

LINC02086 通过调控 Wnt/β-catenin 通路介导巨噬细胞 M2 极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

李军¹, 卜亚飞², 陈杰², 丁波¹, 王磊¹

(宁夏医科大学总医院¹胃肠外科、²急诊科, 银川 750004)

摘要 目的 探讨长链间隔非编码 RNA02086(*LINC02086*)过表达介导的巨噬细胞极化对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及机制。方法 采用qRT-PCR检测人胃黏膜上皮细胞GES-1及人胃癌细胞系HCG-27、NCI-N87、AGS中的*LINC02086*表达水平。使用佛波酯(PMA)将人急性单核细胞白血病细胞(THP-1)诱导分化为M0型巨噬细胞, 分别用*LINC02086*过表达慢病毒(OE-LINC02086)及其阴性对照慢病毒(Vector)感染HGC-27细胞, 收集培养上清液作为条件培养基1(CM1);将M0型巨噬细胞与感染后的HGC-27细胞共培养, 收集培养上清液得到CM2。使用CM1单独或联合Wnt/β-catenin通路抑制剂(IWR-1)处理M0型巨噬细胞, 分别设为Vector+CM1组、OE-LINC02086+CM1组和OE-LINC02086+CM1+IWR-1组;通过流式细胞术检测细胞中甘露糖受体(CD206)水平;qRT-PCR检测细胞中白细胞介素-10(IL-10)、转化生长因子-β(TGF-β)、血管内皮生长因子(VEGF)和趋化因子配体22(CCL22)mRNA表达水平;Western blot检测细胞中CD206、VEGF蛋白和Wnt/β-catenin通路相关蛋白Wnt家族成员3A(Wnt3a)、糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)、β-连环蛋白(β-catenin)表达水平。使用CM2单独或联合IWR-1处理HGC-27细胞, 分别设为Vector+CM2组、OE-LINC02086+CM2组和OE-LINC02086+CM2+IWR-1组;CCK-8法检测细胞增殖活性;Transwell检测细胞迁移、侵袭能力。结果 与GES-1细胞比较, HCG-27、NCI-N87及AGS细胞中*LINC02086*表达水平均升高($P < 0.05$), 其中HCG-27细胞升高幅度最小。与Vector+CM1组比较, OE-LINC02086+CM1刺激后, 巨噬细胞中CD206水平以及IL-10、TGF-β、VEGF和CCL22 mRNA表达水平升高($P < 0.05$), 同时, 细胞中Wnt3a和β-catenin蛋白表达水平升高($P < 0.05$), GSK-3β蛋白表达水平降低($P < 0.05$);然而, IWR-1联合干预可明显逆转*LINC02086*过表达对巨噬细胞CD206和IL-10、TGF-β mRNA等M2型极化标志物表达的促进作用($P < 0.05$)以及对Wnt/β-catenin通路的激活作用($P < 0.05$)。与Vector+CM2组比较, OE-LINC02086+CM2处理后, HGC-27细胞增殖活性及迁移、侵袭细胞数量升高($P < 0.05$);然而, IWR-1联合干预可明显逆转*LINC02086*过表达对HGC-27细胞增殖、迁移和侵袭的促进作用($P < 0.05$)。结论 *LINC02086*过表达可通过激活Wnt/β-catenin通路介导巨噬细胞M2极化并促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词 长链间隔非编码 RNA02086;过表达;胃癌;巨噬细胞;极化;增殖;Wnt/β-catenin通路

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)02-0192-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.02.002

胃癌是全球癌症致死的主要原因之一, 由于其发病隐匿且缺乏早期诊断靶标, 多数患者确诊时已处于中晚期, 导致预后不良^[1]。肿瘤的进展与肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)密切相关, 其中肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)是关键的免疫细胞, 可极化为抗肿瘤的M1表型或促肿瘤的M2表型, 后者通过分泌细胞因子促进胃癌细胞恶性进展^[2-3]。长链非编码RNA(long non coding RNA, LncRNA)是重要的调控分子, 常通

过充当“分子海绵”竞争性吸附miRNA影响TME^[4]。例如, *LncRNA NR_109*和*LncRNA CRNDE*已被证实通过诱导TAM的M2型极化促进胃癌进展^[5-6]。长链间隔非编码RNA02086(long intergenic non coding RNA02086, *LINC02086*)是近年来被关注的LncRNA, 在胰腺癌等多种消化道癌中高表达, 并促进其发展^[7]。在胃癌中, *LINC02086*特异性高表达, 可通过吸附miR-93a-5p上调基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase-3, MMP3)表达, 进而激活细胞外基质重塑通路, 推动胃癌细胞增殖和迁移^[8]。然而, *LINC02086*是否通过调控巨噬细胞极化影响胃癌进展尚未明确。该研究拟探讨*LINC02086*过表达对巨噬细胞极化及胃癌细胞恶性行为的影响与机制, 旨在为胃癌诊断和治疗提供新的潜在靶点。

2025-11-24 接收

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(编号:2024AAC03688)

作者简介: 李军, 男, 主任医师;

王磊, 男, 主任医师, 通信作者, E-mail:wanglei118

2@sina.com

1 材料与方法

1.1 细胞 人急性单核细胞白血病细胞 THP-1、人胃黏膜上皮细胞 GES-1 及人胃癌细胞 HCG-27、NCI-N87、AGS(货号: h213、h062、h095、h164、h016) 购自上海赛百康生物技术股份有限公司。

1.2 主要试剂和仪器 RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基(货号: SH30809、SH30243) 购自美国 Hyclone 公司; F12K 培养基、青-链霉素双抗(货号: PM150910B、PB180120) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)(货号: P1585) 购自美国 Sigma 公司; Wnt/β-catenin 通路抑制剂 IWR-1(货号: HY-12238) 购自美国 MedChemExpress 公司; FITC 标记的甘露糖受体(mannose receptor C-type 1, CD206) 流式抗体以及用于 Western blot 的抗 CD206、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、Wnt 家族成员 3A(Wnt family member 3a, Wnt3a)、糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)、β-连环蛋白(β-catenin)、GAPDH 抗体(货号: ab270647、ab64693、ab46154、ab219412、ab93926、ab32572、ab8245) 购自英国 Abcam 公司; 结晶紫、CCK-8 试剂盒(货号: Y268091、C0038) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 荧光显微镜(型号: CX23) 购自日本 OLYMPUS 公司; 实时荧光定量 PCR 仪(型号: Light-Cycler 96) 购自瑞士 Roche 公司; 流式细胞仪(型号: CytoFLEX) 购自美国 Beckman Coulter 公司; 全波长酶标仪(型号: Multiskan SkyHigh) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 凝胶成像仪(型号: Gel Doc EZ) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中, 分别使用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青-链霉素)的 RPMI-1640 完全培养基培养 THP-1、GES-1 及 NCI-N87 细胞, 使用 DMEM 完全培养基培养 HGC-27 细胞, 使用 F12K 完全培养基培养 AGS 细胞。THP-1 细胞生长至 8×10⁵ 个/mL 时进行传代, 其余细胞融合度生长至 80%~90% 时进行传代。

1.3.2 慢病毒感染 构建 LINC02086 慢病毒过表达载体(pLVX-Puro), 经过慢病毒包装、纯化及浓缩得到相应慢病毒溶液(滴度 1×10⁸ TU/mL)。按照感染复数(multiplicity of infection, MOI) 为 30 的 LINC02086 过表达慢病毒及其阴性对照慢病毒感染

HGC-27 细胞, 经过嘌呤霉素筛选得到稳定过表达 LINC02086 的 HGC-27 细胞系, 分别命名为 Vector 组和 OE-LINC02086 组, 另设置空白对照组(Blank)。LINC02086 慢病毒过表达载体构建、病毒包装、纯化及浓缩由苏州赛业生物科技有限公司完成并提供。

1.3.3 M0 型巨噬细胞诱导及条件培养基(conditioned medium, CM) 获取 体外培养 THP-1 细胞, 加入 10 nmol/L PMA 诱导 48 h 后得到未分化的 M0 型巨噬细胞^[9]。将感染慢病毒后的 HGC-27 细胞置于无血清 RPMI-1640 培养基中培养 24 h, 收集上清液, 经过 0.45 μmol/L 滤膜过滤得到条件培养基 CM1, 分别命名为 Vector+CM1、OE-LINC02086+CM1, 另设置空白对照 CM1(Blank+CM1); 在 Transwell 体系中进行细胞共培养^[10], 分别将感染慢病毒后的 HGC-27 细胞接种于 6 孔板底部, 将 M0 型巨噬细胞接种于与之匹配的 Transwell 小室中, 待二者分开培养至贴壁后, 将培养 M0 型巨噬细胞的小室移至培养 HGC-27 细胞的 6 孔板中建立共培养体系, 无血清培养基共培养 24 h, 收集上清液得到条件培养基 CM2, 分别命名为 Vector+CM2、OE-LINC02086+CM2, 另设置空白对照 CM2(Blank+CM2)。该研究中, CM1 用于评估 LINC02086 过表达的胃癌细胞自身分泌因子对巨噬细胞的直接作用, CM2 用于模拟 TME 中胃癌细胞与巨噬细胞双向交互后的状态, 其中包含了被胃癌细胞诱导 M2 极化后的巨噬细胞所反馈分泌的因子。

1.3.4 细胞分组及处理 采用 qRT-PCR 检测 GES-1、HCG-27、NCI-N87 及 AGS 细胞中的 LINC02086 表达水平。对 HGC-27 细胞进行以下分组及处理: ① Control-1 组: M0 型巨噬细胞不经任何处理; Blank+CM1 组、Vector+CM1 组、OE-LINC02086+CM1 组: 使用对应来源的 CM1 刺激 M0 型巨噬细胞 24 h; Vector+CM1+IWR-1 组、OE-LINC02086+CM1+IWR-1 组: 使用 10 μmol/L IWR-1^[11] 预处理 M0 型巨噬细胞 2 h 后, 再使用对应来源的 CM1 刺激 M0 型巨噬细胞 24 h; ② Control-2 组: HGC-27 细胞不经任何处理; Blank+CM2 组、Vector+CM2 组、OE-LINC02086+CM2 组: 使用对应来源的 CM2 处理 HGC-27 细胞 24 h; Vector+CM2+IWR-1 组、OE-LINC02086+CM2+IWR-1 组: 使用 10 μmol/L IWR-1 预处理 M0 型巨噬细胞 2 h 后, 再使用对应来源的 CM2 刺激 M0 型巨噬细胞 24 h。

1.3.5 流式细胞术检测 CD206 阳性细胞比例 收

集各组巨噬细胞至流式测定管中,1 500 r/min 离心3 min后去除培养基,加入PBS重悬细胞,使其浓度达到 1×10^6 个/mL。4%多聚甲醛固定细胞15 min后破膜,使用1%的牛血清白蛋白封闭液封闭细胞表面非特异性结合位点,加入FITC-CD206抗体,避光孵育30 min,于流式细胞仪上检测各组CD206阳性细胞比例。

1.3.6 qRT-PCR 收集各组HGC-27细胞和巨噬细胞,加入TRIzol试剂使细胞充分裂解,使用氯仿和异丙醇溶液对RNA进行分离,检测RNA浓度后,根据反转录试剂盒说明书操作进行cDNA合成。设计引物(表1),配置包含2×SYBR扩增预混液、引物混合物、cDNA模板和无酶水的PCR反应体系,于实时荧光定量PCR仪上进行扩增反应,反应条件:95 °C预变性2 min;95 °C变性10 s,55 °C退火15 s,72 °C延伸10 s,循环40次。根据扩增和熔解曲线,以GAPDH作为对照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Gene	Primer sequence (5'-3')
LINC02086	F: TCCCTTGAGGTTATTGAC R: CTCAGAACAAACCGATGAC
IL-10	F: AGAACCTGAAGACCCCTCAGGC R: CCACGGCCTGCTCTTGT
TGF- β	F: TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC R: GTTGTGAGGTATGCCAGGAA
VEGF	F: CAGGGACAGTTGCTTCTGGA R: CAGGGACAGTTGCTTCTGGA
CCL22	F: GAGATCTGTGCCGATCCAG R: AGGAAATGCAGAGAGTTGGC
GAPDH	F: AATCCCATCACCATCTTC R: AGGCTGTTGTCATACTTC

1.3.7 CCK-8实验 将对数生长期的HGC-27细胞接种于96孔板中,每孔 3×10^3 个/100 μ L,待细胞贴壁后按照分组要求进行处理,随后每孔加入10 μ L CCK-8试剂,轻轻振荡混匀,继续孵育1 h,于酶标仪波长450 nm处检测各孔吸光度(Absorbance, A)值。细胞增殖活性(%)=(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值)×100%。

1.3.8 Transwell实验 按照分组要求对HGC-27细胞进行处理,随后分别进行迁移和侵袭实验。迁移实验:将细胞接种于Transwell上室中的无血清培养基中进行培养,将含有20%胎牛血清的DMEM培

养基添加到Transwell下室中,将孔板置于培养箱中培养24 h后,取出小室,经过4%多聚甲醛固定、0.1%结晶紫染色,于显微镜下进行拍照和计数,对迁移细胞的数量进行统计。侵袭实验:提前在小室中铺入50 μ L基质胶,后续步骤同迁移实验。

1.3.9 Western blot实验 收集各组巨噬细胞和HGC-27细胞,加入裂解缓冲液后4 °C振荡、1 500 r/min离心3 min取上清液,对蛋白质浓度进行测定。将40 μ g蛋白质上样至SDS-PAGE凝胶中(100 V分离1 h),随后转至PVDF膜上(60 V转膜2 h),将膜置于5%脱脂奶粉中室温封闭1 h,加入1:1 000稀释后的一抗(Wnt3a、GSK-3 β 、 β -catenin、CD206、VEGF、GAPDH)4 °C孵育过夜,TBST洗膜3次,加入1:5 000稀释后的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗室温孵育1 h,加入ECL化学发光底物进行显色,ImageJ软件分析条带,以GAPDH为内参,计算目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学处理 使用SPSS 26.0软件分析数据,结果用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组均数比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用LSD-t检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌HGC-27细胞中LINC02086表达水平及其过表达对M0型巨噬细胞M2极化的影响 采用qRT-PCR检测各细胞系及慢病毒感染后HGC-27细胞中的LINC02086表达水平,结果显示(图1),与GES-1细胞比较,HCG-27、NCI-N87及AGS细胞中LINC02086表达水平均升高(均 $P<0.01$,LSD-t=9.67、37.53、24.26),其中HCG-27细胞升高幅度最小。感染慢病毒后,与Blank组比较,OE-LINC02086组HGC-27细胞中LINC02086表达水平升高($P<0.01$,LSD-t=31.09),Vector组差异无统计学意义($P>0.05$,LSD-t=0.04)。采用不同来源的CM1刺激M0型巨噬细胞,结果显示(图2),与Control-1组比较,Blank+CM1组巨噬细胞中CD206水平以及IL-10、TGF- β 、VEGF和CCL22 mRNA表达水平均升高(均 $P<0.05$,LSD-t=12.61、5.59、3.44、5.80、2.52);与Blank+CM1组比较,OE-LINC02086+CM1组巨噬细胞中CD206水平以及IL-10、TGF- β 、VEGF和CCL22 mRNA表达水平均升高(均 $P<0.05$,LSD-t=12.73、8.87、13.44、3.20、14.85),Vector+CM1组以上指标差异无统计学意义($P>0.05$,LSD-t=0.07)。

0.20、0.67、0.40、0.18)。提示LINC02086过表达可促进巨噬细胞向M2型极化。

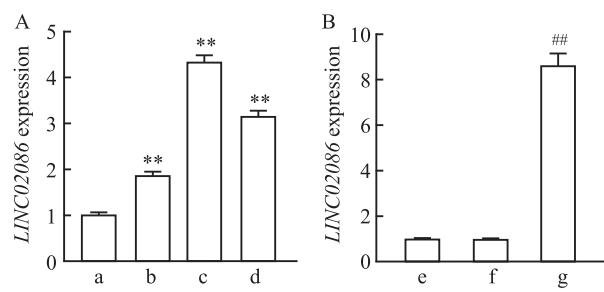


图1 qRT-PCR检测细胞中LINC02086表达水平
Fig. 1 The expression level of LINC02086 in cells was detected by qRT-PCR

A: Expression levels of LINC02086 in each cell line; B: Expression levels of LINC02086 in cells after lentivirus infection; a: GES-1 cells; b: HGC-27 cells; c: NCI-N87 cells; d: AGS cells; e: Blank group; f: Vector group; g: OE-LINC02086 group; ** $P<0.01$ vs GES-1 cells; ## $P<0.01$ vs Blank group.

2.2 LINC02086过表达介导的巨噬细胞M2极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响 采用不同来源的CM2刺激HGC-27细胞,结果显示(图3),与

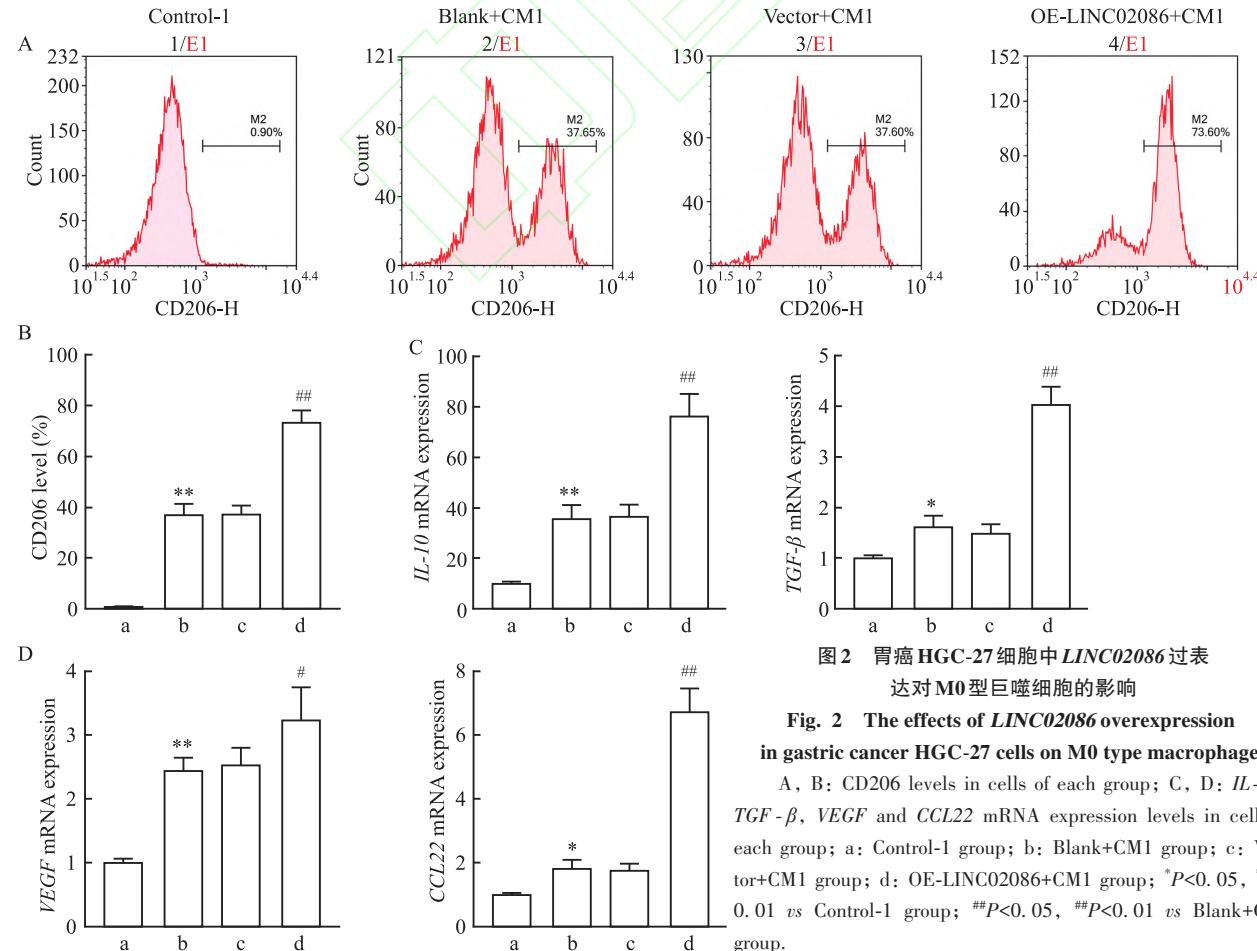


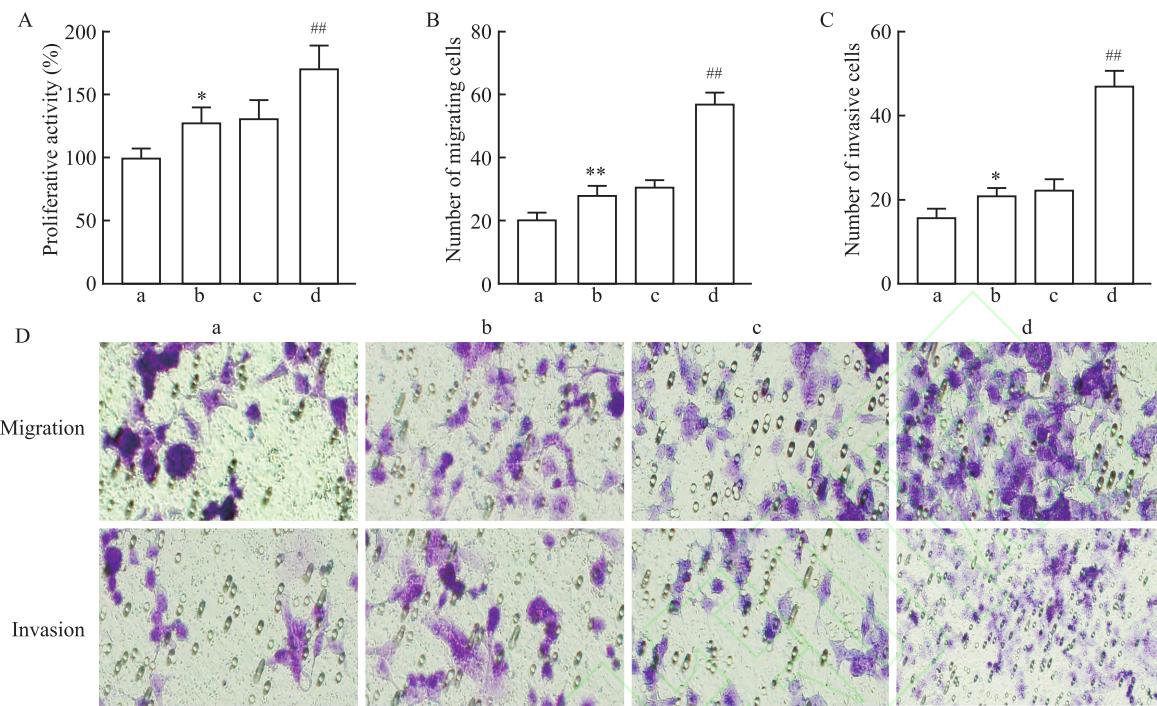
图2 胃癌HGC-27细胞中LINC02086过表达对M0型巨噬细胞的影响

Fig. 2 The effects of LINC02086 overexpression in gastric cancer HGC-27 cells on M0 type macrophages

A, B: CD206 levels in cells of each group; C, D: IL-10, TGF- β , VEGF and CCL22 mRNA expression levels in cells of each group; a: Control-1 group; b: Blank+CM1 group; c: Vector+CM1 group; d: OE-LINC02086+CM1 group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Control-1 group; ## $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs Blank+CM1 group.

Control-2组比较,Blank+CM2组HGC-27细胞增殖活性升高($P<0.05$,LSD- $t=2.43$),迁移、侵袭细胞数量增加(均 $P<0.05$,LSD- $t=3.39$ 、 2.53);与Blank+CM2组比较,OE-LINC02086+CM2组HGC-27细胞增殖活性升高($P<0.01$,LSD- $t=3.81$),迁移、侵袭细胞数量进一步增加($P<0.01$,LSD- $t=12.83$ 、 12.32),Vector+CM2组以上指标差异无统计学意义($P>0.05$,LSD- $t=0.31$ 、 1.18 、 0.63)。

2.3 LINC02086过表达通过激活Wnt/β-catenin通路促进巨噬细胞向M2型极化 采用不同来源的CM1刺激M0型巨噬细胞,结果显示(图4),与Control-1组比较,Blank+CM1组巨噬细胞中Wnt3a和β-catenin蛋白表达水平升高,GSK-3β蛋白表达水平降低(均 $P<0.01$,LSD- $t=14.25$ 、 7.25 、 3.83);与Blank+CM1组比较,OE-LINC02086+CM1组巨噬细胞中Wnt3a和β-catenin蛋白表达水平升高,GSK-3β蛋白表达水平降低(均 $P<0.01$,LSD- $t=7.00$ 、 12.25 、 10.67),Vector+CM1组以上指标差异无统计学意义($P>0.05$,LSD- $t=1.00$ 、 0.33 、 0.50)。采用不同来源的CM1联合IWR-1刺激M0型巨噬细胞,结果显示

图3 *LINC02086*过表达介导的巨噬细胞M2极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响Fig. 3 The effects of M2 polarization of macrophages mediated by *LINC02086* overexpression on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells

A: Cell proliferation activity in each group; B: Number of migrating cells in each group; C: Number of invasive cells in each group; D: Transwell assay was used to detect cell migration and invasion $\times 200$; a: Control-2 group; b: Blank+CM2 group; c: Vector+CM2 group; d: OE-LINC02086+CM2 group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Control-2 group; ## $P<0.01$ vs Blank+CM2 group.

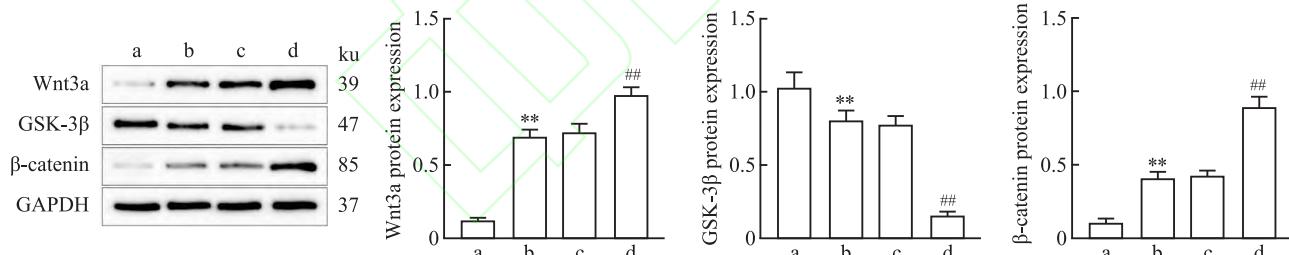


图4 胃癌来源CM1对巨噬细胞中Wnt/β-catenin通路的影响

Fig. 4 The effects of gastric cancer derived CM1 on Wnt/β-catenin pathway in macrophages

a: Control-1 group; b: Blank+CM1 group; c: Vector+CM1 group; d: OE-LINC02086+CM1 group; ** $P<0.01$ vs Control-1 group; ## $P<0.01$ vs Blank+CM1 group.

(图5),与Vector+CM1组比较,Vector+CM1+IWR-1组巨噬细胞中CD206水平以及IL-10、TGF-β、VEGF和CCL22 mRNA表达水平平均降低(均 $P<0.05$,LSD- $t=7.37$ 、 3.46 、 2.38 、 3.24 、 2.53),同时,细胞中β-catenin、CD206和VEGF蛋白表达水平平均降低(均 $P<0.05$,LSD- $t=3.75$ 、 3.83 、 2.60);OE-LINC02086+CM1组巨噬细胞中CD206水平以及IL-10、TGF-β、VEGF和CCL22 mRNA表达水平平均升高(均 $P<0.01$,LSD- $t=11.18$ 、 31.05 、 23.43 、 25.95 、 12.35),同时,细胞中β-catenin、CD206和VEGF蛋白表达水平平均升高(均 $P<0.01$,LSD- $t=16.75$ 、 12.00 、 13.20);与OE-

LINC02086+CM1组比较,OE-LINC02086+CM1+IWR-1组巨噬细胞中CD206水平以及IL-10、TGF-β、VEGF和CCL22 mRNA表达水平平均降低(均 $P<0.01$,LSD- $t=8.01$ 、 27.64 、 18.10 、 9.76 、 4.24),同时,细胞中β-catenin、CD206和VEGF蛋白表达水平平均降低(均 $P<0.01$,LSD- $t=9.75$ 、 6.83 、 6.00)。

2.4 阻断Wnt/β-catenin通路抑制LINC02086过表达介导的巨噬细胞M2极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响 采用不同来源的CM2联合IWR-1刺激HGC-27细胞,结果显示(图6),与Vector+CM2组比较,Vector+CM2+IWR-1组HGC-27细胞增

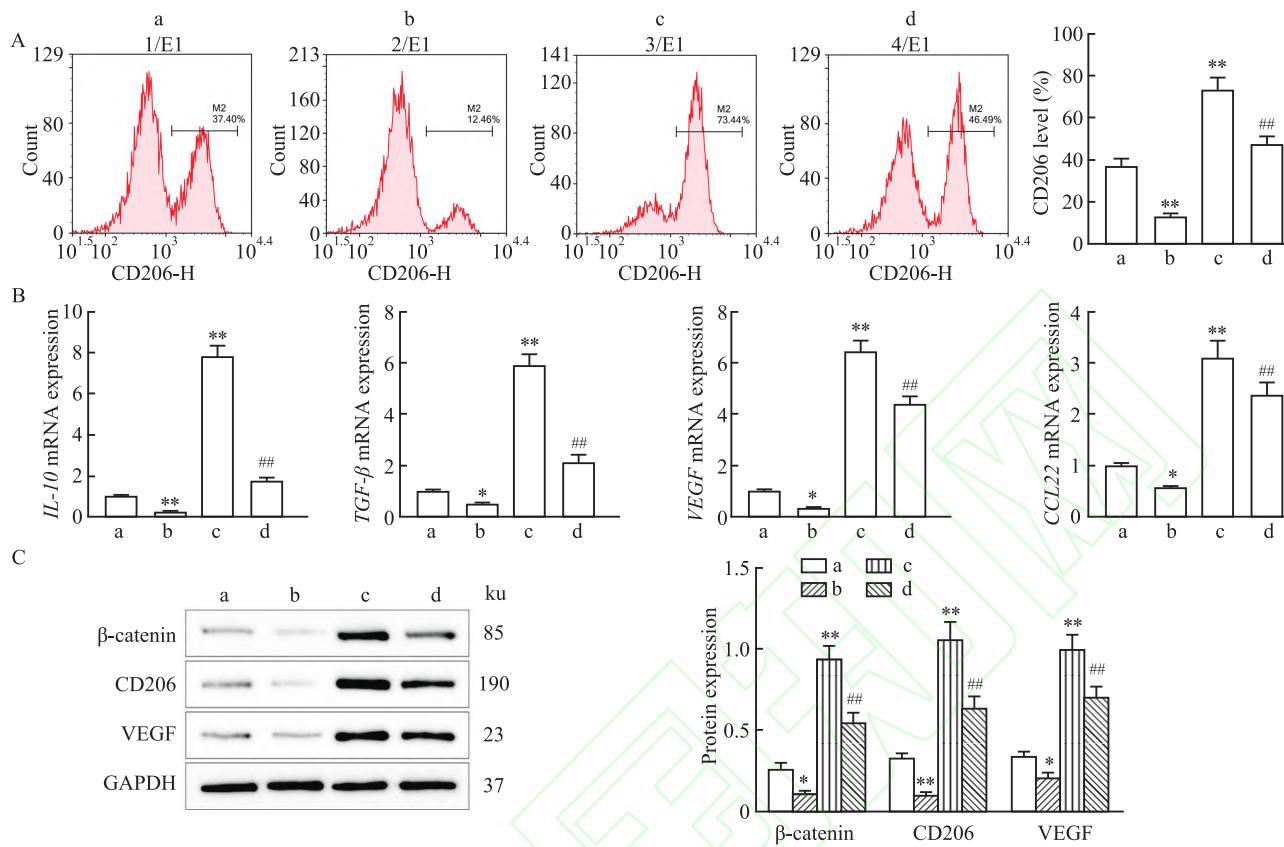


图 5 CM1 联合 Wnt/β-catenin 通路抑制剂对巨噬细胞向 M2 型极化的影响

Fig. 5 The effects of CM1 combined with Wnt/β-catenin pathway inhibitors on the M2 polarization of macrophages

A: CD206 levels in cells in each group; B: mRNA expression levels of M2-type macrophage-associated cytokines in cells in each group; C: Protein expression of β-catenin, CD206 and VEGF levels in cells in each group; a: Vector+CM1 group; b: Vector+CM1+IWR-1 group; c: OE-LINC02086+CM1 group; d: OE-LINC02086+CM1+IWR-1 group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Vector+CM1 group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs OE-LINC02086+CM1 group.

殖活性降低($P<0.05$, LSD- $t=3.22$),迁移、侵袭细胞数量减少(均 $P<0.01$, LSD- $t=5.01$ 、 5.95);且OE-LINC02086+CM2组HGC-27细胞增殖活性升高($P<0.01$, LSD- $t=5.50$),迁移、侵袭细胞数量增加(均 $P<0.01$, LSD- $t=17.43$ 、 10.85)。与OE-LINC02086+CM2组比较,OE-LINC02086+CM2+IWR-1组HGC-27细胞增殖活性降低($P<0.01$, LSD- $t=4.42$),迁移、侵袭细胞数量减少(均 $P<0.01$, LSD- $t=8.71$ 、 8.01)。

3 讨论

TAM是TME中重要的先天免疫细胞群之一,参与刺激肿瘤的慢性炎症、血管生成以及癌细胞免疫逃逸、侵袭和转移^[12]。近年来,靶向TAM干预胃癌的进展受到关注,通过介导肿瘤与TAM之间的相互作用可以抑制或促进胃癌细胞转移,然而其具体的分子机制仍有待进一步深入阐明^[13]。

巨噬细胞作为机体免疫系统的核心成员,其表

型分化和功能重塑受到周围微环境调节。在病原体侵袭过程中,巨噬细胞一方面迅速对病原体发生免疫和炎症反应,一方面对组织进行修复和重塑,这些功能分别由M1型和M2型两种不同亚型的巨噬细胞主导,两种极化状态可通过相互转换维持细胞稳态。M2型TAM在TME中占优势地位,通过增加TGF-β和VEGF含量促进血管内皮细胞活性,导致癌细胞的快速生长和远处转移,而癌细胞反过来又通过分泌高水平的CCL22等趋化因子来募集和扩增TAM,造成恶性循环^[14-15]。钟裕昌等^[16]研究显示,M2型TAM可促进胃癌细胞的侵袭和迁移,过表达M2型TAM中的TIA1基因可通过阻断磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)信号通路抑制胃癌细胞侵袭和迁移。本研究采用CM1诱导M0型巨噬细胞以模拟胃癌肿瘤环境,结果显示,巨噬细胞中CD206水平以及IL-10、TGF-β、VEGF和CCL22

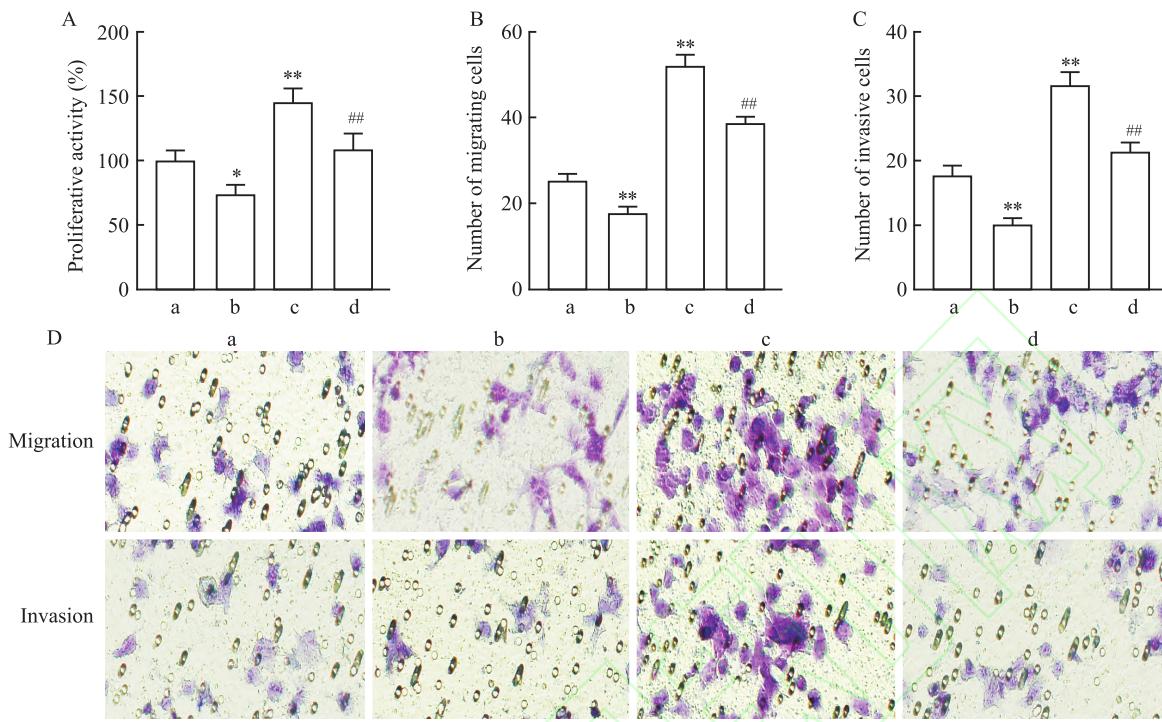


图6 阻断Wnt/β-catenin通路抑制LINC02086过表达介导的巨噬细胞M2极化对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

Fig. 6 Blocking Wnt/β-catenin pathway inhibited the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by inhibiting the M2 polarization of macrophages mediated by LINC02086 overexpression

A: Cell proliferation activity in each group; B: Number of migrating cells in each group; C: Number of invasive cells in each group; D: Transwell assay was used to detect cell migration and invasion $\times 200$; a: Vector+CM2 group; b: Vector+CM2+IWR-1 group; c: OE-LINC02086+CM2 group; d: OE-LINC02086+CM2+IWR-1 group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Vector+CM2 group; ## $P<0.01$ vs OE-LINC02086+CM2 group.

mRNA表达水平较Blank组均显著升高,说明肿瘤环境中的巨噬细胞向M2型极化。近年来,LINC02086展现出的在胰腺癌^[7]、乳腺癌^[17]、肺腺癌^[18]等肿瘤中的治疗潜力引起关注,并被预测可作为胃癌预后的潜在生物标志物^[8],但其在胃癌中的作用和机制还需进一步验证。本研究证实LINC02086在胃癌细胞系中高表达,并选择表达水平相对较低的HGC-27细胞进行慢病毒介导的过表达,以探究LINC02086对胃癌细胞恶性表型的影响及其机制。进一步研究发现,LINC02086过表达能诱导巨噬细胞向M2型极化;在此基础上,通过收集极化后巨噬细胞的条件培养基(CM2)模拟肿瘤微环境中的反馈作用,验证了LINC02086通过介导巨噬细胞M2极化,进而促进胃癌HGC-27细胞增殖、迁移及侵袭的作用。

巨噬细胞极化受Wnt/β-catenin、PI3K/AKT/mTOR、Notch等经典信号通路以及细胞因子微环境、外泌体介导的细胞间通讯的精密调控,Wnt/β-catenin通路尤为重要^[19]。Wnt3a作为Wnt家族中的关键配体,与其共受体结合后激活支架蛋白Disheveled,通过解离GSK-3β和酪蛋白激酶1(casein

kinase 1, CK1)形成的复合体,使胞质β-catenin蛋白入核启动靶基因转录,诱导后续细胞反应^[20]。一方面,TAM来源的VEGF通过Wnt/β-catenin通路以自分泌和旁分泌的方式促进肿瘤干性^[21];另一方面,肿瘤细胞释放的Wnt配体亦可激活该通路,诱导TAM向M2型极化进而促进癌细胞生长和转移^[22]。LINC00662被报道可通过激活Wnt/β-catenin信号通路介导巨噬细胞M2型极化促进肝癌转移^[23]。而本研究发现,LINC00662过表达能激活Wnt/β-catenin通路,诱导巨噬细胞M2极化并增强HGC-27细胞的恶性表型;而使用该通路抑制剂则可逆转上述效应。说明LINC02086可能通过调控Wnt/β-catenin通路介导巨噬细胞M2极化促进胃癌细胞增殖和转移。

综上所述,LINC02086过表达可促使巨噬细胞向M2型分化,并进一步促进胃癌HGC-27细胞的增殖、迁移和侵袭,其机制可能与激活Wnt/β-catenin通路有关,本研究为LINC02086作为胃癌诊疗靶点提供了依据。但研究中还存在一定局限性,例如,沉默LINC02086是否可抑制胃癌细胞的增殖及转移,

该过程中是否还涉及其他机制,都还需进行进一步探索。

参考文献

- [1] Yang W J, Zhao H P, Yu Y, et al. Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29(16): 2452-68. doi: 10.3748/wjg.v29. i16. 2452.
- [2] Li J, Sun J, Zeng Z, et al. Tumour-associated macrophages in gastric cancer: from function and mechanism to application [J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13 (8) : e1386. doi: 10.1002/ctm2. 1386.
- [3] Deng C, Huo M, Chu H, et al. Exosome circATP8A1 induces macrophage M2 polarization by regulating the miR-1-3p/STAT6 axis to promote gastric cancer progression [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 49. doi: 10.1186/s12943-024-01966-4.
- [4] Xu Z, Chen Y, Ma L, et al. Role of exosomal non-coding RNAs from tumor cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(10): 3133-54. doi: 10.1016/j.ymthe. 2022. 01. 046.
- [5] Zhang C, Wei S, Dai S, et al. The NR_109/FUBP1/c-Myc axis regulates TAM polarization and remodels the tumor microenvironment to promote cancer development [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(5): e006230. doi: 10.1136/jitc-2022-006230.
- [6] Xin L, Zhou L Q, Liu C, et al. Transfer of LncRNA CRNDE in TAM-derived exosomes is linked with cisplatin resistance in gastric cancer [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(12) : e52124. doi: 10.1525/embr. 202052124.
- [7] Xiong Y, Kong X, Tu S, et al. LINC02086 inhibits ferroptosis and promotes malignant phenotypes of pancreatic cancer *via* miR-342-3p/CA9 axis [J]. *Funct Integr Genomics*, 2024, 24(2) : 49. doi: 10.1007/s10142-024-01329-8.
- [8] Chen Y, Gao X, Dai X, et al. Integrated bioinformatics and experimental analysis of long noncoding RNA associated-CeRNA as prognostic biomarkers in advanced stomach adenocarcinoma [J]. *J Cancer*, 2024, 15 (6) : 1536-50. doi: 10.7150/jea. 89526.
- [9] Ackermann K, Bonaterra G A, Kinscherf R, et al. Growth differentiation factor-15 regulates oxLDL-induced lipid homeostasis and autophagy in human macrophages [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 281: 128-36. doi: 10.1016/j. atherosclerosis. 2018. 12. 009.
- [10] 代 謂, 靳 鑫, 雷优扬, 等. 过表达miR-382的肿瘤相关巨噬细胞对三阴性乳腺癌生物学特性的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(15): 1375-82.
- [10] Dai M, Jin X, Lei Y Y, et al. Effect of miR-382 overexpressing tumor-associated macrophages on biological properties of triple-negative breast cancer 4T1 cells [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2018, 40(15): 1375-82.
- [11] Li H, Zhao J, Sun J, et al. Demethylation of the *SFRP4* promoter drives gastric cancer progression *via* the Wnt pathway [J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(9) : 1454-64. doi: 10.1158/1541-7786. MCR-20-0933.
- [12] Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 221: 107753. doi: 10.1016/j.pharmthera. 2020. 107753.
- [13] Wang Y, Zhang J, Shi H, et al. M2 tumor-associated macrophages-derived exosomal MALAT1 promotes glycolysis and gastric cancer progression [J]. *Adv Sci (Weinh)* , 2024, 11 (24): e2309298. doi: 10.1002/advs. 202309298.
- [14] Gao J, Liang Y, Wang L. Shaping polarization of tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 888713. doi: 10.3389/fimmu. 2022. 888713.
- [15] 吴婧婧, 黄 瑞, 彭 瑶, 等. SPP1/PD-L1的表达与M2巨噬细胞在肝细胞癌中的关系及对预后的影响研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(6): 970-5.
- [15] Wu J J, Huang Q, Peng Y, et al. The correlation of the expression of SPP1, PD-L1 and M2-polarizedmacrophages in hepatocellular carcinoma and their influence on prognosis [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(6): 970-5.
- [16] 钟裕昌, 阮笃激, 戴 霖, 等. 过表达M2型肿瘤相关巨噬细胞TIA1基因通过调控PI3K/AKT信号通路抑制胃癌细胞侵袭和迁移 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(8): 1658-64.
- [16] Zhong Y C, Ruan D J, Dai L, et al. Overexpression of TIA1 gene in M2-type tumor-associated macrophages inhibited invasion and migration of gastric cancer cells by regulating the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Chin J Immunol*, 2024, 40(8): 1658-64.
- [17] Han X, ShiF, GuoS, et al. LINC02086 promotes cell viability and inhibits cell apoptosis in breast cancer by sponging miR-6757-5p and up-regulating EPHA2 [J]. *World J Surg Oncol*, 2023, 21 (1): 371. doi: 10.1186/s12957-023-03245-w.
- [18] Gu X, Li X, Zhang X, et al. Noncoding RNA-mediated high expression of PFKFB3 correlates with poor prognosis and tumor immune infiltration of lung adenocarcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2023, 16: 767-83. doi: 10.2147/OTT. S416155.
- [19] Mohapatra S, Pioppini C, Ozpolat B, et al. Non-coding RNAs regulation of macrophage polarization in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 24. doi: 10.1186/s12943-021-01313-x.
- [20] 张延平, 庄昆彬, 江 琴, 等. 珠子草素调控GSK3β/β-catenin通路对结肠癌大鼠肿瘤生长和免疫功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(8) : 2009-13. doi: 10.3969/j. issn. 1005-9202. 2024. 08. 054.
- [20] Zhang Y P, Zhuang K B, Jiang Q, et al. Effects of callicarin regulating GSK3β/β-catenin pathway on tumor growth and immune function in colon cancer rats [J]. *Chin J Gerontol*, 2024, 44(8): 2009-13. doi: 10.3969/j. issn. 1005-9202. 2024. 08. 054.
- [21] Wang L, Zhang L, Zhao L, et al. VEGFA/NRP-1/GAPVD1 axis promotes progression and cancer stemness of triple-negative breast cancer by enhancing tumor cell-macrophage crosstalk [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(2): 446-63. doi: 10.7150/ijbs. 86085.
- [22] Tsukanov V V, Tonkikh J L, Kasparov E V, et al. Inhibition of M2 tumor-associated macrophages polarization by modulating the Wnt/β-catenin pathway as a possible liver cancer therapy method [J]. *World J Gastroenterol*, 2024, 30 (40) : 4399-403. doi: 10.3748/wjg. v30. i40. 4399.

[23] Wang J, Shen D, Li S, et al. LINC00665 activating Wnt3a/β-catenin signaling by bond with YBX1 promotes gastric cancer

proliferation and metastasis [J]. *Cancer Gene Ther*, 2023, 30(11): 1530-42. doi: 10.1038/s41417-023-00657-4.

Effects of *LINC02086* on proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by regulating Wnt/β-catenin pathway mediated M2 polarization of macrophages

Li Jun¹, Bu Yafei², Chen Jie², Ding Bo¹, Wang Lei¹

(¹Department of Gastrointestinal Surgery, ²Department of Emergency, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

Abstract **Objective** To investigate the effect and mechanism of long intergenic non-coding RNA02086 (*LINC02086*) overexpression mediated macrophage polarization on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells. **Methods** The expression levels of *LINC02086* in the human gastric epithelial cell line GES-1 and human gastric cancer cell lines HCG-27, NCI-N87, and AGS were determined by qRT-PCR. Human acute monocytic leukemia cells (THP-1) were induced to differentiate into M0 macrophages using phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). HGC-27 cells were infected with either *LINC02086* overexpression lentivirus (OE-*LINC02086*) or its negative control lentivirus (Vector), and the culture supernatants were collected as conditioned medium (CM1). M0 macrophages were co-cultured with the infected HGC-27 cells, and the resulting supernatants were designated as conditioned medium 2 (CM2). M0 macrophages were treated with CM1 alone or in combination with Wnt/β-catenin pathway inhibitor IWR-1, forming the Vector+CM1, OE-*LINC02086*+CM1, and OE-*LINC02086*+CM1+IWR-1 groups, respectively. Flow cytometry was used to detect mannose receptor C-type 1 (CD206) expression, and qRT-PCR was employed to measure mRNA levels of interleukin-10 (*IL-10*), transforming growth factor-β (*TGF-β*), vascular endothelial growth factor (*VEGF*), and chemokine ligand 22 (*CCL22*). Western blot was performed to evaluate protein expression of CD206, VEGF, and key components of the Wnt/β-catenin pathway—Wnt family member 3a (Wnt3a), glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β), and β-catenin. HGC-27 cells were treated with CM2 alone or combined with IWR-1, establishing the Vector+CM2, OE-*LINC02086*+CM2, and OE-*LINC02086*+CM2+IWR-1 groups. CCK-8 assay was used to evaluate cell proliferation, and Transwell assays were conducted to assess migration and invasion capabilities. **Results** Compared with GES-1 cells, the expression levels of *LINC02086* were upregulated in HCG-27, NCI-N87, and AGS cells ($P < 0.05$), with the smallest increase observed in HCG-27 cells. Compared with Vector+CM1 group, the level of CD206 and the expression levels of *IL-10*, *TGF-β*, *VEGF* and *CCL22* mRNA in macrophages stimulated by OE-*LINC02086*+CM1 increased ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression levels of Wnt3a and β-catenin proteins in cells increased ($P < 0.05$), and the expression level of GSK-3β protein decreased ($P < 0.05$). However, co-treatment with IWR-1 markedly reversed the promoting effects of *LINC02086* overexpression on the expression of M2 polarization markers, including CD206, *IL-10*, and *TGF-β* mRNA, in macrophages ($P < 0.05$), as well as its activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway ($P < 0.05$). Compared with Vector+CM2 group, HGC-27 cells infected with OE-*LINC02086*+CM2 had increased proliferation activity and increased number of migration and invasion cells ($P < 0.05$). However, the combined intervention of IWR-1 significantly reversed the promotion of *LINC02086* overexpression on the proliferation, migration and invasion of HGC-27 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** *LINC02086* overexpression promotes the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by activating Wnt/β-catenin pathway to mediate M2 polarization of macrophages.

Key words long intergenic non-coding RNA02086; overexpression; gastric cancer; macrophages; polarization; proliferation; Wnt/β-catenin pathway

Fund program Natural Science Foundation of Ningxia (No. 2024AAC03688)

Corresponding author Wang Lei, E-mail: wanglei1182@sina.com