

网络出版时间:2025-02-06 15:09:23 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20250206.1136.001

◇基础医学研究◇

长链非编码 RNA LUCAT1 调控胰腺癌 MIA PaCa-2 细胞恶性机制研究

叶梦洁, 瞿薇薇, 骆广涛

(安徽医科大学附属第一医院乳腺外科, 合肥 230022)

摘要 目的 探究长链非编码 RNA(lncRNA) LUCAT1 对人胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 生物学行为的影响, 探讨 LUCAT1 在胰腺癌恶性进展中的潜在作用。方法 在线数据库 GEPIA 分析 LUCAT1 在胰腺癌中的突变及表达情况; q-PCR 实验检测对比人胰腺导管细胞 HPNE 及人胰腺癌细胞中 LUCAT1 的表达水平; FISH 检测人胰腺癌组织中 LUCAT1 表达及分布。CCK-8 实验和 Transwell 实验检测 LUCAT1 对 MIA PaCa-2 细胞增殖、凋亡、耐药及迁移能力的影响。基因集合富集分析比对 LUCAT1 参与的相关信号通路, Western blot 实验验证蛋白质表达水平。结果 GEPIA 分析结果显示, LUCAT1 在人胰腺癌组织中表达水平上调; q-PCR 实验结果显示, 人胰腺癌细胞中 LUCAT1 高表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。敲低及过表达 LUCAT1 可影响胰腺癌细胞增殖、凋亡、吉西他滨耐药性以及迁移和侵袭能力 ($P < 0.05$)。在胰腺癌中 LUCAT1 影响 p-Akt 表达水平, 并在 Akt 抑制剂 MK-2206 处理后相关功能被抑制。结论 LUCAT1 通过 PI3K-Akt 信号通路调控胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 恶性进展。

关键词 长链非编码 RNA; LUCAT1; 胰腺癌; MIA PaCa-2; 肿瘤耐药; Akt

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0187-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.001

胰腺癌是一种恶性程度极高的消化系统肿瘤, 5 年生存率仅 9%^[1], 其起病隐匿, 早期多表现为非特异性消化道症状且难以诊断。目前临床对于胰腺癌的治疗手段较为有限且治疗效果不佳, 致使胰腺癌成为严重危害人类生命健康的恶性肿瘤之一^[2]。研究^[3]显示, 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 在肿瘤恶性进展中发挥多样的调控作用。lncRNA 肺癌相关转录本 1 (lung cancer-associated transcript 1, LUCAT1) 源于 5 号染色体 q14.3 反义链转录, 起初被认为与肺癌进展相关^[4]。LUCAT1 在多种恶性肿瘤组织中高表达, 如食管癌、胃癌、乳腺癌、肾癌等, 并促进肿瘤的发生发展, 与肿瘤病理分级、TNM 分期等临床指标相关^[5]。LUCAT1 在胰腺癌中的生物学作用鲜有报道, 该研究探讨了 LUCAT1 对胰腺癌进展的影响及其相关机制, 旨在为胰腺癌治疗提供理论依据和新方向。

1 材料与方法

2024-10-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82002534); 安徽省转化医学研究院科研基金 (编号: 2022zhxy-C71)

作者简介: 叶梦洁, 男, 硕士研究生;

骆广涛, 男, 主治医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: luoguangtao@outlook.com

1.1 主要材料 本研究中 MIA PaCa-2 细胞购自中科院上海细胞库。RPMI-1640 培养基 (货号: 11875176)、10% 胎牛血清 (货号: 16140089) 购自美国 Thermo Fisher 公司, RNA 反转录试剂盒 (货号: MR05401S)、q-PCR 试剂盒 (货号: MQ00401S) 购自武汉莫纳生物科技有限公司, CCK-8 试剂盒 (货号: CK04) 购自日本同仁化学公司, Transwell 小室 (货号: 14342) 购自安徽甄选生物科技有限公司, Akt 蛋白一抗 (货号: 80722)、p-Akt 蛋白一抗 (货号: 13038) 购自美国 CST 公司, P53 蛋白一抗 (货号: T40060) 购自上海艾比玛特生物医药科技有限公司, β -actin 蛋白一抗 (货号: 60008)、山羊抗兔 IgG 二抗 (货号: PR30011)、山羊抗小鼠 IgG 二抗 (货号: PR30012) 购自于武汉三鹰生物科技有限公司。

1.2 细胞培养与 siRNA 干扰 MIA PaCa-2 细胞用添加 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基、置于 5% CO_2 、37 °C 细胞培养箱中培养。转染前预先将 MIA PaCa-2 细胞接种至 6 孔板中 (使用无双抗培养基), 通常细胞融合度约为 50% 时适宜转染。用 100 μl Opti-MEM 稀释 0.1 nmol siRNA 或 2.3 μg 过表达质粒载体, 轻柔吹吸混匀; 用 100 μl Opti-MEM 稀释 5 μl Lipo-2000, 轻柔吹吸混匀, 室温静置 5 min; 混合以上两者的稀释液并轻柔吹吸, 室温静置 20

min。将静置过的转染复合物加入6孔板中,轻摇细胞板混合均匀。将细胞板置于5% CO₂, 37℃恒温培养箱中培养,转染4~6 h后换液。

本研究中使用到的小干扰RNA序列为si-LUCAT1#1: 5'-GCUCCUUUCCUCACAAGAA-3'; si-LUCAT1#2: 5'-CACACUAUGUGUUCUGACU-3', 委托安徽通用生物科技有限公司合成; LUCAT1基因表达载体及阴性对照空载委托北京擎科生物科技有限公司合成; 以si-NC表示小干扰RNA阴性对照, 以si-LUCAT1#1、si-LUCAT1#2表示LUCAT1敲低; 以Vec表示过表达对照组, 以Vec-LUCAT1表示LUCAT1过表达。

1.3 q-PCR实验 将转染后的各组细胞通过TRIzol法提取细胞总RNA, 并测定RNA浓度。根据反转录试剂盒步骤说明, 取每组1 μg总RNA反转录成cDNA, 并稀释20倍后用以q-PCR实验。q-PCR反应体系20 μl, 其中SYBR预混液10 μl、上下游引物各0.4 μl及经稀释的cDNA模版9.2 μl。体系配置完毕后将八连管放入qPCR仪中, 并按三步法程序(变性-退火-延伸)进行反应: 95℃, 70 s; 55~65℃, 10 s; 72℃, 30 s。将β-actin作为内参基因, 用2^{-ΔΔC_T}法计算LUCAT1基因mRNA相对表达量。引物序列: LUCAT1上游5'-TTGGCACCAGAGACCA-CAAA-3', LUCAT1下游5'-GGGCGACAGAGCGAA-ACTCT-3'; β-actin上游序列5'-CCTTCCTGGGCAT-GGAGTC-3', β-actin下游序列5'-TGATCTCATTGT-GCTGGGTG-3'。引物委托安徽通用生物科技有限公司合成。

1.4 细胞增殖实验 将转染后的各组细胞分别接种于96孔板, 每孔细胞量约1×10⁴个, 每个样本设置4个复孔, 分别在培养1、3、5、7 d后每孔加入10 μl CCK-8溶液, 使用酶标仪在450 nm波长测定吸光度(optical density, OD)值。计算转染组与对照组每天OD值相对比得到各组细胞增殖率。

1.5 细胞迁移实验 用无血清培养基将转染后的各组细胞密度调整至1×10⁶个/ml, 取100 μl细胞悬液加入Transwell普通和铺有基质胶的小室上室, 将10%胎牛血清的培养加入小室下室, 培养24 h。用90%乙醇固定小室底部细胞, 0.1%结晶紫染色后置于显微镜下随机选取3个视野计数。

1.6 吉西他滨细胞毒性实验 通过CCK-8实验检测经转染后MIA PaCa-2的吉西他滨半数抑制浓度(50%-inhibiting concentration, IC₅₀)。将转染后的各组细胞分别接种于96孔板, 每孔细胞量约0.5×

10⁴个, 每个样本设置3个重复。待细胞贴壁后, 加入提前配置的含不同浓度吉西他滨(0、5、10、20、30、40、50、60、120 μmol/L)的完全培养基培养, 48 h后每孔加入10 μl CCK-8溶液, 450 nm波长测定OD值。计算不同浓度加药组与对照组OD值相对比得到各组细胞活力。

1.7 Western blot法检测蛋白表达 收集转染后的各组细胞, 加入RIPA裂解液提取细胞总蛋白, 并测定蛋白浓度。配置聚丙烯酰胺凝胶, 根据蛋白浓度统一各组上样浓度进行凝胶电泳分离, 将分离后的蛋白转印至聚偏氟乙烯膜, 并于5%脱脂牛奶中封闭1 h。4℃一抗孵育过夜, 磷酸盐吐温缓冲液洗膜, 二抗孵育1 h, 洗膜后曝光显影。

1.8 流式细胞术 离心收集悬浮细胞, 用冷磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞2次。用400 μl 1×Amexin V结合液重新悬浮细胞, 浓度约为1×10⁶个/ml。在细胞悬浮液中加入5 μl Annexin V-PITC (EGFP/Alexa Fluor488)染色液, 轻轻混匀后于2~8℃避光条件下孵育15 min。加入5~10 μl PI染色液后轻轻混匀于2~8℃避光条件下孵育2~5 min, 随后立即用流式细胞仪检测。

1.9 荧光原位杂交实验(fluorescence in situ hybridization, FISH) 首先将石蜡切片脱蜡至水, 根据组织固定时间长短, 于修复液中煮沸10~15 min, 自然冷却。用基因笔画圈, 滴加蛋白酶K消化10 min。纯水冲洗后PBS清洗。于组织上滴加破膜液, 破膜20 min。滴加阻断剂室温避光孵育15 min, 将玻片置于PBS中在脱色摇床上晃动洗涤。杂交液按照1/100的浓度加入鲑鱼精液体, 然后滴加于切片37℃孵育1 h。倾去预杂交液, 用杂交液稀释探针, 滴加含探针杂交液, 恒温箱42℃杂交过夜。洗去杂交液, 滴加带有标记的链霉亲和素, 室温孵育15 min。显色剂孵育, 复染细胞核, 封片, 显微镜检, 图像采集分析。LUCAT1探针: 5'-TTGTGCTCTCTG-GTGCCAAG-3', 委托哈尔滨金开瑞生物科技有限公司合成。胰腺癌组织来源于安徽医科大学第一附属医院病理科, 本研究已通过伦理委员会审核(批准号: 20200220)。

1.10 基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA) 从TCGA数据库准备表达数据集和基因数据集, 计算富集得分, 评估富集得分的显著性, 通过基于表型的排列检验来计算观察到的富集得分出现的可能性, 进行多重假设检验校正, 设置筛选条件: adjP < 0.05, 最终分析相关分子信号通路。

1.11 泛癌分析 通过在线数据库 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 分析 LUCAT1 在泛癌中肿瘤及肿瘤旁组织的相对表达水平。选取在线数据库中若干例数肿瘤患者及健康患者的器官组织并检测 LUCAT1 表达水平,以点图形式呈现,初步验证 LUCAT1 在各类肿瘤中的表达情况。

1.12 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验均至少完成 3 次以上生物学重复实验,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析。计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LUCAT1 在胰腺癌中的表达情况 在线数据库 GEPIA 分析结果显示,lncRNA LUCAT1 在胰腺癌

肿瘤组织的表达明显高于癌旁组织,差异倍数 > 2 ($P < 0.05$,图 1A)。通过 q-PCR 实验分别检测人胰腺导管细胞 HPNE 及人胰腺癌细胞 PANC-1、MIA PaCa-2、AsPC-1、CFPAC-1 中 LUCAT1 的表达水平,结果显示胰腺癌细胞 LUCAT1 表达水平均高于 HPNE ($t_{\text{MIA PaCa-2}} = 3.455$, $P_{\text{MIA PaCa-2}} < 0.05$; $t_{\text{AsPC-1}} = 5.876$, $P_{\text{AsPC-1}} < 0.001$; $t_{\text{PANC-1}} = 23.530$, $P_{\text{PANC-1}} < 0.0001$; $t_{\text{CFPAC-1}} = 23.580$, $P_{\text{CFPAC-1}} < 0.0001$,图 1B)。通过 FISH 检测人胰腺癌组织中 LUCAT1 表达及分布,结果显示相对于癌旁组织,LUCAT1 在胰腺癌组织中广泛表达且主要定位于细胞核 ($P < 0.05$,图 1C)。

2.2 LUCAT1 对胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 增殖、凋亡的影响 使用 q-PCR 实验分别检测 MIA PaCa-2 经 siRNA 和质粒转染后 LUCAT1 的表达情况,结果显示,与 si-NC 组比较,si-LUCAT1#1 组、si-LUC-

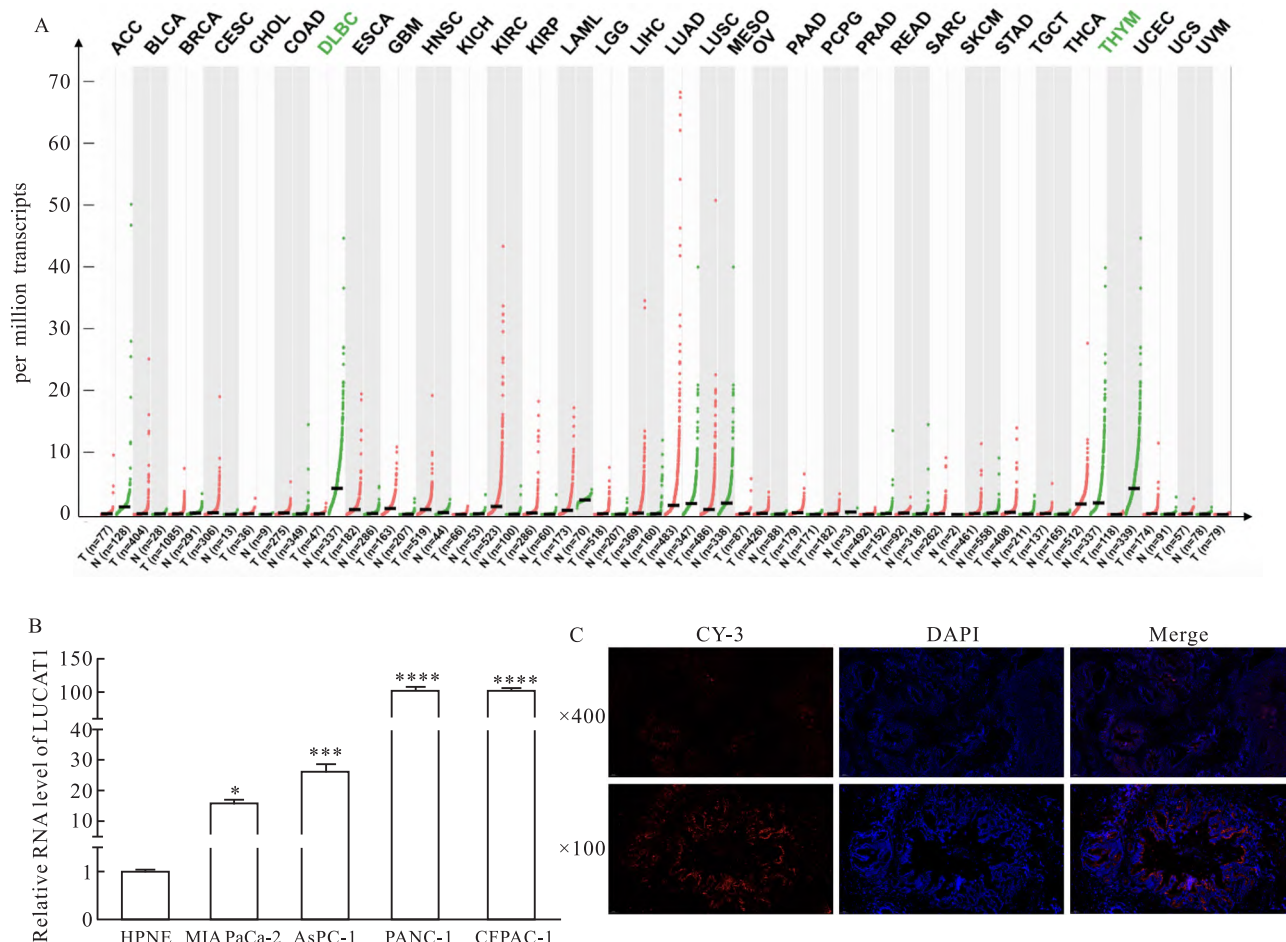


图1 LUCAT1 在人胰腺癌中的表达情况

Fig.1 The expression of LUCAT1 in human pancreatic cancer

A: The expression of LUCAT1 in various tumors and paratumoral tissues in GEPIA database; B: q-PCR detection of the expression of LUCAT1 in different pancreatic cancer cell lines; C: FISH detection of the expression and distribution of LUCAT1 in human pancreatic cancer tissues; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs HPNE group.

AT1#2 组 LUCAT1 RNA 水平下调 ($t_{\text{si-LUCAT1\#1}} = 25.800$, $P_{\text{si-LUCAT1\#1}} < 0.0001$; $t_{\text{si-LUCAT1\#2}} = 30.600$, $P_{\text{si-LUCAT1\#2}} < 0.0001$, 图 2A); 与空载组比较, 经转染 LUCAT1 表达质粒载体后 LUCAT1 RNA 表达水平上调 ($t = 26.130$, $P < 0.0001$, 图 2A)。

CCK-8 实验检测经转染后 MIA PaCa-2 的增殖能力, 结果显示, si-LUCAT1#1 组、si-LUCAT1#2 组细胞增殖率低于 si-NC 组 ($t_{\text{si-LUCAT1\#1}} = 7.212$, $P_{\text{si-LUCAT1\#1}} < 0.001$; $t_{\text{si-LUCAT1\#2}} = 5.438$, $P_{\text{si-LUCAT1\#2}} < 0.01$, 图 2B); LUCAT1 过表达增殖率显著高于空载组 ($t = 6.163$, $P < 0.001$, 图 2B)。通过流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况, 结果显示, si-LUCAT1#1 组、si-LUCAT1#2 组细胞凋亡率高于 si-NC 组 ($t_{\text{si-LUCAT1\#1}} = 12.890$, $P_{\text{si-LUCAT1\#1}} < 0.0001$; $t_{\text{si-LUCAT1\#2}} = 23.780$, $P_{\text{si-LUCAT1\#2}} < 0.0001$, 图 2C); LUCAT1 过表达凋亡率低于空载组 ($t = 14.760$, $P < 0.0001$, 图 2C)。

2.3 LUCAT1 对胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 迁移能

力的影响 Transwell 实验结果显示, 与 si-NC 组比较, si-LUCAT1#1 组、si-LUCAT1#2 组迁移细胞数目减少 ($t_{\text{si-LUCAT1\#1}} = 7.587$, $P_{\text{si-LUCAT1\#1}} < 0.0001$; $t_{\text{si-LUCAT1\#2}} = 8.331$, $P_{\text{si-LUCAT1\#2}} < 0.0001$, 图 3A), LUCAT1 过表达后细胞迁移数目增多 ($t = 8.113$, $P < 0.0001$, 图 3A)。同样, 划痕实验结果表明, LUCAT1 敲低抑制细胞迁移能力 ($t_{\text{si-LUCAT1\#1}} = 8.406$, $P_{\text{si-LUCAT1\#1}} < 0.0001$; $t_{\text{si-LUCAT1\#2}} = 8.765$, $P_{\text{si-LUCAT1\#2}} < 0.0001$, 图 3B), LUCAT1 过表达促进细胞迁移能力 ($t = 8.430$, $P < 0.0001$, 图 3B)。

2.4 LUCAT1 对胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 吉西他滨化疗敏感性的影响 CCK-8 实验结果显示, 与 si-NC 组比较, si-LUCAT1#1 组、si-LUCAT1#2 组吉西他滨 IC_{50} 降低, 过表达组则上调 (Control 组、si-NC 组、si-LUCAT1#1 组、si-LUCAT1#2 组、Vec 组、Vec-LUCAT1 组的 IC_{50} 分别为 30.05、30.91、24.10、19.89、31.68、43.91 $\mu\text{mol/L}$, 图 4)。

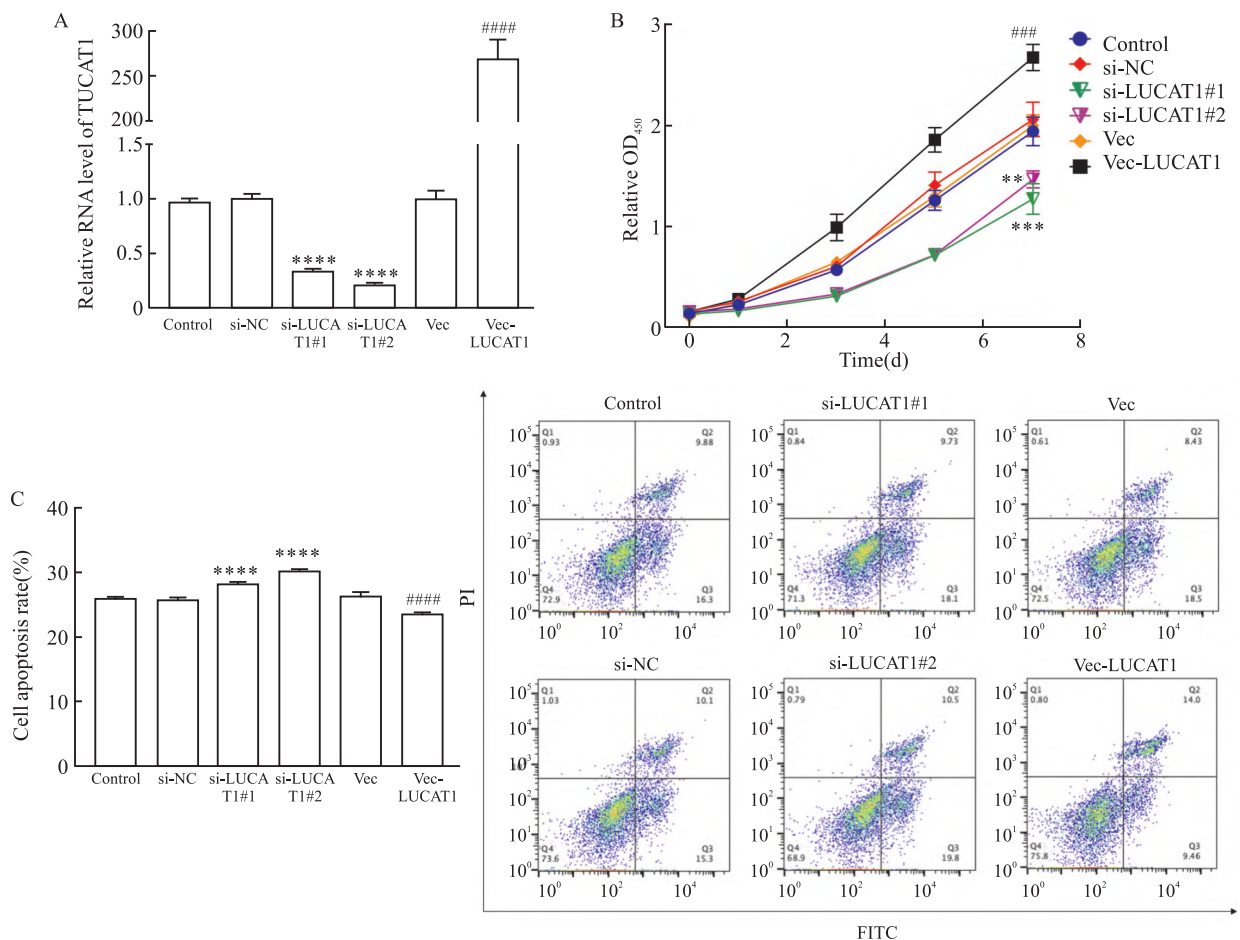


图 2 LUCAT1 对胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 增殖、凋亡的影响

Fig. 2 Effect of LUCAT1 on the proliferation and apoptosis of MIA PaCa-2 in pancreatic cancer cells

A: q-PCR detection of the expression of LUCAT1 in MIA PaCa-2 after siRNA and plasmid transfection; B: CCK-8 assay detection of the proliferation ability of MIA PaCa-2 after transfection; C: Flow cytometry results of the apoptosis of MIA PaCa-2 after transfection; * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ vs si-NC group; #### $P < 0.001$, ##### $P < 0.0001$ vs Vec group.

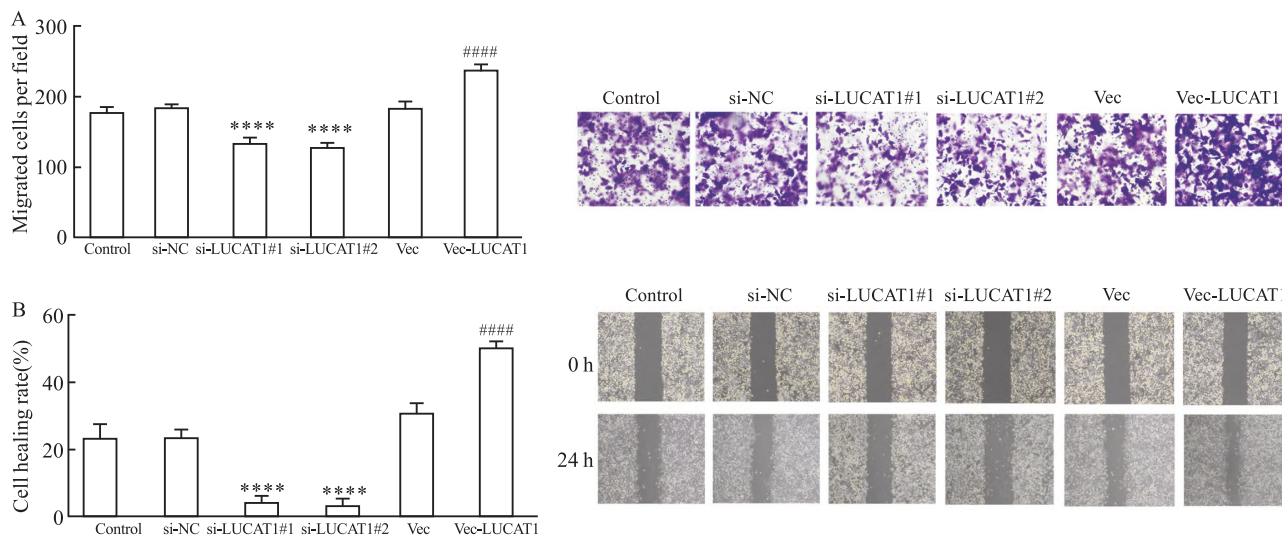


图3 LUCAT1对胰腺癌细胞MIA PaCa-2迁移能力的影响

Fig. 3 Effect of LUCAT1 on the migration ability of MIA PaCa-2 in pancreatic cancer cells

A: Transwell assay detection of the migration ability of MIA PaCa-2 after transfection $\times 5$; B: The scratch assay detection of the healing ability of MIA PaCa-2 after transfection $\times 5$; **** $P < 0.0001$ vs si-NC group; #### $P < 0.0001$ vs Vec group.

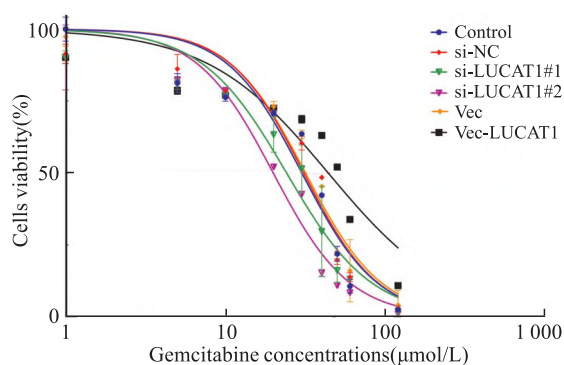


图4 LUCAT1对胰腺癌细胞MIA PaCa-2对吉西他滨化疗敏感性的影响

Fig. 4 Effect of LUCAT1 on the sensitivity of MIA PaCa-2 to gemcitabine chemotherapy in pancreatic cancer cells

2.5 LUCAT1 调控 Akt 信号通路 通过 GSEA 将 LUCAT1 高表达胰腺癌患者差异基因 ($\text{adj}P < 0.05$) 与肿瘤相关信号通路因子比对, 分析结果显示 (图 5A) PI3K-Akt、P53 等信号通路富集。Western blot 实验验证被富集信号通路的关键蛋白 (图 5B), LUCAT1 被敲低后, p-Akt 表达降低; 将 LUCAT1 过表达后 p-Akt 表达上调。在 LUCAT1 过表达同时使用 Akt 抑制剂 MK-2206 处理细胞, 发现 p-Akt 表达较过表达组减少。p-P53 蛋白表达随 LUCAT1 表达改变无明显变化。

Transwell 实验结果显示, 过表达 LUCAT1 后

MIA PaCa-2 迁移能力可被 MK-2206 抑制 (图 5C:

$t_{\text{Vec-LUCAT1}} = 7.528$, $P_{\text{Vec-LUCAT1}} < 0.001$; $t_{\text{Vec-LUCAT1} + \text{MK-2206}} = 7.009$, $P_{\text{Vec-LUCAT1} + \text{MK-2206}} < 0.001$); CCK-8 实验检测 MIA PaCa-2 的增殖能力, 结果显示, 在 LUCAT1 高表达的情况下, MK-2206 处理组的 MIA PaCa-2 细胞增殖能力被抑制 (图 5D: $t_{\text{Vec-LUCAT1}} = 8.748$, $P_{\text{Vec-LUCAT1}} < 0.01$; $t_{\text{Vec-LUCAT1} + \text{MK-2206}} = 9.482$, $P_{\text{Vec-LUCAT1} + \text{MK-2206}} < 0.001$); 用吉西他滨 MIA PaCa-2 细胞 IC_{50} 浓度处理, CCK-8 实验检测各组 MIA PaCa-2 的细胞活力, 结果显示, MK-2206 可降低 MIA PaCa-2 细胞中 LUCAT1 高表达所提升的吉西他滨耐药性 (图 5E: $t_{\text{Vec-LUCAT1}} = 17.320$, $P_{\text{Vec-LUCAT1}} < 0.0001$; $t_{\text{Vec-LUCAT1} + \text{MK-2206}} = 11.010$, $P_{\text{Vec-LUCAT1} + \text{MK-2206}} < 0.001$)。

3 讨论

LncRNA LUCAT1 在多种恶性肿瘤中差异表达并通过不同调控方式影响肿瘤发生发展的作用。研究^[6]表明, LUCAT1 可以和多梳抑制复合物 2 形成复合体, 抑制 p21 与 p53, 进而增强非小细胞肺癌细胞在体内外的增殖能力。研究^[7]表明, LUCAT1 还可通过泛素化、甲基化等多种方式促进食管癌的发生。此外, LUCAT1 可通过下调 DNA 甲基转移酶 1 从而促进食管癌细胞增殖转移^[7]。然而, lncRNA LUCAT1 在胰腺癌发生发展中的作用机制尚未明确。本研究结合在线数据库 GEPIA 分析发现, LUCAT1 在肺癌、肝癌、胰腺癌等恶性肿瘤中表达上

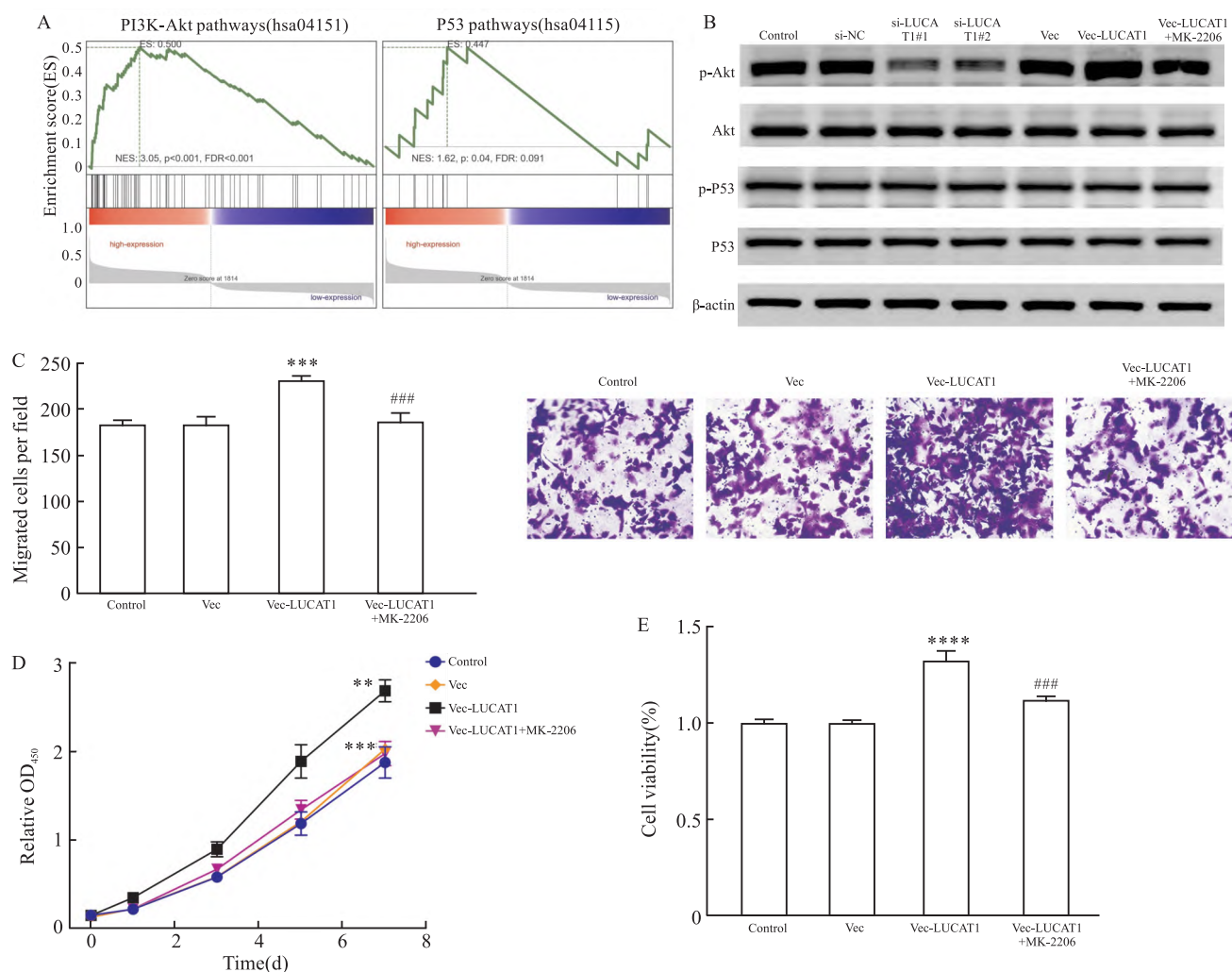


图5 LUCAT1 调控 Akt 信号通路

Fig. 5 LUCAT1 regulated Akt signaling pathway

A: GSEA gene enrichment analysis; B: Western blot assay detection of protein expression; C: Transwell assay detection of the effect of MK-2206 on the migration ability of MIA PaCa-2 cells $\times 5$; D: CCK-8 assay detection of the effect of MK-2206 on the proliferation ability of MIA PaCa-2 cells after LUCAT1 overexpression; E: CCK-8 assay detection of the effect of MK-2206 on gemcitabine resistance in MIA PaCa-2 cells after LUCAT1 overexpression; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Vec group; ### $P < 0.001$ vs Vec-LUCAT1 group.

调。Transwell 实验结果提示, LUCAT1 促进 MIA PaCa-2 迁移能力。CCK-8 及流式细胞术实验结果表明, LUCAT1 对于 MIA PaCa-2 细胞具有促进增殖、抑制凋亡以及促进对吉西他滨耐药的作用。上述结果初步提示, LUCAT1 在胰腺癌中可能具有促进肿瘤进展的作用。

LUCAT1 可通过与 miRNA、RNA 结合蛋白 (RNA-binding protein, RBP) 或直接结合肿瘤相关基因启动子区域等多种方式影响肿瘤进展。在乳腺癌中^[8], LUCAT1 通过吸附 miRNA, 间接激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 促进乳腺癌细胞干性。另有研究^[9]表明, LUCAT1 在大肠癌中可间接活化 P53 信

号通路进而促进肿瘤进展。本研究通过 FISH 实验验证了 LUCAT1 在胰腺癌组织中的表达及分布情况, LUCAT1 在胰腺癌组织中广泛分布且主要定位于细胞核, 进一步印证了 LUCAT1 可能参与的分子调控机制。为了寻找 LUCAT1 调控胰腺癌进展的具体机制, 本研究通过 GSEA 预测下游信号通路: PI3K-Akt、P53 等信号通路被显著富集。经 Western blot 验证, 发现 p-Akt 蛋白水平随 LUCAT1 表达水平波动, 当 LUCAT1 被敲低时, p-Akt 蛋白水平下调; 过表达 LUCAT1 后则上升, 且该现象可被 MK-2206 逆转。P53 蛋白水平无明显变化。因此认为 PI3K-Akt 信号通路可能与 LUCAT1 密切相关。尽管目前少有

报道阐述胰腺癌中 LUCAT1 与 PI3K-Akt 信号通路之间的具体关系,但鉴于其 lncRNA 的特性,亦有报道证实了 PI3K-Akt 信号通路可影响胰腺癌吉西他滨耐药性^[10],LUCAT1^[11-14]或通过充当 miRNA“分子海绵”、或与 RBP 结合、或直接结合癌与抑癌基因 DNA 等方式影响 PI3K-Akt 信号通路活性水平。

Akt 是一类由 Akt1、Akt2 和 Akt3 亚型组成的功能性致癌蛋白,主要通过调控细胞增殖、凋亡和糖代谢等功能来发挥其生物学效应。其中 p-Akt 是 Akt 最重要的活化形式,p-Akt 不仅可以联合细胞内的生长因子和凋亡蛋白抑制肿瘤细胞的凋亡,还可以干预自噬相关信号通路影响肿瘤细胞自噬性凋亡,这与本研究中的功能实验结果一致,过表达 LUCAT1 的 MIA PaCa-2 增殖和抗凋亡能力显著促进;MK-2206 是一种 Akt 小分子变构抑制剂,主要通过影响 Akt 的磷酸化过程,在用 MK-2206 处理后,MIA PaCa-2 增殖能力则有所减弱,MK-2206 还可影响胰腺癌细胞对吉西他滨耐药性^[10],这说明 p-Akt 是 LUCAT1 在 MIA PaCa-2 中调控肿瘤生物学功能的重要直接或者间接靶向因子。此外,Akt 调控肿瘤微环境的形成,其中不乏 lncRNA 的参与。研究^[15]显示,HIF-1 α 的反义 RNA 在吉西他滨耐药的胰腺癌细胞中显著升高,其通过上调 HIF-1 α 表达,从而促进糖酵解,增强胰腺癌细胞的吉西他滨抵抗力。LUCAT1 也是一种可被 HIF-1 α 诱导的 lncRNA^[16]。本研究虽然初步验证了 LUCAT1 与 PI3K-Akt 信号通路的相关性,但尚未明确其具体分子机制。Akt 作为肿瘤中高丰度表达且活跃的信号分子,其上下游通路及其相关调控因子也具有研究意义,如 mTOR、VEGF、MAPK 等,LUCAT1 与 Akt 及其信号通路网络的关系和具体机制有待继续研究。

本研究存在一定局限性:初步探究了 LUCAT1 在胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 中的功能和机制,有待在其他胰腺癌细胞系中进一步证实 LUCAT1 对胰腺癌细胞恶性表型的影响。初步表明 LUCAT1 可调控 Akt 信号通路表达,但具体机制有待进一步探究。未来需深入寻找可能与 LUCAT1 结合的 miRNA 或 RBP,并通过双荧光素酶报告实验、RNA pulldown、RIP 等实验来进一步验证。LUCAT1 表达水平与病理特征之间的关联需结合临床病例样本从而进一步商榷 LUCAT1 作为胰腺癌诊断及预后标志物的可靠性。

综上所述,本研究发现 LUCAT1 在胰腺癌组织中高表达,在体外实验中可促进胰腺癌细胞 MIA

PaCa-2 增殖、迁移能力,抑制细胞凋亡,促进对吉西他滨耐药,并初步探究了 LUCAT1-Akt 轴可能是促进胰腺癌进展的重要信号通路。本研究拓展了 LUCAT1 在胰腺癌中的功能及其调控机制,并为临床肿瘤诊断标志物及靶向治疗提供理论依据和新思路。

参考文献

- [1] Giaquinto A N, Miller K D, Tossas K Y, et al. Cancer statistics for African American/black people 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(3): 202-29. doi:10.3322/caac.21718.
- [2] Rahib L, Smith B D, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States[J]. Cancer Res, 2014, 74(11): 2913-21. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0155.
- [3] Slack F J, Chinnaiyan A M. The role of non-coding RNAs in oncology[J]. Cell, 2019, 179(5): 1033-55. doi:10.1016/j.cell.2019.10.017.
- [4] Shen X, Zhang Y, Wu X, et al. Upregulated lncRNA-PCAT1 is closely related to clinical diagnosis of multiple myeloma as a predictive biomarker in serum[J]. Cancer Biomark, 2017, 18(3): 257-63. doi:10.3233/CBM-160158.
- [5] Xing C, Sun S G, Yue Z Q, et al. Role of lncRNA LUCAT1 in cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134: 111158. doi:10.1016/j.biopha.2020.111158.
- [6] Sun Y, Jin S D, Zhu Q, et al. Long non-coding RNA LUCAT1 is associated with poor prognosis in human non-small lung cancer and regulates cell proliferation via epigenetically repressing p21 and p57 expression[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 28297-311. doi:10.18632/oncotarget.16044.
- [7] Yoon J H, You B H, Park C H, et al. The long noncoding RNA LUCAT1 promotes tumorigenesis by controlling ubiquitination and stability of DNA methyltransferase 1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2018, 417: 47-57. doi:10.1016/j.canlet.2017.12.016.
- [8] Zheng A, Song X, Zhang L, et al. Long non-coding RNA LUCAT1/miR-5582-3p/TCF7L2 axis regulates breast cancer stemness via Wnt/ β -catenin pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 305. doi:10.1186/s13046-019-1315-8.
- [9] Zhou Q, Hou Z, Zuo S, et al. LUCAT1 promotes colorectal cancer tumorigenesis by targeting the ribosomal protein L40-MDM2-p53 pathway through binding with UBA52[J]. Cancer Sci, 2019, 110(4): 1194-207. doi:10.1111/cas.13951.
- [10] 骆广涛, 汤为香, 裴正军. 低氧条件下 Akt 抑制剂 MK-2206 增强胰腺癌细胞对吉西他滨敏感性的作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(2): 166-71. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.003.
- [10] Luo G T, Tang W X, Qiu Z J. Mechanism of Akt inhibitor MK-2206 in enhancing the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine under hypoxia[J]. Acta Univ Med Anhui, 2020, 55

- (2): 166 – 71. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 – 1492. 2020. 02. 003.
- [11] Wang X, Guo S, Zhao R, et al. STAT3-Activated long non-coding RNA lung cancer associated transcript 1 drives cell proliferation, migration, and invasion in hepatoblastoma through regulation of the miR-301b/STAT3 axis[J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30 (6): 702 – 13. doi:10.1089/hum.2018.146.
- [12] Cao W, Zhang H F, Ding X L, et al. The progression of pancreatic cancer cells is promoted by a long non-coding RNA LUCAT1 by activating AKT phosphorylation[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(2): 738 – 48. doi:10.26355/eurev_202101_24635.
- [13] Huan L, Guo T, Wu Y, et al. Hypoxia induced LUCAT1/PTBP1 axis modulates cancer cell viability and chemotherapy response [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 11. doi:10.1186/s12943 – 019 – 1122 – z.
- [14] Lou Y, Yu Y, Xu X, et al. Long non-coding RNA LUCAT1 promotes tumourigenesis by inhibiting ANXA2 phosphorylation in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(3): 1873 – 84. doi:10.1111/jcmm.14088.
- [15] Xu F, Huang M, Chen Q, et al. LncRNA HIF1A-AS1 promotes gemcitabine resistance of pancreatic cancer by enhancing glycolysis through modulating the AKT/YB1/HIF1 α pathway [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(22): 5678 – 91. doi:10.1158/0008 – 5472. CAN – 21 – 0281.
- [16] Huan L, Guo T, Wu Y, et al. Hypoxia induced LUCAT1/PTBP1 axis modulates cancer cell viability and chemotherapy response [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 11. doi:10.1186/s12943 – 019 – 1122 – z.

Study on the mechanism of long non-coding RNA LUCAT1 regulating the malignancy of pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells

Ye Mengjie, Qu Weiwei, Luo Guangtao

(Dept of Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of long non-coding RNA LUCAT1 (lncRNA LUCAT1) on the biological behavior of MIA PaCa-2 in human pancreatic cancer cells, and to explore the potential role of LUCAT1 in the malignant progression of pancreatic cancer. **Methods** The mutation and expression of LUCAT1 in pancreatic cancer were analyzed by GEPIA, the expression levels of LUCAT1 in human pancreatic ductal cells HPNE and human pancreatic cancer cells were detected by q-PCR, and the expression and distribution of LUCAT1 in human pancreatic cancer tissues were detected by FISH. CCK-8 assay and Transwell assay were used to detect the effects of LUCAT1 on the proliferation, apoptosis, drug resistance, and migration of MIA PaCa-2 cells. Gene ensemble enrichment analysis was performed to compare the related signaling pathways involved in LUCAT1, and Western blot assay was used to verify the protein expression level. **Results** The results of GEPIA analysis showed that the expression level of LUCAT1 in human pancreatic cancer tissues was up-regulated, and the expression of LUCAT1 in human pancreatic cancer cells was significantly higher ($P < 0.05$). Knockdown and overexpression of LUCAT1 could affect the proliferation, apoptosis, gemcitabine resistance, migration and invasion of pancreatic cancer cells, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). In addition, LUCAT1 affected p-Akt expression levels in pancreatic cancer and was inhibited after treatment with Akt inhibitor MK-2206. **Conclusion** LUCAT1 regulates the malignant progression of MIA PaCa-2 in pancreatic cancer cells through the PI3K-Akt signaling pathway. **Key words** long non-coding RNA; LUCAT1; pancreatic cancer; MIA PaCa-2; tumor drug resistance; Akt **Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 82002534); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2022zhxy-C71) **Corresponding author** Luo Guangtao, E-mail: luoguangtao@outlook.com