

地西他滨及沉默 *DNMT1* 对骨肉瘤 MG-63 细胞中 *LINC00472* 表达及甲基化的影响



邹 琼¹, 杨琰茗¹, 任丹阳¹, 涂彩霞¹, 沈建玲¹, 高丽辉², 李发双¹, 张力麟¹, 李惠英^{1, 2}

1. 昆明市儿童医院药剂科 (昆明 650228)

2. 昆明医科大学医工交叉研究院 (昆明 650500)

【摘要】目的 初步探究在骨肉瘤 MG-63 细胞中长链非编码 RNA00472 (*LINC00472*) 的表达及甲基化是否受地西他滨 (DAC) 和 *DNMT1* 的调控。**方法** 去甲基化诱导剂 DAC 终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 作用 MG-63 细胞 48 h, 利用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测 DAC 对 MG-63 细胞中 *LINC00472* mRNA 表达水平的影响, 甲基化特异性 PCR (MSP) 和亚硫酸氢盐测序 PCR (BSP) 检测 DAC 对 *LINC00472* 启动子区域 CpG 岛甲基化水平的影响; 利用慢病毒沉默 MG-63 细胞中 *DNMT1* 基因后, 通过 CCK-8 实验、平板克隆形成实验、划痕实验、Transwell 迁移及侵袭实验检测 *DNMT1* 对 MG-63 细胞功能的影响, 利用 RT-qPCR 检测 *DNMT1* 对 MG-63 细胞中 *LINC00472* mRNA 表达水平的影响, MSP 和 BSP 检测 *DNMT1* 对 MG-63 细胞 *LINC00472* 启动子区域 CpG 岛甲基化水平的影响。**结果** RT-qPCR 结果表明 DAC 能诱导 *LINC00472* 过表达, 甲基化结果表明 MG-63 细胞中 *LINC00472* 启动子区域 CpG 岛处于极低甲基化水平 (1.4%), 且 DAC 能使 *LINC00472* 启动子 CpG 岛从极低甲基化 (1.4%) 降至完全非甲基化 (0%)。沉默 *DNMT1* 后, MG-63 细胞的增殖、克隆、迁移、侵袭能力被抑制; *LINC00472* mRNA 表达水平轻微升高; *LINC00472* 启动子区域 CpG 岛甲基化水平下降 (1.4% $\rightarrow$ 0.7%)。**结论** 在 MG-63 细胞中 *LINC00472* 启动子区域呈极低甲基化; DAC 可诱导其表达上调并完全去甲基化, 说明甲基化可能参与调控, 但并非主要途径; 沉默 *DNMT1* 可抑制细胞生长, 但对 *LINC00472* 无明显影响, 可能与其固有低甲基化有关。

【关键词】 *LINC00472*; 地西他滨; *DNMT1*; 甲基化; 骨肉瘤 MG-63 细胞

【中图分类号】 R738.1

【文献标识码】 A

Effects of decitabine and *DNMT1* silencing on the expression and methylation of *LINC00472* in osteosarcoma MG-63 cells

ZOU Qiong¹, YANG Yanming¹, REN Danyang¹, TU Caixia¹, SHEN Jianling¹, GAO Lihui², LI Fashuang¹, ZHANG Lilin¹, LI Huiying^{1,2}

1. Department of Pharmacy, Kunming Children's Hospital, Kunming 650228, China

2. Institute of Medical Engineering Interdisciplinary Research, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

Corresponding author: LI Huiying, Email: chongch_9@126.com

【Abstract】Objective To preliminarily investigate whether the expression and methylation

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202601053

基金项目: 云南省科技厅科技计划项目 (202301AY070001-280)

通信作者: 李惠英, 博士, 主任药师, 硕士研究生导师, Email: chongch_9@126.com

of long non-coding RNA *LINC00472* in osteosarcoma MG-63 cells are regulated by decitabine (DAC) and *DNMT1*. **Methods** MG-63 cells were treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ DAC, a demethylation inducer, for 48 h. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the effect of DAC on *LINC00472* mRNA expression level; methylation-specific PCR (MSP) and bisulfite sequencing PCR (BSP) were used to detect changes in CpG island methylation in the *LINC00472* promoter region. After lentivirus-mediated silencing of *DNMT1* in MG-63 cells, the effects on cell function were assessed by CCK-8 assay, colony formation assay, wound-healing assay, and Transwell migration and invasion assays. RT-qPCR was used to assess the effect of *DNMT1* on the expression levels of *LINC00472* mRNA in MG-63 cells, MSP and BSP were used to assess the effect of *DNMT1* on the methylation levels of CpG islands in the *LINC00472* promoter region of MG-63 cells. **Results** RT-qPCR showed that DAC induced *LINC00472* overexpression. Methylation analysis revealed that the CpG islands in the *LINC00472* promoter region were at an extremely low methylation level (1.4%) in MG-63 cells, and DAC reduced this methylation from 1.4% to complete non-methylation (0%). After *DNMT1* silencing, the cell proliferation, colony formation, migration, and invasion of MG-63 were inhibited, the *LINC00472* mRNA expression slight increased, and CpG island methylation in the *LINC00472* promoter region decreased (from 1.4% to 0.7%). **Conclusion** In MG-63 cells, the *LINC00472* promoter region exhibits extremely low methylation. DAC can upregulate its expression and induce complete demethylation, suggesting that methylation may be involved in its regulation. but not as the primary pathway. *DNMT1* silencing inhibits cell growth but has no significant effect on *LINC00472*, possibly due to its inherently low methylation status.

【Keywords】 *LINC00472*; Decitabine; *DNMT1*; Methylation; Osteosarcoma MG-63 cells

骨肉瘤是儿童和青少年中最常见的原发性恶性骨肿瘤^[1-2]。尽管治疗手段不断进步,其预后仍不理想,亟须探索新的分子靶点和表观遗传调控机制。长链非编码RNA00472 (long non-coding RNA 00472, *LINC0072*) 为 lncRNAs 的成员之一,定位于人类染色体6q13,这些RNA未被翻译成蛋白质,但参与蛋白质翻译过程中的调控^[3]。近年来的研究发现,*LINC00472*在多种肿瘤中发挥抑癌作用,且其表达可受DNA甲基化调控^[4-5]。DNA甲基化是由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMTs, 如 *DNMT1*、*DNMT3A/B*)催化的重要表观遗传修饰,*DNMT1*负责维持位于CG二核苷酸丰富区域的甲基化模式。*DNMT1*的异常表达抑制了肿瘤抑制因子,减少了正常的阻滞信号,导致肿瘤细胞的生长失控^[6]。此前也有研究证明,*DNMT1*活性在肝细胞癌细胞的恶性进展中起积极作用^[7]。在骨肉瘤中,*DNMT1*的高表达与化疗耐药性相关,沉默*DNMT1*可增强细胞对药物的敏感性^[8]。地西他滨(decitabine, DAC)是一种胞嘧啶类似物,可通过诱导去甲基化恢复抑癌基因表达^[9]。

本课题组前期发现,DAC处理可抑制MG-63细胞的生长并改变其表型,同时伴*LINC00472*表达上调,提示DAC的抗肿瘤作用可能部分通过上调该基因实现,即该基因表达可能受DNA甲基化调控^[10]。然而,DAC及*DNMT1*对骨肉瘤中*LINC00472*的调控作用尚不明确。为此,本研究拟探讨MG-63细胞中*LINC00472*表达与甲基化的关系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

5415R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司); THZ-032型恒温摇床(上海博迅仪器有限公司); QuantStudio 6 Flex型实时荧光定量仪(美国Applied Biosystems公司); Synergy2型全波长紫外-可见光酶标仪(美国BioTek公司); CKX-A32PH型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司); DMi8型倒置荧光显微镜(德国徕卡公司); DYCZ-TRANS2型电泳仪(北京六一生物科技有限公司); KZ-III-F型高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物公司); NanoDrop2000型超微量分光光度计(美国Thermo公司)。

1.2 主要药品与试剂

DAC (批号: BM001565, 纯度 $\geq 99.17\%$) 和 CCK-8 试剂盒 (批号: 20010784) 购自 Proteintech 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号: GP2410003)、DMEM 高糖培养基 (批号: GA2410015)、青霉素混合液 (批号: GA2409003)、特级胎牛血清 (批号: SO20220216)、RIPA 裂解液 (批号: CR2404066)、结晶紫染色液 (批号: CR2410094)、通用型 DNA 纯化回收试剂盒 (批号: MPC2505023)、SerRed 核酸染料 (10 000 $\times$, 水溶, 批号: MPC2403070) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 嘌呤霉素 (上海吉玛生物公司, 批号: 20241119); RNA 提取试剂盒 (批号: T1250218) 和逆转录试剂盒批号 (批号: T1250314-V3) 购自全式金生物公司; 实时荧光定量聚合酶链反应试剂盒 (启衡星生物公司, 批号: 32586497); 慢病毒 *DNMT1*-Homo-1135 (批号: 20241113) 和空白对照载体病毒 (批号: 20241111) 均由上海吉玛生物公司设计, 包括慢病毒克隆的制备、病毒包装与质量检测等。

1.3 细胞

人成骨肉瘤 MG-63 细胞 (广州赛库生物技术有限公司, 批号: 2024080103)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养

将 MG-63 细胞培养于 DMEM 高糖培养基中 (含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素), 待细胞密度达 80% 以上时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 进行后续传代、冻存等实验。

1.4.2 慢病毒介导的 MG-63 细胞 *DNMT1* 基因沉默

取对数生长期、状态良好、细胞融合率约 85% 的 MG-63 细胞, 以 5×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板中, 每孔加液 500 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中贴壁 24 h。设置空白对照组 (标记为 Control 组) 和沉默组 (标记为 sh-*DNMT1* 组), 分别加入上海吉玛基因公司定制的空白对照慢病毒及靶向沉默 *DNMT1* 基因的慢病毒, 以感染复数为 40 进行感染, 同时加入终浓度为 5 μ g/mL 的 Polybrene 以提高感染效率。感染 24 h 后弃去含病毒培养基, 用 PBS 轻轻洗涤细胞, 更换为完全培养基继续培养。感染 72 h 后于荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况, 评估感染效率。当荧光

率大于 80% 时, 向培养液中加入终浓度为 1 μ g/mL 的嘌呤霉素, 筛选感染成功的细胞, 筛选周期约 14 d, 期间正常换液培养。待细胞荧光率达 95% 以上时, 收集细胞并裂解提取 RNA, 用于后续检测。

1.4.3 RNA 提取及 RT-qPCR 检测

收集 sh-*DNMT1* 组、Control 组及未经处理的正常 MG-63 细胞样本。其中, sh-*DNMT1* 组与 Control 组细胞接种于 6 孔板中培养 48 h 后收样; 正常 MG-63 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞融合率达 80% 时, 加入终浓度为 5 μ mol/L 的 DAC 处理 48 h 后收集样本, 其中, 经 DAC 处理的细胞标记为 DAC 组, 未经 DAC 处理的正常 MG-63 细胞标记为 NC 组。采用 Trizol 法提取各组细胞总 RNA, 具体操作按 PCR 检测试剂盒说明书进行。以 *GAPDH* 为内参, 每个反应设 3 个复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量。所用引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1. Primer sequences for RT-qPCR

基因	引物序列
<i>GAPDH</i>	正向: 5'-GTCAAGGCTGAGAACGGGAA-3' 反向: 5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTC-3'
<i>LIN00472</i>	正向: 5'-GATGGCAGCTGTCTCTCTCC-3' 反向: 5'-GGGCTCTCTGACCGTATCT-3'
<i>DNMT1</i>	正向: 5'-AGAACGGTGCTCATGCTTACA 反向: 5'-CTCTACGGGCTTCACTTCTTG

1.4.4 CCK8 实验检测细胞增殖活性

取慢病毒介导的 sh-*DNMT1* 组及 Control 组 MG-63 细胞, 常规消化后制备单细胞悬液, 计数后以 8×10^3 个/孔的密度、100 μ L/孔的体积接种于 96 孔板中, 每组设 3 个复孔, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养。分别培养 24、48、72 h 后取出 96 孔板, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续孵育 2 h, 采用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔光密度 (OD) 值。

1.4.5 平板克隆形成实验

取慢病毒介导的 sh-*DNMT1* 组及 Control 组 MG-63 细胞, 常规消化后制备单细胞悬液, 计数后以 500 个/孔的数量、2 mL/孔的体积接种于 6 孔板中, 每组设 3 个复孔, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养, 每 3 d 换 1 次培养液, 持续培养至肉眼可见克隆形成时, 吸弃旧培养基, PBS 洗涤后, 每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 30~60 min; PBS 洗涤后弃尽液体, 每孔加入 1 mL 0.1% 结晶紫染液

染色 20 min。吸弃染液，PBS 洗涤，细胞风干后拍照记录。将 6 孔板倒置于白色背景板上，用手机拍照，利用 ImageJ 进行克隆计数。

1.4.6 细胞划痕实验

取慢病毒介导的 sh-DNMT1 组及 Control 组 MG-63 细胞，常规消化后制备单细胞悬液，计数后以 1×10^6 个/mL、2 mL/孔的体积接种于 6 孔板中，每组设 3 个复孔，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。当细胞生长至 100 % 融合后，用 100 μ L 枪头垂直于板底，沿直尺在各孔底部均匀划痕，尽量保证各组划痕面积大小一致。划痕后弃去旧培养基，用 PBS 轻轻洗涤细胞以去除划痕脱落的细胞，每孔加入 2 mL 基础培养基，立即于倒置荧光显微镜下拍照记录，记为 0 h 划痕面积。将 6 孔板放回培养箱继续培养 24 h 后，于相同位置再次拍照记录（取样前在板底做好标记，确保前后拍照部位一致）。采用 ImageJ 软件测量各视野划痕面积，按以下公式计算细胞迁移愈合率，愈合率越高，表明细胞迁移能力越强。

愈合率 (%) = (1 - 24 h 划痕面积 / 0 h 划痕面积) $\times$ 100%

1.4.7 Transwell 迁移实验

取对数生长期、状态良好、细胞融合率约为 85% 的 sh-DNMT1 组及 Control 组 MG-63 细胞，用无血清的 DMEM 高糖培养基分别调整细胞密度为 1×10^5 /mL。取 200 μ L 细胞悬液加入 Transwell 上室中，下室加入 500 μ L 含 20% 的完全培养基，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。培养结束后，取出上室，吸弃培养基，用 PBS 轻轻清洗 1~2 次；将上室置于含 600 μ L 4% 多聚甲醛的孔中，室温固定 30 min；取出后转移至含 600 μ L 0.1% 结晶紫染液的孔中，室温染色 20 min；随后用 PBS 轻轻漂洗 2 次，以去除未结合的染液。将小室自然晾干后，置于载玻片上，于倒置显微镜下观察，每个上室随机选取 3 个视野拍照记录。

1.4.8 Transwell 侵袭实验

提前将枪头、离心管、Transwell 小室置于冰箱预冷。将 Matrigel 胶从 -20 °C 取出，置于 -4 °C 冰箱中过夜，按照试剂盒说明书以 1 : 8 比例用无血清培养基稀释。取 60 μ L 稀释后的 Matrigel 胶均匀铺于 Transwell 上室底部，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 3 h，吸弃多余液体，每孔加入 100 μ L 无血清培养基，于培养箱中水化 30 min。

取出小室，吸弃多余液体，检查是否有液体穿过小室至下层，确认无穿液后即可接种细胞。后续细胞悬液制备、接种、培养、固定、染色及拍照计数等操作同“1.4.7”项。

1.4.9 甲基化 PCR 检测 MG-63 细胞 LINC00472 启动子区域 CpG 岛甲基化状态

各组细胞样本收集同“1.4.3”项下，将各组细胞沉淀提取 DNA。取上述基因组 DNA 经亚硫酸氢盐转化处理，使未甲基化的胞嘧啶 (C) 脱氨基转化为尿嘧啶 (U)，而甲基化的胞嘧啶保持不变。使用纯化柱回收修饰后的 DNA。设计甲基化特异性引物 (M 引物) 和非甲基化特异性引物 (U 引物)，分别对目标区域进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，根据 M 条带和 (或) U 条带的有无判断 LINC00472 启动子区 CpG 岛的甲基化状态：仅出现 M 条带提示甲基化，仅出现 U 条带提示非甲基化，M 和 U 条带均出现则提示部分甲基化。

1.4.10 亚硫酸氢盐测序 PCR 检测 MG-63 细胞 LINC00472 启动子区域 CpG 岛甲基化水平

将“1.4.9”项下经亚硫酸氢盐处理过的 DNA 样本进一步通过亚硫酸氢盐测序 PCR (bisulfite sequencing PCR, BSP) 实验检测 LINC00472 甲基化水平。PCR 扩增：设计覆盖目标区域的 BSP 引物 (引物序列中需避开 CpG 位点)，以亚硫酸氢盐转化后的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。克隆测序：将 PCR 产物克隆至载体，挑取多个单克隆测序 (反映单个 DNA 分子的甲基化状态)。对 PCR 产物直接进行测序，比对测序结果与参考序列，统计每个 CpG 位点的 C (甲基化) 或 T (未甲基化) 信号，计算甲基化比例。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较时，若数据符合正态分布且方差齐，采用两独立样本 *t* 检验；若不符合正态分布，则采用非参数秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒介导的 DNMT1 基因沉默 MG-63 细胞株的构建及验证

采用嘌呤霉素 (1 μ g/mL) 筛选 14 d，期间及

时去除死亡细胞。筛选结束后, 荧光显微镜下可见 95% 以上细胞呈现绿色荧光 (图 1-A)。同时收集细胞, 通过 RT-qPCR 检测 *DNMT1* mRNA 表达水平, 结果 (图 1-B) 显示, sh-DNMT1 组 *DNMT1* mRNA 表达水平较 Control 组显著降低约 50% ($P < 0.01$), 表明 *DNMT1* 基因被成功沉默, 可用于后续实验。

此外, RT-qPCR 结果显示, DAC 组 *LINC00472* 表达水平较 NC 组显著上调 (图 1-C) ($P < 0.01$), 而 sh-DNMT1 组 *LINC00472* 表达水平与 Control 组相比差异无统计学意义 (图 1-D) ($P > 0.05$), 提示沉默 *DNMT1* 对 *LINC00472* 的表

达无明显影响。

2.2 CCK-8 法检测沉默 DNMT1 对 MG-63 细胞增殖活性的影响

采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性, OD 值反映活细胞数量。与 Control 组相比, sh-DNMT1 组在 48 h 和 72 h 细胞 OD 值显著降低 ($P < 0.05$)。具体见图 2。

2.3 沉默 DNMT1 后对骨肉瘤 MG-63 细胞克隆能力的影响

平板克隆形成实验结果显示, 与 Control 组相比, sh-DNMT1 组的克隆形成数量显著减少 ($P < 0.01$)。具体见图 3。

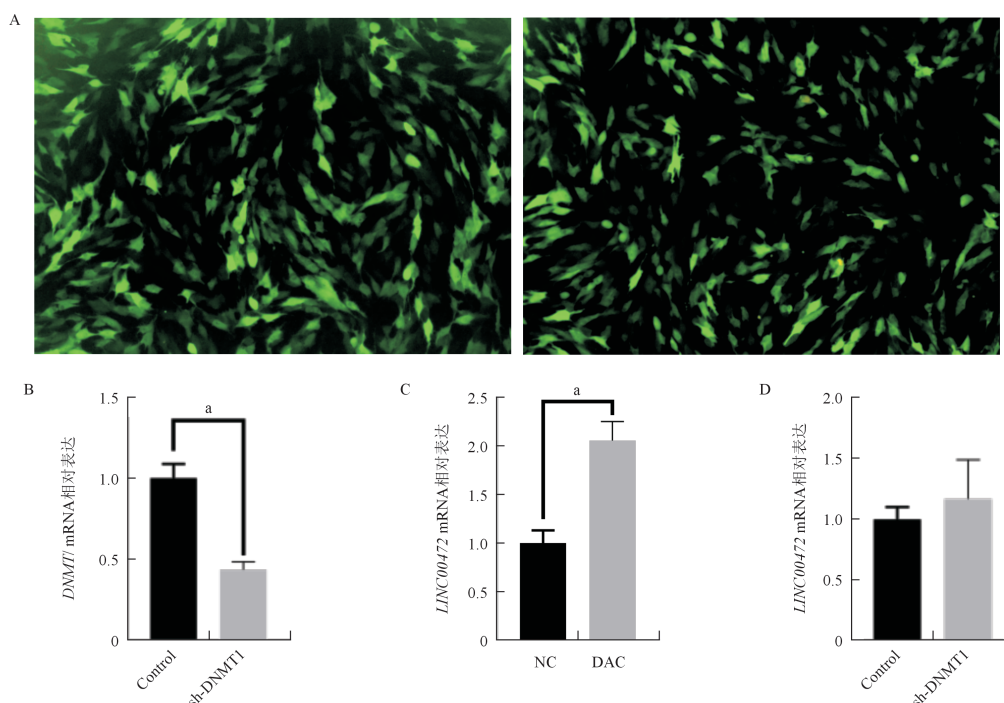


图 1 荧光图片和 RT-qPCR 结果 ($n = 3$)

Figure 1. Fluorescence images and RT-qPCR results ($n=3$)

注: A. 嘌呤霉素筛选 14 d 后 Control 组和 sh-DNMT1 组细胞的荧光表达 (10 $\times$); B. Control 组和 sh-DNMT1 组细胞中 *DNMT1* mRNA 表达水平; C. NC 组和 DAC 组细胞中 *LINC00472* mRNA 表达水平; D. Control 组和 sh-DNMT1 组细胞中 *LINC00472* mRNA 表达水平; ^a $P < 0.01$ 。

2.4 沉默 DNMT1 后对骨肉瘤 MG-63 细胞平面迁移能力的影响

划痕实验结果显示, 与 Control 组相比, sh-DNMT1 组的迁移率有所下降, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。具体见图 4。

2.5 沉默 DNMT1 后对骨肉瘤 MG-63 细胞的迁移能力的影响

Transwell 迁移实验结果显示, 与 Control 组相比, sh-DNMT1 组迁移到下室的细胞数量显著减少 ($P < 0.05$)。具体见图 5。

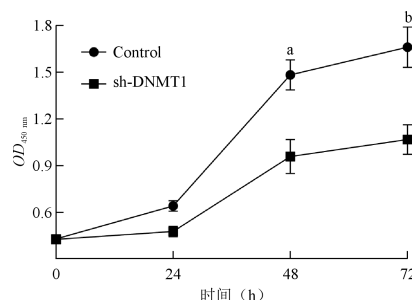


图 2 沉默 DNMT1 后 MG-63 细胞 OD 值 ($n = 5$)

Figure 2. The OD value of MG-63 cells after *DNMT1* silencing ($n=5$)

注: 与 sh-DNMT1 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

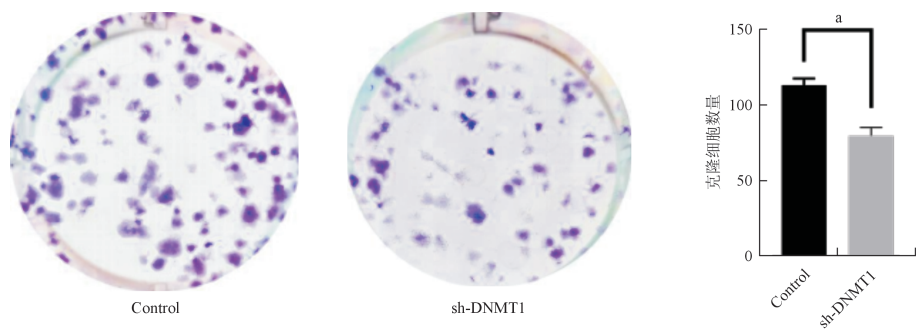


图3 沉默 *DNMT1* 后 MG-63 细胞的克隆能力 (4×, *n* = 3)

Figure 3. Clonogenic ability of MG-63 cells after *DNMT1* silencing (4×, *n*=3)

注: ^a*P* < 0.01。

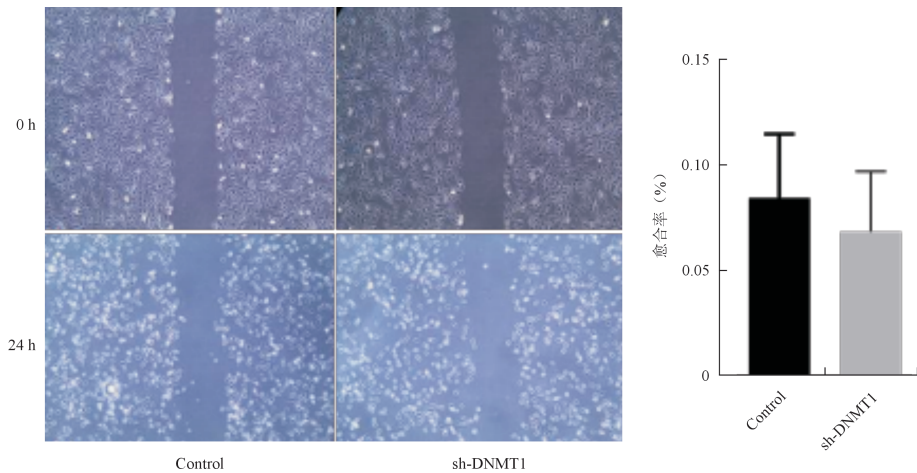


图4 沉默 *DNMT1* 后 MG-63 细胞的平面迁移能力 (4×, *n* = 3)

Figure 4. Migration ability of MG-63 cells after *DNMT1* silencing (4×, *n*=3)

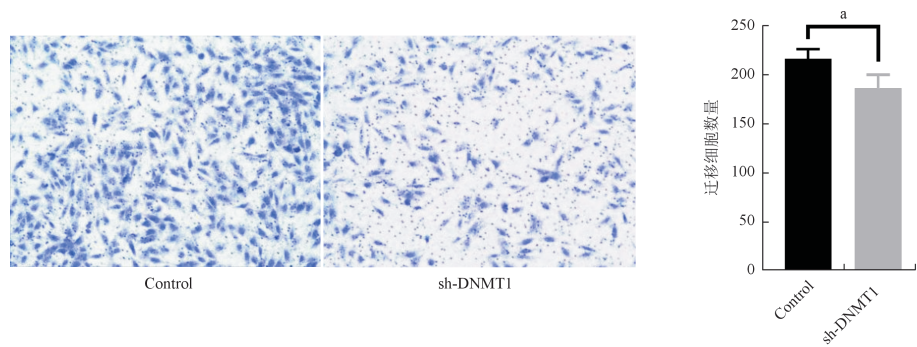


图5 沉默 *DNMT1* 后 MG-63 细胞的迁移能力 (10×, *n* = 3)

Figure 5. Migration ability of MG-63 cells after *DNMT1* silencing (10×, *n*=3)

注: ^a*P* < 0.05。

2.6 沉默 *DNMT1* 后对骨肉瘤 MG-63 细胞的侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验结果显示, 与 Control 组相比, sh-*DNMT1* 组侵袭到下室的细胞数量显著减少 (*P* < 0.05)。具体见图6。

2.7 MSP 检测沉默 *DNMT1* 后 MG-63 细胞中 *LINC00472* 甲基化状态

MSP 引物如表2, NC 组、DAC 组、Control

组、sh-*DNMT1* 组均显示发生完全非甲基化。具体见图7。

2.8 BSP 检测沉默 *DNMT1* 后 MG-63 细胞中 *LINC00472* 甲基化水平

BSP 引物序列见表3, *LINC00472* 基因启动子区的 CpG 岛分布如图8所示。BSP 检测结果显示, NC 组、DAC 组、Control 组和 sh-*DNMT1* 组的甲基化水平分别为 1.4%、0、1.4% 和 0.7% (图9-A ~ D)。

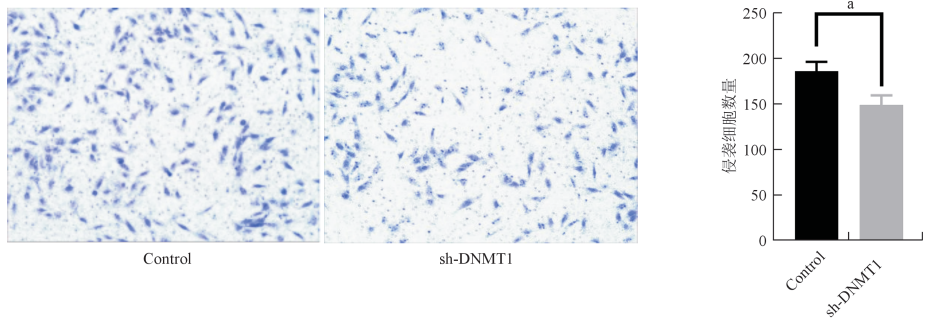


图6 沉默 *DNMT1*后 MG-63细胞的侵袭能力 (10×, *n*=3)
Figure 6. Invasion ability of MG-63 cells after *DNMT1* silencing (10×, *n*=3)

注：^a*P*<0.05。

表2 MSP引物序列
Table 2. Primer sequences for MSP

引物名称	引物序列 (5'-3')	片段长度 (bp)
<i>LINC00472</i> (M)-F	ATTAGGGCGGCTGTGTTGTC	123
<i>LINC00472</i> (M)-R	CAACGCCCTCCAATAATATCG	
<i>LINC00472</i> (U)-F	GGATTAGGTTGGGTGTGTTGTT	128
<i>LINC00472</i> (U)-R	CTCCAACACCCTCCAATAATATCA	

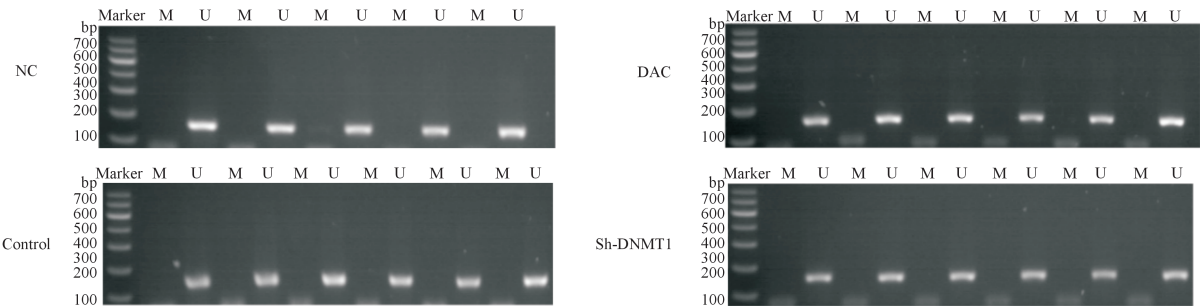


图7 各组 *LINC00472*甲基化状态
Figure 7. Methylation status of *LINC00472* in each group

注：图中仅出现U条带提示完全非甲基化。

表3 BSP引物设计
Table 3. Design of BSP Primers

引物名称	序列 (5'-3')	长度 (bp)	熔融温度 (°C)	GC 含量 (%)	碱基数 (个)	位置
H- <i>linc00472</i> -BSP-正向	TGCTTTGATTTCGGTTTTAGGAT	315	59.9	34.8	23	第1 670~
H- <i>linc00472</i> -BSP-反向	AATTAATAAAAACCCCTTCCTCC		59.2	37.5	24	1 984位

注：GC 含量为鸟嘌呤和胞嘧啶2种碱基所占的百分比。

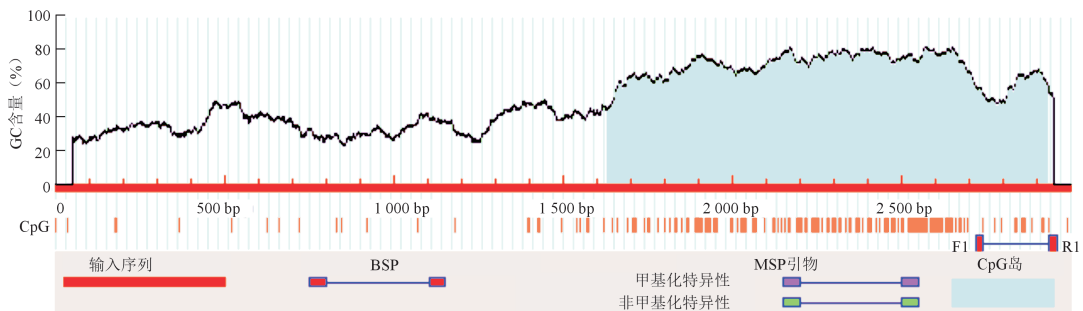


图8 *LINC00472*基因启动子区的CpG岛分布
Figure 8. Distribution of CpG islands in the promoter region of the *LINC00472* gene

注：深色标注区域为 *LINC00472*基因启动子区域CpG岛。

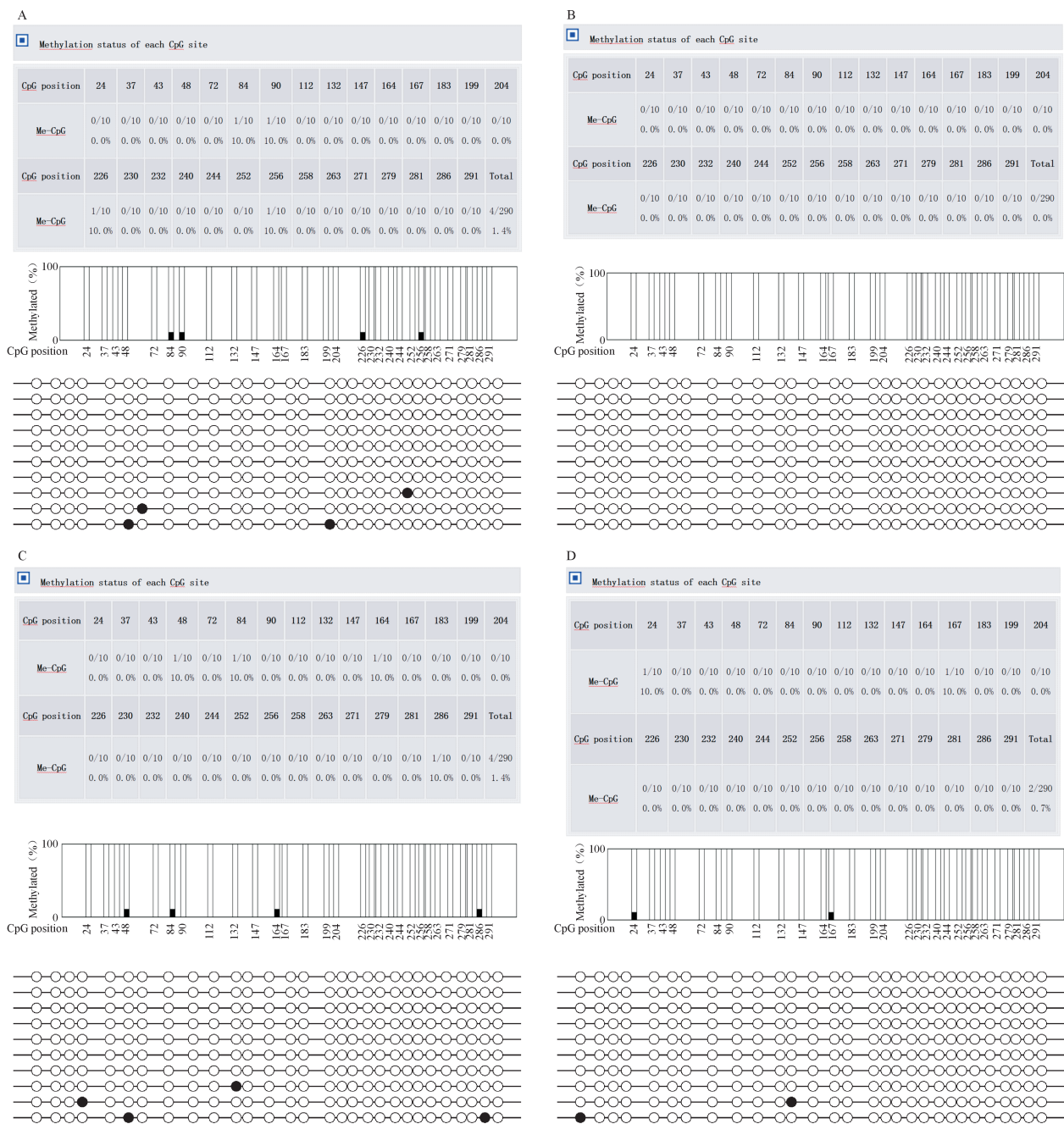


图9 各组 *LINC00472* CpG 位点甲基化状态

Figure 9. Methylation status of *LINC00472* CpG sites across different groups

注：A. NC组；B. DAC组；C. Control组；D. sh-DNMT1组；单个位点甲基化率和总甲基化率；黑色条带为甲基化克隆比例；横轴标记了该基因 29 个 CpG 位点，纵轴为每个 CpG 位点的 10 个克隆。

3 讨论

研究发现，在儿童骨肉瘤中，DNA 甲基化与肿瘤疾病的治疗结果有关，在肿瘤复发的儿童骨肉瘤组织中，发现启动子和非启动子位点都可能发生甲基化^[11]。在乳腺癌中，CpG 岛甲基化与 *LINC00472* 表达呈负相关，即高甲基化、低表达^[5]。同时在胃癌的研究中发现，*LINC00472* 可

通过 DNA 甲基化进行表观遗传调控，且 *LINC00472* 上游的 CpG 区易发生肿瘤特异性的高甲基化^[4]。本研究首先采用 MSP 检测各组 *LINC00472* 启动子区域均发生完全非甲基化，但因 MSP 检测目标仅针对引物设计的 1~2 个特定 CpG 位点，需甲基化水平 $\geq 10\% \sim 20\%$ 才能检出（假阴性风险高）。BSP 测序覆盖目标区域所有 CpG 位点，BSP 可检测低至 5% 的甲基化水平，故

考虑利用BSP进一步验证,结果证明MG-63细胞中*LINC00472*启动子区域甲基化水平为1.7% (低于5%),本研究首次揭示了*LINC00472*在骨肉瘤MG-63细胞中的独特甲基化特征,发现MG-63细胞中*LINC00472*启动子区呈现极低甲基化状态,这一现象提示*LINC00472*的甲基化调控具有显著的肿瘤异质性。DAC是临床常用的甲基化抑制剂,能诱导骨肉瘤细胞miR-23a、miR-129-5p及miR-142分子的高表达^[12-14]。因本课题前期已完成DAC对MG-63细胞功能学相关的实验,故本文的主要目的是初步探究在MG-63细胞中*LINC00472*表达是否受DNA甲基化调控。利用DAC处理MG-63细胞后,发现*LINC00472*过表达且检测区域发生完全非甲基化,证实*LINC00472*可受甲基化调控,但因*LINC00472*启动子区域的甲基化水平极低,DAC对*LINC00472*的调控可能并非主要通过直接去甲基化其启动子区域,而更可能通过其他非甲基化途径间接实现。*DNMT1*下调可抑制食管鳞状细胞癌的增殖、迁移和侵袭^[15]。Wu等^[16]研究也表明,*DNMT1*在喉鳞状细胞癌中也具有重要作用。特别是在骨肉瘤的研究中,*DNMT1*高表达,且为miR-148a的靶点,沉默*DNMT1*增加了骨肉瘤细胞对抗肿瘤药物蟾毒灵的敏感性^[8];而miR-139-5p通过降低*DNMT1*抑制骨肉瘤的进展^[17];同时,*DNMT1*的异常激活导致了miR-34a的启动子甲基化,引起miR-34a的低表达^[18]。由以上研究结果推测,*DNMT1*在骨肉瘤中可能扮演重要的角色,故本研究利用慢病毒沉默MG-63细胞中的*DNMT1*,发现MG-63细胞的增殖、迁移和侵袭能力被抑制,但仅轻微降低*LINC00472*启动子甲基化水平且未显著影响其表达,提示在骨肉瘤MG-63细胞中*LINC00472*表达受*DNMT1*基因的调控很弱。

综上,本研究揭示了*LINC00472*在MG-63细胞中的独特甲基化特征,即*LINC00472*在MG-63细胞中呈极低甲基化水平;发现了DAC处理MG-63细胞可诱导*LINC00472*表达上调并使其启动子完全去甲基化,证实了*LINC00472*可能受甲基化调控,但在骨肉瘤MG-63细胞中不是主要途径;沉默*DNMT1*抑制MG-63细胞生长和功能,但对*LINC00472*的表达或甲基化水平无明显影响,可能与*LINC00472*在MG-63细胞中本身低甲基化有关。本文不足之处在于相关结论仅基于MG-63细

胞,后续研究可拓展至不同骨肉瘤细胞系和动物实验进一步验证和探究,以期更全面阐明骨肉瘤中*LINC00472*表达和甲基化的关系。

参考文献

- 1 Guimaraes GM, Tesser-Gamba F, Petrilli AS, et al. IGFBP5 in osteosarcoma tumorigenesis: gene expression profile among metastatic and non-metastatic patients[J]. Gene, 2025, 934: 149026. DOI: 10.1016/j.gene.2024.149026.
- 2 Espejo VJ, De NS, Trevers K, et al. Ongoing chromothripsis underpins osteosarcoma genome complexity and clonal evolution[J]. Cell, 2025, 188(2): 352-370. DOI: 10.1016/j.cell.2024.12.005.
- 3 Chattopadhyay P, Srinivasa VJ, Pandey R. Noncoding RNAs: modulators and modulatable players during infection-induced stress response[J]. Brief Funct Genomics, 2021, 20(1): 28-41. DOI: 10.1093/bfpg/ela026.
- 4 Kuo W, Chung Y, Chou NH, et al. Aberrant DNA hypermethylation silenced LncRNA expression in gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2019, 39(10):5381-5391. DOI:10.21873/anticancer.13732.
- 5 Wang ZW, Katsaros D, Biglia N, et al. ER α upregulates the expression of long non-coding RNA *LINC00472* which suppresses the phosphorylation of NF- κ B in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2019, 175(2): 353-368. DOI: 10.1007/s10549-018-05108-5.
- 6 Hervouet E, Nadaradjane A, Gueguen M, et al. Kinetics of DNA methylation inheritance by the *DNMT1*-including complexes during the cell cycle[J]. Cell Div, 2012, 7: 5. DOI: 10.1186/1747-1028-7-5.
- 7 Jiang CK, Gong F. DNA methyltransferase 1: a potential gene therapy target for hepatocellular carcinoma?[J]. Oncol Res Treat, 2016, 39(7-8): 448-452. DOI: 10.1159/000447414.
- 8 Chang YW, Zhao YF, Gu W, et al. Bufalin inhibits the differentiation and proliferation of cancer stem cells derived from primary osteosarcoma cells through miR-148a[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(3): 1186-1196. DOI: 10.1159/000430289.
- 9 李元,路玉祥,楚元奎,等.地西他滨通过DNA甲基化调控乳腺癌细胞中miR-1301-3p的表达及机制[J].中国医院药学杂志, 2024, 44(24): 2839-2844. [Li Y, Lu YX, Chu YK, et al. Decitabine regulates the expression and mechanism of miR-1301-3p in breast cancer cells through DNA methylation[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2024, 44(24): 2839-2844.] DOI: 10.13286/j.1001-5213.2024.24.01.
- 10 李惠英,任丹阳,邹琼,等. *LINC00472*通过PI3K/AKT及VEGF信号通路抑制人骨肉瘤MG-63细胞的生长[J].中国药理学通报, 2026, 42(4): 704-712. [Li HY, Ren DY, Zou Q, et al. *LINC00472* inhibits the growth of human osteosarcoma MG-63 cells through the PI3K/AKT and VEGF signaling pathways[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2026, 42(4): 704-712.] DOI: 10.12360/CPB202507033.
- 11 Rosenblum JM, Wijetunga NA, Fazzari MJ, et al. Predictive properties of DNA methylation patterns in primary tumor samples for osteosarcoma relapse status[J]. Epigenetics, 2015, 10(1): 31-39. DOI: 10.4161/15592294.2014.989084.

- 12 Ding mL, Hu JZ, Ni JD, et al. Demethylation of microRNA-142 induced by demethylation agents plays a suppressive role in osteosarcoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(5): 2261–2267. DOI: [10.3892/ol.2015.3036](https://doi.org/10.3892/ol.2015.3036).
- 13 Long XH, Zhou YF, Peng AF, et al. Demethylation-mediated miR-129-5p up-regulation inhibits malignant phenotype of osteogenic osteosarcoma by targeting Homo sapiens valosin-containing protein (VCP) [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(5): 3799–3806. DOI: [10.1007/s13277-014-3021-7](https://doi.org/10.1007/s13277-014-3021-7).
- 14 Wang GB, Li Bin, Fu YH, et al. miR-23a suppresses proliferation of osteosarcoma cells by targeting SATB1[J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(6): 4715–4521. DOI: [10.1007/s13277-015-3120-0](https://doi.org/10.1007/s13277-015-3120-0).
- 15 Bai J, Zhang X, Hu K, et al. Silencing DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*) inhibits proliferation, metastasis and invasion in ESCC by suppressing methylation of RASSF1A and DAPK[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44129–44141. DOI: [10.18632/oncotarget.9866](https://doi.org/10.18632/oncotarget.9866).
- 16 Wu TY, Q LM, He GQ, et al. Regulation of laryngeal squamous cell cancer progression by the lncRNA H19/miR-148a-3p/*DNMT1* axis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11553–11566. DOI: [10.18632/oncotarget.7270](https://doi.org/10.18632/oncotarget.7270).
- 17 Shi YK, Guo YH. MiR-139-5p suppresses osteosarcoma cell growth and invasion through regulating *DNMT1* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2): 459–466. DOI: [10.1016/j.bbrc.2018.04.124](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.124).
- 18 Liang X, Xu C, Wang W, et al. The *DNMT1*/miR-34a axis is involved in the stemness of human osteosarcoma cells and derived stem-like cells[J]. *Stem Cells International*, 2019, 2019: 7028901. DOI: [10.1155/2019/7028901](https://doi.org/10.1155/2019/7028901).

收稿日期: 2026 年 01 月 19 日 修回日期: 2026 年 05 月 14 日
本文编辑: 钟巧妮 洗静怡