

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.010

· 基础研究 ·

## lncRNA LUCAT1 通过靶向调控 miR-199a-5p/HIF-1 $\alpha$ 促进肾透明细胞癌 786-O 细胞的增殖和迁移

林其玲<sup>a</sup>, 陈畅<sup>b</sup> (宜昌市第一人民医院·三峡大学人民医院 a. 肾内科; b. 消化内科, 湖北 宜昌 443000)

**[摘要]** **目的:** 探讨长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 肺癌相关转录物 1 (lung cancer associated transcript 1, LUCAT1) 对肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 786-O 细胞的增殖和迁移能力的影响及其作用机制。 **方法:** 选取 2013 年 6 月至 2017 年 6 月宜昌市第一人民医院泌尿外科行手术切除的 40 例 ccRCC 患者癌组织及相应的癌旁组织样本, 组织均经病理检查诊断明确。ccRCC 细胞株 786-O、ACHN、UM-RC-2 及正常肾上皮细胞系 KiMA 培养完成后, 用 qPCR 法检测 ccRCC 组织和细胞株中 miR-199a-5p、HIF-1 $\alpha$  和 LUCAT1 mRNA 的表达, 用 CCK-8 实验检测 786-O 细胞的增殖能力, Transwell 法检测 786-O 细胞的迁移能力, 双荧光素酶报告基因实验验证 LUCAT1 与 miR-199a-5p 的靶向作用关系, Western blotting 实验检测 LUCAT1、miR-199a-5p 对 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的影响。 **结果:** LUCAT1 在 ccRCC 组织和细胞系 786-O、ACHN 和 UM-RC-2 中呈高表达 (均  $P < 0.01$ ), 敲低 LUCAT1 后可明显抑制 786-O 细胞的增殖和迁移 (均  $P < 0.01$ )。miR-199a-5p 在 ccRCC 组织和细胞系中呈低表达 (均  $P < 0.01$ ), StarBase 数据库分析结果显示 LUCAT1 含有 miR-199a-5p 的保守目标位点, miR-199a-5p 对 LUCAT1-Wt 的报告活性具有明显的抑制作用 ( $P < 0.01$ ); 敲低 LUCAT1 可明显降低 miR-199a-5p 的表达 ( $P < 0.01$ )。LUCAT1 在转染 miR-199a-5p 模拟物的 786-O 细胞中呈低表达, 但在 LUCAT1+miR-199a-5p 模拟物共转染的 786-O 细胞中出现逆转 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。转染 miR-199a-5p 模拟物的 786-O 细胞中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白表达水平升高, 而 LUCAT1 过表达可逆转该效应 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。转染 miR-199a-5p 模拟物抑制 786-O 细胞的增殖和迁移, 而转染 LUCAT1 可部分消除转染 miR-199a-5p 模拟物对 786-O 细胞增殖和迁移的影响 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。 **结论:** lncRNA LUCAT1 通过靶向调节 miR-199a-5p/HIF-1 $\alpha$  的表达从而在 ccRCC 中发挥促癌效应。

**[关键词]** 长链非编码 RNA; 肺癌相关转录物 1; miR-199a-5p; HIF-1 $\alpha$ ; 肾透明细胞癌; 786-O 细胞; 增殖; 迁移

**[中图分类号]** R737; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)03-0273-09

## lncRNA LUCAT1 facilitates the proliferation and metastasis of clear cell renal cell carcinoma 786-O cells via regulating miR-199a-5p/HIF-1 $\alpha$ axis

LIN Qiling<sup>a</sup>, CHEN Chang<sup>b</sup> (a. Department of Nephrology; b. Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Yichang, the People's Hospital of Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA) lung cancer associated transcript 1 (LUCAT1) on proliferation and migration of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) 786-O cells and the underlying mechanism. **Methods:** A total of 40 pairs of pathologically confirmed tumor tissues and corresponding adjacent normal tissues from ccRCC patients, who underwent surgical resection in the Department of Urology, the First People's Hospital of Yichang during June 2013 and June 2017, were selected for this study. ccRCC cell lines (786-O, ACHN, UM-RC-2) and normal renal epithelial KiMA cells were also used in this study. qPCR was used to detect the mRNA expressions of LUCAT1, miR-199a-5p and hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in above mentioned tissues and cell lines; CCK-8 assay was used to evaluate the proliferation of 786-O cells; Transwell assay was used to evaluate the migration of 786-O cells; Dual luciferase reporter gene assay was performed to validate the relationship between LUCAT1 and miR-199a-5p; and Western blotting was conducted to detect the effect of LUCAT1 and miR-199a-5p on the protein expression of HIF-1 $\alpha$ . **Results:** LUCAT1 was significantly up-regulated in ccRCC tissues and cell lines (all  $P < 0.01$ ), and its knockdown significantly inhibited the proliferation and migration of 786-O cells (all  $P < 0.01$ ). miR-199a-5p was low-expressed in ccRCC tissues and cell lines (all  $P < 0.01$ ), Star-

**[基金项目]** 三峡大学教学研究重点项目 (No. J2017056)。Project supported by the Key Teaching and Research Programme of Three Gorges University (No. J2017056)

**[作者简介]** 林其玲 (1983-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事泌尿系统疾病的临床和基础研究, E-mail: bufeizhi04@163.com

**[通信作者]** 陈畅 (CHEN Chang, corresponding author), 硕士, 副主任医师, 主要从事消化内科介入治疗的临床工作及研究, E-mail: jinglicai3@163.com

Base analysis showed that LUCAT1 contained a conserved target site for miR-199a-5p. miR-199a-5p exerted significant suppression on the luciferase activity of LUCAT1-Wt ( $P<0.01$ ), and LUCAT1 knockdown significantly reduced miR-199a-5p expression ( $P<0.01$ ). LUCAT1 was low-expressed in 786-O cells transfected with miR-199a-5p mimics, however, it was attenuated after co-transfection with LUCAT1. The mRNA and protein expressions of HIF-1 $\alpha$  in 786-O cells transfected with miR-199a-5p mimics were up-regulated, which was then reversed by LUCAT1 over-expression ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). miR-199a-5p over-expression suppressed the proliferation and migration of 786-O cells, which was partially attenuated by LUCAT1 transfection ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **Conclusion:** LUCAT1 exerts oncogenic function in ccRCC via regulating miR-199a-5p/HIF-1 $\alpha$  axis.

**[Key words]** long non-coding RNA (lncRNA); lung cancer associated transcript 1 (LUCAT1); miR-199a-5p; HIF-1 $\alpha$ ; clear cell renal carcinoma; 786-O cell; proliferation ; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(3): 273-281. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.010]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是10种主要癌症类型之一,肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是其主要的亚型之一<sup>[1]</sup>。虽然手术切除可以有效地治疗ccRCC,但仍有20%~40%的患者发生局部复发或远处转移<sup>[2]</sup>。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类超过200个核苷酸的非编码RNA,其在多种生物生长过程中的作用通过多种机制调控基因的表达。lncRNA参与了肿瘤细胞的增殖、侵袭等<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明,在多种癌症中已经发现lncRNA的失调。在ccRCC的发生和发展中,lncRNA也具有重要作用,如lncRNA ZNF180-2是ccRCC预后的一个生物标志物<sup>[5]</sup>;lncRNA CADM1-AS1表达下调与ccRCC预后不良有关<sup>[6]</sup>。此外,有研究<sup>[7]</sup>表明,LUCAT1可通过抑制KISS1的表达促进前列腺癌细胞的迁移和侵袭。然而,目前LUCAT1在ccRCC中的作用机制尚不清楚。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种内源性非编码小RNA,长度为20个左右核苷酸,可通过靶向目标基因mRNA的3'-端非编码区导致转录抑制或mRNA降解从而发挥重要作用<sup>[8]</sup>。miRNA通过调控蛋白质在促进或抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭、凋亡和耐药性方面发挥着重要作用,研究<sup>[9-10]</sup>表明,miR-199a-5p在多种类型的癌症中起重要作用,如miR-199a-5p可通过靶向SNAI1抑制甲状腺乳头状癌的进展,miR-199a-5p可通过靶向CCR7抑制膀胱癌细胞的转移。恶性肿瘤的快速生长使肿瘤细胞处于缺氧微环境中,胞内高表达的缺氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )可以诱导实体肿瘤发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),促进肿瘤细胞异质化及肿瘤血管形成,导致肿瘤细胞发生浸润、转移<sup>[11]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>表明,HIF-1 $\alpha$ 和G蛋白偶联雌激素受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)的相互作用与乳腺癌淋巴结转移、临床分期有关。HIF-1 $\alpha$ 上调血管内皮生长因子-3促进人淋巴畸形内皮细胞的增殖<sup>[13]</sup>;而miR-199a-5p可靶向调控HIF-1 $\alpha$ 的表达已经在大量研究中被证实,如下调miR-199a-5p能抑制HIF-1 $\alpha$ 促

进前列腺腺癌进展<sup>[14]</sup>。miR-199a-5p/HIF-1 $\alpha$ 轴在调控肝癌细胞的Warburg效应中起着重要作用<sup>[15]</sup>。但对于miR-199a-5p靶向作用于HIF-1 $\alpha$ 对ccRCC的作用机制尚未完全阐明。本研究通过探讨ccRCC组织和细胞中LUCAT1/miR-199a-5p/HIF-1 $\alpha$ 之间的调控关系,为揭示ccRCC的发病机制提供了新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织样本、细胞系及主要试剂

选取2013年6月至2017年6月宜昌市第一人民医院泌尿外科行手术治疗的40例ccRCC患者癌组织及相应的癌旁组织样本,组织均经病理检查诊断明确。所有患者术前均未行放化疗,未服用过靶向治疗药物。其中男性28例、女性12例,平均年龄47.5岁(19~72岁)。参照肾肿瘤TNM分期(2017 AJCC第八版):I期15例,II期19例,III期5例,IV期1例。患者手术前均告知并签署知情同意书。将所有收集的癌组织和正常组织保存标本入液氮中,于-80℃冰箱中保存。组织样本获取前告知患者并签署知情同意书,研究方案获得医院医学伦理委员会批准。

ccRCC细胞株786-O、ACHN和UM-RC-2及正常肾上皮细胞系KiMA均购自美国ATCC公司(Manassas, VA, USA)。胎牛血清及RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司(Grand Island, NY, USA),青霉素/链霉素购自美国Thermo Fisher公司(Waltham, MA, USA),pcDNA3.1质粒购自美国Sigma公司(St. Louis, MO, USA),Lipofectamine 2000(Invitrogen)、RIPA裂解缓冲液、Transwell试剂盒、miR-199a-5p mimic以及阴性对照物(mimic ctrl)购自中国Ribobio公司(广州,广东,中国),TRIzol试剂(Invitrogen)、MMLV逆转录酶(Invitrogen)、SYBR预混剂EX TAQ II购自TaKaRa公司(大连,辽宁,中国),CCK-8试剂盒、DNA寡核苷酸和pMiR-Reporter载体购自美国MCE公司(Monmouth Junction, NJ, USA)。

### 1.2 细胞培养

将ccRCC细胞株786-O、ACHN和UM-RC-2及

正常肾上皮细胞系 KiMA 置于含 10% 胎牛血清和 100 U/ml (Invitrogen) 的 RPMI 1640 培养基中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。

### 1.3 细胞转染

根据国家生物技术信息中心数据库合成缺乏 poly-A 尾的全长 LUCAT1 序列, 并亚克隆到 pcDNA3.1 质粒中。使用上海吉凯生物科技有限公司设计并合成的 sh-LUCAT1 敲低 LUCAT1 的表达。根据制造商的说明书, 使用 Lipofectamine 2000 将 sh-NC、sh-LUCAT1 和 miR-199a-5p mimics、mimics NC 分别转染至在六孔板中培养的 786-O 细胞中, 转染 48 h 后检测转染效果。

### 1.4 qPCR 法检测 ccRCC 组织和细胞中 miR-199a-5p、HIF-1 $\alpha$ 和 LUCAT1 mRNA 的表达

从冷冻组织和细胞中用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 用 MMLV 逆转录酶进行逆转录, 获得 cDNA。在 ABI 7500 实时 PCR 系统上, 采用 SYBR 预混剂 EX TAQ II 按照制造商的说明进行定量实时聚合酶链反应 (qPCR), 反应条件为: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 15 s、60 °C 15 s, 45 个循环, 获取荧光信号温度为 60 °C。以 GAPDH 为检测 LUCAT1 和 HIF-1 $\alpha$  表达水平的内参, 以 U6 为检测 miR-199a-5p 表达水平的内参, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法计算 miR-199a-5p、HIF-1 $\alpha$ 、LUCAT1 的表达水平。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列  
Tab.1 Primer sequences for qPCR

Gene	Primer sequences
LUCAT1	F:5'-ACCAGCTGTCCCTCAGTGTCT-3' R:5'-AGGCCTTTATCCTCGGGTTGCT-3'
miR-199a-5p	F:5'-ACATTCCAGCTGGCCAGT-3' R:5'-TGGTCGTGGAGTCGTCG-3'
GAPDH	F:5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' R:5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
HIF-1 $\alpha$	F:5'-GGGAGAAAATCAAGTCGTGC-3' R:5'-AGCAAGGAGGGCCTCTGATG-3'
U6	F:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' R:5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'

### 1.5 CCK-8 实验检测 786-O 细胞的增殖能力

参照 CCK-8 试剂盒说明书, 将转染后的 786-O 细胞以每孔 1 $\times$ 10<sup>3</sup> 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔培养基体积 100  $\mu$ l, 设空白对照 (仅加培养基)。将细胞分别培养 1、2、3、4 d。每个时间点的每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂, 37 °C 继续培养 2 h 后终止培养, 将空白对照孔调零, 用酶标仪测定波长 450 nm 处的光密度 (*D* 值), 以相对 *D* 值的比值表示细胞增殖能力的大

小, 各组取 3 孔均值绘制增殖曲线。

### 1.6 Transwell 实验检测 786-O 细胞的迁移能力

转染后各组细胞接种在装有小室的 6 孔板中, 每组设置 2 个复孔。786-O 细胞悬浮在无血清培养基的上室 (1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞/孔), 下室为 500  $\mu$ l 含体积分数 10% 的胎牛血清的 RPMI-1640 培养液。培养 24 h 后, 用棉签轻轻地拭去上室表面的细胞 (即未侵入下室的细胞), 侵入下室的细胞采用甲醇固定, 然后用结晶紫染色。在倒置显微镜下随机选取 5 个视野 (包括膜的中央和周边), 计数侵入下室的细胞数目。

### 1.7 双荧光素酶基因报告实验验证 LUCAT1 和 miR-199a-5p 的靶向关系

DNA 寡核苷酸和 pMiR-Reporter 载体用于构建荧光素酶报告载体 (pMiR-LUCAT1-Wt/pMiR-LUCAT1-Mut)。pMiR-LUCAT1-Wt 或 pMiR-LUCAT1-Mut 和 miR-199a-5p mimics 或 mimic ctrl 共转染 786-O 细胞, 在转染后 48 h 使用双荧光素酶报告测定其荧光素酶活性, 并验证 LUCAT1 和 miR-199a-5p 的靶向关系。

### 1.8 WB 实验检测 LUCAT1、miR-199a-5p 对 HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达的影响

用含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解缓冲液制备 ccRCC 细胞裂解液。加入蛋白质样品行 SDS-PAGE 并转移到硝酸纤维素膜上。5% 无脂牛奶封闭后用 HIF-1 $\alpha$  一抗 (1:1 000) 和抗 GAPDH (1:2 000) 抗体检测膜。洗涤后, 将膜与辣根过氧化物酶缀合的 HRP 二抗 (1:2 000) 一起温育 1 h。置于自动显影仪显影, 计算灰度值。

### 1.9 统计学处理

qPCR、Wb、MTT、Transwell 等实验均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 软件进行统计数据分析, 用 GraphPad Prism 7 软件绘制图片。符合正态分布的计量数据以  $\bar{x}\pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以  $P<0.05$  或  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LUCAT1 在 ccRCC 组织和细胞系中呈高表达

qPCR 检测结果显示, 与癌旁组织比较, ccRCC 组织中 LUCAT1 表达显著增加 ( $P<0.01$ , 图 1A); 与 KiMA 细胞比较, ccRCC 细胞系 786-O、ACHN 和 UM-RC-2 中 LUCAT1 表达水平显著上调 (均  $P<0.01$ , 图 1B)。选择 LUCAT 表达水平最高的 786-O 细胞进行后续实验。

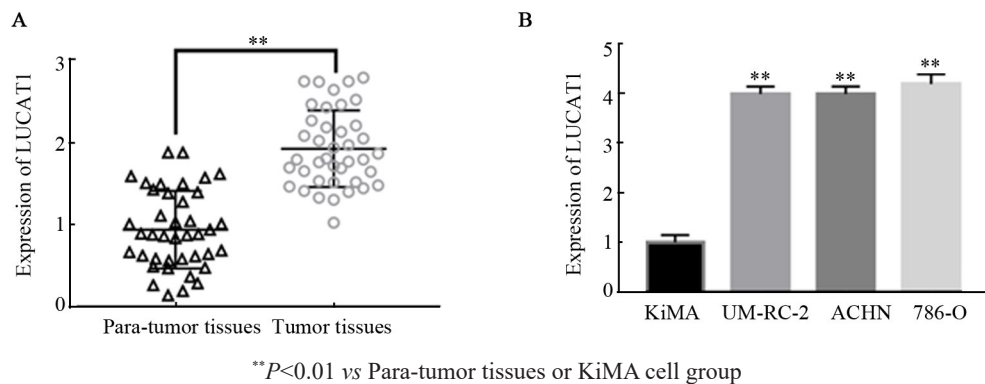
### 2.2 敲低 LUCAT1 可抑制 786-O 细胞的增殖和迁移

qPCR 检测结果显示, 转染 shLUCAT1 后, 786-O 细胞中 LUCAT1 表达水平明显高于对照组 ( $P<0.01$ ,



图2A),表明在786-O细胞中成功构建了LUCAT1敲低细胞系。CCK-8实验检测结果显示,敲低LUCAT1可明显抑制786-O细胞的增殖能力( $P<0.01$ ,图2B)。

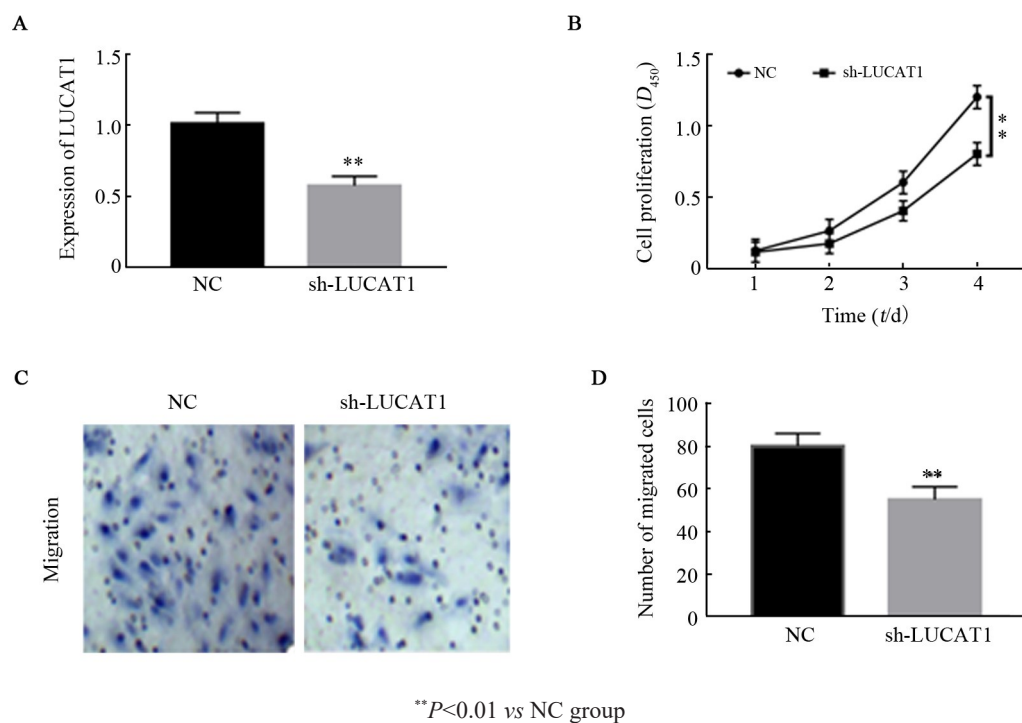
Transwell实验结果显示,敲低LUCAT1可明显抑制786-O细胞的迁移能力( $P<0.01$ ,图2C)。



A: The expression of LUCAT1 in ccRCC tissues; B: The expression of LUCAT1 in ccRCC cell strains

图1 LUCAT1在ccRCC组织和细胞株中的表达

Fig.1 Expression of LUCAT1 in ccRCC tissues and cell strains



A: Knockdown of LUCAT1 expression in 786-O cells after sh-LUCAT1 transfection; B: CCK-8 test to detect the effect of LUCAT1 knockdown on 786-O cells proliferation; C: Transwell test to detect the effect of LUCAT1 knockdown on 786-O cell migration

图2 下调LUCAT1对786-O细胞增殖和迁移的影响( $\times 200$ )

Fig.2 Effect of down-regulating LUCAT1 on the proliferation and migration of 786-O cells( $\times 200$ )

2.3 miR-199a-5p在ccRCC组织和细胞系中呈低表达  
qPCR实验结果显示,与癌旁组织比较,miR-199a-5p在ccRCC组织中呈低表达( $P<0.01$ ,图3A);与KiMA细胞比较,miR-199a-5p在786-O、ACHN和UM-RC-2细胞中呈低表达( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ,图3B)。

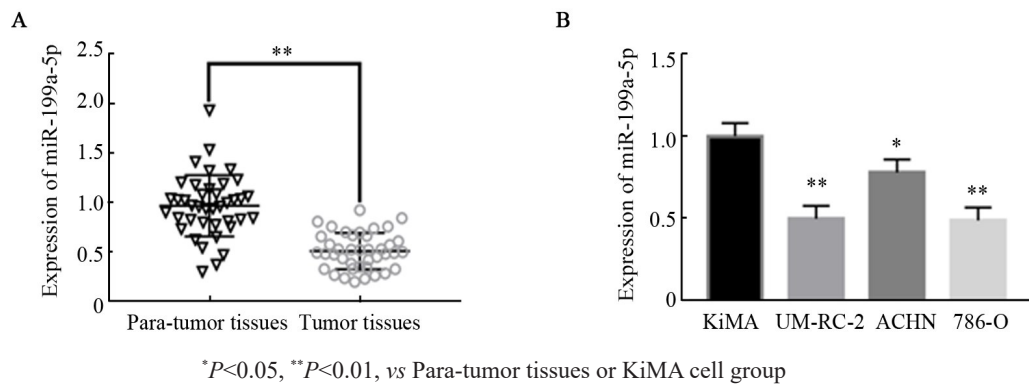
2.4 LUCAT1靶向作用miR-199a-5p

通过StarBase数据库进行了生物信息学分析,结果(图4A)显示,LUCAT1含有miR-199a-5p的保守目标位点。双荧光素酶检测结果(图4B)显示,miR-199a-5p对LUCAT1-Wt的荧光素酶活性具有明显的抑制作用( $P<0.01$ ),但对LUCAT1-Mut抑制作用不明显。qPCR检测结果显示,敲低LUCAT1可明显增高miR-199a-5p的表达( $P<0.01$ ,图4C)。上述结果表

明, LUCAT1 与 miR-199a-5p 之间存在靶向作用关系。  
2.5 转染 miR-199a-5p mimics 抑制 786-O 细胞的增殖和迁移能力

将 miR-199a-5p mimics 转染到 786-O 细胞中, 成功构建了 miR-199a-5p 过表达模型(图 5A)。CCK-8 实验显示, 过表达 miR-199a-5p 可明显抑制 786-O

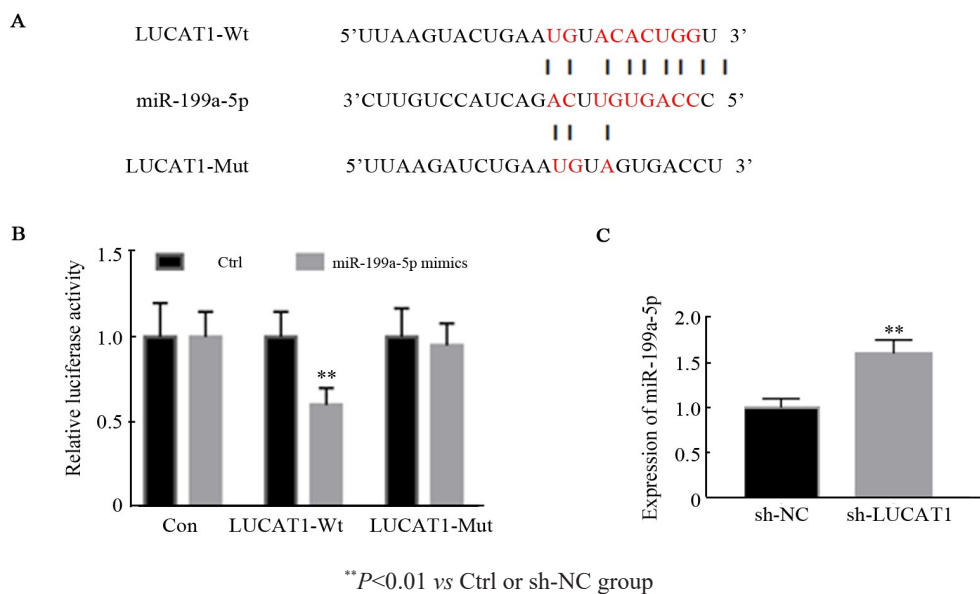
细胞的增殖能力( $P < 0.01$ , 图 5B); Transwell 实验结果显示, 过表达 miR-199a-5p 可明显降低 786-O 细胞的迁移能力( $P < 0.01$ , 图 5C)。上述结果表明, 转染 miR-199a-5p mimics 对 786-O 细胞的增殖和迁移具有明显的抑制作用。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs Para-tumor tissues or KiMA cell group

图3 miR-199a-5p 在 ccRCC 组织(A)和细胞株(B)中的表达

Fig.3 Expression of miR-199a-5p in ccRCC tissues (A) and cell strains (B)



\*\* $P < 0.01$  vs Ctrl or sh-NC group

A: The binding site between LUCAT1 and miR-199a-5p; B: The effect of miR-199a-5p on LUCAT1-Wt and LUCAT1-Mut was verified by luciferase reporter gene experiment; C: Effect of knockdown LUCAT1 on the expression of miR-199a-5p by qPCR

图4 LUCAT1 可与 miR-199a-5p 靶向结合

Fig.4 The binding between LUCAT1 and miR-199a-5p

2.6 LUCAT1 通过抑制 miR-199a-5p 而促进 HIF-1 $\alpha$  的表达

分别将 miR-199a-5p mimics 和 LUCAT1+miR-199a-5p mimics 转染 786-O 细胞后, qPCR 实验结果(图 6A)显示, miR-199a-5p 在 LUCAT1 高表达的 786-O 细胞中表达下调, 但在 LUCAT1+miR-199a-5p mimics 共转染的 786-O 细胞中出现逆转。转染 miR-199a-5p mimics 的 786-O 细胞中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白表达水平降低, 而

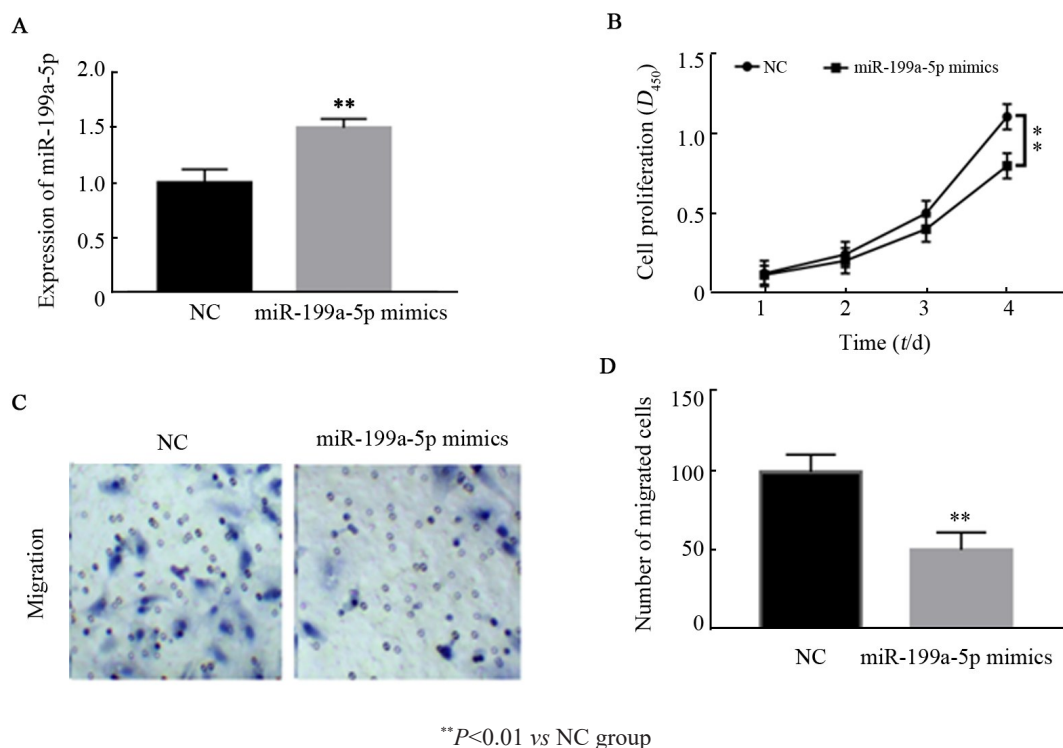
LUCAT1 的过表达可逆转该效应( $P < 0.01$ , 图 6A、B、C), 表明 LUCAT1 可以通过抑制 786-O 细胞中的 miR-199a-5p 诱导 HIF-1 $\alpha$  的表达。上述结果表明, LUCAT1 可通过抑制 miR-199a-5p 而调节 HIF-1 $\alpha$  的表达。

2.7 LUCAT1 通过抑制 miR-199a-5p 而促进 786-O 细胞的增殖和迁移

CCK-8 实验检测结果显示, 转染 miR-199a-5p mimics 抑制 786-O 细胞的增殖和迁移(均  $P < 0.05$ , 图

7A), 而转染 LUCAT1 可部分消除转染 miR-199a-5p mimics 对 786-O 细胞增殖和迁移的影响 ( $P < 0.05$  或

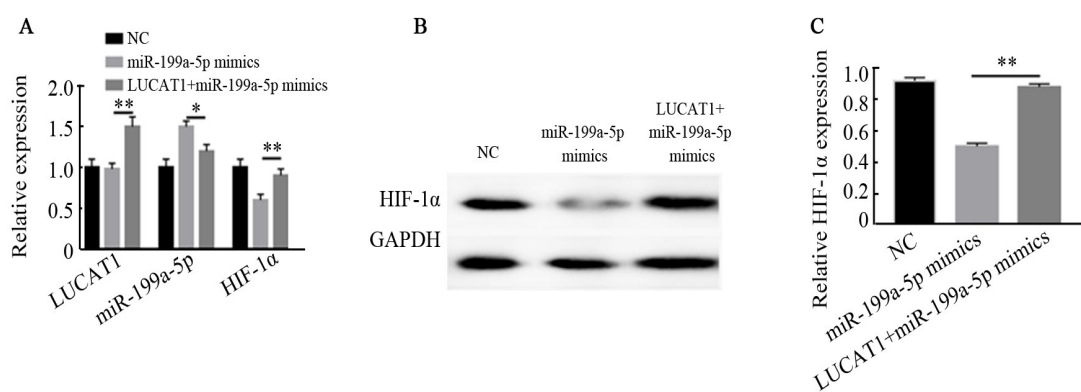
$P < 0.01$ , 图 7B)。上述结果表明, LUCAT1 可通过抑制 miR-199a-5p 而调节 786-O 细胞的增殖和迁移。



A: Over expression model of miR-199a-5p was successfully constructed; B: Effect of overexpression of miR-199a-5p on 786-O cell proliferation was detected by CCK-8; C: Effect of overexpression of miR-199a-5p on 786-O cells migration by Transwell test

图 5 转染 miR-199a-5p mimics 对 786-O 细胞增殖和迁移能力的影响 ( $\times 200$ )

Fig.5 Effect of miR-199a-5p mimics transfection on the proliferation and migration of 786-O cells ( $\times 200$ )



A: Expression levels of miR-199a-5p, LUCAT1 and HIF-1  $\alpha$  mRNA were detected by qPCR; B, C: Detection of HIF-1  $\alpha$  protein expression in 786-O cells transfected with miR-199a-5p or overexpressed with LUCAT1 was detected by WB

图 6 LUCAT1 可通过抑制 miR-199a-5p 而促进 HIF-1 $\alpha$  的表达

Fig.6 LUCAT1 promoted HIF-1 $\alpha$  expression by inhibiting miR-199a-5p

### 3 讨论

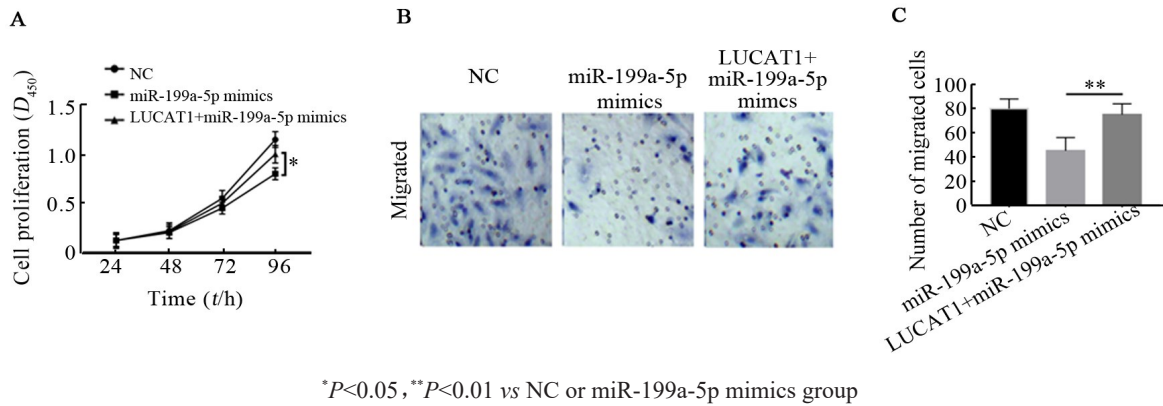
近年来研究<sup>[16]</sup>表明, lncRNA 参与了人体内许多重要的生物学过程, 其中包括肿瘤的发生和转移。lncRNAs 的异常表达已在多种肿瘤细胞中被发现, 因

其很可能会为临床治疗提供有价值的新治疗靶点, lncRNAs 成为近年来肿瘤学研究的热点<sup>[17]</sup>。例如, lncRNA DUXAP8 通过下调 miR-126 促进 ccRCC 的进展<sup>[18]</sup>; lncRNA Z38 对人 ccRCC 细胞的增殖和转移有促进作用<sup>[19]</sup>。受这些研究的启发, 本课题研究了

LUCAT1 在 ccRCC 中的作用。

本研究在 40 例 ccRCC 组织及癌旁组织标本中检测了 LUCAT1 的表达水平, 发现 LUCAT1 在 ccRCC 组织中的表达较癌旁组织明显升高, 继而发现 LUCAT1 在 ccRCC 中的高表达可以促进 ccRCC 细胞

的增殖和迁移。本研究不仅发现 LUCAT1 基因在 ccRCC 组织和细胞中异常升高, 还成功将 LUCAT1 的高表达与 ccRCC 细胞的恶性表型联系到一起, 这些发现揭示了 LUCAT1 作为癌基因在 ccRCC 的进展中的重要作用。



A: CCK-8 test for proliferation of 786-O cells; B, C: Transwell test for the migration of 786-O cells

图7 共转染LUCAT1和miR-199a-5p mimics对786-O细胞增殖和迁移的影响( $\times 200$ )

Fig.7 Effects of co-transfection of LUCAT1 and miR-199a-5p mimics on the proliferation and migration in 786-O cells( $\times 200$ )

近来也有研究<sup>[20]</sup>发现, miRNAs可作为促肿瘤基因或抑肿瘤基因调控肿瘤的发展。例如, miR-186-5p可靶向调节FGF2和RelA抑制多形性成胶质细胞瘤的发生<sup>[21]</sup>; miR-106a-363簇可促进尤文肉瘤的生长<sup>[22]</sup>。另外, 越来越多的证据也表明miRNAs的失调与ccRCC发病机制有关。例如, miR-645通过靶向控制GK5促进ccRCC细胞的转移和增殖<sup>[23]</sup>; miR-199a-3p在ccRCC中起抑癌作用<sup>[24]</sup>。与此同时, miR-199a-5p在多种癌症的发生和发展中起着抑癌的作用。例如, miR-199a-5p负调控FZD6的表达从而抑制大肠癌的进展<sup>[25]</sup>, 也可通过靶向IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B信号通路抑制口腔鳞状细胞癌的进展<sup>[26]</sup>。因此本研究着重观察了miR-199a-5p在ccRCC组织中的表达情况, 发现与癌旁组织相比, miR-199a-5p在ccRCC组织中显著下调, 且发现miR-199a-5p模拟物在体外能明显抑制ccRCC细胞的增殖和迁移。

目前为止miRNA和lncRNA的相互作用在ccRCC发生中的确切功能尚不清楚, 但两者均可调控肿瘤细胞的增殖与迁移过程。近年有研究表明, 通过上调Lnc-SNHG1通过阻断miR-577和激活WNT2B/Wnt/ $\beta$ -catenin途径来促进骨肉瘤的进展<sup>[27]</sup>, 或依赖LncRNA SNHG20调节miR-495参与乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移过程<sup>[28]</sup>, 还有Lnc-SNHG1可作为miR-497的海绵促进非小细胞肺癌的进展<sup>[29]</sup>。因此了解miRNA和lncRNA之间的相互作用, 将极大地促进恶性肿瘤基于miRNA/lncRNA途径诊断和

治疗的发展。本研究通过生物信息学分析并用双荧光素酶报告法证实了LUCAT1与miR-199a-5p之间直接结合的结合位点。在ccRCC细胞中, LUCAT1通过与miR-199a-5p的结合抑制其表达以发挥促癌作用, 有力地表明LUCAT1直接靶向并下调miR-199a-5p的表达从而影响ccRCC的进展。

miR-199a-5p可以通过调节HIF-1 $\alpha$ 对多种肿瘤产生影响, 例如miR-199a-5p靶向调节HIF-1 $\alpha$ 抑制黑色素瘤的肿瘤增殖<sup>[30]</sup>, miR-199a-5p可通过直接靶向调节HIF-1 $\alpha$ 来抑制自噬并降低肝癌细胞的放射抗性<sup>[31]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 的表达及其下游缺氧应激反应的激活在多种肿瘤中普遍存在。目前的研究<sup>[32]</sup>揭示HIF-1 $\alpha$ 调节的基因作用于肿瘤发生发展的一些关键环节, 例如肿瘤的增殖、血管生成、凋亡和自噬、肿瘤的代谢、DNA损伤与修复、细胞外基质的重塑、细胞的侵袭和迁移。同时ccRCC中HIF-1 $\alpha$ 的作用在既往研究中也有一部分涉及: lncRNA HOTAIR通过抑制miR-217调控HIF-1 $\alpha$ /Ax1信号转导从而促进ccRCC的进展<sup>[33]</sup>; 在散发性ccRCC中, HIF-1 $\alpha$ 的生成和VHL的基因改变可以调控结节性硬化症复合蛋白1的表达<sup>[34]</sup>。但尚无研究探讨LUCAT1是否会影响HIF-1 $\alpha$ 表达, 而本研究中发现过表达LUCAT1可抑制miR-199a-5p, 从而促进了HIF-1 $\alpha$ 的表达。

综上所述, LUCAT1作为“lncRNA”通过下调miR-199a-5p表达来促进HIF-1 $\alpha$ 表达水平, 从而在ccRCC的进展中发挥重要作用。本研究结果为



ccRCC的发病机制提供了新的思路,为ccRCC的治疗提供了潜在的靶点。

### [参 考 文 献]

- [1] HU X, CHEN J, FU Q. Downregulation of YAP in clear cell renal cell carcinoma contributes to poor prognosis and progressive features[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2017, 47(1): 36-39.
- [2] RAN L, LIANG J, DENG X, WU J, et al., miRNAs in prediction of prognosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2017. 2017: 4832931-4832931. DOI:10.1155/2017/4832931
- [3] LI T, ZHU J, WANG X et al. Long non-coding RNA lncTCF7 activates the Wnt/beta-catenin pathway to promotemetastasis and invasion in colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7384-7390. DOI: 10.3892/ol.2017.7154.
- [4] SONG H, HE P, SHAO T, et al. Long non-coding RNA XIST functions as an oncogene in human colorectal cancer bytargeting miR-132-3p[J]. *J BUON*, 2017, 22(3): 696-703.
- [5] ELLINGER J, ALAM J, ROTHENBURG J, et al. The long non-coding RNA lnc-ZNF180-2 is a prognostic biomarker in patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(9): 2799-2807. eCollection 2015.
- [6] YAO J, CHEN Y, WANG Y, et al., Decreased expression of a novel lncRNA CADM1-AS1 is associated with poorprognosis in patients with clear cell renal cell carcinomas[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6): 2758-2767. eCollection 2014.
- [7] LIU C, WANG L, LI Y W, et al., Long noncoding RNA LUCAT1 promotes migration and invasion of prostate cancercells by inhibiting KISS1 expression[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(8): 3277-3283. DOI: 10.26355/eurev\_201904\_17689.
- [8] ZENG M, ZHU L, LI L, et al. miR-378 suppresses the proliferation, migration and invasion of colon cancercells by inhibiting SDAD1 [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2017, 22: 12. DOI: 10.1186/s11658-017-0041-5. eCollection 2017.
- [9] SUGANG MA, WEI JIA, SHIYU NI. miR-199a-5p inhibits the progression of papillary thyroid carcinoma by targeting SNAIL[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(1): 181-186. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.051.
- [10] ZHOU M, WANG S, HU L Y, et al. miR-199a-5p suppresses human bladder cancer cell metastasis by targeting CCR7[J]. *BMC Urol*, 2016, 16 (1): 64. DOI: 10.1186/s12894-016-0181-3.
- [11] TANG N N , ZHU H , ZHANG H J, et al. HIF-1 $\alpha$  induces VE-cadherin expression and modulates vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(47):17894-17904. DOI: 10.3748/wjg.v20.i47.17894
- [12] DE FRANCESCO E M, MAGGIOLINI M, MUSTI M M. Crosstalk between Notch, HIF-1alpha and GPER in breast cancer EMT[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 2011. DOI: 10.3390/ijms19072011.
- [13] Han T, Yan J, Chen H N, et al. HIF-1alpha contributes to tube malformation of human lymphatic endothelial cells by upregulating VEGFR-3[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54 (1): 139-151. DOI: 10.3892/ijo.2018.4623.
- [14] ZHONG J J, HUANG R, SU Z Z, et al. Downregulation of miR-199a-5p promotes prostate adeno-carcinoma progression through loss of its inhibition of HIF-1alpha[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(48): 83523-83538. DOI: 10.18632/oncotarget.18315.
- [15] LIB K, HE L R, ZUO D L, et al. Mutual Regulation of MiR-199a-5p and HIF-1alpha modulates the warburg effect in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2017, 8(6): 940-949. DOI: 10.7150/jca.17496.
- [16] NIU G C, ZHUANG H J, LI B Q, et al. Long noncoding RNA linc-UBC1 promotes tumor invasion and metastasis by regulating EZH2 and repressing E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J BUON*, 2018, 23(1): 157-162. PMID: 29552776.
- [17] LEI K C, LIANG X, GAO Y W, et al. Lnc-ATB contributes to gastric cancer growth through a MiR-141-3p/TGFbeta2 feedback loop [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(3): 514-521. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.094.
- [18] HUANG T, WANG X, YANG X K, et al. Long non-coding RNA DUXAP8 enhances renal cell carcinoma progression viadownregulating miR-126[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 7340-7347. DOI: 10.12659/MSM.910054.
- [19] HE X F, LIU H J, GUO F F, et al. Long non-coding RNA Z38 promotes cell proliferation and metastasis in human renalcell carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (4): 5489-5494. DOI: 10.3892/mmr.2017.7218.
- [20] CHEN Q, HOU J, WU Z W, et al. miR-145 Regulates the sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells to 5-FU via targeting REV3L[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(7): 152427. DOI: 10.1016/j.prp.2019.04.019.
- [21] WANG F C, JIANG H, WANG S J, et al. Dual functional MicroRNA-186-5p targets both FGF2 and RelA to suppress tumorigenesis of glioblastoma multiforme[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(8): 1433-1442. DOI: 10.1007/s10571-017-0474-4.
- [22] DYLLA L, JEDLICKA P. Growth-promoting role of the miR-106a~363 cluster in Ewing sarcoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (4): e63032. [2019-11-20]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063032> DOI: 10.1371/journal.pone.0063032.
- [23] CHENJ, SHU Y, YU Q, et al. MicroRNA-645 promotes cell metastasis and proliferation of renal clear cellcarcinoma by targeting GK5 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(20): 4557-4565. PMID: 29131260.
- [24] LIU J M, LIU B B, GUO Y Y, et al. MiR-199a-3p acts as a tumor suppressor in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(6): 806-813. DOI: 10.1016/j.prp.2018.05.005.
- [25] KIM B K, YOO H I, KIM I, et al. FZD6 expression is negatively regulated by miR-199a-5p in human colorectalcancer[J]. *BMB Rep*, 2015, 48(6): 360-366. DOI: 10.5483/bmbrep.2015.48.6.031.
- [26] WEI D Y, SHEN B H, WANG W X, et al. MicroRNA199a5p functions as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinomavia targeting the IKKbeta/NFkappaB signaling pathway[J]. *Inte J Mol Med*, 2019, 43(4): 1585-1596. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4083.
- [27] JIANG Z, JIANG C, FANG J. Up-regulated lnc-SNHG1 contributes to osteosarcoma progression throughsequestration of miR-577 and activation of WNT2B/Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 238-245. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.012.
- [28] GUANY X, ZHANG M Z, CHEN X Z, et al. Lnc RNA SNHG20 participated in proliferation, invasion, and migration of breastcancer cells via miR-495[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119 (10): 7971-7981.



- DOI: 10.1002/jcb.26588.
- [29] LI Z X, LU Q C, ZHU D Y, et al. Lnc-SNHG1 may promote the progression of non-small cell lung cancer by acting as a sponge of miR-497[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(3): 632-640. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.086.
- [30] YANG X H, LEI S R, LONG J H, et al. MicroRNA-199a-5p inhibits tumor proliferation in melanoma by mediating HIF-1 $\alpha$ [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6): 5241-5247. DOI: 10.3892/mmr.2016.5202.
- [31] LI B K, HE L R, ZUO D L, et al. Mutual regulation of MiR-199a-5p and HIF-1 $\alpha$  modulates the warburg effect in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2017, 8(6): 940-949. eCollection. DOI: 10.7150/jca.17496.
- [32] BERTOUT J A, PATEL S A, SIMON M C. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(12): 967-975. DOI: 10.1038/nrc2540.
- [33] HONG Q, LI Q, ZHENG W, et al. LncRNA HOTAIR regulates HIF-1 $\alpha$ /AXL signaling through inhibition of miR-217 in renal cell carcinoma[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2772[2019-11-20]. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28492542/?from\\_single\\_result=DOI%3A+10.1038%2Fcddis.2017.181.&expanded\\_search\\_query=DOI%3A+10.1038%2Fcddis.2017.181.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28492542/?from_single_result=DOI%3A+10.1038%2Fcddis.2017.181.&expanded_search_query=DOI%3A+10.1038%2Fcddis.2017.181) DOI: 10.1038/cddis.2017.181.
- [34] DAMJANOVIC S S, ILIC B B, COKIC B B, et al. Tuberous sclerosis complex protein 1 expression is affected by VHL gene alterations and HIF-1 $\alpha$  production in sporadic clear-cell renal cell carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(3): 323-331. DOI: 10.1016/j.yexmp.2016.11.003.

[收稿日期] 2019-11-22

[修回日期] 2020-02-05

[本文编辑] 韩丹