

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.004

· 基础研究 ·

lncRNA NEAT1 通过抑制 hsa-miR-450b-5p 促进胃癌细胞中 EZH2 的表达与细胞的增殖和迁移能力

贺娇,任伟宏(河南中医药大学第一附属医院 检验科,河南 郑州 450000)

[摘要] **目的:**筛选果蝇 Zeste 基因增强子同源物 2(EZH2)基因上游 miRNA 及 lncRNA,分析其在胃癌细胞中的表达并验证其间的靶向关系,探讨它们对胃癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响。**方法:**通过 ENCORI、miRDB 和 Target Scan 数据库查询并分析、筛选 EZH2 上游 miRNA (has-miR-450b-5p), ENCORI 数据库和 DAINA 数据库筛选 has-miR-450b-5p 上游 lncRNA (lncRNA NEAT1),预测 has-miR-450b-5p、lncRNA NEAT1 与 EZH2 之间的结合位点,双荧光素酶报告基因实验验证 has-miR-450b-5p 与 lncRNA NEAT1 的结合关系。采用 qPCR 和 WB 法检测 lncRNA NEAT1 和 EZH2 在正常胃黏膜细胞(GES-1)与胃癌细胞(MGC-803、SGC-7901 和 MKN-28)中的表达量。按转染物的不同将 MGC-803 和 SGC-7901 细胞分为 has-miR-450b-5p-mimic 组、mimic-NC 组、si-NEAT1 组和 si-NC 组,转染 36~48 h 后 qPCR 法验证过表达及敲减效果;通过 qPCR、WB 法检测观察过表达 has-miR-450b-5p 对细胞中 lncRNA NEAT1 和 EZH2 mRNA、蛋白表达的影响,以及敲减 lncRNA NEAT1 对 has-miR-450b-5p 和 EZH2 mRNA 表达的影响;CCK-8 法、划痕愈合实验和流式细胞术分别检测敲减 EZH2 或敲减 lncRNA NEAT1 对细胞增殖、迁移和凋亡能力的影响。**结果:**生物信息学分析筛选获得 EZH2 上游 miRNA 和 lncRNA 为 has-miR-450b-5p 和 lncRNA NEAT1,双荧光素酶报告基因实验验证了两者间存在靶向关系。lncRNA NEAT1 和 EZH2 mRNA、蛋白在胃癌细胞中均呈高表达(均 $P<0.05$)。与 mimic-NC 组相比,has-miR-450b-5p-mimic 组 MGC-803、SGC-7901 细胞中 miR-450b-5p 水平均显著升高,而 EZH2 mRNA、蛋白和 lncRNA NEAT1 的表达量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与 si-NC 组相比,si-NEAT1 组 MGC-803、SGC-7901 细胞中 lncRNA NEAT1 和 EZH2 mRNA 的表达量均显著降低(均 $P<0.01$),SGC-7901 细胞中 has-miR-450b-5p 表达量显著升高($P<0.05$)。敲减 EZH2 或敲减 lncRNA NEAT1 后,MGC-803、SGC-7901 细胞的增殖、迁移能力均显著降低(均 $P<0.01$)。**结论:**lncRNA NEAT1 和 EZH2 在胃癌细胞中均呈高表达,lncRNA NEAT1 可通过 has-miR-450b-5p 促进 EZH2 的表达并提高胃癌 MGC-803 和 SGC-7901 细胞的增殖和迁移能力。

[关键词] 胃癌;lncRNA NEAT1;果蝇 Zeste 基因增强子同源物 2(EZH2);miRNA;增殖;迁移

[中图分类号] R735.2;R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)02-0135-11

lncRNA NEAT1 promotes the expression of EZH2 in gastric cancer cells and improves cell proliferation and migration through inhibiting hsa-miR-450b-5p

HE Jiao, REN Weihong (Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the upstream miRNAs and lncRNAs of EZH2 gene, analyze their expressions in gastric cancer cells, verify the targeting relationship between them, and discuss their effects on the proliferation, migration and apoptosis of gastric cancer cells. **Methods:** The upstream miRNA (has-miR-450b-5p) of EZH2 was queried, analyzed and screened by ENCORI, miRDB and Target Scan databases, and the upstream lncRNA (lncRNA NEAT1) of has-miR-450b-5p was screened by ENCORI database and DAINA database. The binding sites between has-miR-450b-5p, lncRNA NEAT1 and EZH2 were predicted. Dual-luciferase reporter assay was used to verify the binding relationship between has-miR-450b-5p and lncRNA NEAT1. The expression levels of lncRNA NEAT1 and EZH2 in normal gastric epithelial cells (GES-1) and gastric cancer cells (MGC-803, SGC-7901 and MKN-28) were detected by qPCR and WB. MGC-803 and SGC-7901 cells were divided into the has-miR-450b-5p-mimic group, the mimic-NC group, the si-NEAT1 group and the si-NC group according to different transfections, and the overexpression and knockdown effects were verified by qPCR 36~48 h after transfection. qPCR and WB were used to detect and observe the effects of overexpression of has-miR-

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 82174146);河南省科技攻关项目(No. 212102310639)

[作者简介] 贺娇(1994—),女,硕士,检验技师,主要从事胃癌分子诊断研究。E-mail:1738051721@qq.com

[通信作者] 任伟宏,E-mail:ren_weihong@163.com

450b-5p on the protein expressions of lncRNA NEAT1 and EZH2 mRNA, in cells, and the effect of knockdown of lncRNA NEAT1 on the expressions of hsa-miR-450b-5p and EZH2 mRNA. CCK-8 method, scratch healing assay and flow cytometry were used to detect the effects of knockdown of EZH2 or knockdown of lncRNA NEAT1 on cell proliferation, migration, and apoptosis, respectively. **Results:** The upstream miRNA and lncRNA of EZH2 obtained through bioinformatic analysis and screening were has-miR-450b-5p and lncRNA NEAT1, and the targeting relationship between the two was verified by double luciferase reporter gene assay. lncRNA NEAT1 and EZH2 mRNA、protein were highly expressed in gastric cancer cells (both $P<0.05$). Compared with the mimic-NC group, the levels of miR-450b-5p in MGC-803 and SGC-7901 cells in the hsa-miR-450b-5p-mimic group increased significantly, while the expressions of EZH2 mRNA, protein and lncRNA NEAT1 decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the si-NC group, the expressions of lncRNA NEAT1 and EZH2 mRNA in MGC-803 and SGC-7901 cells decreased significantly in the si-NEAT1 group (both $P<0.01$), and the expression of hsa-miR-450b-5p in SGC-7901 cells increased significantly ($P<0.05$). The proliferation and migration abilities of MGC-803 and SGC-7901 cells were significantly reduced after knockdown of EZH2 or lncRNA NEAT1 (both $P<0.01$). **Conclusion:** lncRNA NEAT1 and EZH2 were highly expressed in gastric cancer cells, and lncRNA NEAT1 promoted the expression of EZH2 and improved the proliferation and migration abilities of gastric cancer MGC-803 and SGC-7901 cells through hsa-miR-450b-5p.

[Key words] gastric cancer; lncRNA NEAT1; enhancer of zeste homolog 2 (EZH2); miRNA; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(2): 135-145. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.004]

在全球范围内,胃癌是第五常见的癌症和第三大常见的病死原因^[1]。目前,胃癌最有效的诊断方法是内镜病理活组织检查,主要的治疗方法包括手术完全切除、化疗、放疗和靶向性治疗等^[2]。大多数胃癌患者在病情发展到晚期之前都是无症状的^[3],因此,阐明胃癌发生发展的分子作用机制,寻找其潜在的生物标志物和治疗靶点具有重要的临床意义。研究^[4]发现,某些特定基因的甲基化可以为胃癌提供新的分类,而且它可以预测患者的预后和肿瘤转移的风险。近年来,DNA甲基化在肿瘤转录或转录后水平调控中的作用逐渐成为研究热点。组蛋白甲基化转移酶果蝇 Zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 是位于染色体 7q35 上的基因,它内含 20 个外显子,可以编码由 746 个氨基酸组成的蛋白质^[5]。EZH2 在胃癌、乳腺癌和前列腺癌等多种实体瘤中的表达量升高,且与肿瘤细胞的增殖能力、侵袭性、转移能力、耐药性以及预后不良有关^[6]。越来越多的研究发现,lncRNA-miRNA-mRNA 相互作用的 ceRNA 网络调控通路在多种人类癌症中发挥着关键作用,例如乳腺癌^[7]、胃癌^[8]、肝癌^[9]和胰腺癌^[10]。因此,本研究拟探讨 lncRNA NEAT1、hsa-miR-450b-5p 与 EZH2 基因之间的靶向关系及其对胃癌细胞增殖和迁移能力的影响,为 EZH2 是否可作为早期胃癌诊断标志物及临床靶向性治疗的方法与策略提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

胃癌细胞(MGC-803、SGC-7901 和 MKN-28)及正常胃黏膜细胞(GES-1)均购自北纳生物有限公司,均使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基于

37 °C、含 5%CO₂ 的恒温细胞培养箱中常规培养。

RPMI 1640 培养基、青链霉素、胰蛋白酶均购自索莱宝公司, opti-MEM 购自 Gibco 公司,胎牛血清(FBS)购自澳洲 CLARK 公司, miRNA 提取纯化试剂盒、miRNA cDNA 合成试剂盒及 miRNA qPCR 定量分析试剂盒均购自康为世纪生物有限公司, TRIzol 试剂购自 Life Technologies 公司, RNA 逆转录试剂盒购自 Thermo Fisher 公司, SYBR green Premix Ex Taq™ 荧光定量检测试剂盒购自 TaKaRa 公司, qPCR 引物序列、荧光报告载体质粒 psiCHECK-2-NEAT1-WT 和 psiCHECK-2-NEAT1-MUT 由上海生物工程公司构建、合成,兔抗 EZH2 一抗购自美国 CST 公司(工作液 1:1 000 稀释), HRP 标记的山羊抗兔二抗 IgG 购自美国 Proteintech 公司(工作液 1:10 000 稀释), PVDF 膜购自美国默克密理博公司, Omni-ECL™ 超灵敏化学发光检测试剂盒购自北京索莱宝有限公司, Lipofectamine™2000 转染试剂购自上海碧云天公司, CCK-8 试剂盒和 Annexin V -FITC/PI 凋亡检测试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 生物信息学方法筛选 EZH2 上游 miRNA 及其上游 lncRNA

通过 ENCORI、miRDB 和 Target Scan 数据库分别查询 EZH2 对应的 miRNA,然后将查询到的 miRNA 数据结果导入韦恩图工具中,绘制数据集并取其交集,用 miRanda (v3.3a) 分析软件对交集集中的 miRNA 与 EZH2 的结合程度,采用 RNAfold 计算热力学稳定性,最终通过“Score”值筛选分值较高 miRNA,再在细胞中进行验证。

通过 ENCORI 数据库和 DAINA 数据分别查询筛选所得 EZH2 上游 miRNA 对应的 lncRNA,然后将查询到的 lncRNA 数据结果导入韦恩图工具中,绘制数据集并

取其交集,使用 miRanda(v3.3a)分析软件对上述交集集中的 lncRNA 与 EZH2 上游 miRNA 的位点结合程度进行分析,主要强调连接位点的进化保守性,亦偏重于以 miRNA 的 5'端序列搜索靶基因,采用 RNAfold 计算热力学稳定性。在 miRNA 和 lncRNA 比对的原始结果基础上,根据比对情况和热力学稳定性评估出来的“Score”(“评分”)值筛选 miRNA 进行后续实验,此值越大,说明结合的越好,最终通过“评分”值筛选出来分值最高的 lncRNA 进行后续实验。

1.3 qPCR 法检测胃癌细胞中 EZH2 mRNA、lncRNA NEAT1 和靶标 miRNA 的表达水平

取胃癌 MGC-803、SGC-7901、MKN-28、GES-1 细胞和转染后的 MGC-803 和 SGC-7901 细胞,用 TRIzol 试剂或 miRNA 提纯试剂盒提取 RNA,按照逆转录试剂盒或 miRNA cDNA 合成试剂盒说明书操作,合成 cDNA,用 SYBR Green Premix Ex Taq™ 试剂盒或 miRNA qPCR 定量分析试剂盒检测 EZH2 mRNA、lncRNA NEAT1 以及 hsa-miR-450b-5p 的相对表达水平,所用引物(包括所涉及的所有 mimics、siRNA 及 mimic-NC、si-NC)均由上海生物工程公司构建、合成。引物名称及序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

引物名称	引物序列(5'-3')
GADPH-F	CTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC
GADPH-R	TGAGCGATGTGGCTCGGCT
EZH2-F	GGACCACAGTGTTACCAGCAT
EZH2-R	GTGGGGTCTTTATCCGCTCAG
hsa-miR-1301-3p	ATTGCAGCTGCCTGGGAGTGA
hsa-miR-4644	AGCGCTCAAGTAGTCTGACCAGGG
hsa-miR-5047	CGTTGCAGCTGCGGTTGTAAGGT
hsa-miR-144-3p	CCGATCGCGAGCGCTACAGTATAGATG
hsa-miR-450b-5p	GCGCACGCGTTTTGCAATATGTTCTTG
U6	CCGAGAGAAGATTAGCATGGCCCCCTG
lncRNA NEAT1-F	CCTCACCTATCCCACCCTACTACAC
lncRNA NEAT1-R	CTCTCCCTCCCTCTGCCTTCAC
mimic-NC Sense	UUGUACUACACAAAAGUACUG
mimic-NC Antisense	GUACUUUUGUGUAGUACAAUU
hsa-miR-450b-5p-mimic Sense	UUUUGCAAUAUGUUCUGAAUA
hsa-miR-450b-5p-mimic Antisense	UUCAGGAACAUAUUGCAAAAUU

1.4 WB 法检测胃癌细胞中 EZH2 蛋白的表达水平

用高效 RIAP 组织/细胞裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白量后进行 SDS-PAGE 分离,剪取所需 PVDF 膜,将 PVDF 膜放入 3% BSA 封闭液中封闭 10 min, EZH2 抗体和 GAPDH 抗体分别稀释 1 000 倍、10 000 倍,随后把 PVDF 膜放入相应抗体中,置于摇床上 4℃ 下反应过夜。用 1×TBST 缓冲液在摇床上洗涤 PVDF 膜 10 min,重复 3 次,按照 HRP 标记山羊抗兔二抗 IgG 说明书,使用 1×TBST 缓冲液将二抗稀释 10 000 倍, PVDF 膜放入抗体溶液中,置于摇床上室温下反应 1 h,用 1×TBST 缓冲液在摇床上洗涤 10 min,重复 3 次,按照 Omni-ECLTM 超灵敏化学发光检测试剂盒说明书配制化学发光工作液,将其均匀地滴加到 PVDF 膜上曝光图像。用 Image J 对蛋白条带进行定量分析。

1.5 细胞分组转染

将 MGC-803 和 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板内,随机分为对照组(不转染)、hsa-miR-450b-5p-mimic 组、mimic-NC 组, si-NEAT1 组、si-NC 组, si-EZH2 组、si-NC 组。待细胞生长至覆盖孔底 50%~60% 时,分别取 3 μL 预先溶解的 siNC 和 siRNA 加至有 147 μL 的 opti-MEM 减血清培养基的 EP 管(管 1)中;取 5 μL Lipofectamine™2000 转染试剂加至有 145 μL opti 有 siRNA 的混合物逐滴加入管 2,得到转染试剂,室温静置 5 min 后,将转染试剂逐滴加至 MGC-803 和 SGC-7901 细胞中,最后用 opti-MEM 减血清培养基将孔内培养基补足 2 mL。在培养 5~6 h 后,将含有转染试剂的 opti-MEM 减血清培养基吸出,用 2 mL PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,再向各孔内加入 2 mL RPMI 1640 完全培养基,继续培养 36~48 h。

1.6 CCK-8 法检测胃癌细胞的增殖能力

转染 48 h 后,将各组 MGC-803 和 SGC-7901 细胞

按照 1×10^3 个/孔分别接种于 96 孔板中, 每组设置 4 个复孔, 于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 24 和 48 h。按照 CCK-8 试剂盒说明书, 在每个设定的检测时间点向每孔内加入 $10\ \mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 反应 30 min 后用酶标仪检测 $450\ \text{nm}$ 波长处各孔的光密度 (D) 值。实验重复 3 次, 计算细胞存活率。细胞存活率 = $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{NC组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.7 划痕愈合实验检测胃癌细胞的迁移能力

将各组 MGC-803 和 SGC-7901 细胞分别接种至 6 孔板内, 待细胞生长至覆盖孔底 95% 以上, 用 $10\ \mu\text{L}$ 无菌枪头在细胞层划“十”字交叉型痕迹, 再用 PBS 洗涤 2 次, 加入含 $10\%\text{FBS}$ 的 RPMI 1640 培养基继续培养, 并在 0 和 24 h 时进行拍照记录划痕宽度, 计算细胞迁移率。细胞迁移率 = $(0\ \text{h}$ 时划痕宽度 - $24\ \text{h}$ 时划痕宽度) / $0\ \text{h}$ 时划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.8 流式细胞术检测胃癌细胞的凋亡水平

将各组接种至 6 孔板内, 培养 36~48 h 后, 收集细胞、离心、获取所有细胞沉淀, 向其中加入 $1\ \text{mL}$ 4°C 的 PBS 重悬细胞沉淀, 再次洗涤细胞后用 $1 \times$ 结合缓冲液重悬细胞, 调整其密度为 1×10^6 个/mL, 取 $100\ \mu\text{L}$ 细胞悬液加入流式管中, 加入 $5\ \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 染液, 混匀后室温下避光反应 5 min; 加入 $5\ \mu\text{L}$ 的 PI 染液、 $400\ \mu\text{L}$ PBS, 轻轻混匀后使用流式细胞仪进行检测。

1.9 双荧光素酶报告基因实验

将荧光报告载体质粒 psiCHECK-2-NEAT1-WT 和 psiCHECK-2-NEAT1-MUT 分别与 hsa-miR-450b-5p-mimic-NC、hsa-miR-450b-5p-mimic 共转染至 SGC-7901 细胞, 48 h 后裂解细胞, 取 $20\ \mu\text{L}$ 细胞混悬液与 $100\ \mu\text{L}$ 萤火虫荧光素酶加入 96 孔板中, 振荡混匀后测得萤火虫荧光素酶活性; 加入 $100\ \mu\text{L}$ 海肾荧光素酶, 振荡混匀后测得海肾荧光素酶活性。psiCHECK2 载体以萤火虫荧光素酶活性为内参, psiCHECK-2-NEAT1-WT

和 psiCHECK-2-NEAT1-cRNA NEAT1 MUT 的表达为对照, 测定 SGC-7901 细胞的海肾荧光素酶活性和萤火虫荧光素酶活性, 两者的比值即相对荧光素酶活性。

1.10 统计学处理

该实验涉及的所有实验数据均使用 Prism 进行可视化图形绘制和统计学分析。运用正态性检验和配对 t 检验进行两组间比较, 分析数据的统计学意义。符合正态分布的计量资料均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有的实验均重复 3 次或以上, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EZH2 基因上游 miRNA 的查询及筛选

2.1.1 从数据库中查询到 5 个 EZH2 上游 miRNA

通过 ENCORI、miRDB 和 Target Scan 数据库分析, 绘制出 3 个数据集, 其交集集中有 18 个 miRNA (图 1)。用 miRanda (v3.3a) 分析软件对上述 18 个 miRNA 与 EZH2 的结合程度进行分析, 最终通过“评分”值筛选出来分值较高的 5 个 miRNA: hsa-miR-1301-3p、hsa-miR-4465、hsa-miR-5047、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-450b-5p。mRNA 与 miRNA 热力学稳定性分析 (表 2)。



图 1 生物信息学方法分析 EZH2 基因上游 miRNA

表 2 EZH2 与 miRNA 热力学分析结果

miRNA	mRNA	评分	热能	miRNA_起始	miRNA_终止	mRNA_起始	mRNA_终止	结合长度	比对率/%
hsa-miR-1301-3p	EZH2-mRNA	157	-22.53	2	20	2536	2558	18	83.33
hsa-miR-4465	EZH2-mRNA	152	-13.09	2	13	2612	2633	11	90.91
hsa-miR-5047	EZH2-mRNA	152	-21.31	2	20	2540	2558	18	77.78
hsa-miR-144-3p	EZH2-mRNA	149	-15.55	2	15	2039	2062	17	76.47
hsa-miR-450b-5p	EZH2-mRNA	148	-9.38	2	13	2178	2199	11	90.91
hsa-miR-26a-5p	EZH2-mRNA	147	-10.11	2	12	2612	2633	10	90.00
hsa-miR-26b-5p	EZH2-mRNA	147	-11.31	2	18	2614	2633	16	75.00
hsa-miR-1297	EZH2-mRNA	146	-10.86	2	13	2618	2633	11	90.91
hsa-miR-892c-5p	EZH2-mRNA	145	-10.86	2	10	2463	2483	8	100.00
hsa-miR-138-5p	EZH2-mRNA	143	-19.25	2	21	2530	2554	21	71.43

2.1.2 筛选获得 EZH2 基因的上游 miRNA 为 hsa-miR-450b-5p

qPCR 法检测结果显示,敲低 MGC-803(表 3)和 SGC-7901(表 4)细胞中 EZH2 的表达后,只有 hsa-

miR-1301-3p、hsa-miR-4465 和 hsa-miR-450b-5p 的表达量在 2 种胃癌细胞中升高,且差异具有统计学意义 ($P<0.05$);并且只有 hsa-miR-450b-5p 在 3 种胃癌细胞中的表达量均低于 GES-1 细胞($P<0.01$,图 2)。

表3 胃癌细胞MGC-803中沉默 EZH2 后 miRNA 表达量的分析

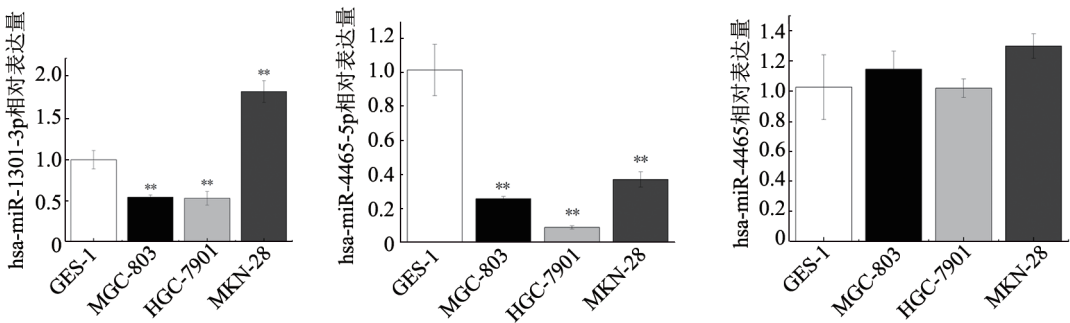
组 别	hsa-miR-1301-3p	hsa-miR-4465	hsa-miR-5047	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-450b-5p
NC 组	1.015±0.182	1.010±0.138	1.045±0.324	1.001±0.049	1.007±0.111
siRNA 组	2.405±0.366*	1.439±0.070*	1.717±0.375	1.577±0.533	2.754±0.053*
t	10.20	4.427	1.409	2.300	23.60

与 NC 组相比,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 。

表4 胃癌细胞SGC-7901中沉默 EZH2 后 miRNA 表达量的分析

组 别	hsa-miR-1301-3p	hsa-miR-4465	hsa-miR-5047	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-450b-5p
NC 组	1.001±0.042	1.095±0.444	1.008±0.127	1.002±0.055	1.000±0.009
siRNA 组	1.667±0.118*	9.754±0.859*	1.589±0.078*	0.760±0.133	1.403±0.108*
t	9.613	14.93	5.656	3.235	4.878

与 NC 组相比,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 。



与 GES-1 细胞相比,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 。

图2 hsa-miR-1301-3p、hsa-miR-4465 和 hsa-miR-450b-5p 在 GES-1 和 3 种胃癌细胞中的表达

2.2 生物信息学分析获 hsa-miR-450b-5p 上游 lncRNA 为 NEAT1

通过 ENCORI 数据库和 DAINA 数据分别查询 hsa-miR-450b-5p 对应的 lncRNA,然后将查询到的 lncRNA 数据结果导入韦恩图工具中,将两个数据库中的数据取交集,最终得到 2 个 lncRNA,分别是 lncRNA NEAT1 和 lncRNA XIST(图 3)。使用 miRanda(v3.3a)分析软件对上述 2 个 lncRNA 与 hsa-miR-450b-5p 的位点结合程度进行分析,最终通过

“评分”值筛选出来分值最高的 lncRNA NEAT1 进行后续实验(表 5)。

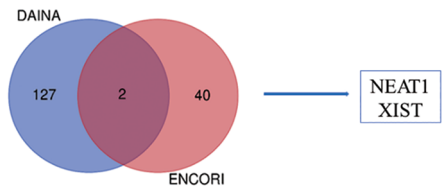


图3 生物信息学方法分析 hsa-miR-450b-5p 上游 lncRNA

表5 lncRNA 与 hsa-miR-450b-5p 热力学稳定性分析结果

miRNA	lncRNA	评分	热能	miRNA_start	miRNA_end	lncRNA_start	lncRNA_end	Aligen Len	比对率/%	比对率/%
hsa-miR-450b-5p	NEAT1	162	-16.31	2	20	16 490	16 513	20	75.00	80.00
hsa-miR-450b-5p	XIST	155	-11.91	2	17	16 240	16 262	16	81.25	81.25

2.3 lncRNA NEAT1 和 EZH2 在胃癌细胞中均呈高表达

qPCR 法检测结果显示, lncRNA NEAT1 (图 4A) 和 EZH2 (图 4B) 在 MGC-803、SGC-7901 和 MKN-28 细胞中的表达量均显著高于 GES-1 细胞 (均 $P < 0.01$)。WB 法检测结果 (图 4C) 显示, EZH2 在 MGC-803、SGC-7901 和 MKN-28 细胞中的表达量均显著高于 GES-1 细胞 (均 $P < 0.01$)。

2.4 mimics、siRNA 转染后效果验证

2.4.1 siRNA 敲减 EZH2 的 PCR 验证结果

在胃癌细胞 MGC-803 (图 5A) 中, 与 si-NC 组相比, 转染 siRNA-919、siRNA-1683 和 siRNA-410 后, EZH2 的表达量均显著降低 (均 $P < 0.01$), 敲减率分别为 $(43.6 \pm 0.042)\%$ 、 $(55.7 \pm 0.062)\%$ 和 $(62.8 \pm 0.095)\%$ 。在胃癌细胞 SGC-7901 (图 5B) 中, 与 NC 组相比, 转染 siRNA-919 后未达到敲减 EZH2 的目的; 转染 siRNA-1683 后 EZH2 敲减率为 $(46.1 \pm 0.034)\%$, 但差异不具统计学意义 ($P > 0.05$); 转染 siRNA-410 后 EZH2 显著降低, 敲减率为 $(41.0 \pm 0.072)\%$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。综上所述, siRNA-410 对 EZH2 的敲减效

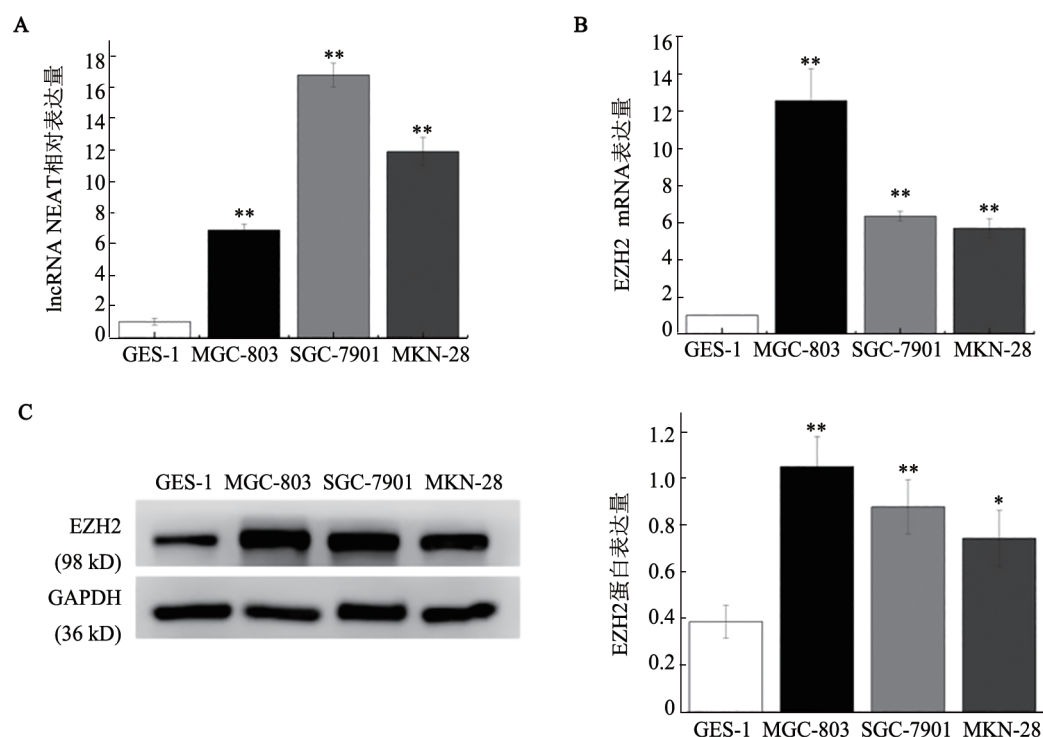
果较好, 可用于后续 EZH2 对胃癌细胞生物学功能影响的研究。

2.4.2 siRNA-410 敲减 EZH2 蛋白的 WB 法验证结果

WB 法检测结果 (图 6) 显示, 在 MGC-803 细胞 $[(0.953 \pm 0.054) \text{ vs } (0.689 \pm 0.041)]$ 和 SGC-7901 细胞 $[(0.893 \pm 0.015) \text{ vs } (0.640 \pm 0.046)]$ 中, si-NC 组 EZH2 相对表达水平均显著高于 si-EZH2 组 (均 $P < 0.01$), 说明 siRNA-410 可以有效敲减胃癌细胞中的 EZH2 蛋白表达。

2.4.3 转染 has-miR-45b-5p-mimic 后 has-miR-45b-5p 过表达效果验证

qPCR 法检测结果显示, 相较于 mimic-NC 组, 在 MGC-803 细胞中, has-miR-45b-5p-mimic 组 has-miR-45b-5p 的表达量升高至 mimic-NC 组的 (14.153 ± 1.376) 倍, 在 SGC-7901 细胞中, has-miR-45b-5p-mimic 组 has-miR-45b-5p 的表达量升高至 mimic-NC 组的 (906.589 ± 224.777) 倍, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。结果说明, 转染 has-miR-45b-5p-mimic 可以有效提高胃癌细胞中的 has-miR-45b-5p 的表达量, 可用于后续 miRNA 上下游作用机制的探讨。



A: qPCR 法检测 lncRNA NEAT1 的表达; B: qPCR 法检测 EZH2 mRNA 的表达; C: WB 法检测 EZH2 蛋白的表达。

与 GES-1 细胞相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 lncRNA NEAT1 和 EZH2 在胃癌细胞和正常胃黏膜细胞 GES-1 中的表达

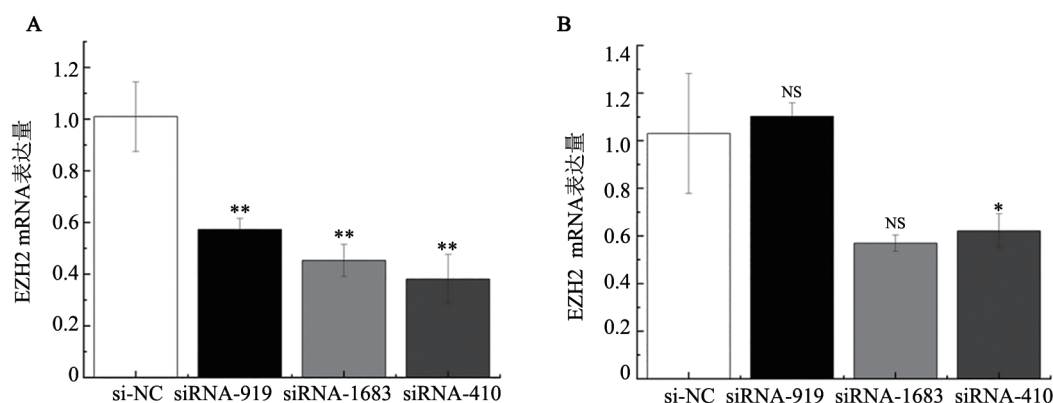
2.4.4 siRNA 对 lncRNA NEAT1 敲减效果的验证

qPCR 法检测结果显示, 在胃癌细胞 MGC-803 (图 7A) 中, 与 si-NC 组相比, 转染 hNEAT1-1811 和

hNEAT1-2396 后, lncRNA NEAT1 敲减率分别为 $(30.2 \pm 0.055)\%$ 和 $(60.4 \pm 0.012)\%$, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 但转染 hNEAT1-3006 不能有效敲

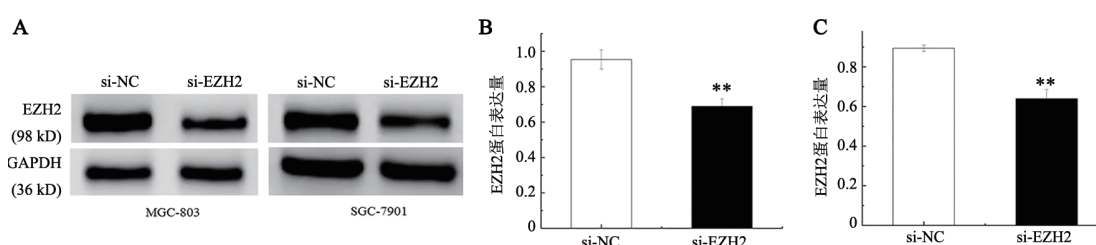
减($P>0.05$)。在胃癌细胞 SGC-7901(图 7B)中,与 NC 组相比,转染 hNEAT1-1811、hNEAT1-2396 和 hNEAT1-3006 后,lncRNA NEAT1 的表达量均显著降低,敲减率分别为 $(38.2\pm 0.050)\%$ 、 $(48.1\pm 0.035)\%$ 和

$(16.0\pm 0.032)\%$,差异均具有统计学意义(均 $P<0.01$)。综上,hNEAT1-2396 对 lncRNA NEAT1 的敲减效果较好,可用于后续 lncRNA NEAT1 对胃癌细胞生物学功能影响的研究。



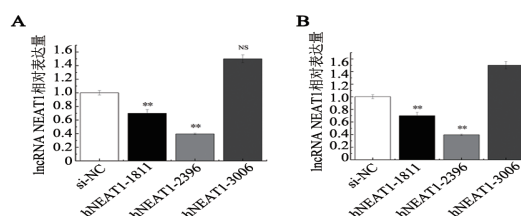
与 si-NC 组相比,NS $P>0.05$ 、* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 。

图5 转染 siRNA 敲减胃癌细胞 MGC-803(A)和 SGC-7901(B)中 EZH2 效果



A: 转染 siRNA 后胃癌细胞(MGC-803、SGC-7901)中 EZH2 蛋白表达情况;B、C: 转染 siRNA 后胃癌细胞 MGC-803(B)和 SGC-7901(C)中 EZH2 蛋白相对表达量的统计分析。与 si-NC 组相比,** $P<0.01$ 。

图6 转染 si-EZH2 成功敲低胃癌细胞中 EZH2 蛋白表达



与 si-NC 组相比,NS $P>0.05$ 、** $P<0.01$ 。

图7 转染 siRNA 对胃癌细胞 MGC-803(A)和 SGC-7901(B)中 lncRNA NEAT1 沉默效果的分析

2.5 lncRNA NEAT1、hsa-miR-450b-5p 与 EZH2 之间具有互作关系

2.5.1 过表达 hsa-miR-450b-5p 使胃癌细胞中 EZH2 和 lncRNA NEAT1 的表达降低

qPCR 法检测 EZH2 mRNA 表达,结果显示,hsa-miR-450b-5p-mimic 组 MGC-803 细胞中 EZH2 mRNA 的表达量是 mimic-NC 组的 (0.822 ± 0.062) 倍,hsa-miR-450b-5p-mimic 组 SGC-7901 细胞中 lncRNA NEAT1 的表达量是 mimic-NC 组的 (0.176 ± 0.022) 倍,

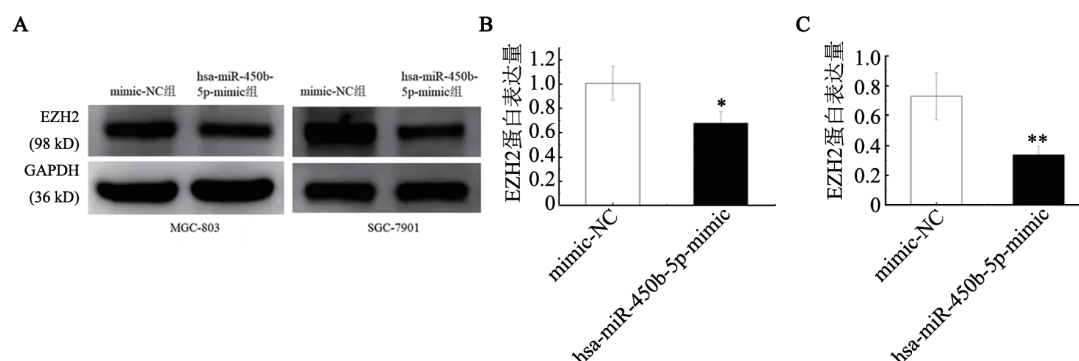
差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$),说明过表达 hsa-miR-450b-5p 可以抑制下游靶标 EZH2 的表达。WB 法检测结果(图 8)显示,与 mimic-NC 组相比,hsa-miR-450b-5p-mimic 组中 EZH2 在 MGC-803 和 SGC-7901 细胞中表达量均有所降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。qPCR 法检测 lncRNA NEAT1 表达,结果显示,与 mimic-NC 组相比,hsa-miR-450b-5p-mimic 组 MGC-803 和 SGC-7901 细胞中 lncRNA NEAT1 的表达量均显著降低(均 $P<0.05$),其中,MGC-803 细胞中 lncRNA NEAT1 的表达量是 mimic-NC 组的 (0.796 ± 0.032) 倍,在 SGC-7901 细胞中 lncRNA NEAT1 的表达量是 mimic-NC 组的 (0.073 ± 0.010) 倍。

2.5.2 沉默 lncRNA NEAT1 使胃癌细胞中 hsa-miR-450b-5p 表达增加、EZH2 表达量降低

qPCR 检测结果显示,与 si-NC 组相比,si-NEAT1 组 hsa-miR-450b-5p 在 SGC-7901 细胞中表达量是 si-NC 组的 2.220 ± 0.307 倍($P<0.05$),但在 MGC-803 细胞中 si-NEAT1 组和 si-NC 组中 hsa-miR-450b-5p 的表

达量没有发生明显变化[(1.010±0.152) vs (1.017±0.066), $P>0.05$]。与 si-NC 组相比, si-NEAT1 组中 EZH2 mRNA 在 MGC-803 和 SGC-7901 细胞中表达量均显著降低(均 $P<0.01$), 其中, 在 MGC-803 细胞中

EZH2 的表达量是 NC 组的(0.746±0.044)倍, 在 SGC-7901 中 EZH2 的表达量是 mimic-NC 组的(0.721±0.130)倍。



A: 过表达 hsa-miR-450b-5p 抑制 MGC-803、SGC-7901 细胞中 EZH2 蛋白的表达; B、C: MGC-803 (B)、SGC-7901 (C) 细胞中 EZH2 蛋白相对表达量的统计分析。与 mimic-NC 组相比, * $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 。

图 8 过表达 hsa-miR-450b-5p 后胃癌细胞中 EZH2 蛋白相对表达量

2.5.3 ENCORI 网站预测靶向结合能力及双荧光素酶报告基因实验

为了进一步明确 hsa-miR-450b-5p 与 lncRNA

NEAT1 之间的靶向结合关系, 使用 ENCORI 网站数据库预测 hsa-miR-450b-5p 与 LNCRNA NEAT1、的靶向结合位点, 发现结合能力均较高(表 6)。

表 6 hsa-miR-450b-5p 与 lncRNA NEAT1 的靶向结合

	结合位点	位点类型
lncRNA NEAT1	Target: 5' uucuaauGAUUGUUUGCAAAa 3'	
	::	8mer
hsa-miR-450b-5p	miRNA : 3' auaagucCUUGUAUAACGUUUu 5'	

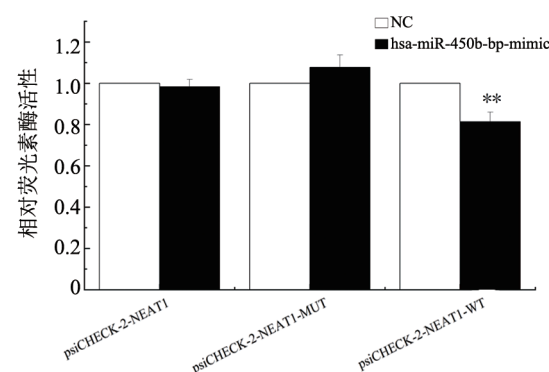
双荧光素酶报告基因实验结果(图 9)显示, 与 hsa-miR-450b-5p-mimic-NC+psiCHECK-2-NEAT1-WT 组相比, hsa-miR-450b-5p-mimic+psiCHECK-2-NEAT1-WT 组细胞荧光素酶相对活性显著降低($P<0.01$); 而 hsa-miR-450b-5p-NC+psiCHECK-2-NEAT1 组、hsa-miR-450b-5p-mimic+psiCHECK-2-NEAT1 组、hsa-miR-450b-5p-mimic+psiCHECK-2-NEAT1-MUT 组和 hsa-miR-450b-5p-mimic+psiCHECK-2-NEAT1-MUT 组相比较细胞荧光素酶相对活性均无明显差异($P>0.05$)。

2.6 沉默 EZH2 对胃癌细胞生物学功能的影响

2.6.1 沉默 EZH2 降低胃癌细胞的增殖能力

CCK-8 法检测结果(图 10)显示, 与 NC 组比较, 沉默 EZH2 后, MGC-803 细胞存活率在 24 和 48 h 时均显著降低(均 $P<0.01$), SGC-7901 细胞存活率在 48 h 时显著降低($P<0.01$)。综上所述, EZH2 对胃癌细胞增殖能力有一定的影响, 沉默 EZH2 可以降低胃

癌细胞增殖能力。



与 NC 组相比, ** $P<0.01$

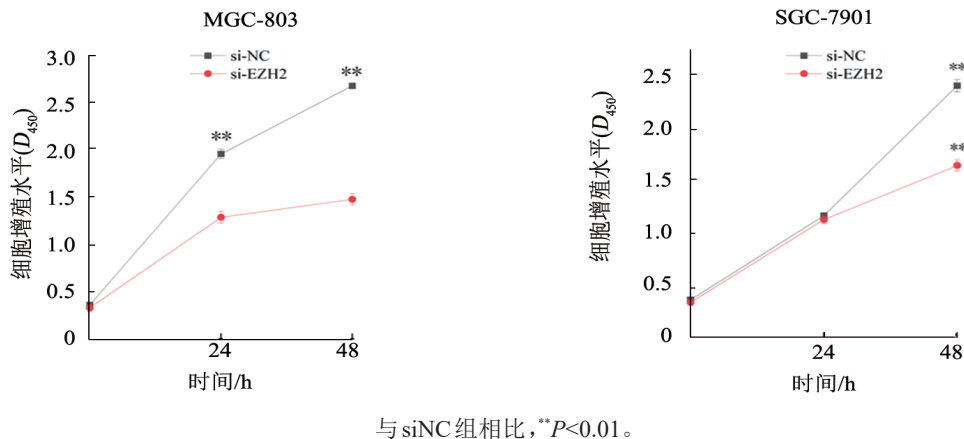
图 9 双荧光素酶报告基因实验验证 hsa-miR-450b-5p 与 lncRNA NEAT1 间的结合关系

2.6.2 沉默 EZH2 降低胃癌细胞的迁移能力

划痕愈合实验结果(图 11)显示, si-EZH2 组 MGC-803 细胞[(36.0±3.442)% vs (68.9±0.816)%, $P<0.01$],

SGC-7901 细胞[(13.0±2.197)% vs (42.9±2.616)% ,
P<0.01)]均显著低于 si-NC 组。
2.6.3 沉默 EZH2 对胃癌细胞凋亡无显著影响
流式细胞术检测结果(图 12)显示, si-EZH2 组

MGC-803 细胞[(29.0±1.171)% vs (30.2±1.014)%],
SGC-7901 细胞[(29.8±2.959)% vs (24.9±1.357)%]与
对应的 si-NC 组均无显著差异(均 P>0.05)。



与 siNC 组相比, **P<0.01。
图 10 沉默 EZH2 对 MGC-803、SGC-7901 细胞增殖能力的影响

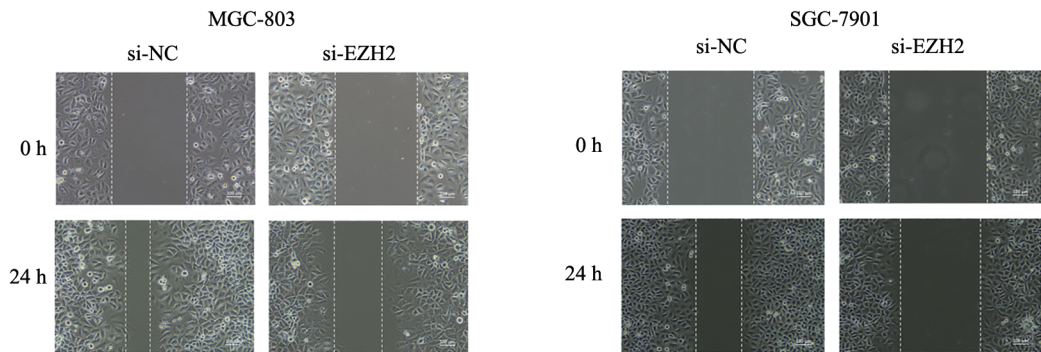


图 11 沉默 EZH2 对 MGC-803 和 SGC-7901 细胞迁移能力的影响

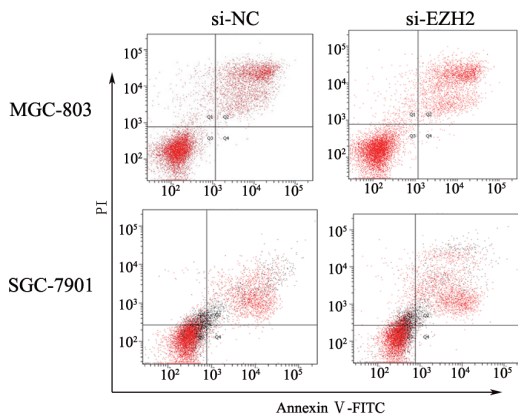


图 12 沉默 EZH2 对 MGC-803 和 SGC-7901 细胞凋亡的影响

2.7 沉默 lncRNA NEAT1 对胃癌细胞生物学功能的影响

2.7.1 沉默 lncRNA NEAT1 降低胃癌细胞的增殖能力
CCK-8 法检测结果(图 13)显示, 与 si-NC 组比较, si-NEAT1 组 24、48 h 后, MGC-803 和 SGC-7901 细

胞增殖能力均显著降低(P<0.05 或 P<0.01)。
2.7.2 沉默 lncRNA NEAT1 降低胃癌细胞的迁移能力
划痕愈合实验结果(图 14)显示, si-NEAT1 组 MGC-803 细胞[(40.7±5.906)% vs (70.7±0.727)% ,
P<0.05]、SGC-7901 细胞[(25.9±9.631)% vs (54.2±9.486)% , P<0.05]迁移率均显著低于 si-NC 组。

3 讨论

胃癌是一种预后较差的异质性疾病, 是全球三大癌症相关死亡原因。胃癌的进展过程涉及多个阶段和多种因素, 发病机制较为复杂。因此, 现在迫切需要确定胃癌发生发展和转移相关的关键分子作用机制, 以提高早期诊断、临床治疗和预后。
除了遗传改变外, 表观遗传异常调控在致癌作用和癌症发展中起重要作用, 其中基因转录失调是癌症表型的决定因素^[11]。表观遗传调控在多种肿瘤的发生发展、转移等过程中发挥较为重要的作用, 如胶质母细胞瘤^[12]、乳腺癌^[13]、胃癌^[14]等。DNA 甲基化

是表观遗传调控机制中的一种类型,对调节基因转录至关重要。目前研究已经在肝癌^[15]、乳腺癌^[16]等多种癌症中发现异常基因DNA甲基化。EZH2基因具备组蛋白甲基转移酶相关活性,可参与DNA甲基化^[17]。本研究将与DNA甲基化相关的EZH2作为目的基因,对与其相关的上游调控因子及其在胃癌细胞生物学功能中的作用展开研究。EZH2在多种肿

瘤中过表达,包括卵巢癌^[18]、胃癌^[19]、乳腺癌^[20]、胰腺癌^[21]等,并且与侵袭性疾病的发病机制相关,导致其一度被认为是癌基因。在基因水平和蛋白水平实验结果均证实了EZH2在胃癌细胞中呈高表达。从这一现象提示,EZH2有望成为胃癌早期诊断的标志物之一。

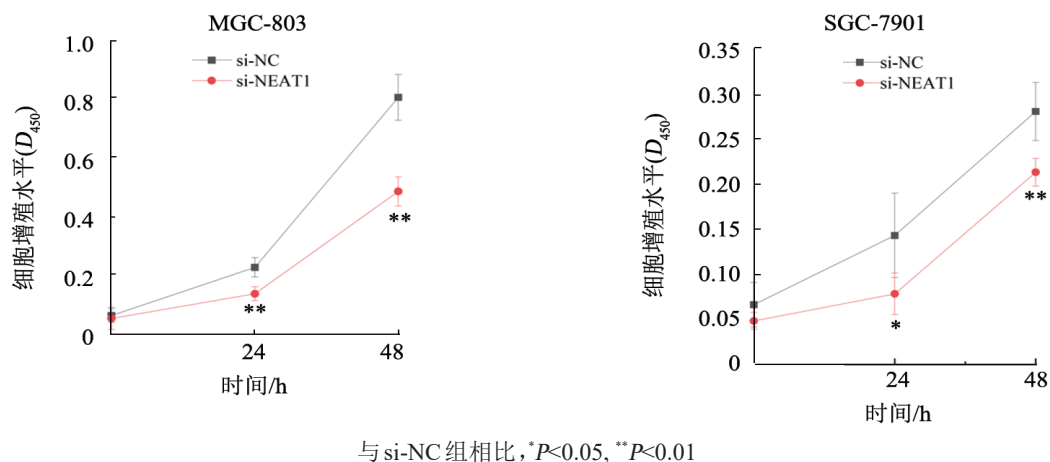


图13 沉默EZH2对MGC-803和SGC-7901细胞增殖能力的影响

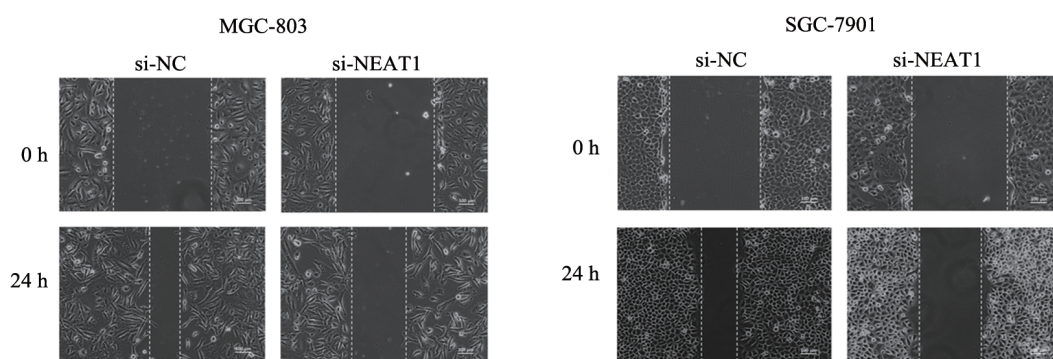


图14 沉默EZH2对MGC-803和SGC-7901细胞迁移能力的影响

为了进一步探究调控EZH2的上游分子作用机制,本研究利用生物信息分析手段,通过数据库查询EZH2上游靶标miRNA和上游lncRNA,并使用miRanda(v3.3a)分析软件对miRNA与EZH2、hsa-miR-450b-5p与lncRNA的位点结合程度进行热力学稳定性分析,结果发现hsa-miR-450b-5p同时在3种胃癌细胞中低表达,lncRNA NEAT1在3种胃癌细胞中均高表达;同时过表达hsa-miR-450b-5p后EZH2和lncRNA NEAT1表达均相应地降低。沉默lncRNA NEAT1后下游EZH2表达随之降低,hsa-miR-450b-5p在胃癌SGC-7901中的表达随之增高,但是在胃癌细胞MGC-803中的表达没有发生明显的变化,hsa-miR-450b-5p在另种胃癌细胞中的表达情况变化不一致可能是细胞分化程度或者细胞来源肿瘤部位不

同造成的。为了明确hsa-miR-450b-5p与lncRNA NEAT1、hsa-miR-450b-5p与EZH2之间的靶向结合关系,本研究使用TargetScan数据库预测hsa-miR-450b-5p与lncRNA NEAT1、hsa-miR-450b-5p与EZH2的靶向结合位点,发现结合能力均较高。为了进一步研究hsa-miR-450b-5p与lncRNA NEAT1的结合关系,本研究使用双荧光素酶报告基因实验hsa-miR-450b-5p与lncRNA NEAT1的结合关系,结果显示将psiCHECK-2-NEAT1-WT和hsa-miR-450b-5p-mimic同时转染进SGC-7901中,显著抑制了SGC-7901细胞的荧光素酶活性。可见,lncRNA NEAT1、hsa-miR-450b-5p和EZH2在胃癌细胞中的表达有一定程度的相互影响。同时验证了EZH2和lncRNA NEAT1对胃癌细胞生物学功能的影响,实验结果表明沉默

EZH2 和 lncRNA NEAT1 均可以抑制胃癌细胞的增殖和迁移能力。

综上,本研究证实 EZH2 在人胃癌细胞中呈高表达,且可以促进胃癌细胞的增殖和迁移,但对凋亡没有影响;同时通过生物信息技术分析发现 lncRNA NEAT1 和 hsa-miR-450b-5p 与 EZH2 之间有靶向关系,为 EZH2 应用于胃癌早期诊断、靶向性临床治疗以及预后评估提供一定的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, *et al.* Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648. DOI: 10.1016/s0140-6736(20)31288-5.
- [2] JOHNSTON F M, BECKMAN M. Updates on management of gastric cancer[J/OL]. *Curr Oncol Rep*, 2019, 21(8): 67 [2023-10-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31236716/>. DOI: 10.1007/s11912-019-0820-4.
- [3] NECULA L, MATEI L, DRAGU D, *et al.* Recent advances in gastric cancer early diagnosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(17): 2029-2044. DOI: 10.3748/wjg.v25.i17.2029.
- [4] CHOI R S Y, LAI W Y X, LEE L T C, *et al.* Current and future molecular diagnostics of gastric cancer[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2019, 19(10): 863-874. DOI: 10.1080/14737159.2019.1660645.
- [5] LEE C H, LI Y Y, KIM H, *et al.* The role of EZH1 and EZH2 in development and cancer[J]. *BMB Rep*, 2022, 55(12): 595-601. DOI: 10.5483/bmbrep.2022-0174.
- [6] HAO A X, WANG Y X, STOVALL D B, *et al.* Emerging roles of lncRNAs in the EZH2-regulated oncogenic network[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(13): 3268-3280. DOI: 10.7150/ijbs.63488.
- [7] FAN C N, MA L, LIU N. Systematic analysis of lncRNA-miRNA-mRNA competing endogenous RNA network identifies four-lncRNA signature as a prognostic biomarker for breast cancer [J/OL]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 264[2023-10-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30261893/>. DOI: 10.1186/s12967-018-1640-2.
- [8] WANG P C, LI J, ZHAO W, *et al.* A novel lncRNA-miRNA-mRNA triple network identifies lncRNA RP11-363E7.4 as an important regulator of miRNA and gene expression in gastric cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(3): 1025-1041. DOI: 10.1159/000490168.
- [9] YAN H X, WANG Q, SHEN Q, *et al.* Identification of potential transcription factors, long noncoding RNAs, and microRNAs associated with hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(Supplement): S622-S627. DOI: 10.4103/0973-1482.204846.
- [10] SUN Y P, ZHU Q D, YANG W J, *et al.* lncRNA H19/miR-194/PFTK1 axis modulates the cell proliferation and migration of pancreatic cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 3874-3886. DOI: 10.1002/jcb.27669.
- [11] DUAN R, DU W F, GUO W J. EZH2: a novel target for cancer treatment[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 104[2023-10-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32723346/>. DOI: 10.1186/s13045-020-00937-8.
- [12] WANG L, CAO H Y, ZHONG Y, *et al.* The role of m6A regulator-mediated methylation modification and tumor microenvironment infiltration in glioblastoma multiforme[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 842835[2023-10-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35265626/>. DOI: 10.3389/fcell.2022.842835.
- [13] WANG Y, DAN L Y, LI Q Q, *et al.* ZMYND10, an epigenetically regulated tumor suppressor, exerts tumor-suppressive functions via miR145-5p/NEDD9 axis in breast cancer[J/OL]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1): 184[2023-10-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31801619/>. DOI: 10.1186/s13148-019-0785-z.
- [14] ZHAO L F, QI F Y, ZHANG J G, *et al.* Identification of the upstream regulators of KDM5B in gastric cancer[J/OL]. *Life Sci*, 2022, 298: 120458[2023-10-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35248525/>. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120458.
- [15] MEKKY M A, SALAMA R H, ABDEL-AAL M F, *et al.* Studying the frequency of aberrant DNA methylation of APC, P14, and E-cadherin genes in HCV-related hepatocarcinogenesis[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(3): 503-509. DOI: 10.3233/CBM-171156.
- [16] QI M, XIONG X. Promoter hypermethylation of RAR β 2, DAPK, hMLH1, p14, and p15 is associated with progression of breast cancer: a PRISMA-compliant meta-analysis[J/OL]. *Medicine*, 2018, 97(51): e13666[2023-10-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30572486/>. DOI: 10.1097/MD.00000000000013666.
- [17] LIU Y K, YANG Q. The roles of EZH2 in cancer and its inhibitors [J/OL]. *Med Oncol*, 2023, 40(6): 167[2023-10-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37148376/>. DOI: 10.1007/s12032-023-02025-6.
- [18] WEN Y P, HOU Y Y, YI X Q, *et al.* EZH2 activates CHK1 signaling to promote ovarian cancer chemoresistance by maintaining the properties of cancer stem cells[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1795-1813. DOI: 10.7150/thno.48101.
- [19] CHEN Z L, YUAN L Y, LI X P, *et al.* BMP2 inhibits cell proliferation by downregulating EZH2 in gastric cancer[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(21): 2298-2308. DOI: 10.1080/15384101.2022.2092819.
- [20] ZHANG L, QU J K, QI Y T, *et al.* EZH2 engages TGF β signaling to promote breast cancer bone metastasis via integrin β 1-FAK activation[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2543. DOI: 10.1038/s41467-022-30105-0.
- [21] 柳君君, 张燕燕, 雷衡阳. miR-32-5p 通过靶向下调 EZH2 的表达抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的恶性生物学行为与裸鼠移植瘤生长 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(6): 557-566. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.007.

[收稿日期] 2023-10-22

[修回日期] 2024-02-18

[本文编辑] 黄静怡