5'-CTTTGGGTTGAGGTTCTGT-3'; *GAPDH*上游引物5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC-3', *GAPDH*下游引物5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'。

1.4 Western blotting法检测各组细胞中自噬相关蛋白LC3-I、LC3-II和p62蛋白表达水平 收集贴壁培养细胞、失巢凋亡抵抗细胞和转染后各组GIST-T1细胞, 用RIPA裂解液提取总蛋白, 测定蛋白浓度。沸水煮10 min使蛋白变性, 取40 μg变性蛋白上样进行电泳, 转膜。将膜浸入5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 加入LC3B、p62和*GAPDH*抗体(1:1 000稀释), 4℃冰箱孵育过夜。次日, TBST洗膜, 加入二抗(1:5 000), 室温孵育2 h。于暗室中添加ECL试剂显影并成像。采用Image J软件分析蛋白条带灰度, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白*GAPDH*条带灰度值。

1.5 流式细胞术检测转染后各组细胞失巢凋亡率 收集转染处理后各组GIST-T1细胞, 加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗后, 取适量培养基重悬细胞。加入5 μL Annexin V-FITC, 混匀后孵育10 min, 加入5 μL PI染色液, 将细胞与染色液充分混匀, 避光反应5 min。补加200 μL PBS缓冲液吹打至完全混匀。采用流式细胞术检测各组细胞失巢凋亡率。

1.6 CCK-8法检测转染后各组细胞增殖活性 收集

转染处理后各组 GIST-T1 细胞,加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 新鲜培养基稀释成单细胞悬液,接种到 96 孔细胞培养板中,每孔细胞数为 5×10^3 个,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中。分别于 0、24、48 和 72 h 后弃去培养基,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,孵育 2 h。采用酶标仪测定 450 nm 波长处各组细胞吸光度 (A) 值,使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制细胞生长曲线。以各组细胞 A 值平均值代表细胞增殖活性,A 值越高代表细胞增殖活性越强。

1.7 细胞划痕实验检测转染后各组细胞划痕愈合率

收集转染处理后各组 GIST-T1 细胞,接种于 6 孔细胞培养板中,每孔细胞数为 2×10^5 个。待融合度达到 80% 后,使用无菌枪头在 6 孔细胞培养板内作一均匀划痕,PBS 缓冲液冲洗划痕下的细胞碎片,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱内。分别于 0 和 48 h 时使用倒置显微镜观察并拍照,使用 Image J 软件分析划痕区域面积,计算各组划痕愈合率。划痕愈合率 = (0 h 划痕面积 - 48 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.8 Transwell 小室实验检测转染后各组侵袭细胞数 将适量 Matrigel 基质胶与无血清培养基充分混匀,取 50 μL 加入 Transwell 小室的上室,于 37°C 下静置 3 h 待其凝固。在铺好胶的上室中加入转染处理后各组 GIST-T1 细胞,细胞总数为 1×10^5 个。下室加入 600 μL 新鲜培养基,并补充 10% 胎牛血清,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中常规培养。24 h 后终止培养,加入 4% 甲醛固定底层细胞,1% 结晶紫染色,使用光学显微镜观察并拍照,计数各组细胞穿膜细胞数,取平均值为各组侵袭细胞数。

1.9 裸鼠移植瘤模型的构建 将 10 只裸鼠随机分为 sh-NC 组和 sh-UCA1 组,每组 5 只,分别于麻醉后尾静脉注射 sh-NC 组和 sh-UCA1 组 GIST-T1 细胞,每只注射细胞数为 1×10^7 个。4 周后,采用荧光活体成像仪检测 2 组裸鼠体内肿瘤生长和肝脏转移情况。采用颈椎脱臼法处死裸鼠,解剖取出肿瘤组织,使用电子天平测量 2 组肿瘤组织的质量。

1.10 TUNEL 染色法观察 2 组裸鼠肿瘤组织中细胞凋亡情况 将肿瘤组织浸泡在 4% 多聚甲醛中固定后,制成石蜡切片。切片依次经二甲苯和梯度乙醇处理后,滴加 50 μL Proteinase K 工作液覆盖,置于湿盒 37°C 孵育 30 min,PBS 缓冲液清洗。加入 50 μL TUNEL 标记反应混合物,于湿盒中避光

孵育 1 h。PBS 缓冲液洗涤,DAPI 工作液染核,室温反应 10 min。采用荧光显微镜观察并拍照,计数每张染色切片 6 个随机视野下 TUNEL 标记阳性细胞数和肿瘤细胞总数,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数 / 总细胞数 $\times 100\%$ 。

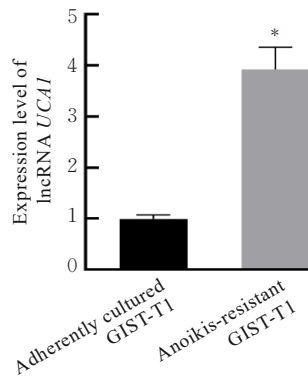
1.11 免疫组织化学染色法检测 2 组裸鼠肿瘤组织中 LC3B 和 p62 蛋白表达水平 将肿瘤组织石蜡切片置于 68°C 烘箱烘烤 2 h,经二甲苯和梯度乙醇处理后,加入抗原修复液,于微波炉中高火反应 5 min。冷却后加入 10% 山羊血清孵育 25 min。分别加入 LC3B 和 p62 抗体 (1:500 稀释),于 4°C 冰箱孵育过夜。次日,PBS 缓冲液清洗切片,加入二抗 (1:1000 稀释) 室温孵育 1 h。加入 DAB 工作液充分反应显色后,流水冲洗,终止反应,苏木素复染后再次冲洗。滴加中性树脂封片并晾干。使用光学显微镜观察并拍照,使用 Image J 软件分析 2 组裸鼠肿瘤组织中目标蛋白平均光密度 (MOD) 值,以 MOD 值代表目的蛋白表达水平。

1.12 统计学分析 采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。各组细胞中 lncRNA UCA1 表达水平,LC3-I、LC3-II 和 p62 蛋白表达水平,各组细胞失巢凋亡率、增殖活性、划痕愈合率和侵袭细胞数,以及 2 组裸鼠肿瘤组织质量、肿瘤组织中细胞凋亡率和 LC3B 及 p62 蛋白表达水平均符合正态分布且方差齐性,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验,2 组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 失巢凋亡抵抗的 GIST-T1 细胞中 lncRNA UCA1 表达水平和自噬相关蛋白表达水平 与贴壁培养的 GIST-T1 细胞比较,失巢凋亡抵抗的 GIST-T1 细胞中 lncRNA UCA1 表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图 1。与贴壁培养的 GIST-T1 细胞比较,失巢凋亡抵抗的 GIST-T1 细胞中 LC3-II / LC3-I 比值明显升高 ($P < 0.05$),p62 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.2 转染后各组 GIST-T1 细胞中 lncRNA UCA1 表达水平 RT-qPCR 检测结果显示:与对照组 (1.00 ± 0.02) 和 sh-NC 组 (0.98 ± 0.08) 比较,sh-UCA1 组 GIST-T1 细胞中 lncRNA UCA1 表达水平 (0.18 ± 0.02) 明显降低 ($P < 0.05$)。



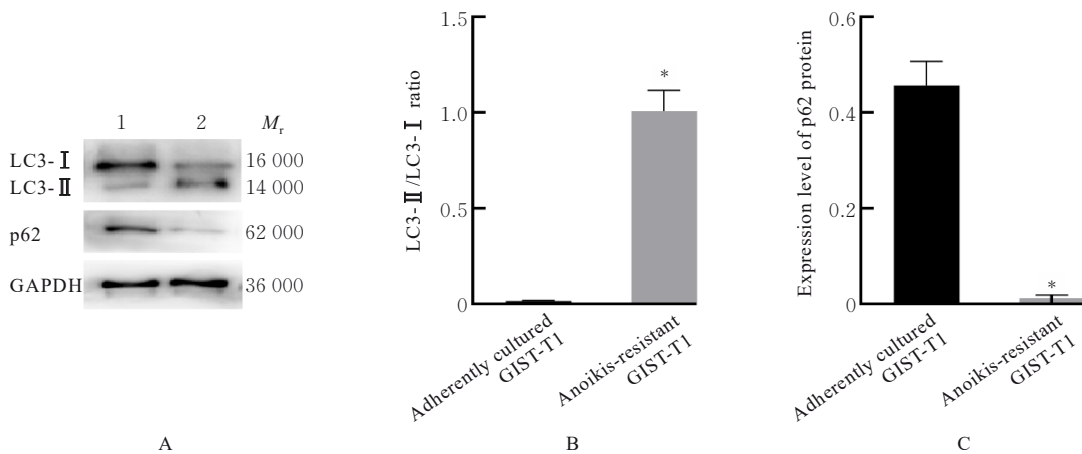
* $P<0.05$ compared with adherent GIST-T1 cells.

图1 2种GIST-T1细胞中lncRNA UCA1表达水平

Fig. 1 Expression levels of lncRNA UCA1 in two kinds of GIST-T1 cells

2.3 转染后各组GIST-T1细胞失巢凋亡率 流式细胞术检测结果显示:与sh-NC组比较,sh-UCA1组GIST-T1细胞失巢凋亡率明显升高($P<0.05$);与sh-UCA1组比较,sh-UCA1+RAPA组GIST-T1细胞失巢凋亡率明显降低($P<0.05$)。见图3和4。

2.4 转染后各组GIST-T1细胞中LC3-II/LC3-I比值和p62蛋白表达水平 Western blotting法检测结果显示:与sh-NC组比较,sh-UCA1组GIST-T1细胞中LC3-II/LC3-I比值明显降低($P<0.05$),p62蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。与sh-UCA1组比较,sh-UCA1+RAPA组GIST-T1细胞中LC3-II/LC3-I比值明显升高($P<0.05$),p62蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。见图5。



Lane 1: Adherently cultured GIST-T1 cells; Lane 2: Anoikis-resistant GIST-T1 cells. B: LC3-II/LC3-I ratio; C: Expression level of p62 protein. * $P<0.05$ compared with adherently cultured GIST-T1 cells.

图2 2种GIST-T1细胞中自噬相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B,C)

Fig. 2 Electrophoregram (A) and histograms (B, C) of expressions of autophagy-related proteins in two kinds of GIST-T1 cells

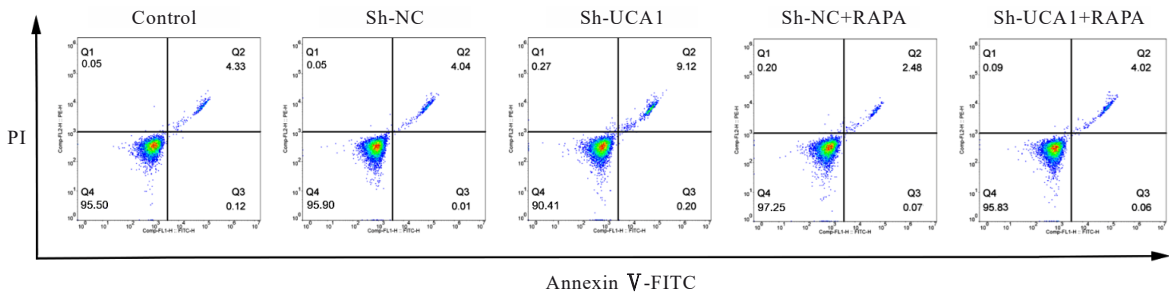
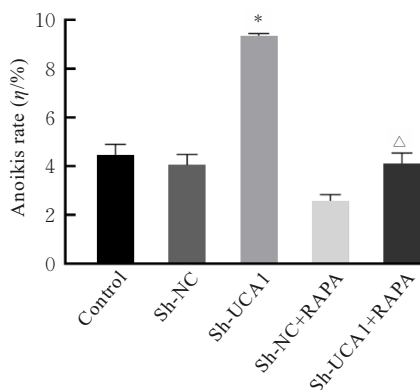


图3 流式细胞术检测各组GIST-T1细胞失巢凋亡情况

Fig. 3 Anoikis of GIST-T1 cells in various groups detected by flow cytometry

2.5 转染后各组GIST-T1细胞增殖活性、划痕愈合率和侵袭细胞数 CCK-8法检测结果显示:处理

后48和72h,与sh-NC组比较,sh-UCA1组GIST-T1细胞增殖活性明显降低($P<0.05$);与



* $P < 0.05$ compared with sh-NC group; $\Delta P < 0.05$ compared with sh-UCA1 group.

图4 流式细胞术检测各组 GIST-T1 细胞失巢凋亡率

Fig. 4 Anoikis rates of GIST-T1 cells in various groups detected by flow cytometry

sh-UCA1 组比较, sh-UCA1+RAPA 组 GIST-T1 细胞增殖活性明显升高 ($P < 0.05$)。见图 6。

细胞划痕实验和 Transwell 小室实验结果显示: 与 sh-NC 组比较, sh-UCA1 组细胞划痕愈合率明显降低 ($P < 0.05$), 侵袭细胞数明显减少 ($P < 0.05$)。与 sh-UCA1 组比较, sh-UCA1+RAPA 组细胞划痕愈合率明显升高 ($P < 0.05$), 侵袭细胞数明显增加 ($P < 0.05$)。见图 7、图 8 和表 1。

2.6 2 组裸鼠移植瘤生长情况和肿瘤组织中细胞凋亡情况 荧光活体成像结果显示: sh-UCA1 组裸鼠肝脏部位荧光强度弱于 sh-NC 组。与 sh-NC 组 ($2.42 \text{ g} \pm 0.25 \text{ g}$) 比较, sh-UCA1 组裸鼠移植瘤质量 ($1.09 \text{ g} \pm 0.11 \text{ g}$) 明显降低 ($P < 0.05$)。见图 9。

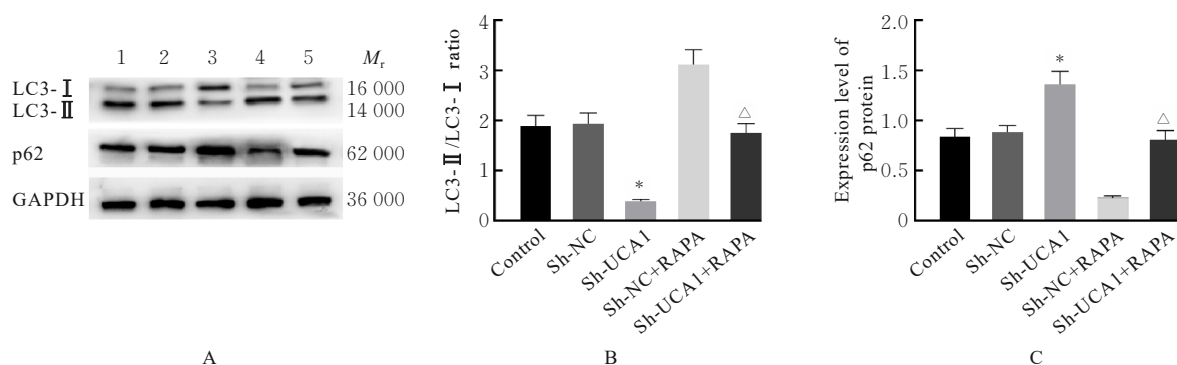
TUNEL 染色法结果显示: 荧光显微镜下, sh-UCA1 组裸鼠肿瘤组织中 TUNEL 标记绿色荧光强度升高。与 sh-NC 组 ($24.50\% \pm 2.27\%$) 比较, sh-UCA1 组裸鼠肿瘤组织中细胞凋亡率 ($48.79\% \pm 5.03\%$) 明显升高 ($P < 0.05$)。见图 10。

免疫组织化学染色结果显示: 与 sh-NC 组 (45.73 ± 4.49 和 19.55 ± 1.86) 比较, sh-UCA1 组裸鼠肿瘤组织中 LC3B 蛋白表达水平 (18.34 ± 1.92) 明显降低 ($P < 0.05$), p62 蛋白表达水平 (49.51 ± 5.14) 明显升高 ($P < 0.05$)。见图 11。

3 讨论

GIST 发生率较低, 但其转移能力强, 常见转移部位包括肝脏和腹膜, 少数病例可转移至淋巴结或肺部^[11]。GIST 的治疗通常包括手术切除和靶向治疗。手术切除可在早期阶段治愈部分患者, 而对于已发生转移的病例, 靶向药物如伊马替尼等成为主要治疗选择。然而, 随着药物治疗时间延长, 肿瘤细胞可能产生耐药性, 增加治疗复杂性。在正常生理状态下, 细胞依赖与细胞外基质的连接以维持其正常生长, 一旦失去连接便会触动失巢凋亡程序, 该机制对防止肿瘤扩散和转移有重要作用。肿瘤细胞则可通过调节细胞黏附、重塑细胞外基质和激活相关信号转导通路等机制抵抗失巢凋亡, 维持存活状态, 促进肿瘤进展^[12]。

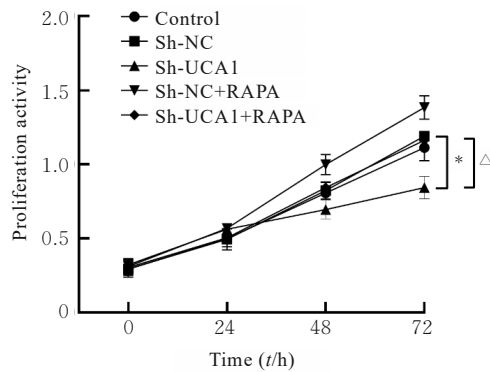
研究^[13-14]表明: lncRNA 可参与调控肿瘤细胞的多种生物学过程, 包括干细胞特性维持、细胞增殖、程序性细胞凋亡、细胞侵袭和转移等。部分



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: Sh-NC group; Lane 3: Sh-UCA1 group; Lane 4: Sh-NC+RAPA group; Lane 5: Sh-UCA1+RAPA group); B: LC3-II/LC3-I ratio; C: Expression level of p62 protein. * $P < 0.05$ compared with sh-NC group; $\Delta P < 0.05$ compared with sh-UCA1 group.

图5 各组 GIST-T1 细胞中自噬相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B,C)

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histograms(B,C) of expressions of autophagy-related proteins in GIST-T1 cells in various groups



* $P < 0.05$ compared with sh-NC group; $\Delta P < 0.05$ compared with sh-UCA1 group.

图6 各组 GIST-T1 细胞增殖活性

Fig. 6 Proliferation activities of GIST-T1 cells in various groups

lncRNA 还可影响细胞对失巢凋亡的抵抗能力。LU 等^[15]研究表明: lncRNA *APOC1P1-3* 在乳腺癌中异常高表达, 并可通过 Caspase 依赖性途径促进失巢凋亡抵抗, 加速乳腺癌进展。LI 等^[16]研究表明: lncRNA *MPRL23-AS1* 可将 EZH2 募集至

p19INK4D 启动子区, 从而抑制 p19INK4D 表达, 促进唾液腺腺样囊性癌细胞的失巢凋亡抵抗能力, 并促进肿瘤细胞向肺部转移。另有研究^[17]显示: 一些失巢凋亡相关的 lncRNA 可能通过调节肿瘤微环境中的免疫细胞浸润, 影响肿瘤的进展及患者预后。因此, 针对特定 lncRNA 进行干预可能有助于促进或恢复肿瘤细胞的失巢凋亡功能, 从而抑制肿瘤转移。本研究结果显示: 与贴壁培养的 GIST-T1 细胞比较, 失巢凋亡诱导的 GIST-T1 细胞中 lncRNA *UCA1* 表达水平明显上调, 推测其高表达可能与 GIST-T1 细胞失巢凋亡抵抗有关联。为进一步探讨 lncRNA *UCA1* 在 GIST-T1 细胞失巢凋亡中的作用, 本研究通过慢病毒转染技术下调 GIST-T1 细胞中 lncRNA *UCA1* 表达后诱导其失巢凋亡, 结果显示: sh-UCA1 组 GIST-T1 细胞凋亡率明显升高, 细胞增殖活性降低, 划痕愈合率降低, 侵袭细胞数减少, 说明下调 lncRNA *UCA1* 表达能够促进 GIST-T1 细胞失巢凋亡, 从而抑制细胞增殖、迁移及侵袭。

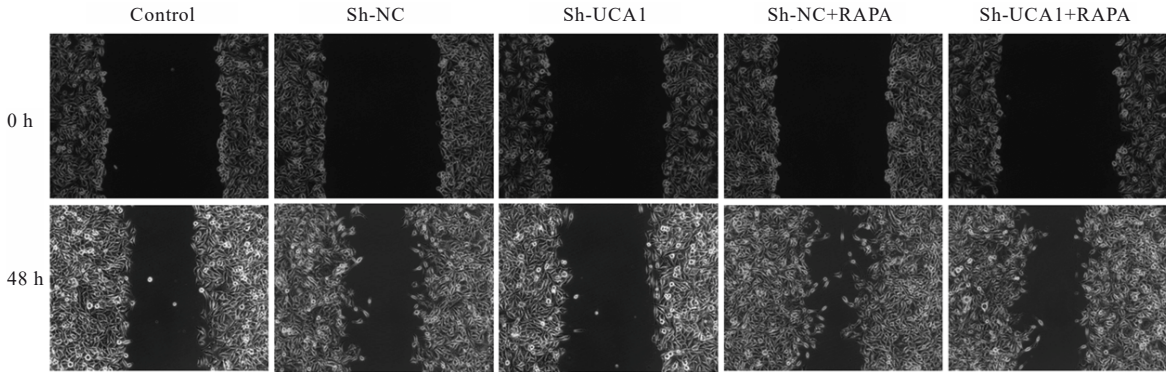
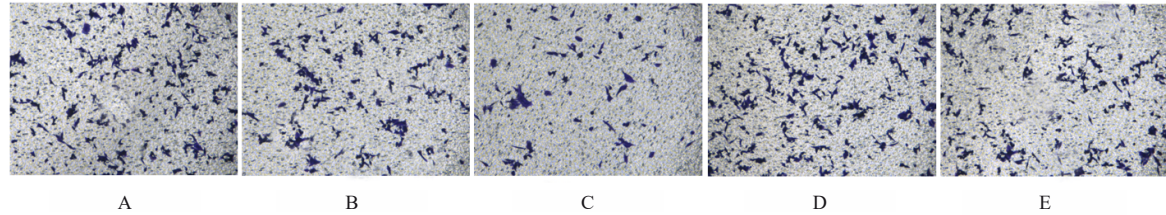


图7 各组 GIST-T1 细胞迁移情况(×100)

Fig. 7 Migration of GIST-T1 cells in various groups(×100)



A: Control group; B: Sh-NC group; C: Sh-UCA1 group; D: Sh-NC+RAPA group; E: Sh-UCA1+RAPA group.

图8 各组 GIST-T1 细胞侵袭情况(结晶紫, ×100)

Fig. 8 Invasion of GIST-T1 cells in various groups(Crystal violet, ×100)

自噬是一种细胞内降解过程, 在此过程中, 细胞通过形成自噬体包裹并降解细胞内受损细胞器和

蛋白质, 以维持内环境稳定。LC3是自噬过程中的重要蛋白, 通常以 LC3- I 形式游离于细胞质中,

表 1 各组 GIST-T1 细胞划痕愈合率和细胞侵袭数

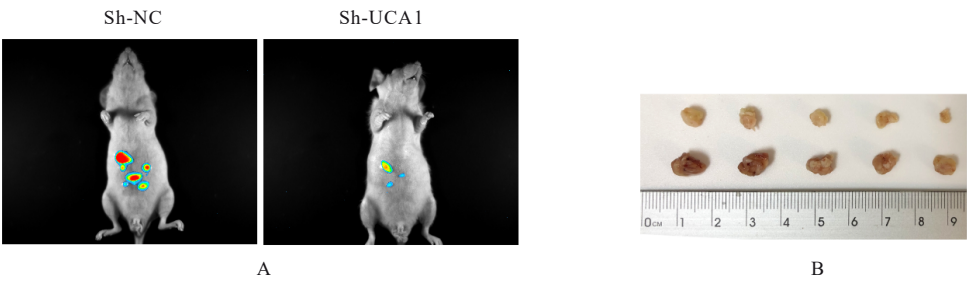
Tab. 1 Rates of scratch healing and numbers of invasion cells of GIST-T1 cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Rate of scratch healing ($\eta/\%$)	Number of invasion cells
Control	31.23 ± 3.25	138.56 ± 14.23
Sh-NC	32.26 ± 3.57	134.92 ± 11.80
Sh-UCA1	$10.89 \pm 1.12^*$	$59.50 \pm 6.04^*$
Sh-NC+RAPA	58.75 ± 6.32	166.77 ± 17.03
Sh-UCA1+RAPA	$34.51 \pm 3.49^\Delta$	$129.83 \pm 13.21^\Delta$

* $P<0.05$ compared with sh-NC group; $^\Delta P<0.05$ compared with sh-UCA1 group.

自噬启动时则转化为与自噬体膜结合的脂质化形式 LC3- II , 因此 LC3- II /LC3- I 比值常被用作自噬激活的生物标志物^[18]。p62 是一种多功能蛋白, 可作为自噬的适配器, 选择性地引导泛素化蛋白进入自噬体, 并通过与 LC3 结合促进自噬体形成, p62

表达下调表明细胞自噬降解有效进行^[19]。自噬可作为肿瘤细胞应对失巢凋亡的重要机制^[20-22], 其通过增强自噬水平帮助细胞应对缺氧和营养不足等压力, 从而使肿瘤细胞在脱离细胞外基质后仍具备生存能力, 从而逃避失巢凋亡并促进肿瘤细胞转移。因此, 抑制肿瘤细胞自噬可促进其失巢凋亡, 进而抑制肿瘤转移。本研究结果显示: 与贴壁培养的 GIST-T1 细胞比较, 失巢凋亡诱导后的 GIST-T1 细胞中 LC3- II /LC3- I 比值明显升高, p62 蛋白表达水平明显降低, 说明失巢凋亡抵抗的 GIST-T1 细胞自噬水平升高; 慢病毒转染下调 lncRNA UCA1 表达后, sh-UCA1 组细胞中 LC3- II /LC3- I 比值明显降低, p62 蛋白表达水平明显升高, 提示下调 lncRNA UCA1 表达可能通过抑制自噬, 从而促进 GIST-T1 细胞失巢凋亡。为进一步验证, 本研究使用自噬激活剂 RAPA 干预下调 lncRNA UCA1 表达的 GIST-T1 细胞, 结果显示:



A: Tumor formation detected by fluorescence *in vivo* imaging; B: Morphology of subcutaneous xenograft tumor.
图 9 2 组裸鼠移植瘤生长情况

Fig. 9 Xenograft tumor growth of nude mice in two groups

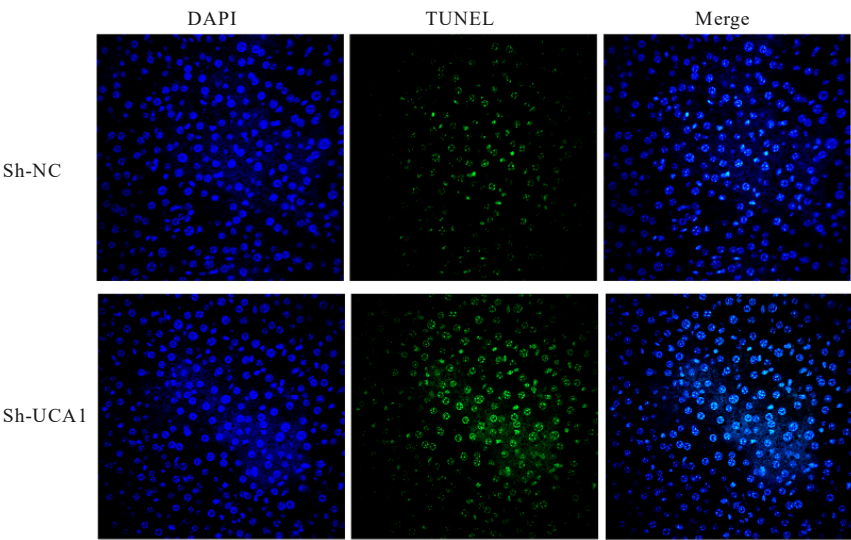


图 10 2 组裸鼠肿瘤组织中细胞凋亡情况(TUNEL, $\times 100$)

Fig. 10 Apoptosis in tumor tissue of nude mice in two groups(TUNEL, $\times 100$)

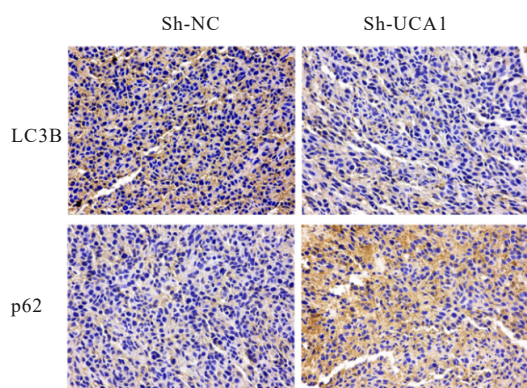


图11 2组裸鼠肿瘤组织中LC3B和p62蛋白表达情况(免疫组织化学,×100)

Fig. 11 Expressions of LC3B and p62 proteins in tumor tissue of nude mice in two groups(Immunohistochemistry, ×100)

sh-UCA1+RAPA组细胞中LC3-II/LC3-I比值明显升高, p62蛋白表达水平明显降低, 细胞凋亡率降低, 细胞增殖活性和划痕愈合率升高, 侵袭细胞数增加。上述结果表明: 下调lncRNA *UCA1*表达能够降低GIST-T1细胞自噬从而促进失巢凋亡, 抑制肿瘤生长和转移。本研究还通过裸鼠移植瘤实验开展体内验证, 结果显示: 下调lncRNA *UCA1*表达可抑制裸鼠体内GIST细胞成瘤和肝脏转移, 促进肿瘤细胞凋亡, 并抑制肿瘤组织中LC3B蛋白表达, 提高p62蛋白表达, 与体外实验结果一致。

综上所述, lncRNA *UCA1*在诱导失巢凋亡后的GIST-T1细胞中表达上调, 下调其表达可通过抑制自噬促进GIST-T1细胞失巢凋亡, 抑制GIST生长和转移, 表明lncRNA *UCA1*可作为GIST失巢凋亡抵抗及抗肿瘤治疗的潜在新靶点。然而, lncRNA *UCA1*促进GIST转移的分子机制和信号通路仍需深入探讨, 以期GIST转移的精准防治提供实验依据和新的干预靶点。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

赵宇参与实验操作和论文撰写, 何小双参与文献整理和数据分析, 董晓寅参与实验操作和数据收集, 高丰毅参与实验操作和论文修改, 何家康参与研究指导和论文审阅。

参考文献

[1] PATIL A, HAVAL S, NICHKAODE P, et al. Gastrointestinal stromal tumor: a clinicopathological

study and management[J]. Cureus, 2023, 15(11): e49469.

[2] MUNTEANU A, PATRASCU S, BORDU S, et al. Clinical and morphological characteristics of gastrointestinal stromal tumor [J]. Chirurgia, 2023, 118(6): 618-623.

[3] KHAN S U, FATIMA K, MALIK F. Understanding the cell survival mechanism of anoikis-resistant cancer cells during different steps of metastasis [J]. Clin Exp Metastasis, 2022, 39(5): 715-726.

[4] SATTARI FARD F, JALILZADEH N, MEHDIZADEH A, et al. Understanding and targeting anoikis in metastasis for cancer therapies [J]. Cell Biol Int, 2023, 47(4): 683-698.

[5] ZHANG Y G. LncRNA-encoded peptides in cancer[J]. J Hematol Oncol, 2024, 17(1): 66.

[6] 李颖霞, 姜利彬, 周明霞, 等. 敲低长链非编码RNA TTTY15表达对结肠癌细胞增殖、凋亡、迁移和克隆形成能力的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2025, 60(2): 173-176.

[7] 白雪, 伍燕平, 李忠玉, 等. lncRNA *UCA1*在急性髓系白血病患者中的表达及其临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2024, 32(4): 999-1004.

[8] ASKARI N, PIROUZ M S, MAFIKANDI V, et al. The lncRNA *UCA1* enhances pancreatic cancer EMT by regulating miR-708-5p and miR-135b-5p: a bioinformatics approach [J]. Iran J Public Health, 2024, 53(7): 1659-1669.

[9] RAMLI S, SIM M S, GUAD R M, et al. Long noncoding RNA *UCA1* in gastrointestinal cancers: molecular regulatory roles and patterns, mechanisms, and interactions[J]. J Oncol, 2021, 2021: 5519720.

[10] AN L F, DONG K J, CHI S Q, et al. lncRNA *UCA1* promotes tumor progression by targeting SMARCD3 in cervical cancer[J]. Mol Carcinog, 2024, 63(3): 384-399.

[11] CAO L L, LIN C, LIU Y, et al. Clinical characteristics and prognostic analysis of postoperative recurrence or metastasis of low-risk gastrointestinal stromal tumors[J]. World J Surg Oncol, 2024, 22(1): 65.

[12] ADESHAKIN F O, ADESHAKIN A O, AFOLABI L O, et al. Mechanisms for modulating anoikis resistance in cancer and the relevance of metabolic reprogramming[J]. Front Oncol, 2021, 11: 626577.

[13] MCCABE E M, RASMUSSEN T P. lncRNA involvement in cancer stem cell function and epithelial-mesenchymal transitions[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 75: 38-48.

- [14] YANG M Y, LU H F, LIU J J, et al. lncRNAfunc: a knowledgebase of lncRNA function in human cancer[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(D1): D1295-D1306.
- [15] LU Q, WANG L, GAO Y B, et al. lncRNA *APOC1P1-3* promoting anoikis-resistance of breast cancer cells[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 232.
- [16] LI Y R, FU M, SONG Y Q, et al. Long non-coding RNA *MRPL23-AS1* suppresses anoikis in salivary adenoid cystic carcinoma *in vitro*[J]. Oral Dis, 2023, 29(4): 1588-1601.
- [17] MENG W J, GUO J M, HUANG L, et al. Anoikis-related long non-coding RNA signatures to predict prognosis and immune infiltration of gastric cancer[J]. Bioengineering, 2024, 11(9): 893.
- [18] PEÑA-MARTINEZ C, RICKMAN A D, HECKMANN B L. Beyond autophagy: LC3-associated phagocytosis and endocytosis[J]. Sci Adv, 2022, 8(43): eabn1702.
- [19] 金美英, 潘韦韦, 苏 婧, 等. 基于自噬调控探讨解毒通路调肝方对SD大鼠胰岛细胞保护的作用机制[J]. 中国兽医学报, 2024, 44(11): 2435-2444.
- [20] GULIA S, CHANDRA P, DAS A. The prognosis of cancer depends on the interplay of autophagy, apoptosis, and anoikis within the tumor microenvironment[J]. Cell Biochem Biophys, 2023, 81(4): 621-658.
- [21] 汪佳兵, 王石健, 魏 静, 等. 微小RNA-520e通过下调自噬调控肝癌细胞失巢凋亡抵抗[J]. 江苏医药, 2022, 48(11): 1081-1084.
- [22] WU Y R, CHEN Y, YAN X J, et al. Lopinavir enhances anoikis by remodeling autophagy in a circRNA-dependent manner[J]. Autophagy, 2024, 20(7): 1651-1672.