

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.002

· 基础研究 ·

lncRNA LOC440173 在非小细胞肺癌组织中的表达及其对癌细胞恶性生物学行为的影响

梁佳¹, 刘欣燕², 戴献利², 申婷², 沈素朋¹, 郭炜¹, 董稚明¹, 吴树才² (1. 河北医科大学第四医院 肿瘤研究所, 河北石家庄 050011; 2. 河北省胸科医院 呼吸内科, 河北 石家庄 050041)

[摘要] **目的:** 检测 lncRNA LOC440173 在 NSCLC 组织和细胞中的表达及探讨其对癌细胞恶性生物学行为的影响。**方法:** 选取河北医科大学第四医院生物标本库中 2014 至 2017 年手术切除的 72 例 NSCLC 患者的癌及癌旁组织标本, 应用 qPCR 法检测 NSCLC 组织和癌旁组织中, 以及 6 种 NSCLC 细胞株 (H520、H358、A549、HCC827、H1703 和 H1299) 中 LOC440173 的表达水平; 构建 LOC440173 的敲低及过表达载体, 分别转染 H520 和 H1703 细胞, 应用 MTS、克隆形成及 Transwell 小室迁移和侵袭实验分别检测敲低及过表达 LOC440173 对 NSCLC 细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响, qPCR 法检测 LOC440173 对于 EMT 过程相关标志物 (E-cadherin、N-cadherin 及 vimentin) mRNA 表达水平的影响, WB 法检测其对 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达的影响。**结果:** LOC440173 在 NSCLC 组织中的表达明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$), 并与淋巴结转移、组织学分化程度、TNM 分期和肿瘤大小有关联 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。敲低 LOC440173 可以抑制 H520 细胞的体外增殖、迁移和侵袭 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 过表达 LOC440173 可显著促进 H1703 细胞的增殖、迁移和侵袭 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在转录水平上, 敲低 LOC440173 后, E-cadherin 的表达水平升高, 间充质相关标志物 N-cadherin、vimentin 的表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而过表达 LOC440173 后, E-cadherin 的表达水平降低, 间充质相关标志物 N-cadherin、vimentin 的表达水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在转录后水平上, LOC440173 负向调节 E-cadherin 蛋白的表达、正向调节 N-cadherin 的蛋白表达 (均 $P < 0.05$)。**结论:** LOC440173 在 NSCLC 组织中的异常高表达可能与 NSCLC 的发生发展有关, LOC440173 可显著提高 NSCLC 细胞的体外增殖、迁移、侵袭能力, 且其作用机制可能与调控 EMT 相关基因表达有关。

[关键词] 非小细胞肺癌; H520 细胞; H1703 细胞; 长链非编码 RNA; LOC440173; 生物学行为; 上皮-间质转化

[中图分类号] R734.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)08-0775-08

Expression of lncRNA LOC440173 in non-small cell lung cancer tissues and its influence on the malignant biological behaviors of cancer cells

LIANG Jia¹, LIU Xinyan², DAI Xianli², SHEN Ting², SHEN Supeng¹, GUO Wei¹, DONG Zhiming¹, WU Shucui² (1. Institute of Oncology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Hebei Chest Hospital, Shijiazhuang 050041, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of lncRNA LOC440173 in NSCLC tissues and cells and to explore its influence on the malignant biological behavior of cancer cells. **Methods:** The cancer and para-cancerous tissues removed from 72 patients with NSCLC who were surgically during 2014 to 2017 in the biological specimen library of the Fourth Hospital of Hebei Medical University were selected. qPCR method was applied to detect the expression of LOC440173 in NSCLC tissues and the corresponding para-cancerous tissues as well as in six NSCLC cell lines (H520, H358, A549, HCC827, H1703 and H1299). The vectors to used for LOC440173 knockdown or overexpression were constructed and transfected into H520 and H1703 cells, respectively. The effects of LOC440173 knockdown or overexpression on proliferation, migration, and invasion of lung cancer cells were examined by MTS, Clone formation, Transwell migration and invasion assays, respectively. qPCR method was used to detect the regulatory effect of LOC440173 on mRNA expression of EMT-related markers (E-cadherin, N-cadherin, and vimentin), WB method was employed to observe the protein expression of E-cadherin and N-cadherin. **Results:** The expression of LOC440173 in NSCLC tissues was significantly higher than that in corresponding para-cancerous tissues ($P < 0.01$), and was correlated with lymph node metastasis, histological grade, TNM stage, and tumor size ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). LOC440173 gene knockdown could inhibit the *in vitro* proliferation, invasion and migration of H520

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No.81572441); 河北省医学科学研究重点课题资助项目 (No.20201050)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81572441), and the Key Project of Medical Science Research of Hebei Province (No.20201050)

[作者简介] 梁佳 (1987—), 硕士, 助理研究员, 主要从事肿瘤病因机制的研究, E-mail: liangjia603@163.com

[通信作者] 吴树才 (WU Shucui, corresponding author), 教授, 博士生导师, 主要从事肺癌病因机制的研究, E-mail: shucaiwu2009@163.com

cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Overexpression of LOC440173 gene significantly promoted the *in vitro* proliferation, migration, and invasion of H1703 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). At the transcriptional level, knockdown of LOC440173 was found to promote the expression level of E-cadherin and inhibit the expression level of N-cadherin and vimentin ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while overexpression of LOC440173 displayed the opposite results ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). At the post-transcriptional level, LOC440173 negatively regulated protein expression of E-cadherin and positively modulated protein expression of N-cadherin ($P < 0.05$). **Conclusion:** The abnormal high expression of LOC440173 may be related to the occurrence and development of NSCLC. LOC440173 can significantly improve the *in vitro* proliferation, migration and invasion of NSCLC cells, and the mechanism may be related to the regulation of EMT-related genes.

[Key words] non-small cell lung cancer (NSCLC); H520 cell; H1703 cell; long non-coding RNA (lncRNA); LOC440173; biological behavior; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(8): 775-782. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.002]

肺癌是中国最常见的恶性肿瘤之一,其包括小细胞肺癌和NSCLC两类;其中NSCLC是最常见的类型,占肺癌的80%左右,它还可分为鳞状细胞癌、腺癌和大细胞肺癌等。中国人肺癌主要以NSCLC为主,由于其发展迅速,缺少可靠的早期诊断标志物和抑制肿瘤转移的治疗靶标,中、晚期患者5年生存率很低。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是指长度大于200 nt并且缺乏蛋白质编码能力的RNA分子^[1],其与肺癌的发生、发展、转移、复发存在密切关系^[2-4]。LOC440173是一个新发现的lncRNA,长度为2 018 nt,位于人类染色体9q21.33,其在NSCLC中的表达及其功能在国内外文献中尚少见报道。本研究检测LOC440173在人NSCLC组织和细胞系中的表达情况,分析其表达与患者临床病理参数之间的关系,同时检测LOC440173的表达对于NSCLC细胞生物学功能的影响,敲低或过表达LOC440173后观察NSCLC细胞中EMT相关标志物的变化,探讨LOC440173在EMT过程中的调控作用,据此分析LOC440173在NSCLC发生发展中作用及其机制,旨在为NSCLC的靶向治疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

NSCLC细胞系H520、H358、A549、HCC827、H1703和H1299由河北医科大学第四医院生物标本库留存并传代,其中H520细胞用不含丙酮酸的DMEM培养基培养,其余细胞均用RPMI培养基常规培养。TRIzol试剂购自赛百盛基因技术有限公司,逆转录试剂盒和MTS试剂均购自美国Promega公司,胎牛血清购自德国PAN公司,DMEM培养基和RPMI 1640培养基均购自美国Gibco公司,Lipofectamine™2000购自美国Thermo公司,Transwell小室和matrigel胶均购自美国Corning公司,蛋白提取试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司。一抗包括兔抗人上皮钙黏素(E-cadherin)、神经钙黏素(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)及β肌动

蛋白(β-actin)抗体均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗购自美国KPL公司,电化学发光试剂购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.2 临床标本资料

标本取自2014至2017年收入河北医科大学第四医院生物标本库的72例NSCLC患者手术切除组织,其中男性39例、女性33例,年龄39~74岁、中位年龄60.0岁。全部患者术前均未接受任何放、化疗。每例患者均取NSCLC原发灶组织及距原发灶边缘3~5 cm的相应癌旁组织。手术切除标本一部分常规制作蜡块行H-E染色;另一部分在新鲜状态放入-80℃低温冰箱保存,用于提取总RNA。所有癌组织标本在H-E染色后由3位病理医师共同确认为NSCLC组织,癌旁组织均未见癌细胞浸润。所取标本均具有完整的相关病理资料(参照医院病理诊断规则)及临床资料。按照国际抗癌联盟(UICC)标准进行TNM分期:72例肿瘤患者中,I期10例(13.9%)、II期41例(56.9%)、III期12例(16.7%)、IV期9例(12.5%)。按肿瘤的病理组织学分级:72例患者中,高分化23例(31.9%)、中等分化30例(41.7%)、低分化19例(26.4%)。72例患者中,肿瘤直径≥4 cm的38例(52.8%),<4 cm的34例(47.2%)。

1.3 qPCR检测LOC440173和EMT相关标志物mRNA的表达

根据TRIzol试剂说明书步骤提取组织或细胞的总RNA,之后将提取的总RNA逆转录成cDNA,再以cDNA为模板进行qPCR扩增,用于检测LOC440173及EMT相关标志物mRNA表达,引物序列见表1。反应条件:95℃预变性10 min;95℃变性15 s、55℃退火30 s、72℃延伸30 s,40个循环;72℃终延伸7 min。LOC440173以GAPDH作为内参,每个样本设3个复孔。以每孔荧光信号达到阈值时经历的循环数作为Ct值,采用相对定量法: $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{癌组织}} - \Delta Ct_{\text{配对癌旁组织}}$,以 $N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量,其数值表示癌组织中表达

量相对于配对癌旁组织的倍数。

1.4 细胞培养及转染

转染前一天选择生长状态良好的H520和H1703细胞均匀铺于6孔板内,待细胞生长汇合至70%左右开始转染。按照Lipofectamine™2000转染试剂盒说明进行shRNA及过表达重组质粒转染,培养24 h后,提取各组细胞总RNA,进行后续检测。4条shRNA-LOC440173由上海吉玛基因公司设计合成,分别命名

为sh1-LOC440173、sh2-LOC440173、sh3-LOC440173和sh4-LOC440173,另附sh-NC作为对照,转染LOC440173表达水平较高的H520细胞。由上海生工公司合成LOC440173过表达载体pcDNA3.1-LOC440173,克隆位点Nhe I/BamH I,氨苄青霉素抗性,以pcDNA3.1空质粒作为对照,转染LOC440173表达水平较低的H1703细胞。

表1 qPCR引物序列及反应条件

Tab.1 Primer sequences and reaction conditions of qPCR

Gene	Primer sequence	Annealing temperature (t/°C)	Product size (bp)
LOC440173	F: 5'-GCCGAAAGCATTAACCTCCG-3' R: 5'-TGGAGGTGTTGGCTAGTTGT-3'	54	156
GAPDH	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' R: 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'	58	102
E-cadherin	F:5'-CGAGAGCTACACGTTACGG-3' R:5'-GGCCTTTTACTGTAATCACACC-3'	59	162
N-cadherin	F:5'-CAACTTGCCAGAAAACCTCCAGG-3' R:5'-ATGAAACCGGGCTATCTGCTC-3'	59	205
Vimentin	F:5'-CGCCTGCAGGATGAGATTCAG-3' R:5'-TCAGGGAGGAAAAGTTTGGAAA-3'	58	175

F: Forward primer; R: Reverse primer

1.5 MTS实验及克隆形成实验检测LOC440173表达对NSCLC细胞增殖的影响

转染后细胞培养24 h后用胰酶消化,悬浮于含10%胎牛血清的培养基中,调整细胞密度,接种于96孔板,每孔接种100 μl(含约 1.0×10^3 个细胞)。分别在细胞贴壁后0、24、48、72和96 h向每孔中加入20 μl MTS试剂(500 μg/ml),孵育4 h后用酶标仪测定各孔在492 nm处的光密度(D)值。每组设6个复孔,实验重复3次。

转染后细胞培养24 h,胰酶消化,悬浮于含10%胎牛血清的培养基中,按细胞密度 3.0×10^3 个/孔接种于6孔板,常规培养1周。用PBS洗2次,用4%多聚甲醛固定20 min,风干,用结晶紫染液染色20 min,洗涤后在显微镜下计数克隆数,以大于50个细胞的集落确认为是一个克隆,计算克隆形成率。克隆形成率=克隆个数/接种细胞总数 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.6 Transwell小室迁移实验检测LOC440173表达对NSCLC细胞迁移的影响

转染细胞培养24 h后,常规胰酶消化,轻柔地吹打混匀,悬浮于无血清培养基中,调整细胞密度为 1×10^5 个/ml,Transwell上室每孔加入200 μl细胞悬液,下室加入600 μl含20%FBS的完全培养基,常规培养24 h后取出小室,除去小室底部聚碳酸酯膜表面的细胞,PBS洗3次,染色、固定膜下室侧的细胞,

将膜轻轻剪下,放于载玻片上,树脂封片,显微镜下随机计数5个视野内的细胞数,比较各组穿膜细胞数量来判断细胞的迁移能力。实验重复3次。

1.7 Transwell小室侵袭实验检测LOC440173表达对细胞侵袭的影响

将matrigel胶稀释后,向Transwell上室底部加入50 μl,37 °C放置过夜。细胞首先使用无血清培养基饥饿24 h,后续操作步骤与1.6迁移实验相同,比较各组穿膜细胞数量来判断细胞的侵袭能力。实验重复3次。

1.8 WB法检测LOC440173表达对NSCLC细胞中EMT标志物表达水平的影响

按照蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白,按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。取适量蛋白样品进行10% SDS-PAGE分离蛋白,以80 V为起始电压进行电泳,分离胶电压为120 V,电泳约90 min。将分离后的蛋白条带转至PVDF膜上,取出后放入含5%脱脂奶粉的封闭液中室温孵育1 h,加入稀释后的一抗[兔抗人E-cadherin、N-cadherin、vimentin及β-actin(内参照)单克隆抗体(体积稀释比例分别为1:2 000、1:6 000、1:2 000和1:10 000)],在摇床上4 °C孵育过夜,用TBST清洗膜3次,每次5 min,加入稀释的二抗[辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(体积稀释比例为1:100 000)],室温孵育1 h后,用TBST清洗膜3次,

每次 5 min; 在 PVDF 膜上滴加电化学发光剂, 曝光、显影。以 β -actin 为内参照, 用 Image J 软件分析条带灰度值并计算目的蛋白相对表达量。

1.9 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的比较采用独立样本 t 检验和近似 t 检验; 多组间的均数比较采用单因素方差分析, 组内的两两比较采用 SNK- q 检验。

以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LOC440173 的编码能力预测

通过编码能力预测网站 Coding Potential Assessment Tool (<http://lilab.research.bcm.edu/cpat/>) 预测 LOC440173 的编码能力, 结果表明 LOC440173 是一个无编码蛋白能力的 lncRNA (图 1)。

Coding potential assessment tool

Result for species name: hg19 with job ID: 160307512							
Data ID	Sequence name	RNA size	ORF size	Ficket score	Hexamer score	Coding probability	Coding label
0	NR_027471.1	2018	312	0.5684	0.0372579584064	0.056556316045851	No

图 1 LOC440173 的编码能力预测

Fig.1 Prediction of the coding capability of LOC440173

2.2 LOC440173 在 NSCLC 细胞系中的表达

随机取 10 例 NSCLC 癌旁组织的 cDNA 混合后作为细胞表达的对照组 (Pool), qPCR 检测结果 (图 2) 显示, LOC440173 在 H1299、H1703、A549、HCC827、H358 和 H520 细胞中的相对表达量分别为 3.560 ± 0.245 、 2.045 ± 0.231 、 6.789 ± 0.123 、 5.678 ± 0.235 、 2.258 ± 0.110 和 8.654 ± 0.220 , 均显著高于对照组细胞的相对表达量 (1.005 ± 0.110), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。

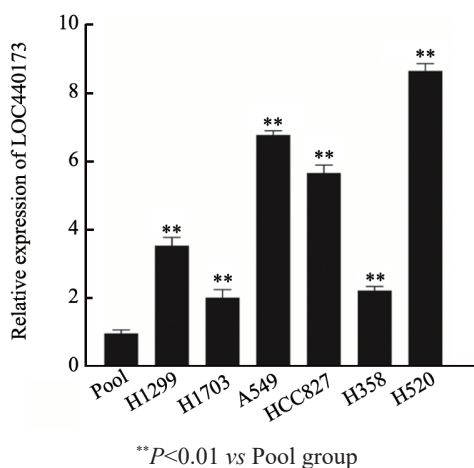


图 2 NSCLC 细胞系中 LOC440173 的表达

Fig.2 The expression of LOC440173 in NSCLC lines

2.3 LOC440173 在 NSCLC 组织中的表达及其与临床病理参数的关联情况

qPCR 检测结果 (图 3A) 显示, LOC440173 在 NSCLC 组织中的相对表达量显著高于相应的癌旁组织 [3.325 ± 1.773] vs [1.452 ± 1.174], $P < 0.01$ 。结合临床病理资料分析发现 (图 3B), LOC440173 在发生淋巴结转移患者的 NSCLC 组织中表达水平显著高于未发生淋巴结转移患者的 NSCLC 组织 [3.909 ± 1.794]

vs [2.635 ± 1.498], $P < 0.05$]; 在低分化的 NSCLC 组织中的表达显著高于中、高分化组中 NSCLC 组织 [4.058 ± 1.417] vs [3.063 ± 1.825], $P < 0.05$]; 在 III 期和 IV 期 NSCLC 组织中的表达高于 I 期和 II 期 NSCLC 组织 [4.060 ± 1.642] vs [3.023 ± 1.751], $P < 0.05$]; 在肿瘤直径 ≥ 4 cm 的 NSCLC 组织中的表达显著高于直径 < 4 cm 的 NSCLC 组织 [4.195 ± 1.777] vs [2.353 ± 1.174], $P < 0.01$]。按照年龄、性别分组进行统计分析, 各组 NSCLC 中 LOC440173 的表达差异均不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 敲低 LOC440173 表达对 H520 细胞生物学行为的影响

为了进一步研究 LOC440173 在 NSCLC 细胞中的生物学功能, 进行了细胞功能实验。首先在 LOC440173 高表达的 H520 细胞中, 转染了 4 个针对 LOC440173 设计的 shRNA, 用 qPCR 法检测 LOC440173 的敲低效果, 结果 (图 4A) 显示, sh2-LOC440173 具有较为显著的敲低效果 ($P < 0.01$), 因此选择 sh2-LOC440173 进行后续实验。

MTS 实验结果 (图 4B) 显示, 48 h 起, 与对照组相比较, sh2-LOC440173 组 H520 细胞的增殖能力显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。克隆形成实验结果 (图 4C) 显示, sh2-LOC440173 组 H520 细胞克隆形成率为 (13.00 ± 1.38)%, 与对照组的 (29.00 ± 1.48)% 比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果表明, 敲低 LOC440173 表达可以降低 H520 细胞的体外增殖能力。

Transwell 小室迁移实验 (图 4D) 显示, 在 24 h 时, sh2-LOC440173 组 H520 细胞穿过基底膜的数量显著低于 sh-NC 组 [321 ± 19.31] vs [405.00 ± 13.23] 个, $P < 0.01$ 。结果表明, 敲低 LOC440173 表达可以降低

H520细胞的体外迁移能力。

Transwell小室侵袭实验的结果(图4E)显示,与对照组细胞穿膜数[(323.35±25.17)]个比较,sh2-LOC440173

组穿膜细胞数[(232.00±12.12)个]显著减少,差异具有统计学意义($P<0.05$),提示敲低LOC440173表达可以降低H520细胞的体外侵袭能力。

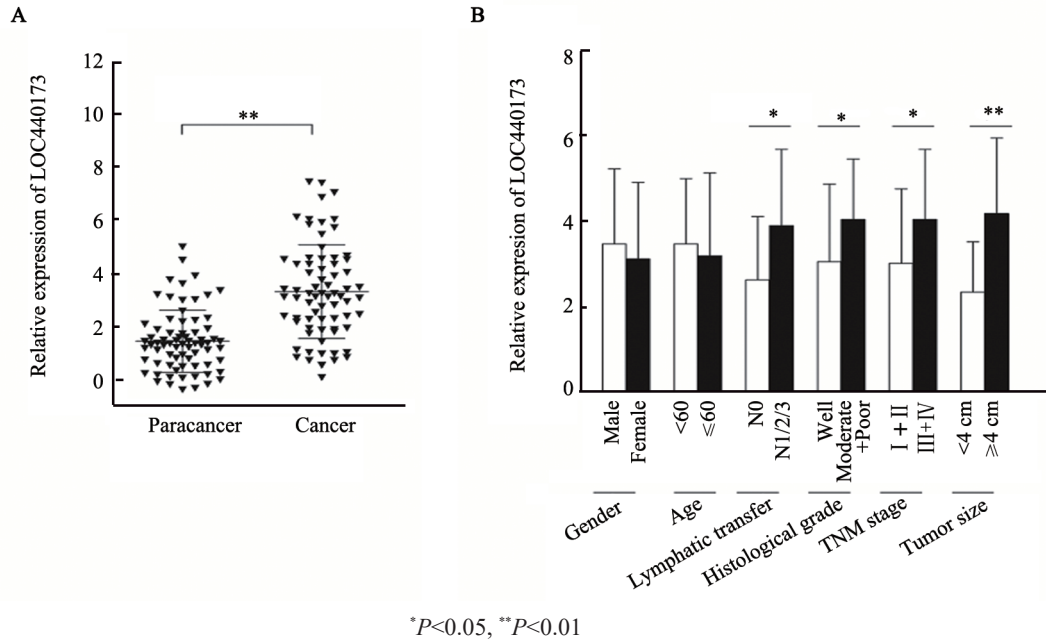


图3 LOC440173在NSCLC及相应癌旁组织中的表达水平(A)及其与临床病理参数的关联情况(B)
Fig.3 Relative expression level of LOC440173 in NSCLC tissues and corresponding paracancer tissues(A), as well as its correlation with clinicopathological characteristics (B)

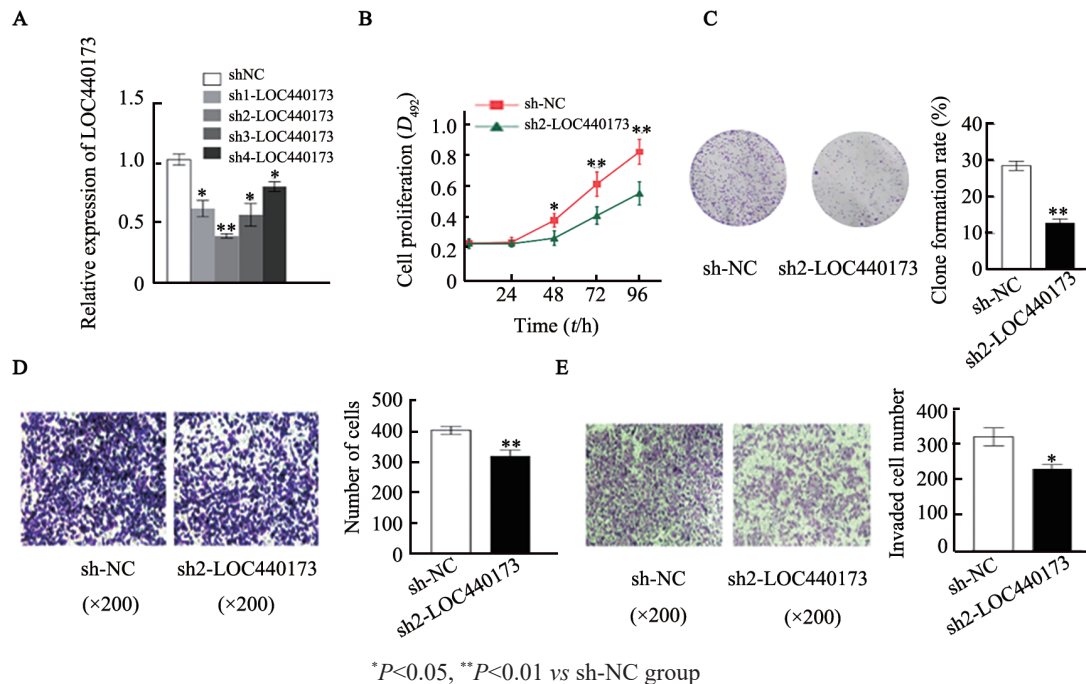


图4 转染sh-LOC440173的干扰效率(A)及敲低LOC440173表达对H520细胞增殖(B-C)、迁移(D)及侵袭能力(E)的影响
Fig.4 The interference efficiency of sh-LOC440173 transfecting (A), and the effects of LOC440173 knockdown on proliferation (B-C), migration (D), and invasion (E) of H520 cells

2.5 过表达LOC440173对H1703细胞生物学行为的影响

由于shRNA敲低基因表达可能会受到脱靶效应的影响,

故本课题组构建了LOC440173过表达载体并转染H1703细胞,观察过表达LOC440173对细胞功能的影响。在LOC440173相对低表达的H1703细胞中转染

了pcDNA3.1-LOC440173, qPCR检测结果(图5A)显示, 转染pcDNA3.1-LOC440173后, LOC440173表达水平明显上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

MTS实验结果(图5B)显示, 与对照组相比较, pcDNA3.1-LOC440173组能够显著促进H1703细胞的增殖, 差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

Transwell小室迁移实验结果(图5C)显示, 在24 h

时, pcDNA3.1-LOC440173组H1703细胞穿过基底膜的数量显著高于对照组[(512.36±11.24)vs(415.68±18.88)个, $P < 0.01$]。

Transwell小室侵袭实验结果(图5D)显示, 与对照组细胞穿膜数(275.32±27.94)个比较, pcDNA3.1-LOC440173组穿膜细胞数显著增加至(347.02±24.52)个, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

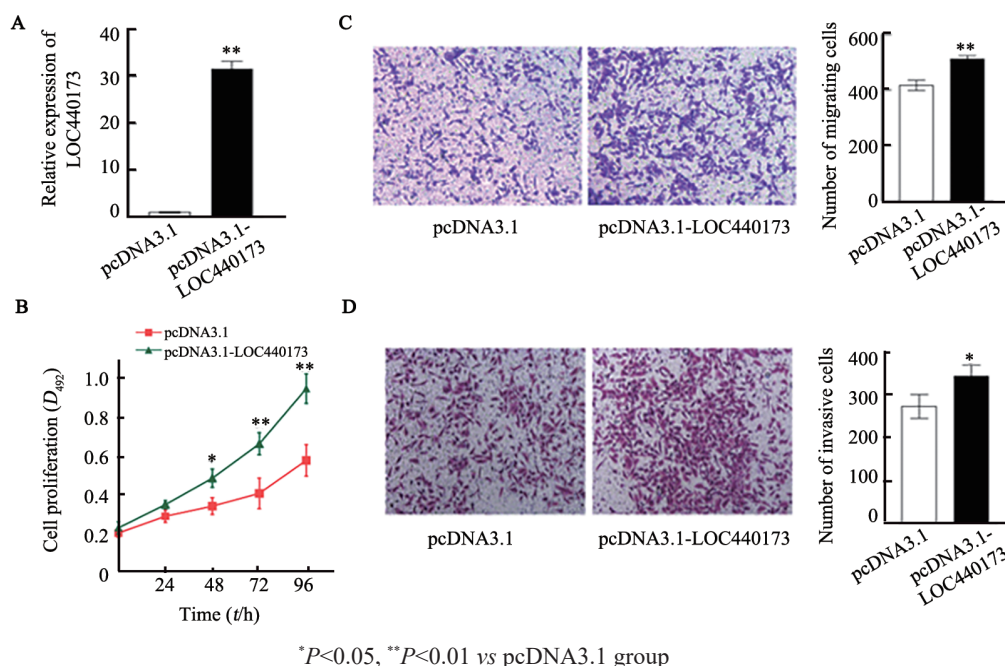


图5 转染后H1703细胞中LOC440173的过表达(A)及过表达LOC440173对H1703细胞增殖(B)、迁移(C)及侵袭能力(D)的影响($\times 200$)

Fig.5 The overexpression of LOC440173 in H1703 cells after transfection (A), and effects of LOC440173 overexpression on proliferation (B), migration (C), and invasion (D) of H1703 cells ($\times 200$)

2.6 LOC440173在转录水平及转录后水平对EMT相关标志物表达的影响

qPCR检测结果显示, 与对照组比较, 敲低LOC440173后(图6A), H520细胞中E-cadherin mRNA表达水平上调($P < 0.01$), N-cadherin mRNA表达水平下调($P < 0.05$), vimentin mRNA表达水平也下调($P < 0.01$); 过表达LOC440173后(图6B), H1703细胞中E-cadherin mRNA表达水平下调($P < 0.01$), N-cadherin mRNA表达水平上调($P < 0.05$), vimentin mRNA表达水平也上调($P < 0.01$), 差异均具有统计学意义。WB检测蛋白质表达结果显示, 与对照组比较, 敲低LOC440173后(图6C), E-cadherin表达上调($P < 0.01$), N-cadherin表达下调($P < 0.05$); 过表达LOC440173后(图6D), E-cadherin表达下调($P < 0.01$), N-cadherin表达上调($P < 0.05$)。

3 讨论

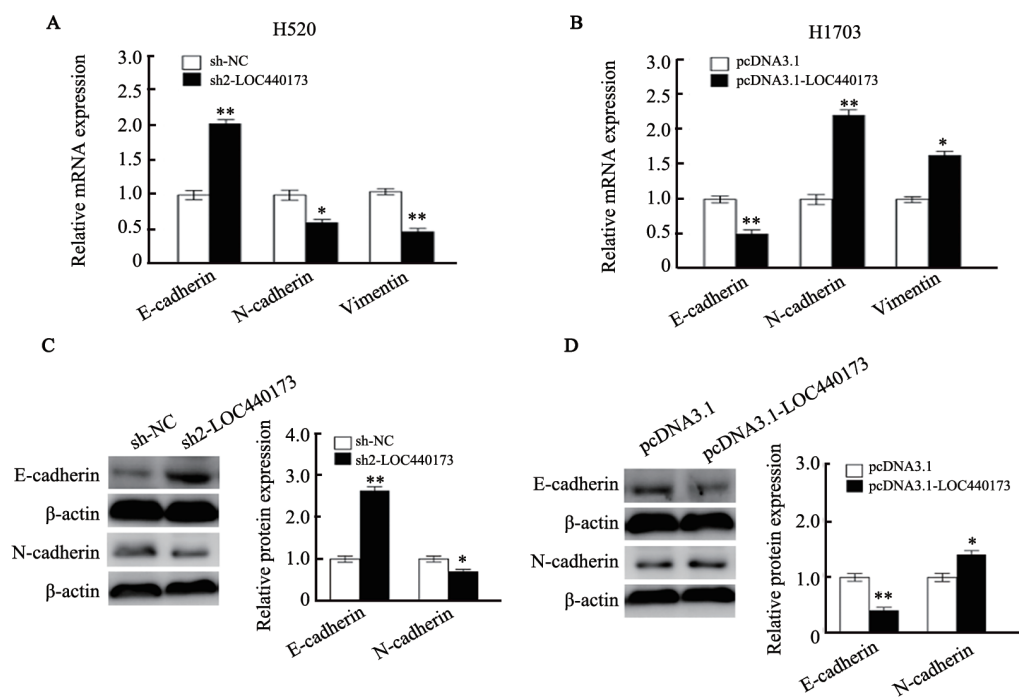
近年来, lncRNA在肿瘤中的重要作用受到了研究

者的关注, 其与肿瘤的发生发展相关, 在多种恶性肿瘤中表达失调, 可能充当癌基因或抑癌基因的角色^[5-6]。研究发现, lncRNA GClnc1促进胃癌细胞的增殖、侵袭和转移, 并可能充当WDR5(WD repeat-containing protein 5)和KAT2A(histone acetyltransferase 2A)复合物的支架, 调控靶基因的转录水平, 促进胃癌发生发展^[7]; lncRNA MALAT1、lncRNA SNHG1及lncRNA HMMR-AS1等的高表达与肺癌的不良预后密切相关^[8-10]。

LOC440173是位于基因间的lncRNA。WEIRICK等^[11]研究发现, LOC440173对肾细胞生长与增殖具有重要作用, 并且其在肾细胞的胞质和胞核中均有表达。研究^[12]发现, LOC440173可通过调控miR-30d-5p/HDAC9通路显著提高食管癌细胞的体外增殖、迁移、侵袭能力。本研究首先通过在线网站分析了LOC440173编码蛋白的能力, 发现其是没有编码蛋白能力的lncRNA; 随后检测发现, LOC440173在6株NSCLC细胞系和癌组织中均呈高表达, 提示LOC440173在NSCLC中可能发挥癌基因的作用。进一步分析LOC440173表达水平

与患者临床病理资料的关系发现, LOC440173 表达水平与患者的淋巴结转移、肿瘤分化程度、TNM 分期和肿瘤大小有关, 提示 LOC440173 的高表达可能促进 NSCLC 发生发展。为了更深入地了解 LOC440173 在 NSCLC 中的生物学作用, 本课题组构建了 LOC440173 敲低或

过表达的 NSCLC 细胞, 发现下调 LOC440173 可抑制 H520 细胞的增殖能力、迁移能力及侵袭能力, 而过表达 LOC440173 后其结果相反, 这与前述的 LOC440173 的表达水平与 NSCLC 患者的肿瘤分化程度、淋巴结转移、TNM 分期和肿瘤大小相关的结论相符。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sh-NC group or pcDNA3.1 group

A: Effect of knockdown of LOC440173 on the expression of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin mRNA in H520 cells detected by qPCR method; B: Effect of overexpression of LOC440173 on the expression of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin mRNA in H1703 cells detected by qPCR method; C: Effect of knockdown of LOC440173 on the expression of E-cadherin and N-cadherin in H520 cells detected by WB experiment; D: Effect of overexpression of LOC440173 on the expression of E-cadherin and N-cadherin in H1703 cells detected by WB experiment

图6 LOC440173 在转录水平及转录后水平对 EMT 相关标志物表达的调控

Fig.6 The regulation of LOC440173 on EMT-related markers at transcriptional and post-transcriptional level

EMT 是与恶性肿瘤侵袭、转移相关的最重要的通路^[13-14]。研究发现, lncRNA TTN-AS1 可通过海绵吸附 miR-142-5p 调节 CDK5 促进肺腺癌的迁移、侵袭和 EMT^[15]; 在细胞中下调 lncRNA FEZF1-AS1 表达可能增加 E-cadherin 和 ZO-1 的表达, 同时抑制 slug、twist 和 vimentin 的表达, 从而抑制 EMT 过程^[16]。WANG 等^[12]研究发现, 在食管鳞癌中 LOC440173 可能通过调控 EMT 相关基因而发挥致癌作用。为了研究 LOC440173 是否参与 NSCLC 的 EMT 进程, 本研究在转录水平和转录后水平上检测了 EMT 相关标志物的表达变化。在转录水平上, 敲低 LOC440173 后, E-cadherin mRNA 的表达水平升高, 间充质相关标志物 N-cadherin mRNA、vimentin mRNA 的表达水平降低; 而过表达 LOC440173 后, 上述分子的表达水平变化与 LOC440173 敲低后相反。在转录后水平上,

LOC440173 负向调节 E-cadherin 蛋白的表达, 正向调节 N-cadherin 蛋白的表达, 提示 LOC440173 有可能参与 EMT 进程并通过调控 EMT 相关标志物的表达促进肺癌细胞迁移和侵袭能力。

根据 lncRNA 在细胞中的定位不同, 其可通过不同途径参与基因表达及各种生物过程的调控^[17]。在细胞质中, lncRNA 可以通过多种方式调控 mRNA 的稳定性, 其中, 作为竞争性内源性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 是目前发现的影响 mRNA 稳定性的最为普遍的作用方式^[18], 且其可通过 ceRNA 机制参与肿瘤的发生和发展^[19-21]。本课题组前期研究已经证实 LOC440173 主要定位于细胞质中(资料待发表), 下一步将通过生物信息软件预测可能与 LOC440173 结合的 miRNA, 同时通过 mRNA 测序寻找下游靶基因, 进一步探索 LOC440173 促进 NSCLC 进展的潜在机制。

综上所述,本研究证实 LOC440173 可提高 NSCLC 细胞的增殖、迁移、侵袭能力并促进 EMT 进程,提示 LOC440173 在 NSCLC 的发生发展中起重要作用,有望成为 NSCLC 治疗的新靶标,这为 NSCLC 的基因治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] ULITSKY I, BARTEL D P. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms[J]. *Cell*, 2013, 154(1): 26-46. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.020.
- [2] LOEWEN G, JAYAWICKRAMARAJAH J, ZHUO Y, et al. Functions of lncRNA HOTAIR in lung cancer[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7: 90 [2021-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25491133/>. DOI:10.1186/s13045-014-0090-4.
- [3] LI J L, LI Z L, ZHENG W Y, et al. lncRNA-ATB: an indispensable cancer-related long noncoding RNA[J/OL]. *Cell Prolif*, 2017, 50(6): e12381 [2021-02-06]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/cpr.12381>. DOI:10.1111/cpr.12381.
- [4] SU M, XIAO Y, TANG J, et al. Role of lncRNA and EZH2 interaction/regulatory network in lung cancer[J]. *J Cancer*, 2018, 9(22): 4156-4165. DOI:10.7150/jca.27098.
- [5] BHAN A, SOLEIMANI M, MANDAL S S. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 3965-3981. DOI:10.1158/0008-5472.can-16-2634.
- [6] PENG W X, KOIRALA P, MO Y Y. lncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(41): 5661-5667. DOI:10.1038/ncr.2017.184.
- [7] SUN T T, HE J, LIANG Q, et al. lncRNA GCInc1 promotes gastric carcinogenesis and may act as a modular scaffold of WDR5 and KAT2A complexes to specify the histone modification pattern[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(7): 784-801. DOI:10.1158/2159-8290.cd-15-0921.
- [8] GUTSCHNER T, HÄMMERLE M, EISSMANN M, et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(3): 1180-1189. DOI:10.1158/0008-5472.can-12-2850.
- [9] CUI Y, ZHANG F, ZHU C, et al. Upregulated lncRNA SNHG1 contributes to progression of non-small cell lung cancer through inhibition of miR-101-3p and activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11): 17785-17794. DOI:10.18632/oncotarget.14854.
- [10] CAI Y, SHENG Z, CHEN Y, et al. lncRNA HMMR-AS1 promotes proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma by regulating miR-138/sirt6 axis[J]. *Aging (Albany N Y)*, 2019, 11(10): 3041-3054. DOI:10.18632/aging.101958.
- [11] WEIRICK T, MILITELLO G, PONOMAREVA Y, et al. Logic programming to infer complex RNA expression patterns from RNA-seq data[J]. *Brief Bioinform*, 2018, 19(2): 199-209. DOI:10.1093/bib/bbw117.
- [12] WANG G, FENG B, NIU Y, et al. A novel long noncoding RNA, LOC440173, promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma by modulating the miR-30d-5p/HDAC9 axis and the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(12): 1392-1408. DOI:10.1002/mc.23264.
- [13] GUGNONI M, CIARROCCHI A. Long noncoding RNA and epithelial mesenchymal transition in cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1924 [2021-02-16]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31003545/>. DOI:10.3390/ijms20081924.
- [14] HAO Y, BAKER D, TEN DIJKE P. TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2767 [2021-02-06]. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/11/2767>. DOI:10.3390/ijms20112767.
- [15] JIA Y, DUAN Y, LIU T, et al. lncRNA TTN-AS1 promotes migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition of lung adenocarcinoma via sponging miR-142-5p to regulate CDK5[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 573 [2021-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31363080/>. DOI:10.1038/s41419-019-1811-y.
- [16] HE R, ZHANG F H, SHEN N. lncRNA FEZF1-AS1 enhances epithelial-mesenchymal transition (EMT) through suppressing E-cadherin and regulating WNT pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 331-338. DOI:10.1016/j.biopha.2017.08.057.
- [17] CHAN J, TAY Y. Noncoding RNA: RNA regulatory networks in cancer [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1310 [2021-02-06]. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/5/1310>. DOI:10.3390/ijms19051310.
- [18] LOU W, DING B, FU P. Pseudogene-derived lncRNAs and their miRNA sponging mechanism in human cancer[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 85 [2021-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32185172/>. DOI:10.3389/fcell.2020.00085.
- [19] ZHANG X N, ZHOU J, LU X J. The long noncoding RNA NEAT1 contributes to hepatocellular carcinoma development by sponging miR-485 and enhancing the expression of the STAT3[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6733-6741. DOI:10.1002/jcp.26371.
- [20] SHI G, CHENG Y, ZHANG Y, et al. Long non-coding RNA LINC00511/miR-150/MMP13 axis promotes breast cancer proliferation, migration and invasion[J/OL]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(3): 165957 [2021-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33031905/>. DOI:10.1016/j.bbadis.2020.165957.
- [21] ZHOU L, LI J, TANG Y, et al. Exosomal lncRNA LINC00659 transferred from cancer-associated fibroblasts promotes colorectal cancer cell progression via miR-342-3p/ANXA2 axis[J/OL]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 8 [2021-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33407563/>. DOI:10.1186/s12967-020-02648-7.

[收稿日期] 2021-03-22

[修回日期] 2021-08-10

[本文编辑] 黄静怡,沈志超