

• 论 著 •

lncRNA-KAT7 对肺癌细胞侵袭迁移能力的影响*

雷 鸣¹,王晴美²,龚永禄¹,杜 维¹,邓 毅¹,罗迪贤^{2△}

1. 湖南省常德市第一人民医院检验科,湖南常德 415003;2. 南华大学转化医学研究所,湖南衡阳 421000

摘 要:目的 探讨 lncRNA-KAT7 在肺癌组织中表达水平变化及对肺癌细胞侵袭迁移的影响。方法 采用实时荧光定量 PCR(q-PCR)检测 lncRNA-KAT7 在肺癌组织中的表达情况,分析 lncRNA-KAT7 的表达水平与其临床病理特征的关系;采用瞬时转染技术在 A549 细胞内过表达 lncRNA-KAT7,q-PCR 检测 lncRNA-KAT7 的过表达效率;采用 Transwell 实验分析 lncRNA-KAT7 过表达对 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响。结果 肺癌组织中 lncRNA-KAT7 的表达水平明显低于癌旁组织($P<0.05$);选取的 38 份肺癌组织及癌旁组织标本中,84.2%(32/38)的肺癌组织标本中 lncRNA-KAT7 的表达水平明显低于癌旁组织标本;lncRNA-KAT7 的表达水平与患者的淋巴结转移($P=0.043$)、肺癌组织学类型($P=0.001$)及年龄($P=0.027$)有关,但与患者的肿瘤分化程度、肿瘤最大径、TNM 分期、T 分级及性别无关($P>0.05$);Transwell 实验结果表明,与 pcDNA-3.1 组比较,pcDNA-lncRNA-KAT7 组平均每个视野穿至小室外的迁移细胞数和侵袭细胞数均明显减少($P<0.05$)。结论 lncRNA-KAT7 在肺癌的发生发展过程中具有调控肿瘤细胞迁移和侵袭能力的作用,其有望成为肺癌分子靶向治疗中的潜在靶点。

关键词:肺癌; 长链非编码 RNA; lncRNA-KAT7; 迁移; 侵袭
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.10.003 **中图法分类号:**R734.2
文章编号:1673-4130(2022)10-1162-05 **文献标志码:**A

Effect of lncRNA-KAT7 on the migration and invasion of lung cancer cells*

LEI Ming¹,WANG Qingmei²,GONG Yonglu¹,DU Wei¹,DENG Yi¹,LUO Dixian^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Changde First People's Hospital, Changde, Hunan 415003, China;2. Institute of Translational Medicine, University of South China, Hengyang, Hunan 421000, China

Abstract: Objective To investigate the expression level of lncRNA-KAT7 in lung cancer tissues and its effect on the invasion and migration of lung cancer cells. **Methods** Real-time quantitative PCR (q-PCR) was used to detect the expression of lncRNA-KAT7 in lung cancer tissues, and the relationship between the expression level of lncRNA-KAT7 and its clinicopathological characteristics was analyzed. The lncRNA-KAT7 was overexpressed in A549 cells by transient transfection technology, and the overexpression efficiency of lncRNA-KAT7 was detected by q-PCR. The effects of lncRNA-KAT7 on the migration and invasion ability of A549 cells were analyzed by Transwell assay. **Results** The expression level of lncRNA-KAT7 in lung cancer tissues was significantly lower than that in adjacent tissues ($P<0.05$). Among the selected 38 lung cancer tissue and paracancerous tissue samples, the expression level of lncRNA-KAT7 in 84.2% (32/38) of lung cancer tissue samples were significantly lower than that in adjacent tissue samples. The expression level of lncRNA-KAT7 was related to the lymph node metastasis ($P=0.043$), histological type ($P=0.001$) and the age of patients ($P=0.027$), but it was not related to the degree of tumor differentiation, tumor size, TNM stage, T stage and gender of patients ($P<0.05$). The results of Transwell experiment showed that, compared with the pcDNA-3.1 group, the average number of migrating cells and invasive cells per field in the pcDNA-lncRNA-KAT7 group were significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** lncRNA-KAT7 has the function of regulating tumor cell migration and invasion in the occurrence and development of lung cancer, and is expected to become a potential target in molecular targeted therapy of lung cancer.

* 基金项目:湖南省卫生健康委科研计划项目(C2019135, B20180434);湖南省常德市科技计划项目(2019S199)。
作者简介:雷鸣,女,主任技师,主要从事临床检验诊断工作。 △ 通信作者, E-mail: luodixian_2@163.com。
网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20220429.1753.002.html>(2022-05-06)

Key words: lung cancer; long non-coding RNA; lncRNA-KAT7; migration; invasion

肺癌是全球发病率最高、生命危害最大的恶性肿瘤之一^[1]。由于肺癌早期没有明显的临床症状,在确诊时癌细胞就已经不受控制的增殖、侵袭和转移,大多数患者的中位生存期不足 1 年,5 年生存率仅在 17% 左右^[2]。因此,在分子层面对肺癌的发生发展和转移机制进行更深入的研究,对肺癌的早期诊断和精准治疗具有重要意义^[3]。长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类转录本长度大于 200 nt,但不具备编码蛋白质功能的 RNA 分子^[4],其以 RNA 形式在多种层面上参与调节转录或转录后水平基因的表达,影响细胞的生长、发育、凋亡和分化^[5],并且与物种进化、胚胎发育及肿瘤的发生发展等有着密切的联系^[6]。目前已有多个 lncRNA 被证实与肿瘤的侵袭迁移及预后有关。lncRNA-KAT7 是本课题组前期应用 lncRNA 表达谱芯片分析技术在肺癌组织及癌旁组织中筛选到的具有明显差异表达的 lncRNA。lncRNA-KAT7 位于人 17 号染色体的 hg19 区域正链上,GC 水平为 58%,转录子长度为 575 bp,无编码蛋白的开放阅读框。有研究发现,lncRNA-KAT7 在结直肠癌癌组织内低表达,其可能通过抑制 NF- κ B 磷酸化及肿瘤细胞上皮间质转化过程来抑制结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭^[7]。而目前关于 lncRNA-KAT7 在肺癌中的表达及相关功能的报道较少。本研究旨在分析 lncRNA-KAT7 基因在肺癌组织及癌旁组织标本中的表达情况,并了解其与肺癌患者临床病理参数的关系,同时通过 Transwell 实验在体外条件下检测 lncRNA-KAT7 过表达对肺癌细胞迁移和侵袭能力的影响,为临床治疗肺癌寻找新的靶点。

1 材料与方法

1.1 组织标本 收集 2018 年 1—6 月于常德市第一人民医院胸外科行肺癌切除术的 38 例患者的原发病灶癌组织标本及其癌旁组织标本(距离癌灶边缘 5 cm 以上),并保存于液氮中。本研究经常德市第一人民医院医学伦理委员会批准,入选患者均知情同意。

1.2 仪器与试剂 人肺癌细胞株(A549)购自上海细胞库;通用细胞冻存液、DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、RNA 提取试剂盒、实时荧光定量 PCR(q-PCR)、Lipofectamine® 2000 Reagent 试剂均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;质粒小抽提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;康宁 Transwell 板、Matrigel 基质胶购自北京拜尔迪生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 q-PCR 检测 采用 Trizol 试剂盒提取肺癌组织及癌旁组织、肺癌 A549 细胞的总 RNA,测定其纯度和浓度。将得到的 RNA 反转录为 cDNA,以 cD-

NA 为模板,GAPDH 作为内参,采用 q-PCR 测定肺癌组织、癌旁组织及各组 A549 细胞中 lncRNA-KAT7 的表达水平。lncRNA-KAT7 引物序列如下,上游引物:5'-AGCTCTTGGTTGAGCCCTTC-3';下游引物:5'-GGGGCTGTGTGTGATTTTGTC-3';GAPDH 的引物序列如下,上游引物:5'-ACCA-CAGTCCATGCCATCAC-3';下游引物:5'-TCCAC-CCTGTTGGTGTA-3'。q-PCR 反应条件:50 ℃ 2 min;95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,共 40 个循环;使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算 lncRNA-KAT7 的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.3.2 质粒载体构建和细胞转染 空载体 pcDNA-3.1 为本实验室自备,采用分子克隆方法构建 lncRNA-KAT7 表达质粒 pcDNA-lncRNA-KAT7;选取生长状态良好的 A549 细胞悬液,将其稀释为每毫升 DMEM 培养基中含 1×10^6 个 A549 细胞后,接种于六孔板进行细胞培养,当细胞融合度达到 70%~80% 时根据基因转染操作手册进行瞬时转染。根据实验设计将 A549 细胞分为 pcDNA-3.1 组和 pcDNA-lncRNA-KAT7 组,分别将空载体 pcDNA-3.1 和 pcDNA-lncRNA-KAT7 质粒瞬时转染至 A549 细胞,同时将绿色荧光蛋白 GFP 瞬时转染至 A549 细胞,q-PCR 检测 lncRNA-KAT7 的转染效果。

1.3.3 细胞迁移和侵袭实验 迁移实验:将瞬时转染 24 h 后的 A549 细胞重悬于无血清培养液中过夜饥饿培养,在 Transwell 上层小室中按每孔 100 μ L 加入无血清 A549 细胞悬液(1×10^5 个细胞),同时将 800 μ L 含 10% FBS 的培养基作为化学引诱剂加入 Transwell 下层小室中,将其放置于 5% CO₂、37 ℃ 培养箱中继续培养 24 h。取出小室,在上室中加入多聚甲醛固定迁移细胞,采用结晶紫染色试剂染色后用显微镜观察和捕获图像,取 8 个视野,进行细胞计数并计算平均值。细胞侵袭实验:需在 Transwell 小室上室包被 Matrigel 基质胶再孵育 2 h 水化后备用,其余步骤同迁移实验。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件对数据进行处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件分析作图。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

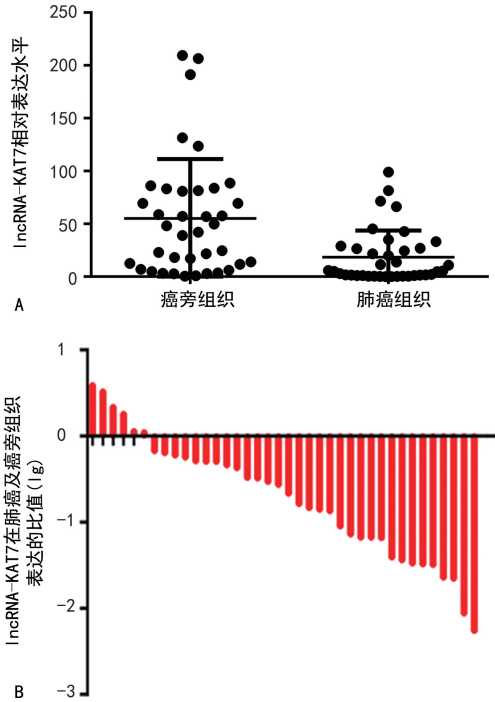
2.1 肺癌组织及癌旁组织中 lncRNA-KAT7 基因的表达比较 肺癌组织中 lncRNA-KAT7 的表达水平明显低于癌旁组织($P < 0.05$);选取的 38 份肺癌组织

及癌旁组织标本中,84.2%(32/38)的肺癌组织标本中 lncRNA-KAT7 的表达水平明显低于癌旁组织。见图 1。

2.2 lncRNA-KAT7 的表达水平与临床病理特征的关系 lncRNA-KAT7 的表达水平与患者的淋巴结转移($P=0.043$)、肺癌组织学类型($P=0.001$)及年龄($P=0.027$)有关,但与患者的肿瘤分化程度、肿瘤最大径、TNM 分期、T 分级及性别无关($P>0.05$)。见表 1。

2.3 A549 细胞瞬时转染 pcDNA-lncRNA-KAT7 质粒后的结果检测 A549 细胞瞬时转染 pcDNA-lncRNA-KAT7 质粒后,pcDNA-lncRNA-KAT7 组 lncRNA-KAT7 表达水平明显高于 pcDNA-3.1 组,差异有统计学意义($P<0.05$);采用倒置荧光显微镜检测 A549 细胞的转染效率在 40%~50%。见图 2。

2.4 Transwell 实验检测 lncRNA-KAT7 对肺癌 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响 Transwell 实验结果显示,与 pcDNA-3.1 组比较,pcDNA-lncRNA-KAT7 组平均每个视野穿至小室外的迁移细胞数和侵袭细胞数均明显减少($P<0.05$)。见图 3。



注:A 为 lncRNA-KAT7 在肺癌组织及癌旁组织中的表达;B 为 lncRNA-KAT7 在肺癌及癌旁组织表达的比值图。

图 1 lncRNA-KAT7 在肺癌组织及癌旁组织中的表达比较

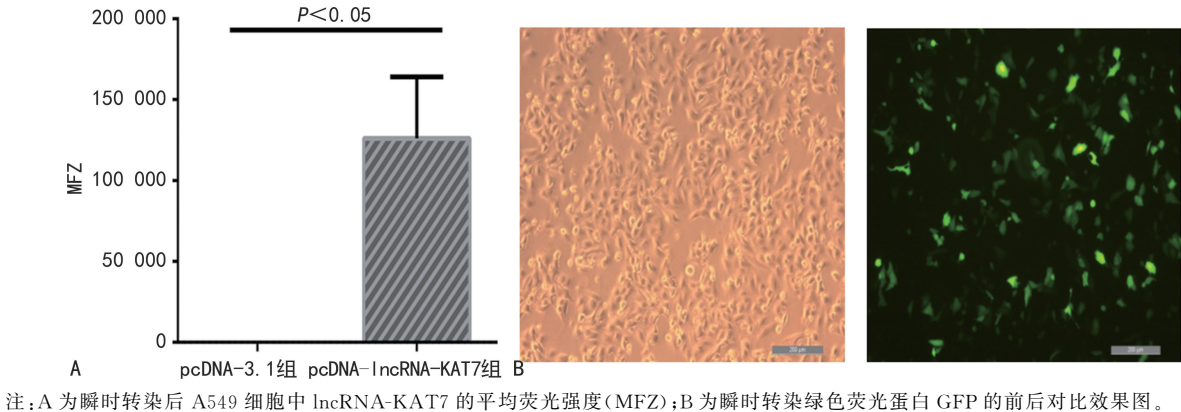
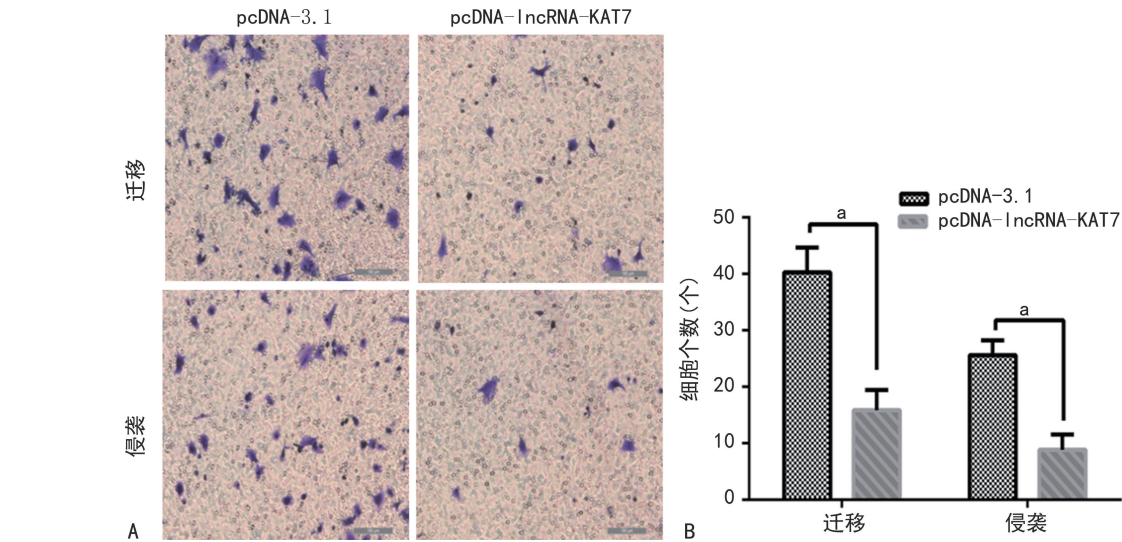


图 2 A549 细胞瞬时转染 pcDNA-lncRNA-KAT7 质粒后的结果



注:A 为 Transwell 实验结果图;B 为 Transwell 实验结果统计图;^a $P<0.05$ 。

图 3 Transwell 实验检测 lncRNA-KAT7 对肺癌 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响

表 1 lncRNA-KAT7 表达水平与临床病理特征的关系[n(%)]

项目	lncRNA-KAT7 低表达(n=28)	lncRNA-KAT7 高表达(n=10)	P
年龄(岁)			0.027
<60	17(60.7)	2(20.0)	
≥60	11(39.3)	8(80.0)	
性别			0.653
男	19(67.9)	6(60.0)	
女	9(32.1)	4(40.0)	
肿瘤组织学类型			0.001
腺癌	7(25.0)	9(90.0)	
鳞癌	21(75.0)	1(10.0)	
其他	0(0.0)	0(0.0)	
肿瘤最大径(cm)			0.099
<4	14(50.0)	8(80.0)	
≥4	14(50.0)	2(20.0)	
肿瘤分化程度			0.142
高/中分化	15(53.6)	8(80.0)	
低分化	13(46.4)	2(20.0)	
T 分级			0.424
T1/2	22(78.6)	9(90.0)	
T3/4	6(21.4)	1(10.0)	
淋巴结转移			0.043
有	12(42.9)	8(80.0)	
无	16(57.1)	2(20.0)	
TNM 分期			0.900
I / II 期	19(67.9)	7(70.0)	
III / IV 期	9(32.1)	3(30.0)	

3 讨 论

lncRNA 定位于细胞核和细胞质,曾被认为是基因转录的“噪音”或“暗物质”,并未受到重视^[8]。但后来的研究发现,lncRNA 可通过表观遗传学调控、转录调控及转录后调控机制调控基因表达,从而参与细胞的生理过程^[9]。lncRNA 的异常表达与肿瘤的形成、浸润、转移过程相关,其参与细胞分化、细胞内物质交换、核内运输、细胞周期、染色质修饰、干细胞重组、转录激活、转录干扰等多种重要的调控过程^[10]。抑制肿瘤进展的关键在于抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭,而 lncRNA 既可对肿瘤细胞的周期、凋亡、转移等产生影响^[11],又可在表观遗传的层面上宏观调控肿瘤细胞的很多特征,从而在肿瘤发生和发展过程中发挥重要作用^[12]。

随着精准医学的快速发展,肿瘤基因诊断和分子靶向治疗成为肿瘤诊断和治疗的重要发展方向^[13]。在对 lncRNA 深入研究的过程中,人们发现了一些新的在肺癌中发挥促癌或抑癌作用的 lncRNA^[14],这些肺癌相关基因的异常表达对肺癌细胞的侵袭、迁移及增殖能力起到了重要的调控作用^[15],并与患者预后及

对化疗药物的耐药有密切关系^[16]。研究发现 lncRNA-ATB 在肺癌组织和肺癌细胞中高表达,利用 siRNA 外源性沉默 lncRNA-ATB,能够抑制肺癌细胞的增殖和迁移能力,以及促进肺癌细胞凋亡^[17]。YANG 等^[18]的研究发现,lncRNA-BANCR 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织和细胞中表达缺失,其作为分子表达途径的重要调控因子对肺癌细胞活性、迁移、侵袭和凋亡发挥抑制作用,体内实验表明,为 NSCLC 模型小鼠注射 lncRNA-BANCR 表达细胞,对 NSCLC 肿瘤生长有一定的抑制作用。

lncRNA-KAT7 是新近发现的一种结直肠癌抑制因子,但其在其他恶性肿瘤中的作用尚不清楚。本研究表明,lncRNA-KAT7 在肺癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织($P<0.05$),提示 lncRNA-KAT7 可能是与肺癌发生发展相关的癌基因。为了进一步探讨 lncRNA-KAT7 表达与肺癌的关系,本研究对 lncRNA-KAT7 表达与肺癌患者临床病理特征进行了分析,结果显示 lncRNA-KAT7 的表达水平与患者的年龄、淋巴结转移有关,差异有统计学意义($P<0.05$),但与患者的肿瘤分化程度、肿瘤最大径、TNM 分期、T 分级及性别无关($P>0.05$),提示肺癌组织中 lncRNA-KAT7 参与肺癌淋巴结转移。本研究表明,lncRNA-KAT7 表达水平与肺癌组织学类型有一定关系,其在肺鳞癌组织中的表达水平明显低于肺腺癌组织,提示 lncRNA-KAT7 在肺鳞癌中发挥的抑癌作用可能更强一些。由此笔者认为,lncRNA-KAT7 有望成为肺癌诊断和预后判断的潜在肿瘤分子标志物。肿瘤的侵袭和转移被认为是肺癌死亡的重要原因之一。研究表明 lncRNA 可通过与 miRNA 竞争性结合、细胞内的剪切作用形成 miRNA 的前体,通过发挥内源性 miRNA 海绵作用的方式抑制 miRNA 的表达,从而促进或抑制肿瘤的发生发展^[16,19]。GAO 等^[19]在研究中发现,过表达 lncRNA-KAT7 可以通过正向调节 miR-10a 基因的甲基化,负向调节 miR-10a 的表达来抑制肺癌细胞的增殖和转移。有研究表明,lncRNA-KAT7 在结直肠癌癌组织和细胞内低表达,与 pcDNA-3.1 组比较,过表达 lncRNA-KAT7 的 HCT116 细胞中 E-钙黏蛋白(与上皮间质转移相关)的表达水平明显增加, β -连环蛋白(与增殖相关)和 MMP-2 蛋白(与侵袭相关)的表达水平相对降低,从而推测 lncRNA-KAT7 可能通过调控 EMT 途径抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[20]。本研究采用 Transwell 实验进一步验证 lncRNA-KAT7 与肺癌细胞侵袭迁移的关系,实验结果表明,过表达 lncRNA-KAT7 可以抑制肺癌 A549 细胞的迁移和侵袭。然而本研究对 lncRNA-KAT7 与肺癌的发生发展关系的研究仅处于功能解析的初始阶段,更深层面

对 lncRNA-KAT7 参与的信号通路及其对肺癌具体作用机制的探索,有待后续进一步开展。

综上所述,lncRNA-KAT7 在肺癌的发生发展过程中具有调控肿瘤细胞迁移和侵袭能力的作用,并有望成为肺癌分子靶向治疗中的潜在靶点。

参考文献

[1] XIA H, QU X L, LIU L Y, et al. LncRNA MEG3 promotes the sensitivity of vincristine by inhibiting autophagy in lung cancer chemotherapy[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(4):1020-1027.

[2] HAO Y, YANG X, ZHANG D, et al. Long noncoding RNA LINC01186, regulated by TGF-beta/SMAD3, inhibits migration and invasion through epithelial-mesenchymal-transition in lung cancer[J]. *Gene*, 2017, 608: 1-12.

[3] LI X, YU M, YANG C Y. YY1-mediated overexpression of long noncoding RNA MCM3AP-AS1 accelerates angiogenesis and progression in lung cancer by targeting miR-340-5p/KPNA4 axis[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(3): 2258-2267.

[4] MA Q Y, LI S Y, LI X Z, et al. Long non-coding RNA DILC suppresses bladder cancer cells progression[J]. *Gene*, 2019, 710:193-201.

[5] SHI X, SUN M, LIU H, et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases[J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2):159-166.

[6] MA Y, ZHANG J, WEN L, et al. Membrane-lipid associated lncRNA: a new regulator in cancer signaling[J]. *Cancer Lett*, 2018, 419:27-29.

[7] WANG Q, HE R, TAN T, et al. A novel long non-coding RNA-KAT7 is low expressed in colorectal cancer and acts as a tumor suppressor[J]. *Cancer Cell International*, 2019, 19:40.

[8] DERRIEN T, JOHNSON R, BUSSOTTI G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution and expression[J]. *Genome Res*, 2012, 22(9):1775-1789.

[9] SHI X, SUN M, LIU H, et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases[J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2):159-166.

[10] FORREST M E, KHALIL A M. Review: regulation of

the cancer epi-genome by long non-coding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2017, 407:106-112.

[11] LI G, WANG X, LUO Q, et al. Identification of key genes and long non coding RNAs in celecoxib treated lung squamous cell carcinoma cell line by RNA-sequencing[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5):6456-6464.

[12] CAI L, BAI H, DUAN J, et al. Epigenetic alterations are associated with tumor mutation burden in non-small cell lung cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1):198-208.

[13] 白日兰, 郭寒菲, 崔久嵬. 肿瘤精准医学时代下精准检测技术的发展现状与临床应用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(2):103-108.

[14] ZHANG H Y, YANG W, ZHENG F S, et al. Long non-coding RNA SNHG1 regulates zinc finger E-box binding homeobox 1 expression by interacting with TAp63 and promotes cell metastasis and invasion in lung squamous cell carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90(7): 650-658.

[15] FAN K J, LIU Y, YANG B, et al. Prognostic and diagnostic significance of long non-coding RNA AGAP2-AS1 levels in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(10):2392-2396.

[16] 肖永平, 李庆科, 王兴昌, 等. lncRNA MCM3AP-AS1 靶向 miR-524-5p 在 CIK 细胞诱导肺癌细胞 A549 凋亡中作用机制研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(9): 1142-1146.

[17] KE L, XU S B, WANG J, et al. High expression of long non-coding RNA ATB indicates a poor prognosis and regulates cell proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2017, 19(5):599-605.

[18] YANG L, LIU G. lncRNA BANC1 suppresses cell viability and invasion and promotes apoptosis in non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:3565-3574.

[19] GAO Y, ZHAO H, MU L. LncRNA-KAT7 negatively regulates miR-10a through epigenetic pathway to participate in nonsmall cell lung cancer[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2021, 36(5):441-445.

[20] 王晴美. 长链非编码 RNA-KAT7 在结直肠癌增殖转移中的作用研究[D]. 湖南: 南华大学, 2018.

(收稿日期:2021-10-12 修回日期:2022-02-08)