

lncRNA PVT1 表达在胃癌预后评估及恶性进展中的作用:基于列线图模型与细胞功能实验的研究

陈文亮¹,王欢欢²,郝金锦³,弓蕊³,赵强³,张飞³,高磊³,董静逊⁴

(1.山西医科大学第二医院普通外科,山西太原 030001; 2.山西省晋城市人民医院普通外科,山西晋城 048026; 3.山西医科大学研究生院,山西太原 030001; 4.山西省肿瘤医院消化微创外科,山西太原 030013)

摘要:目的 探讨基于长链非编码 RNA 浆细胞瘤变异易位 1(long noncoding RNA plasmacytoma variant translocation 1, lncRNA PVT1)列线图模型预测胃癌(gastric cancer, GC)术后生存概率的价值,分析 lncRNA PVT1 对胃癌细胞增殖、侵袭能力的影响。方法 采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)法检测 196 例 GC 组织及配对癌旁正常胃黏膜组织中 lncRNA PVT1 和 c-Myc 表达水平,采用 Western blotting 法检测 GC 组织中 c-Myc 蛋白表达,并进行 GC 相关临床病理特征的生存分析和 Cox 回归分析,构建预后模型。以 MGC-803 细胞为研究对象,将转染 siRNA-lncRNA PVT1 组设为实验组,转染 siRNA-NC 组设为生理盐水对照组(siNC),空白对照组不进行任何转染,Western blotting 检测 GC 细胞中 c-Myc 蛋白表达,通过 CCK-8、Transwell 实验检测 GC 细胞增殖、侵袭能力。结果 GC 组织中 lncRNA PVT1 表达($P=0.002$)、c-Myc mRNA 表达($P=0.013$)和蛋白表达($P=0.024$)显著高于癌旁正常组织;单因素生存分析和多因素 Cox 回归分析显示,年龄($P=0.004$)、Lauren's 分型($P=0.021$)、肿瘤局部浸润($P<0.001$)、pTNM 分期($P=0.020$)、局部淋巴结转移($P=0.002$)、lncRNA PVT1 表达水平($P<0.001$)与 GC 患者总生存期(overall survival, OS)显著相关,是其独立危险因素。基于 lncRNA PVT1 的列线图模型预测胃癌术后 1 年、2 年、3 年 OS 生存概率分别为 0.997、0.937、0.828;敲减 lncRNA PVT1 后,与 siNC 组相比,siPVT1-1907 组 c-Myc mRNA($P<0.001$)和蛋白表达($P=0.006$)、细胞增殖($P<0.001$)和侵袭能力($P=0.028$)均显著降低。结论 lncRNA PVT1 在胃癌中高表达,并与患者预后显著相关。基于 lncRNA PVT1 的列线图模型对胃癌术后生存概率具有较好的预测能力。lncRNA PVT1 通过促进胃癌细胞 Myc 的表达而发挥致癌作用,高表达的 lncRNA PVT1 具有促进胃癌细胞增殖、侵袭的作用,提示 lncRNA PVT1-Myc 调控网络可能成为胃癌临床治疗的新靶点。

关键词:浆细胞瘤变异易位 1;胃癌;预后;列线图;癌基因 Myc;RNA 干扰

中图分类号:R735.2

文献标志码:A

The role of lncRNA PVT1 in prognostic assessment and malignant progression of gastric cancer: a study based on nomogram model and functional cellular experiments

CHEN Wenliang¹, WANG Huanhuan², HAO Jinjin³, GONG Rui³, ZHAO Qiang³, ZHANG Fei³, GAO Lei³, DONG Jingxun⁴

(1. Department of General Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China;

2. Department of General Surgery, Jincheng People's Hospital, Jincheng 048026, Shanxi, China;

3. Graduate Department of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China;

4. Department of Minimal Invasive Digestive Surgery, Shanxi Provincial Cancer Hospital, Taiyuan 030013, Shanxi, China)

Abstract: Objective To explore the prognostic value of the long noncoding RNA plasmacytoma variant translocation 1 (lncRNA PVT1) nomogram model in predicting postoperative survival in patients with gastric cancer (GC), and to investigate the effects of lncRNA PVT1 on the proliferation and invasion of GC cells. **Methods** A quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was employed to measure the expression levels of lncRNA PVT1 and c-Myc in GC tissues and paired gastric mucosa tissues from 196 patients. The expression of c-Myc protein in GC tissues was detected using the western blotting technique. The investigation involved the implementation of survival analysis and Cox regression analysis, with the objective of elucidating the clinicopathological factors associated with GC and the construction of a prognostic model. *In vitro*, MGC-803 cells were subjected to transfection with a specific interfering RNA (siRNA) designed to target lncRNA PVT1. The experimental design involved the establishment of three distinct groups: the experimental group, which received the targeted knockdown via the PVT1-siRNA, the control group, which received a non-specific negative control via the PVT1-siRNA, and a third group that served as a blank control, receiving no transfection. The expression of c-Myc protein in GC cells was measured using Western blotting, while cell proliferation and invasion were evaluated using CCK-8 and Transwell assays, respectively. **Results** The expression of lncRNA PVT1 ($P=0.002$), along with c-Myc mRNA expression ($P=0.013$) and protein levels ($P=0.024$), was significantly elevated in GC tissues compared to adjacent normal tissues. Univariate survival analysis and multivariate Cox regression analysis identified several factors significantly correlated with overall survival (OS) in GC patients, including age ($P=0.004$), and Lauren's classification ($P=0.021$). The following factors were found to be statistically significant: local tumor invasion ($P<0.001$), pTNM stage ($P=0.020$), local lymph node metastasis ($P=0.002$), and the expression level of lncRNA PVT1 ($P<0.001$). The expression level of lncRNA PVT1 was found to be an independent risk factor. The nomogram model based on lncRNA PVT1 predicted 1-year, 2-year, and 3-year OS probabilities of 0.997, 0.937, and 0.828, respectively. Furthermore, following the silencing of lncRNA PVT1, a significant reduction in both c-Myc mRNA ($P<0.001$) and protein levels ($P=0.006$) was observed, as well as a reduction in cell proliferation ($P<0.001$) and invasion ability ($P=0.028$) in the siPVT1-1907 group compared to the siNC group. **Conclusion** The present study has showed that the expression of lncRNA PVT1 is elevated in cases of gastric cancer, and that this elevation is associated with a poor prognosis for patients. The lncRNA PVT1-based nomogram model demonstrates good predictive capability for postoperative survival in GC. Additionally, lncRNA PVT1 appears to promote carcinogenesis by upregulating c-Myc expression in GC cells. This finding indicates that the lncRNA PVT1-Myc regulatory network may represent a viable target for the clinical management of gastric cancer.

Key words: Plasmacytoma variant translocation 1; Gastric cancer; Prognosis; Nomogram; Oncogene Myc; RNA interference

胃癌(gastric cancer, GC)的发病率和死亡率在过去的一个世纪呈现稳步下降趋势。然而,随着人口老龄化的到来,在东亚、东欧和南美地区未来仍将会有更多的GC病例出现^[1]。GC是一种在同一肿瘤内、同一患者内和患者之间表现出广泛的形态学和分子特征差异的高度异质性疾病,这种异质性的存在是影响GC患者的精准分层和个体化治疗的主要原因^[2],因此,寻找或者识别关键的分子靶点,显得尤为重要。长链非编码RNA浆细胞瘤变异易位1(long noncoding RNA plasmacytoma variant translocation 1, lncRNA PVT1),位于人类染色体8q24.21区域,MyC癌基因下游57 kb处,具有独立的致癌潜能^[3-4]。染色体8q24区域是基因畸变的脆弱位点,包括病毒整合、基因扩增、染色质易位等的多个危险位点^[5]。已有的研究表明 lncRNA PVT1

可通过竞争内源性RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)活性和调节MyC癌基因蛋白质稳定性,进而影响多种肿瘤细胞的增殖、侵袭和耐药^[6-8]。MyC拷贝数和PVT1表达增加发生在98%以上的8q24拷贝数增加的癌症病例中^[9]。有关lncRNA PVT1在胃癌发病中的确切机制仍不十分清楚。研究报道,lncRNA PVT1可通过负性调控miR-16促进CCND1表达,增强GC细胞的增殖和侵袭能力^[10];也可通过磷酸化YAP促进GC细胞增殖、侵袭和迁移并抑制其凋亡^[11]。在AGS胃癌细胞系中进一步沉默lncRNA PVT1可降低GC细胞对紫杉醇的耐药性,增加其敏感性^[12]。前期的研究发现,转录因子YY1、lncRNA PVT1、MyC癌基因之间存在着密切联系,lncRNA PVT1在胃癌组织中存在高表达^[13-14],但lncRNA PVT1的表达是否影响胃

癌患者的预后以及 lncRNA PVT1 和 Myc 癌基因之间是否存在相互作用尚不清楚,有必要进行更为深入的研究。因此,本研究旨在探讨 lncRNA PVT1 在胃癌预后中的作用以及对胃癌细胞增殖侵袭的影响,为临床治疗胃癌提供新思路。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 临床资料

选取山西医科大学第二医院普通外科和山西省肿瘤医院消化微创外科 2017 年 4 月至 2019 年 8 月住院的 GC 患者 196 例作为研究对象,男 118 例、女 78 例;年龄 26~79(59.63±10.67)岁。GC 临床病理分期采用国际抗癌联盟和美国癌症联合会的第 8 版胃癌 TNM 分期系统^[15]。术前未接受辅助放疗、化疗和其他抗癌治疗,术后 127 例患者接受了辅助化疗,术后 3 个月开始随访(电话或门诊随访),随访至死亡或随访至 2023 年 2 月。本研究经山西医科大学第二医院伦理委员会批准[(2019)YX 第(294)号],已获得所有患者的书面知情同意。

1.1.2 实验细胞和主要试剂

胃癌细胞株 MGC-803 和正常胃黏膜细胞株 GES-1 均购于中国科学院上海细胞生物研究所。PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒购自日本 TAKARA 公司,oligo dT 购自上海生工公司,Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,dNTP 和 Rnase Inhibitor 购自美国 promega 公司,Primer (R&F)购自上海世翱公司,SYBR Master Mixture 购自南京 Vazyme 公司,BCA 定量试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,兔抗人 C-Myc、 β -actin 单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。ABI 7500 型 Real time PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司,Western Blot 电泳仪和转膜仪、凝胶成像仪购自北京天根生化公司。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 GC 组织中 lncRNA PVT1 和 c-Myc 表达

①离体标本立即剪碎放入冻存管,保存于 -80 °C 液氮中,分癌组织及其配对的距离癌组织边缘 >5 cm 癌旁正常胃黏膜组织两组进行实验。取 50~100 mg 组织,根据 Invitrogen 公司 Trizol 操作说明书进行 GC 癌组织和癌旁正常胃黏膜组织总 mRNA 抽提,均为 RNase-free 操作,根据 TAKARA

公司逆转录操作说明书建立 20 μ L 反应体系,每个反应 3 个重复。95 °C 预变性 15 s,40 个循环 95 °C 5 s、60 °C 30 s。② RT-qPCR 反应需引物序列。PVT1 上游引物 5'-GTTACACCTGGGATTTAG-3',下游引物 5'-GACTGGCTCTTAATTCTC-3'; c-Myc 上游引物 5'-GAACAAGAAGATGAGGAAGAA -3',下游引物 5'-CAGAAGGTGATCCAGACT-3'; β -actin 上游引物 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3',下游引物 5'-CTCCTTAATGTACGCACGAT-3'。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达量。

1.2.2 Western blotting 实验检测 c-Myc 蛋白表达

将 GC 组织剪碎至 1 mm³ 大小,加入 1×Lysis Buffer 裂解 30 min 后,4 °C 12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清收于 1.5 ml EP 管中。加入 5×Loading Buffer,95 °C~100 °C 加热 5 min。BCA 法蛋白浓度测定,蛋白上清经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜,含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液室温封闭 2 h。加入一抗,4 °C 孵育过夜。二抗室温下孵育 2 h。ECL 显色。

1.2.3 细胞培养及转染

MGC-803 和 GES-1 细胞株使用 RPMI 1640 培养基培养,置于 37 °C、5% CO₂、70%~80% 湿度的恒温培养箱中。选取对数生长期的细胞进行转染。siRNA-lncRNA PVT1 (siPVT1) 及其阴性对照 siRNA-NC (siNC) 由中国苏州吉玛基因公司设计合成。利用脂质体 3 000 转染试剂将 siPVT1 和阴性对照 siNC 分别转染,空白对照组不做任何转染。将混合好的转染试剂与 siRNA 室温下放置 15~20 min 后加入细胞,培养 48~72 h 后收集细胞沉淀待测。PVT1-homo-417 序列: GCUGAAUGCCU-CAUGGAUUTT AAUCCAUGAGGCAUUCAGCTT; PVT1-homo-1152 序列: GGACUUGAGAACUGUC-CUUTT AAGGACAGUUCUCAAGUCCTT; PVT1-homo-1907 序列: CCGGCCUCGUGUCUAUUAATT UUAUAGACACGAGGCCGTT。

1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖

siRNA-lncRNA PVT1-1907、siNC 分别转染 MGC-803 细胞,铺 96 孔板过夜,第 2 天(记为 0 h)向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,3.5 h 后酶标仪(450 nm 波长)检测 OD 值。每隔 24 h 检测一次,直至 72 h。

1.2.5 Transwell 检测细胞侵袭

将配置好的基质胶(100 μ L Matrigel 和 RPMI 1640 培养基按 1:5 比例混合)铺于 Transwell 小室上层,于 37 °C 放置 2 h。siRNA-lncRNA PVT1-1907、siNC 分别转染 MGC-803 细胞,加入 24 孔板 Tran-

swell 小室上层。于 Transwell 小室下层加入含 20% 胎牛血清的培养基 750 μL 。24 h 后进行染色,并拍照。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计学软件,GraphPad Prism 8.0 作图。对于符合正态分布数值变量,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间差异比较采用独立样本 t 检验;多组且方差齐的数据之间的比较采用单因素方差分析(F 检验),两两均值比较采用 LSD 法。生存分析使用 R 版本 4.1.3。使用“survival”包和“survminer”包等,进行单因素和多因素 Cox 回归分析,并生成生存曲线。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 胃癌组织中的 lncRNA PVT1 和 c-Myc 表达水平

RT-qPCR 结果显示:胃癌组织中 lncRNA PVT1 表达显著高于癌旁正常组织(0.33 ± 0.15 vs. 0.28 ± 0.13 , $t=3.800$, $P=0.002$),见图 1A。与癌旁正常组织相比,胃癌组织中 c-Myc mRNA 表达显著升高

(1.983 ± 0.881 vs. 1.554 ± 0.817 , $t=2.583$, $P=0.013$),差异具有统计学意义,见图 1B。

2.2 胃癌组织中 c-Myc 蛋白表达

Western blotting 结果显示:与癌旁正常组织相比,胃癌组织中 c-Myc 蛋白表达显著升高(1.243 ± 0.571 vs. 0.764 ± 0.335 , $t=2.563$, $P=0.024$),差异具有统计学意义。见图 2。

2.3 胃癌相关临床病理特征的单因素生存分析

196 例 GC 患者中有 14 例失去随访信息,失访率 7.1%。GC 患者术后 42~48 个月内累计死亡 114 例,占总人数的 58.2%,最终 182 例 GC 患者纳入分析。中位生存期(median survival time, MST)定义为患者接受手术日到死亡或者随访结束日的时间,50% 患者发生该事件时所对应的时间点,单位为月。结果表明:lncRNA PVT1 表达水平、患者年龄、肿瘤大小、分型、病理组织分级、肿瘤局部浸润、局部淋巴结转移、pTNM 分期与患者临床结局和预后密切相关。见表 1。

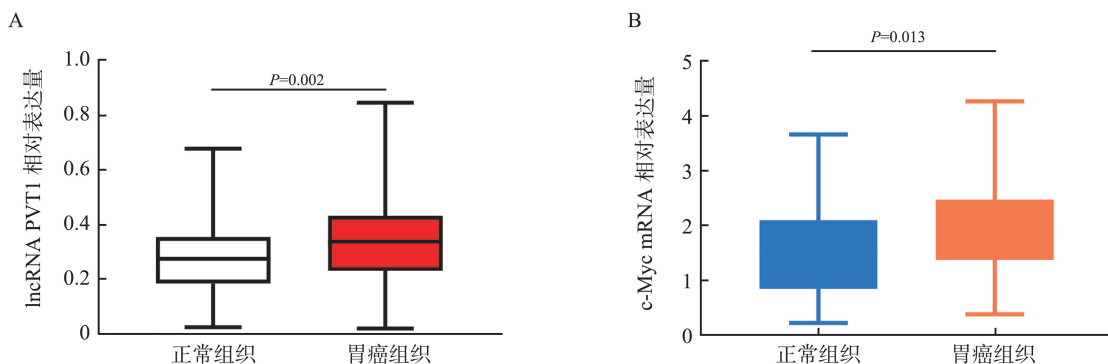


图 1 胃癌组织中 lncRNA PVT1 和 c-Myc mRNA 的表达水平

A: lncRNA PVT1 在胃癌组织及癌旁正常组织中的表达; B: c-Myc mRNA 在胃癌组织及癌旁正常组织中的表达。

Figure 1 Expression of lncRNA PVT1 and c-Myc mRNA in GC tissues

A: Expression of lncRNA PVT1 in gastric cancer tissues and adjacent normal tissues; B: Expression of c-Myc mRNA in gastric cancer tissues and adjacent normal tissues.

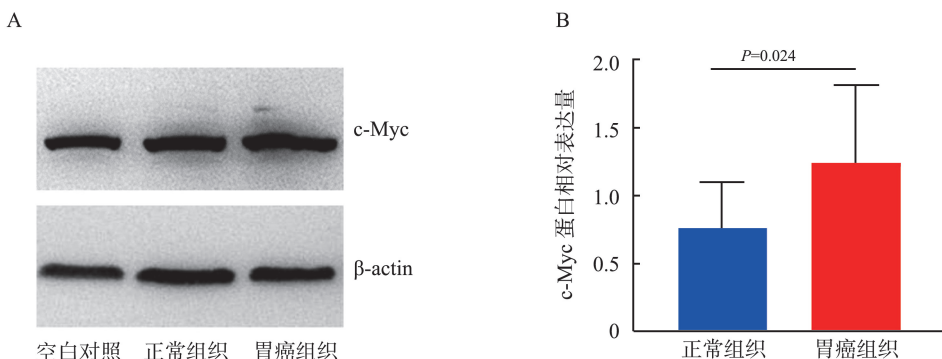


图 2 胃癌组织中 c-Myc 蛋白表达水平

A: Western blotting 检测 c-Myc 蛋白表达; B: c-Myc 蛋白的相对表达量。

Figure 2 Protein level of c-Myc in GC tissues

A: Expression of c-Myc detected by Western blotting; B: Column chart of relative expression level.

表1 GC患者临床病理特征的单因素生存分析
Table 1 Univariate survival analysis of clinicopathologic features in GC patients

变量	例数/ <i>n</i>	中位生存期/月	风险比/[HR(95%CI)]	<i>P</i>
性别			0.811(0.555,1.183)	0.277
男	106	26		
女	76	23		
年龄/岁			1.805(1.238,2.630)	0.002
<60	81	29		
≥60	101	22		
肿瘤部位			1.082(0.739,1.585)	0.686
近端	70	24		
体部/远端	112	23		
肿瘤大小/cm			2.316(1.578,3.399)	<0.001
≤2	67	35		
>2	115	22		
Lauren's 分型				<0.001
肠型	80	32		
弥漫型	62	22	2.343(1.351,4.066)	
混合型	40	19	3.687(2.281,5.969)	
分化程度				<0.001
高	65	43		
中	35	23	4.536(2.380,8.643)	
低	82	20	3.834(2.449,6.002)	
浸润深度			3.949(2.645,5.895)	<0.001
T1/T2	91	33		
T3/T4	91	19		
pTNM 分期			3.469(2.304,5.225)	<0.001
I/II	99	32		
III/IV	83	26		
淋巴结转移			3.471(2.355,5.116)	<0.001
无	66	43		
有	116	21		
PVT1 表达			1.746(1.154,2.642)	0.008
低表达	48	32		
高表达	134	23		
术后化疗方案				0.253
替吉奥(S-1)	41	22.5		
替吉奥+奥沙利铂(SOX)	41	20	1.061(0.631,1.783)	
卡培他滨+奥沙利铂(XELOX)	45	18	1.497(0.913,2.455)	

从图3可以看到,患者年龄≥60岁、瘤体>2cm、Lauren's分型为弥漫型或混合型、病理为低分化或未分化的肿瘤细胞、T3~4期、pTNM分期III/IV、局部淋巴结N1~3阳性、lncRNA PVT1高表

达时,患者死亡风险显著增高(*P*均<0.01)。另外在182例具有随访资料的患者中,术后接受辅助化疗127例(S-1单药41例、SOX 41例、XELOX 45例),而不同化疗方案的选用与患者的预后关系不大。

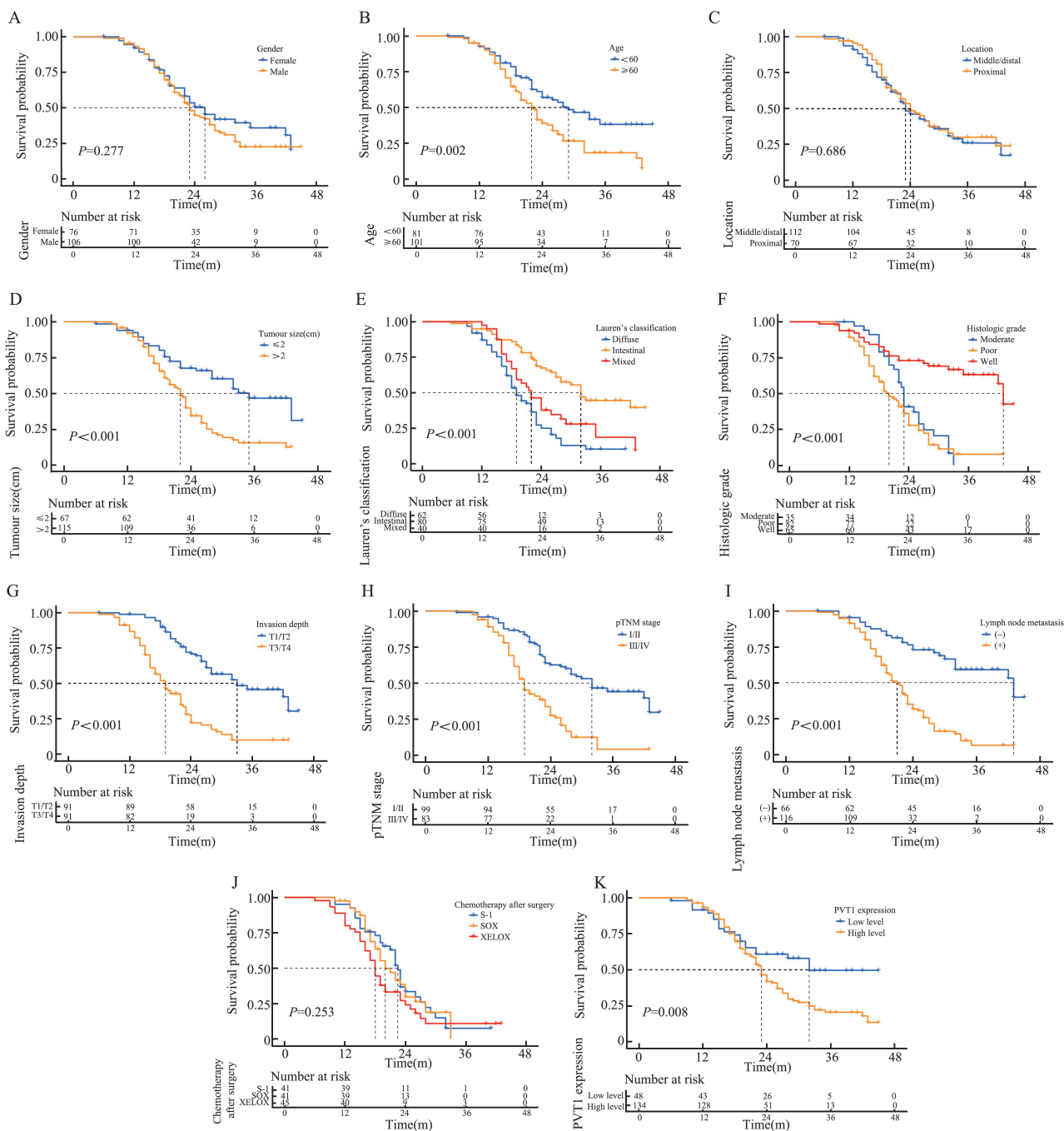


图3 胃癌患者临床病理单因素的Kaplan-Meier生存曲线

A: 性别; B: 年龄; C: 肿瘤部位; D: 肿瘤大小; E: Lauren's 分型; F: 病理分级; G: 局部浸润深度; H: pTNM 分期; I: 淋巴结转移; J: 术后化疗方案; K: lncRNA PVT1 表达。

Figure 3 Kaplan-Meier survival curve of clinicopathologic single factor in patients with GC

A: Gender; B: Age; C: Location; D: Tumour size; E: Lauren's classification; F: Histologic grade; G: Invasion depth; H: Lymph node metastasis; I: pTNM stage; J: Chemotherapy after surgery; K: lncRNA PVT1 expression.

2.4 胃癌相关临床病理特征的Cox回归分析

对随访资料完整的182例GC患者进行单因素和多因素Cox回归分析。在单因素Cox回归分析中,年龄($HR = 1.810, P = 0.002$)、肿瘤大小($HR = 0.409, P < 0.001$)、Lauren's分型($HR = 0.721, P = 0.023$)、病理分级($HR = 2.033, P < 0.001$)、肿瘤局部浸润($HR = 3.553, P < 0.001$)、pTNM分期($HR =$

$3.083, P < 0.001$)、局部淋巴结转移($HR = 4.017, P < 0.001$)、术后辅助化疗($HR = 0.653, P < 0.001$)、lncRNA PVT1表达水平($HR = 1.067, P = 0.039$)均与GC患者总生存期(overall survival, OS)显著相关,见图4A。在多因素Cox回归分析中,如图4B所示,仅年龄($HR = 1.845, P = 0.004$)、Lauren's分型($HR = 0.718, P = 0.021$)、肿瘤局部浸润($HR =$

3.678, $P < 0.001$)、pTNM 分期 ($HR = 1.991$, $P = 0.020$)、局部淋巴结转移 ($HR = 2.878$, $P = 0.002$)、lncRNA PVT1 表达水平 ($HR = 0.810$, $P < 0.001$) 与

GC 患者 OS 显著相关,是 GC 患者 OS 的独立危险因素。在无疾病生存时间 (disease free survival, DFS) 时也得到类似的结果,如图 4C、D 所示。

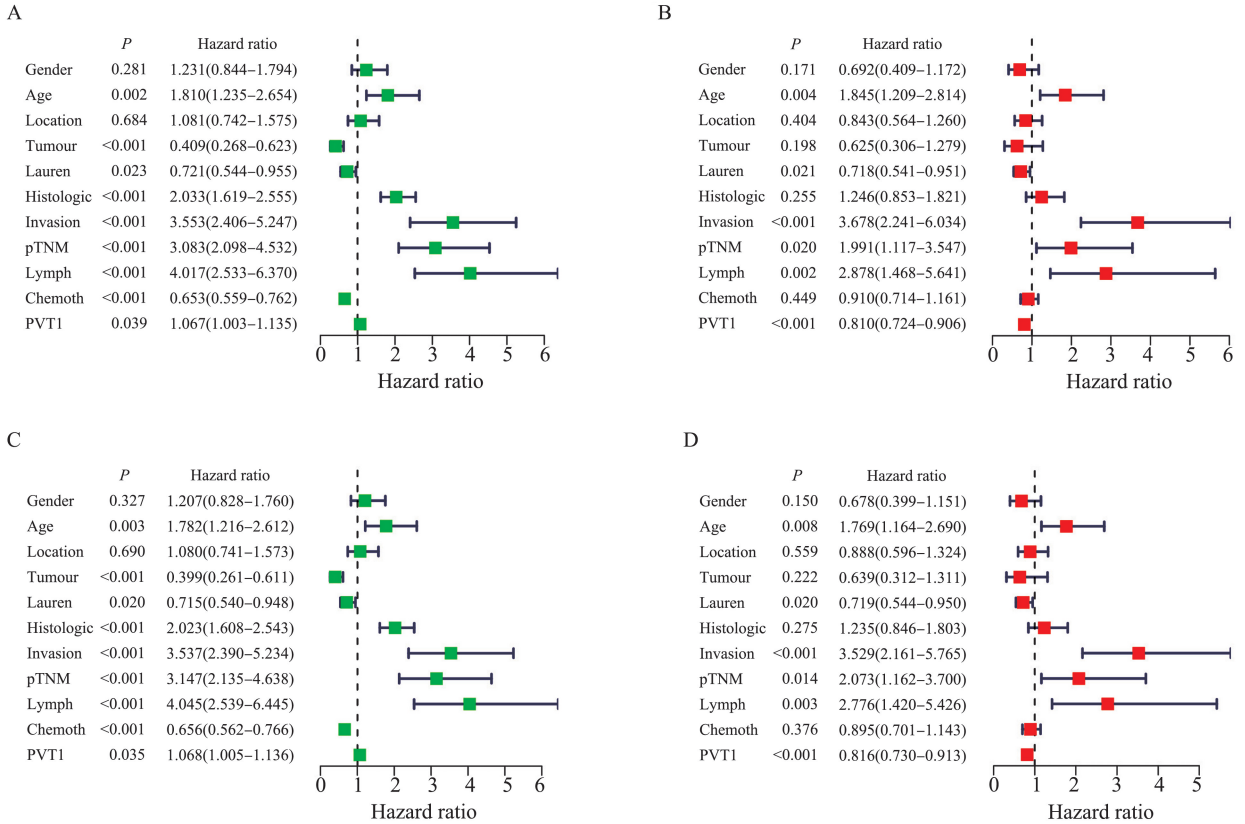


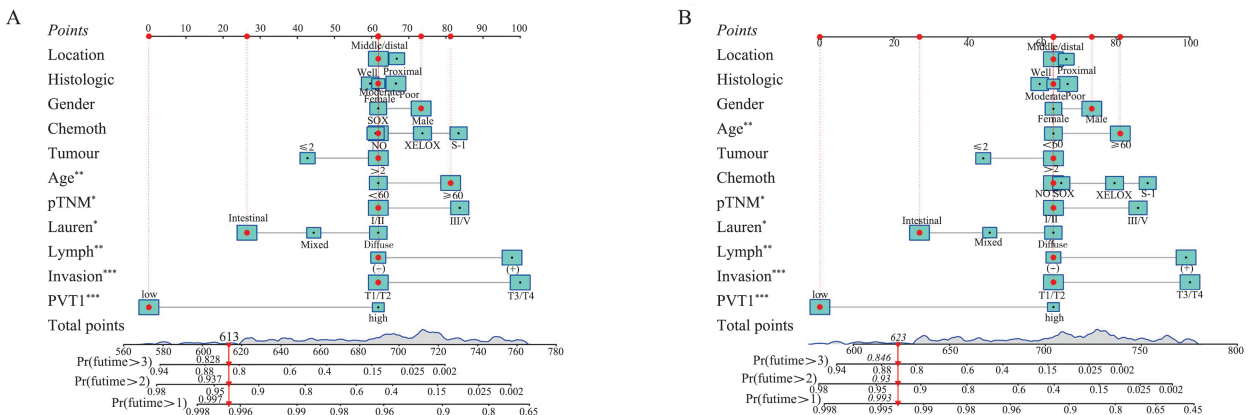
图 4 胃癌患者相关临床病理特征的 Cox 回归分析 A: 与 OS 相关的单因素 Cox 回归分析; B: 与 OS 相关的多因素 Cox 回归分析; C: 与 DFS 相关的单因素 Cox 回归分析; D: 与 DFS 相关的多因素 Cox 回归分析。

Figure 4 Cox regression analysis of clinicopathologic features in patients with GC A: Univariate Cox regression analysis related to OS; B: Multivariate Cox regression analysis related to OS; C: Univariate Cox regression analysis related to DFS; D: Multivariate Cox regression analysis related to DFS.

2.5 胃癌预后模型构建和效能评价

将多因素 Cox 回归分析中可能影响胃癌预后的 11 个因素纳入 R 语言的“rms”包内 cph 函数构建预后模型,预测 1、2、3 年 GC 患者术后生存概率,并利用列线图将模型可视化。结果:胃癌患者 6 个独立预后影响因素总得分 613 分,预测 1、2、3 年 OS

生存概率分别为 0.997、0.937、0.828,见图 5A;如图 5B 所示,胃癌患者 6 个独立预后影响因素总得分 623 分,预测 1、2、3 年 DFS 生存概率分别为 0.993、0.930、0.846。利用图 5C 和 5D 的校准曲线评价该模型的性能,对于 OS,预测 1、2、3 年生存概率的可靠性优于 DFS。



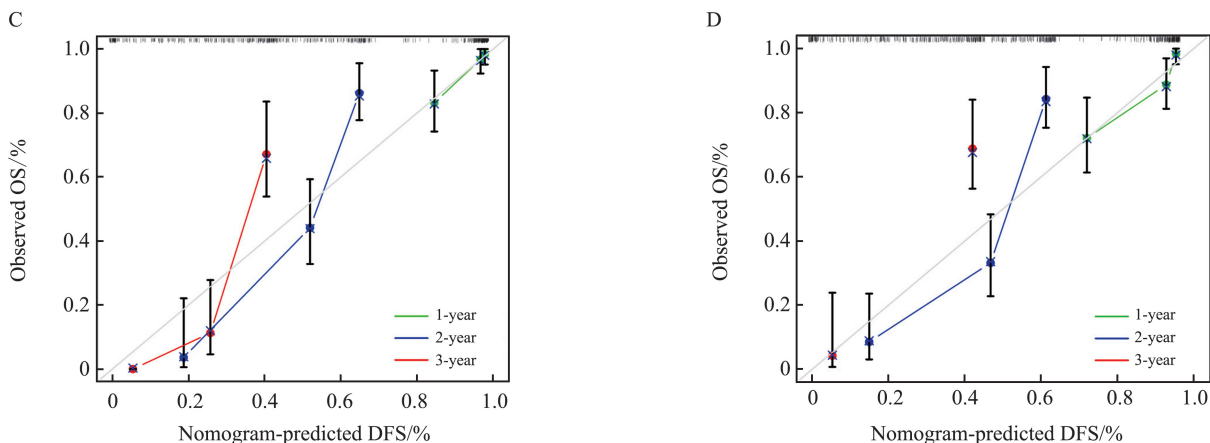


图5 列线图预后模型构建和评价

A: OS 相关列线图预后模型; B: DFS 相关列线图预后模型; C: OS 相关修正曲线; D: DFS 相关修正曲线。

Figure 5 Construction and evaluation of nomogram prognostic model

A: Nomogram prognostic model related to OS; B: Nomogram prognostic model related to DFS; C: Correction curve related to OS; D: Correction curve related to DFS.

2.6 敲减 lncRNA PVT1 抑制胃癌细胞中 c-Myc mRNA 表达

siPVT1-417、siPVT1-1152、siPVT1-1907 分别转染 MGC-803 细胞, RT-qPCR 检测结果符合正态分布, 显示干预组均有显著敲减效果 ($F = 37.576, P < 0.001$)。siPVT1-417 组 vs. siNC 组, $P = 0.021$; siPVT1-1152 组 vs. siNC 组, $P = 0.003$; siPVT1-1907 组 vs. siNC 组, $P < 0.001$, 其中 siPVT1-1907 敲减效率为 84%, 最为显著。见图 6A。沉默 lncRNA

PVT1 后, 各组 c-Myc mRNA 表达结果符合正态分布, 组间差异具有统计学意义 ($F = 20.389, P < 0.001$)。与 siNC 组 (1.006 ± 0.1294) 相比, siPVT1-417 组 ($0.8412 \pm 0.0665, P = 0.122$) 和 siPVT1-1152 组 ($0.8956 \pm 0.1564, P = 0.401$) c-Myc mRNA 表达降低, 差异无统计学意义, 而 siPVT1-1907 组 c-Myc mRNA 表达显著降低 (0.4003 ± 0.0255 vs. $1.006 \pm 0.1294, P = 0.001$), 差异具有统计学意义。见图 6B。

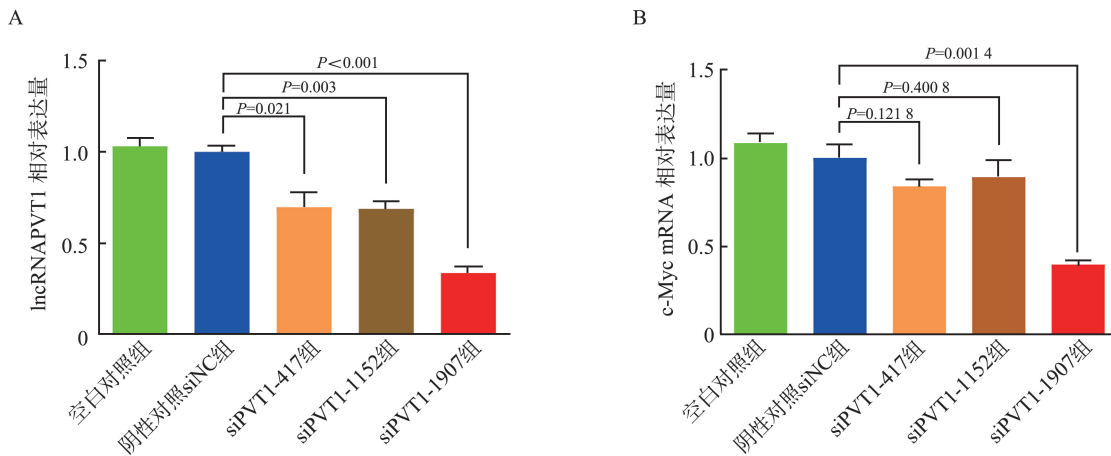


图6 敲减 lncRNA PVT1 抑制胃癌细胞中 c-Myc mRNA 表达

A: MGC-803 细胞株中敲减 lncRNA PVT1; B: MGC-803 细胞株中 c-Myc mRNA 表达。

Figure 6 Knockdown of lncRNA PVT1 inhibited c-Myc mRNA expression in gastric cancer cells

A: Knocking down lncRNA PVT1 in MGC-803 cells; B: Expression of c-Myc mRNA in MGC-803 cells.

2.7 胃癌细胞 c-Myc 蛋白表达水平

各组 Western blotting 检测结果符合正态分布, 组间差异具有统计学意义 ($F = 5.884, P = 0.011$)。与 siNC 组 (0.8390 ± 0.1079) 相比, siRNA-lncRNA

PVT1 各组 c-Myc 蛋白表达水平均有降低, 但 siPVT1-1152 组 c-Myc 蛋白的表达降低无统计学意义 ($0.6289 \pm 0.1285, P = 0.096$), siPVT1-417 组 ($0.6412 \pm 0.0665, P = 0.054$)、siPVT1-1907 组

($0.467 0 \pm 0.049 4, P = 0.006$) c-Myc 蛋白表达显著降低,差异具有统计学意义,其中 siPVT1-1907 组

c-Myc 蛋白表达降低更加显著(图 7)。

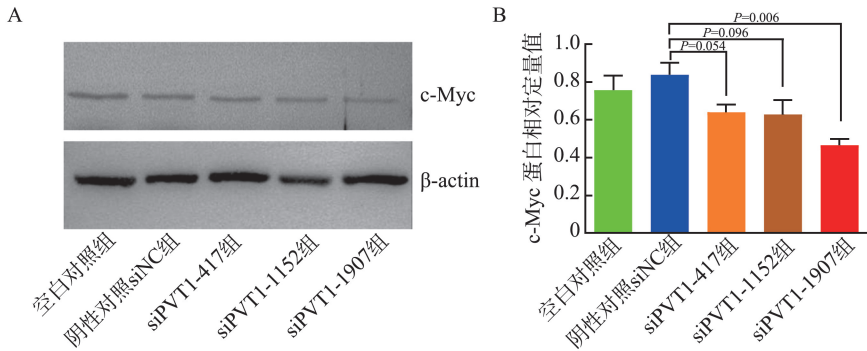


图 7 胃癌细胞 c-Myc 蛋白表达水平

A: Western blotting 检测 c-Myc 蛋白表达; B: c-Myc 蛋白的相对表达量。

Figure 7 Protein level of c-Myc in MGC-803 cells

A: Expression of c-Myc detected by Western blotting; B: Column chart of relative expression level.

2.8 敲减 lncRNA PVT1 抑制胃癌细胞增殖

结果如图 8 所示,相较于 siNC 组, siPVT1-1907 组的细胞活性随着时间明显下降。48 h 时, siPVT1-1907 组的细胞活性较 siNC 组具有显著差异 (1.38 ± 0.11 vs. $1.65 \pm 0.05, t = 5.466, P < 0.001$), 72 h 时, 细胞活性差异更加明显 (1.84 ± 0.13 vs. $2.45 \pm 0.07, t = 9.682, P < 0.001$)。

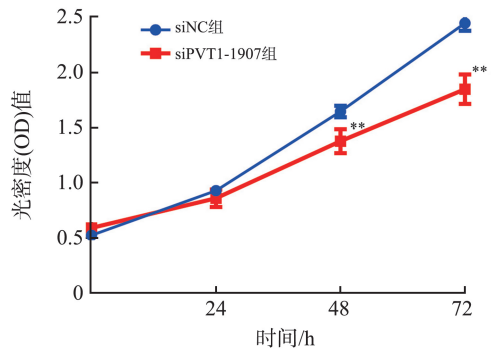


图 8 敲减 lncRNA PVT1 抑制胃癌细胞增殖

Figure 8 Knocking down lncRNA PVT1 inhibited the proliferation of gastric cancer cells

2.9 敲减 lncRNA PVT1 抑制胃癌细胞侵袭

Transwell 实验结果表明,相比较 siNC 组, siRNA-lncRNA PVT1-1907 组 MGC-803 细胞穿过下室的数量减少 (66 ± 12 vs. $77 \pm 13, t = 2.245, P = 0.028$), 图 9A 和 9B。

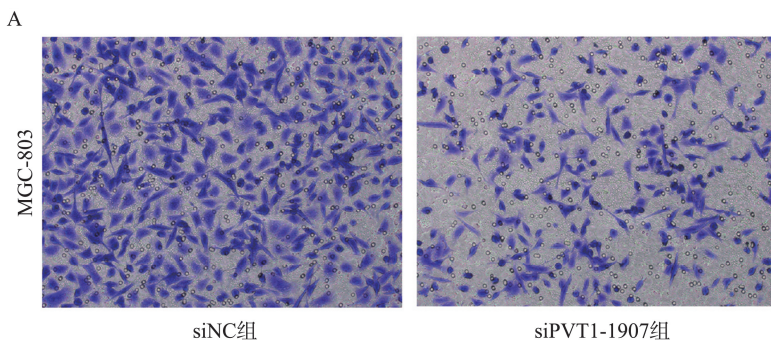


图 9 敲减 lncRNA PVT1 抑制胃癌细胞侵袭

A: 结晶紫染色的 MGC-803 细胞 Transwell 侵袭图像(200 倍放大); B: 细胞侵袭数目柱状图。

Figure 9 Knocking down lncRNA PVT1 inhibited the invasion of gastric cancer cells

A: Transwell invasion image of MGC-803 cells stained with crystal violet (200×magnification); B: Column chart of the number of invaded cell.

3 讨论

人类染色体 8q24 相关的易位是癌症和染色体断点之间联系的早期事例,重要的癌基因 Myc 便位于该区域,1984 年首次发现的浆细胞瘤变异易位 1

(plasmacytoma variant translocation 1, PVT1) 也位于该区域^[16-17]。Myc 通常被认为是所有癌症类型中最常见的致癌基因之一,在健康的成人组织中, Myc 的表达受到严格控制,在大约 70% 的恶性肿瘤中 Myc 会发生过表达或结构改变^[18-19]。Myc 家族由 3 个成员组成: C-Myc、N-Myc 和 L-Myc,属于

bHLHLZ DNA 结合蛋白超家族,其中 c-Myc 扩增最为常见^[20]。染色体 8q24 区域的不稳定可引起 Myc 表达的改变,由于 PVT1 和 c-Myc 均定位于该区域的脆弱位点,PVT1 是否参与 Myc 相关的促癌途径引起了研究人员的广泛兴趣。

已有文献报道 lncRNA PVT1 可促进癌细胞增殖、肿瘤血管生成、凋亡逃逸^[21-23]。通常 lncRNA PVT1 在正常组织中低表达,在恶性肿瘤及肿瘤细胞系中高表达。例如,在卵巢癌中 ALKBH5 通过调控 PVT1/FOXMI,从而影响卵巢癌细胞的恶性行为和化学敏感性^[24]。lncRNA PVT1 还可以通过 EZH2 介导的 Hippo/NOTCH1 信号通路激活,促进非小细胞肺癌转移^[25]。然而关于 lncRNA PVT1 在胃癌中的研究国内外报道尚少。本研究通过 RT-qPCR 检测了 196 例胃癌组织中 lncRNA PVT1 和 c-Myc 的表达,发现 lncRNA PVT1 和 c-Myc 在癌组织中的表达水平显著高于癌旁正常胃黏膜组织;Western blotting 结果显示,与癌旁正常胃黏膜组织相比,胃癌组织中 c-Myc 蛋白表达水平显著升高。这些研究结果提示 lncRNA PVT1 可能通过 c-Myc 促进了胃癌的发生发展。Niu 等^[26]检测了 50 例胃癌组织中 lncRNA PVT1 的表达,发现也存在高表达。lncRNAs-Myc 调控网络在肿瘤发生、发展中的地位,已引起广大学者的关注^[27-28]。Tseng 等^[29]研究发现机体罹患癌症时,PVT1 和 Myc 基因不仅一同扩增,PVT1 还增强了 Myc 蛋白在肿瘤细胞中的表达。Tseng 及的研究与以往的研究结果不同,以往认为癌症时 Myc 基因扩增是主要问题,而忽略了 PVT1 与 Myc 之间存在的或者极其重要的协同作用^[30-31]。

值得注意的是,在本研究单因素分析中具有显著性的肿瘤大小和病理分级,在多因素分析中失去统计学意义,提示 PVT1 可能比传统病理指标更具预后预测价值。基于 lncRNA PVT1 等 6 个独立预后因素构建的列线图模型显示出良好的预测效能,其中 1 年、2 年和 3 年 OS 预测准确率分别达到 99.7%、93.7%和 82.8%。模型校准曲线显示 OS 预测具有较高的可靠性,而 DFS 预测的偏差可能与 3 年随访数据不足有关。Hao 等^[32]对已发表的人类胃癌 lncRNA PVT1 表达水平进行了荟萃分析,共纳入 8 项研究,涉及 747 例 GC 患者,结论是 lncRNA PVT1 高表达与 GC 患者性别、侵袭深度、较差的 OS、较差的 DFS 显著相关。Wu 等^[33]采用 RT-qPCR 检测了 72 例结直肠癌组织中 lncRNA PVT1 的表达水平,发现其在结直肠癌中显著上调并与结直肠癌进展和不良预后相关,另外还发现结直肠癌

患者中 PVT1 高表达组的总生存期明显短于 PVT1 低表达组,这与在胃癌中观察到的结果基本一致。

本研究使用 MGC-803 胃癌细胞株进行了体外实验,以进一步探索 lncRNA PVT1 影响胃癌细胞增殖的潜在机制。结果表明,沉默 lncRNA PVT1 后可显著抑制胃癌细胞 c-Myc 表达,显著抑制胃癌细胞增殖和侵袭。这一结果提示,lncRNA PVT1 通过促进胃癌细胞 Myc 的表达而发挥致癌作用,高表达的 lncRNA PVT1 具有促进胃癌细胞增殖、侵袭的作用。有趣的是,PVT1 也被证明是 Myc 的靶点。c-Myc 在宫颈癌细胞中作为 lncRNA PVT1 的激活剂,通过结合 PVT1 的启动子上调 lncRNA PVT1 的表达,进而通过 miR-486-3p 增强宫颈癌细胞的增殖^[34]。

本研究有一定局限性:①PVT1 和 Myc 之间是直接远距离发生物理作用还是通过未知的基因产物间接发生尚不清楚,以及 PVT1 是否可通过外泌体传递或调控可变剪接体发挥远处效应,需要多组学整合研究;②本研究的临床数据来自于山西省内两家医院,入组数据不够充盈,实验结果可能存在一定程度的偏倚。相信随着样本量扩大和随访时间的延迟,后期得到的结果将更有说服力;③体外实验仅仅就 lncRNA PVT1 对胃癌细胞的增殖、侵袭能力进行了初步探索,具体的调控机制还有待今后进一步深入求证。

总之,胃癌组织中 lncRNA PVT1 呈现高表达。lncRNA PVT1 是胃癌患者预后的独立危险因素。基于 lncRNA PVT1 的列线图模型对胃癌术后生存概率具有较好的预测能力。lncRNA PVT1 通过促进胃癌细胞 Myc 的表达而发挥致癌作用,高表达的 lncRNA PVT1 具有促进胃癌细胞增殖、侵袭的作用,具体机制有待进一步研究证实。本研究结果为临床治疗胃癌提供了新的潜在靶点。

参考文献:

- [1] López MJ, Carbajal J, Alfaro AL, et al. Characteristics of gastric cancer around the world[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2023, 181: 103841. doi: 10.1016/j.critrevonc.2022.103841
- [2] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648.
- [3] Li RM, Wang X, Zhu CM, et al. lncRNA PVT1: a novel oncogene in multiple cancers [J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 84. doi: 10.1186/s11658-022-00385-x
- [4] Hakami MA, Hazazi A, Khan FR, et al. PVT1 lncRNA in lung cancer: a key player in tumorigenesis and thera-

- peutic opportunities [J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 253: 155019. doi: 10.1016/j.prp.2023.155019
- [5] Wilson C, Kanhere A. 8q24.21 locus: a paradigm to link non-coding RNAs, genome polymorphisms and cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1094. doi: 10.3390/ijms22031094
- [6] Xu Y, Luo XX, He WG, et al. Long non-coding RNA PVT1/miR-150/HIG2 axis regulates the proliferation, invasion and the balance of iron metabolism of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(4): 1403-1419.
- [7] Qin S, Zhao Y, Lim G, et al. Circular RNA PVT1 acts as a competing endogenous RNA for miR-497 in promoting non-small cell lung cancer progression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 244-250.
- [8] Yang Q, Yu Y, Sun ZQ, et al. Long non-coding RNA PVT1 promotes cell proliferation and invasion through regulating miR-133a in ovarian cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 61-67.
- [9] Roohinejad Z, Bahramian S, Shamsabadi FT, et al. Up-regulation of the c-MYC oncogene and adjacent long non-coding RNAs PVT1 and CCAT1 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 34. doi: 10.1186/s12885-022-10464-z
- [10] Lv HD, Zhou DX, Liu GQ. PVT1/miR-16/CCND1 axis regulates gastric cancer progression [J]. *Open Med (Wars)*, 2023, 18(1): 20220550. doi: 10.1515/med-2022-0550
- [11] Ji KY, Zhang Q, Song W, et al. LncRNA PVT1 promotes cell proliferation, invasion, and migration and inhibits cell apoptosis by phosphorylating YAP [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2022, 2022: 5332129. doi: 10.1155/2022/5332129
- [12] Naseri B, Farsad-Akhtar N, Mardi A, et al. LncRNA PVT1 silencing inhibits gastric cancer cells' progression via enhancing chemosensitivity to paclitaxel [J]. *Gene*, 2025, 932: 148900. doi: 10.1016/j.gene.2024.148900
- [13] Chen WL, Fan DG, Guo B, et al. The role of lncRNA PVT1 and hsa-miR-30a-3p in the development of gastric cancer [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2022, 52(2): 292-300.
- [14] 陈文亮,董静逊,白子豪,等. 长链非编码 RNA 浆细胞瘤变异易位 1 在胃癌中的表达及临床意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2024, 41(7): 1554-1557.
CHEN Wenliang, DONG Jingxun, BAI Zihao, et al. Expression and clinical significance of long noncoding RNA plasmacytoma variant translocation 1 in gastric [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2024, 41(7): 1554-1557.
- [15] Sano T, Coit DG, Kim HH, et al. Proposal of a new stage grouping of gastric cancer for TNM classification; International Gastric Cancer Association staging project [J]. *Gastric Cancer*, 2017, 20(2): 217-225.
- [16] Chahine JJ, Davis SS, Culfaci S, et al. Chromosome 8q24 amplification associated with human hepatocellular carcinoma predicts MYC/ZEB1/MIZ1 transcriptional regulation [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 24488. doi: 10.1038/s41598-024-75219-1
- [17] Wu F, Zhu YP, Zhou CP, et al. Regulation mechanism and pathogenic role of lncRNA plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1) in human diseases [J]. *Genes Dis*, 2022, 10(3): 901-914.
- [18] Llombart V, Mansour MR. Therapeutic targeting of "undruggable" MYC [J]. *EBioMedicine*, 2022, 75: 103756. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103756
- [19] Duffy MJ, O'Grady S, Tang MH, et al. MYC as a target for cancer treatment [J]. *Cancer Treat Rev*, 2021, 94: 102154. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102154
- [20] Gao FY, Li XT, Xu K, et al. C-MYC mediates the crosstalk between breast cancer cells and tumor microenvironment [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 28. doi: 10.1186/s12964-023-01043-1
- [21] Melone V, Palumbo D, Palo L, et al. LncRNA PVT1 links estrogen receptor alpha and the polycomb repressive complex 2 in suppression of pro-apoptotic genes in hormone-responsive breast cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 80. doi: 10.1038/s41419-025-07423-4
- [22] Shi MM, Zhang R, Lyu H, et al. Long non-coding RNAs: emerging regulators of invasion and metastasis in pancreatic cancer [J]. *J Adv Res*, 2025: S2090-1232(25)00073-6. doi: 10.1016/j.jare.2025.02.001
- [23] Wu SH, Cheng Q, Shi Y, et al. LncRNA PVT1 activated by TGF- β 1/Smad3 facilitates proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma via upregulating Smad6 and NRG1 [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 500. doi: 10.1186/s12967-025-06229-4
- [24] Li L, Chen J, Wang A, et al. ALKBH5 regulates ovarian cancer growth via demethylating long noncoding RNA PVT1 in ovarian cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(2): e18066. doi: 10.1111/jcmm.18066
- [25] Zeng S, Xie JH, Zeng QY, et al. LncRNA PVT1 promotes metastasis of non-small cell lung cancer through EZH2-mediated activation of hippo/NOTCH1 signaling pathways [J]. *Cell J*, 2021, 23(1): 21-31.
- [26] Niu JT, Song XX, Zhang XM. Regulation of lncRNA PVT1 on miR-125 in metastasis of gastric cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(2): 1261-1266.
- [27] Lei Z, Zhu ZP, Yao ZH, et al. Reciprocal interactions between lncRNAs and MYC in colorectal cancer: partners in crime [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(7): 539. doi: 10.1038/s41419-024-06918-w