

高通量测序技术研究长链非编码RNA AOC4P 对上皮性卵巢癌的影响

林晓静, 陈佳华, 季妮妮, 潘佩佩

【摘要】目的 探讨长链非编码RNA AOC4P对上皮性卵巢癌的影响。**方法** 阴性对照小干扰RNA(siRNA-NC)、AOC4P小干扰RNA(AOC4P-siRNA)分别转染卵巢癌细胞系,设为对照组和AOC4P沉默组。运用高通量测序技术检测两组的差异表达基因,通过生物信息学技术对差异表达基因进行分析,使用GEPIA2数据库、蛋白印记实验对关键基因进行验证。通过FunRich软件及miRcode网站预测AOC4P-miRNA-关键基因的调控网络。**结果** 两组卵巢癌细胞系差异表达基因73个。生物信息学分析显示主要富集在细胞核中,通过蛋白质结合的方式发挥作用,主要影响增殖过程,并且主要涉及凋亡和肿瘤坏死因子信号通路。增殖相关的生物学过程所富集的差异表达基因共10个,其中下调2个,上调8个,CDKN1B获得了最高的差异倍数变化(-5.46倍),GEPIA2数据库数据及蛋白印记实验进一步证实了CDKN1B的表达变化。基于AOC4P与CDKN1B的miRNA调控网络的预测结果发现,miR-24-3p可能是AOC4P和CDKN1B共交集的miRNA。**结论** AOC4P可能通过miR-24-3p调节靶基因CDKN1B的表达,从而影响上皮性卵巢癌的细胞增殖。

【关键词】 卵巢癌;长链非编码RNA;AOC4P;CDKN1B;miR-24-3p

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.03.003

【中图分类号】 R737.31 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2025)03-0228-05

Study of the effect of long non-coding RNA AOC4P on epithelial ovarian cancer by high-throughput sequencing
LIN Xiaojing, CHEN Jiahua, JI Nini, PAN Peipei (The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect of long non-coding RNA AOC4P on epithelial ovarian cancer. **Methods** The ovarian cancer cell line was transfected with control siRNA (control group) and siRNA targeting AOC4P (silent group), respectively. The differentially expressed genes (DEGs) between the two groups were detected by high throughput sequencing technology, and analyzed by bioinformatics technology, and the key gene was verified by Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) database and western blot (WB) assay. AOC4P-miRNA key gene regulatory network was predicted by FunRich software and miRcode website. **Results** The study identified a total of seventy-three DEGs between the two groups. The bioinformatics technology analyses revealed that DEGs were mainly enriched in the cell nucleus, and exerted their molecular functions by protein binding. These DEGs mainly regulated the proliferation-related biological processes through apoptosis and tumor necrosis factor signaling pathways. Two of ten proliferation-related DEGs were significantly downregulated, while eight of ten DEGs were significantly upregulated. CDKN1B achieved the highest fold change (-5.46 times), and the expression of CDKN1B was further confirmed by GEPIA2 database and WB assay. The prediction of the miRNA regulatory network showed miR-24-3p might be the cointersection miRNA in AOC4P and CDKN1B. **Conclusions** AOC4P may regulate the expression of the target gene CDKN1B through miR-24-3p, thereby affecting the cell proliferation in epithelial ovarian cancer.

【Key words】 Ovarian carcinoma; Long non-coding RNA; AOC4P; CDKN1B; miR-24-3p

[Modern Practical Medicine, 2025, 37(3):228-232]

基金项目: 国家自然科学基金(82201856);温州市科技计划项目(Y20240578);温州市生殖遗传重点实验室(2022HZSY0051)

作者单位: 325000 浙江省温州,温州医科大学附属第一医院

通信作者: 潘佩佩, Email: peggy26@126.com

卵巢癌是死亡率较高的妇科恶性肿瘤之一^[1]。上皮性卵巢癌是最常见的类型,其高死亡率主要归因于早期诊断困难及缺乏有效的治疗方法^[2-3]。目前,长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在恶性肿瘤中的作用得到了广泛研究。近来,lncRNA AOC4P引起了研究人员的关注,其在肝癌、肺癌、结直肠癌、胃癌及乳腺癌等恶性肿瘤中发挥着调节作用^[4-8]。笔者之前的工作也揭示了,AOC4P抑制了上皮性卵巢癌的转移,但AOC4P是否参与其他生物学过程尚不清楚。本研究通过高通量测序技术探索AOC4P参与上皮性卵巢癌进展的可能生物学过程和相关基因,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 卵巢癌 HEY 和 HO8910 细胞系购自德克萨斯大学 MD 安德森癌症中心。Lipofectamine 3 000 转染重组剂购自美国 Invitrogen 公司,阴性对照小干扰 RNA (siRNA-NC) 和 AOC4P 小干扰 RNA (AOC4P-siRNA) 购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司,siRNA-NC 的序列为 5'-UUCUCCGAAC-GUGUCACGUTT-3', AOC4P-siRNA 的靶序列为 5'-GGUAAGGCAUCCUGGCAGAUU-3'。兔抗人 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,兔抗人 CDKN1B 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,HRP 标记山羊抗兔/鼠二抗购自上海康成生物科技有限公司。测序由励茨(上海)生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 卵巢癌细胞系置于含 10% 胎牛血清 (FBS)、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养基,在温度为 37℃,湿度为 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染及分组 将细胞接种至六孔板上,转染前细胞汇合度为 70%~90%,并更换为不含 FBS 与双抗的培养基。按照说明书配置 siRNA-脂质体复合物:用 125 μl Opti-MEM 减血清培养基分别稀释 siRNA (75 pmol/孔) 和 Lipofectamine 3 000 (7.5 μl/孔),室温下静置 5 min 后混合,孵育 10 min。将 siRNA-脂质体复合物加入细胞中 (250 μl/孔),继续培养 6 h 更换为含 10% FBS 的完全培养基,细胞培

养箱孵育 48 h 后收集细胞。用 AOC4P-siRNA 转染的卵巢癌细胞设为 AOC4P 沉默组,siRNA-NC 转染的卵巢癌细胞设为对照组。

1.2.3 测序实验 AOC4P 沉默组卵巢癌细胞系 (HEY-siRNA1、HEY-siRNA2 和 HEY-siRNA3) 和对照组卵巢癌细胞系 (HEY-NC1、HEY-NC2 和 HEY-NC3) 样本分别进行 RNA-seq 测序。Trizol 试剂提取 6 个样本总 RNA,总 RNA 经质检合格后,使用连接有 Oligo(dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA。经抽提的 mRNA 被片段化试剂随机打断成短片段,以片段化的 mRNA 为模板,用六碱基随机引物合成一链 cDNA,随后加入缓冲液、dNTPs、RNaseH 和 DNA Polymerase I 进行二链 cDNA 合成。AMPure XP beads 纯化双链产物,利用 T4 DNA 聚合酶和 Klenow DNA 聚合酶活性将 DNA 的粘性末端修复为平末端,3' 末端加碱基 A 并加接头,AMPure XP beads 进行片段选择,最后进行 PCR 扩增获得最终测序文库。文库质检合格后采用 Illumina HiSeq4000 进行测序,测序读长为双端 2×150 bp (PE150)。

1.2.4 生物信息学分析 利用 Hisat 软件、StringTie 及 Ballgown 对测序数据进行分析,采用 R 语言对数据结果进行图形化展示。以差异倍数 ≥2 为基值筛选 AOC4P 沉默后的差异表达基因。对 AOC4P 沉默组及对照组细胞的差异性基因表达进行 GO 富集及 KEGG 通路分析。

1.2.5 蛋白印记 (Western-blot, WB) 用 RIPA 裂解液对细胞进行裂解,并使用 BCA 法测定蛋白浓度,对每个处理组样品中的总蛋白进行电泳分离,然后转印至 PVDF 膜。将转膜后的 PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,封闭后的条带置于一抗液中 (GAPDH 单克隆抗体或 CDKN1B 单克隆抗体,按照说明书将一抗原液以推荐的比例配置),在 4℃ 下缓慢摇动过夜。一抗处理后的条带经 TBST 快速漂洗 3 次后,在室温下孵育 HRP 标记山羊抗兔/鼠二抗 1 h。使用 ECL 显影和 Image QuentL AS 4000 mini 成像仪可视化目标蛋白条带^[9]。

1.2.6 CDKN1B mRNA 表达量的分析 从 GEPIA2 中 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) 获取来自 TCGA 和 GTEx 数据库中卵巢癌组织 ($n=426$) 和正常组织 ($n=88$) CDKN1B 表达量的箱线图及小提琴图。

1.2.7 AOC4P-miRNA-mRNA 调控网络的预测 在 FunRich 软件中进行 miRNA 富集, 预测差异表达基因对应的靶 miRNA, 利用 miRcode 网站 (<https://www.mircode.org/>) 预测 AOC4P 可能结合的 miRNA。将结果输入到 Cytoscape 软件中进行可视化分析。

1.3 统计方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 两组比较采用独立的样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

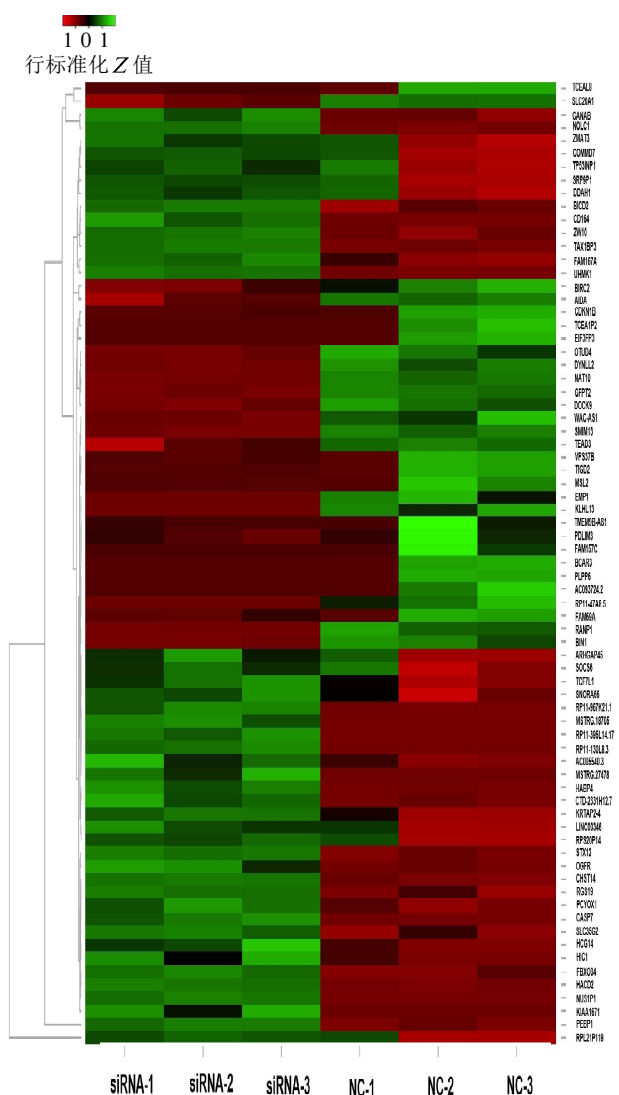
2.1 AOC4P 沉默后上皮性卵巢癌细胞的差异表达基因 AOC4P 沉默组和对照组间存在 73 个差异表达基因, 见图 1。GO 分析显示, 最显著富集的细胞组分是细胞核; 分子功能分析中, 蛋白质结合比其他功能丰富得多; 分子功能主要集中在增殖相关的生物学过程上, 包括生物学过程主要表现在细胞凋亡过程、细胞增殖的负调控、细胞周期停滞和细胞周期等, 见图 2。增殖相关的 GO 条目所富集的差异表达基因共 10 个, 2 个基因 (CDKN1B 和 BIRC2) 下调, 8 个基因 (TP53INP1、UHMK1、CD164、TAX1BP3、CASP7、ZMAT3、NOLC1 和 ZW10) 上调, 其中 CDKN1B 获得了最高的倍数变化 (-5.46)。KEGG 信号通路分析显示主要通路涉及凋亡和肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路等, 见图 3。

2.2 CDKN1B 在卵巢癌中的表达 CDKN1B 在卵巢癌组织中的 mRNA 表达较正常组织低, 且 IIIC 及 IV 期患者 CDKN1B mRNA 的表达较 IIB ~ IIIB 患者低。AOC4P 沉默后, CDKN1B 在 HEY 及 HO8910 卵巢癌细胞系中的蛋白表达均下调, 见图 3。

2.3 AOC4P-miRNA-CDKN1B 调控网络 使用 miRcode 网站预测到 AOC4P 可能结合 miRNA 家族共 21 个, 包含 51 个 miRNAs 成员。通过 FunRich 软件预测到增殖相关基因可能结合的 miRNA 共 70 个, 其中 CDKN1B 可能结合的 miRNA 共 22 个。AOC4P-miRNA、CDKN1B-miRNA 网络图通过 Cytoscape 绘制, 见图 2A。通过分析 AOC4P-miRNA、CDKN1B-miRNA 预测网络发现, AOC4P 与 CDKN1B 共同预测到 miR-24-3p, 见图 2B。

3 讨论

AOC4P 最初在肝癌中被发现^[4], 随后在非小细胞肺癌、结肠癌等恶性肿瘤中揭示了其抑癌作用^[5-6]。本团队前期研究证明了 AOC4P 可抑制上皮性卵巢癌的侵袭和迁移^[10]。本研究结果发现, AOC4P 沉默后的差异表达基因主要富集在增殖相关的生物学过程, 这提示 AOC4P 的作用还可能体现在增殖层面。KEGG 结果提示, 其主要涉及凋亡和 TNF 通路。卵巢癌细胞逃避细胞凋亡是卵巢癌化疗耐药和细胞存活的机制之一^[11]。TNF- α 是由活化的细胞毒性 T 细胞分泌的促炎细胞因子, 可以在靶细胞中启动促生存或促死亡信号^[12]。TNF- α 抗体可以通过可溶性



注: 横坐标为样本, 纵坐标为基因。绿色表示高表达的基因, 红色表示低表达的基因

图 1 AOC4P 沉默后卵巢癌细胞中差异表达基因的聚类热图

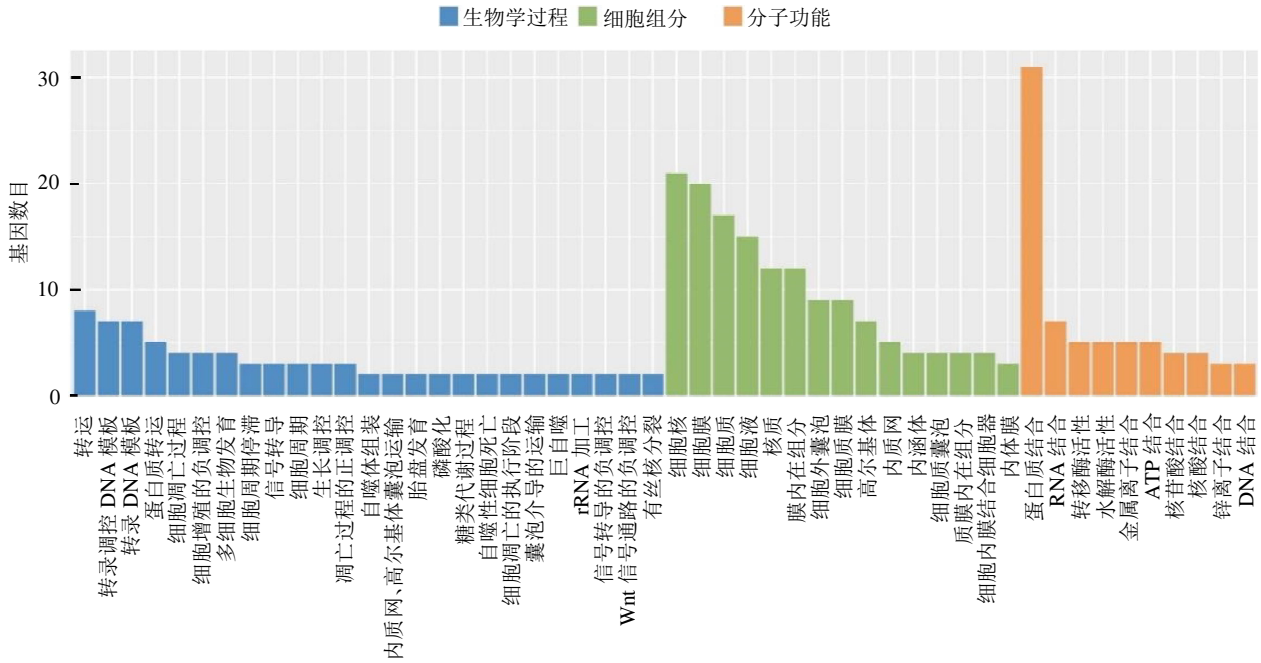


图2 AOC4P 沉默后 HEY 细胞中差异表达基因的富集性柱状图

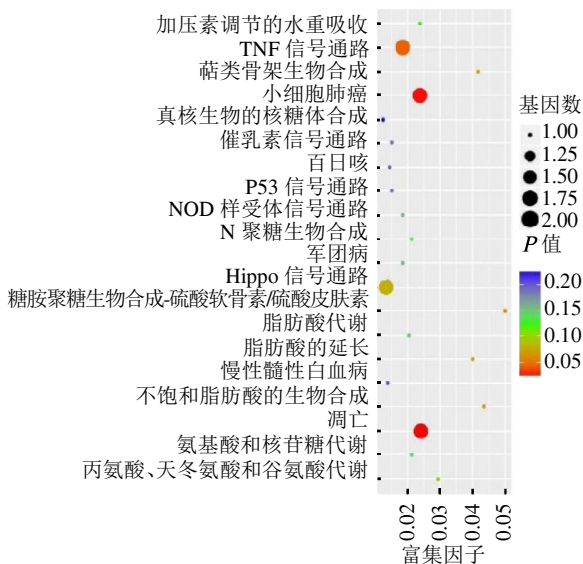


图3 AOC4P 沉默后 HEY 细胞中差异表达基因的 KEGG 信号通路富集气泡图

TNF- α 受体及 TNF- α 反义 mRNA 部分阻断 IL-1 β 对卵巢癌细胞增殖的促进作用^[13-14]。此外, TNF 超家族成员还可以激活凋亡过程^[15]。

本研究发现, AOC4P 沉默后 CDKN1B 的表达改变最为显著。CDKN1B 是一种细胞周期依赖性激酶抑制因子, 以多种方式影响细胞周期的调节, 抑制细胞分裂和增殖, 促进细胞分化和凋亡^[16-17]。CDKN1B 在恶性肿瘤中被认为是一种抑癌基因^[18]。CDKN1B 基因的 rs2066827 位点多态性与卵巢癌的患病风险

相关^[19]。有研究证明 CDKN1B 的低表达与上皮性卵巢癌的进展和转移密切相关^[20]。本研究发现, CDKN1B 的表达与卵巢癌的分期相关, IIC 和 IV 期患者卵巢癌组织中 CDKN1B 的表达低于 IIB ~ IIIB 患者, IIA 患者卵巢癌组织中 CDKN1B 的表达量最低, 这可能与该组样本量最小有关, 难以体现整个群体中 CDKN1B 的真实表达情况。本研究结果提示 CDKN1B 可能是 AOC4P 参与上皮性卵巢癌细胞增殖过程的下游关键基因。lncRNA 与 miRNA 的相互作用被认为是 lncRNA 参与基因转录后调控的重要途径。在 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络中, lncRNA 通过竞争性结合 miRNA, 间接抑制 miRNA 对其靶 mRNA 的负调控。本研究发现, miR-24-3p 可能是 AOC4P 通过 CDKN1B 参与上皮性卵巢癌增殖过程的中间分子。目前, 多项研究证实了 miR-24-3p 在卵巢癌进展中的作用。miR-24-3p 可能通过介导卵巢癌 OVCAR-8R 细胞顺铂耐药相关基因, 从而促进卵巢癌细胞对顺铂的化疗耐药^[21]。此外, 卵巢癌患者血浆外泌体中 miR-24-3p 的表达下调, 可能是肿瘤不良预后的潜在诊断标志物和预测因子^[22]。

综上所述, lncRNA AOC4P 可能通过多靶点(多个增殖相关基因)、多通路(凋亡与 TNF 信号通路)抑制卵巢癌进展; 其中对 CDKN1B 的作用最为显著,

推测 AOC4P 可能通过 miR-24-3p 调控 CDKN1B 表达从而发挥生物学效应。但本研究存在一些局限性：(1) 本研究未对 AOC4P 的增殖相关生物学功能进行实验验证；(2) AOC4P-miR-24-3p-CDKN1B 调控网络未进行深入研究和验证；(3) 缺少 AOC4P 在临床中的应用，这有待更大样本量的研究去验证。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 林晓静：实验设计、实验研究、文章撰写；陈佳华：数据统计分析、文章撰写；季妮妮：数据统计分析；潘佩佩：研究指导、论文审阅、经费支持

参 考 文 献

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] SAMBASIVAN S. Epithelial ovarian cancer: Review article[J]. *Cancer Treat Res Commun*, 2022, 33: 100629.
- [3] WEBB P M, JORDAN S J. Global epidemiology of epithelial ovarian cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2024, 21(5): 389-400.
- [4] WANG T H, LIN Y S, CHEN Y, et al. Long non-coding RNA AOC4P suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by enhancing vimentin degradation and inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23342-23357.
- [5] LI F B, RONG T, CAO G, et al. AOC4P suppresses viability and invasion and induces apoptosis in NSCLC cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 325: 109110.
- [6] KANG J, LI Z, KONG F H, et al. Overexpression of lncRNA AOC4P indicates a poor prognosis for colorectal cancer and regulates cell metastasis by epithelial mesenchymal transition[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(2): 1840-1846.
- [7] TANIUE K, KURIMOTO A, SUGIMASA H, et al. Long noncoding RNA UPAT promotes colon tumorigenesis by inhibiting degradation of UHRF1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(5): 1273-1278.
- [8] ABDOLLAHZADEH R, MANSOORI Y, AZARNEZHAD A, et al. Expression and clinicopathological significance of AOC4P, PRNCR1, and PCAT1 lncRNAs in breast cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(10): 153131.
- [9] QIU J J, LIN Y Y, YE L C, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts poor patient prognosis and promotes tumor metastasis in epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 134(1): 121-128.
- [10] LIN X J, TANG X Y, ZHENG T T, et al. Long non-coding RNA AOC4P suppresses epithelial ovarian cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 45.
- [11] AL-ALEML F, BAKER A T, PANDYA U M, et al. Understanding and targeting apoptotic pathways in ovarian cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1631.
- [12] BALKWILL F. Tumour necrosis factor and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(5): 361-371.
- [13] WU S, BOYER C M, WHITAKER R S, et al. Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: Monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(8): 1939-1944.
- [14] WU S, MEEKER W A, WIENER J R, et al. Transfection of ovarian cancer cells with tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) antisense mRNA abolishes the proliferative response to interleukin-1 (IL-1) but not TNF-alpha[J]. *Gynecol Oncol*, 1994, 53(1): 59-63.
- [15] PIMENTEL J M, ZHOU J Y, WU G S. The role of TRAIL in apoptosis and immunosurveillance in cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(10): 2752.
- [16] HAFERLACH C, BACHER U, KOHLMANN A, et al. CDKN1B, encoding the cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27), is located in the minimally deleted region of 12p abnormalities in myeloid malignancies and its low expression is a favorable prognostic marker in acute myeloid leukemia[J]. *Haematologica*, 2011, 96(6): 829-836.
- [17] LIN K B, QIANG W A, ZHU M Y, et al. Mammalian Pum1 and Pum2 control body size via translational regulation of the cell cycle inhibitor Cdkn1b[J]. *Cell Rep*, 2019, 26(9): 2434-2450.
- [18] BENCIVENGA D, CALDARELLI I, STAMPONE E, et al. p27Kip1 and human cancers: A reappraisal of a still enigmatic protein[J]. *Cancer Lett*, 2017, 403: 354-365.
- [19] LU Y C, GAO K J, ZHANG M, et al. Genetic association between CDKN1B rs2066827 polymorphism and susceptibility to cancer[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(46): e1217.
- [20] LI X D, TANG M L. Exosomes released from M2 macrophages transfer miR-221-3p contributed to EOC progression through targeting CDKN1B[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(16): 5976-5988.
- [21] LIU W S, WANG S Y, ZHOU S H, et al. A systems biology approach to identify microRNAs contributing to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells[J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(11): 2268-2276.
- [22] YUNUSOVA N, DZHUGASHVILI E, YALOVAYA A, et al. Comparative analysis of tumor-associated microRNAs and tetraspanins from exosomes of plasma and ascitic fluids of ovarian cancer patients[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 464.

收稿日期:2024-12-02

(本文编辑:孙海儿)