

LncRNA LUCAT1 在甲状腺乳头状癌中的调控作用机制研究

李 尤 郭宏鹏 陈晶晶 俞建华 孙成林*

沈阳医学院附属中心医院普外一科 辽宁沈阳 110024

【摘要】目的 探究 lncRNA LUCAT1 对甲状腺乳头状癌 (PTC) TPC-1 细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡和 EMT 的影响。方法 收集我院 2019 年 4 月至 2022 年 11 月行手术治疗 110 例 PTC 患者作为研究对象,通过二代测序技术检测 PTC 患者癌和癌旁组织,以及 PTC 患者血液和健康人血液中的 lncRNA 表达水平;敲减 lncRNA LUCAT1 后观察其对 PTC 细胞系 TPC-1 的增殖、侵袭和上皮间质转化的影响。结果 PTC 患者癌和血液中 lncRNA LUCAT1 表达水平明显高于癌旁组织和健康人血液 ($P<0.05$);敲减 lncRNA LUCAT1 可以抑制 TPC-1 细胞的增殖、侵袭和上皮间质转化,促进 PTC 细胞凋亡。结论 在甲状腺乳头状癌组织中 lncRNA LUCAT1 表达上调, lncRNA LUCAT1 可以促进甲状腺乳头状癌细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 并抑制细胞凋亡。

【关键词】长链非编码 RNA, 甲状腺乳头状癌, 上皮间质转化

甲状腺癌 (thyroid carcinoma, TC) 是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,主要由甲状腺上皮细胞转化而来。目前,甲状腺癌的发病率在全球范围内呈上升趋势,2022 年关于全球新发恶性肿瘤患者的流行病学数据显示,TC 以 3.0% 的发病率占比位居第 11 位^[1],其中大多数新诊断的患者为 PTC,这也是分化型甲状腺癌最常见的组织学亚型。早期 TC 的相关研究主要集中在蛋白质编码基因 (protein-coding genes, PCG),但是单纯 PCG 突变并不能较好地解释 TC 发生发展过程。人们已经公认,只有不到 2% 的基因组序列可以编码蛋白质,而其余 98% 的基因组序列不具备编码潜力,其转录产物 (ncRNAs) 的功能特征尚未得到确认,非编码区域既往被认为是基因组转录的“噪音”^[2]。随着测序技术的进步,研究人员发现了一系列 ncRNAs,其中包括了 miRNAs, lncRNAs, circRNAs 等,陆续有研究发现,基因组中非编码区域所产生的非编码 RNA 同样参与调控了不同疾病的发生发展过程,甚至在不同疾病状态下起着至关重要的作用。最初被视为“转录噪声”的 lncRNA 被发现可调节蛋白质的转录和翻译,通过多种机制在多种生物过程中编码基因。近年来研究发现, lncRNAs 在不同器官类型和包括甲状腺癌在内的癌症中出现差异表达^[3],表达失调的 lncRNA 能够作为肿瘤的促癌和抑癌因子,从而调控肿瘤的发生发展过程。研究表明, lncRNA 肺癌相关转录本 1 (LUCAT1) 在多种肿瘤病灶组织中均呈现异常高表达状态^[4],但是 lncRNA LUCAT1 在 PTC 中的表达情况报道较少。本研究旨在探究 lncRNA LUCAT1 对甲状腺乳头状癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和 EMT 的影响,为 PTC 患者的早期诊断发现新的生物标记物,同时为 PTC 患者的治疗和筛选药物作用靶点,提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 标本收集和二代测序

在 2019 年 4 月至 2022 年 11 月沈阳医学院附属中心医院行甲状腺手术的病人中,选取收集了 110 例甲状腺癌组织及癌旁正常组织标本,以及患者和健康人静脉血液样本。入选患者在甲状腺切除术前没有接受任何术前治疗,包括放疗、化疗和左甲状腺素且无伴有其他恶性肿瘤或其他甲状腺炎性疾病。所有的组织样本在手术后立即放入至液氮中进行冰冻处理,并且其储存条件为 -80°C ,直到进一步提取 RNA。沈阳医学院附属中心医院伦理委员会批准了上述研究方案。

1.2 主要试剂与仪器

1.3 细胞培养与实验分组

实验选取人 PTC 细胞系 (TPC-1、K1 和 IHH-4) 和人甲状腺上皮细胞系 Nthy-ori3-1。用含有 10% 胎牛血清 (FBS; Gibco) 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 在 37°C 的湿润空气和 5% 的二氧化碳的细胞培养箱中进行培养 PTC 细胞系。sh-lncRNA-LUCAT1 和 sh-NC 是由广州瑞博生物有限公司化学合成并克隆到 pcDNA3.1 质粒中。然后,使用 Lipofectamine 2000 将 sh-lncRNA-LUCAT1 及 sh-NC 质粒分别转染到 TPC-1 细胞并分组处理,实验组为 sh-lncRNA-LUCAT1 组,对照组为 sh-NC 组。

1.4 RT-qPCR 检测 PTC 细胞中 lncRNA 的表达

向收集的总 RNA 加入总 RNA 提取试剂,Trizol 法提取总 RNA,严格按照反转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,严格按照 SYBR qPCR 试剂盒说明书进行 qPCR 反应,以 U6 或 GAPDH 为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 lncRNA 或 mRNA 的相对表达量。

1.5 CCK-8

将实验组及对照组 PTC 细胞 (每孔 3,000 个细胞) 分别接种于 96 孔板,在 37°C 、5% CO_2 的培养箱培养 24 小时。细胞增殖能力通过使用细胞计数试剂盒-8 (Dojindo, 日本) 在 24、48 和 72 小时进行测量。用酶标仪在测定吸光度为 450nm 下的分光光度值并记录实验组及对照组的的结果。

1.6 流式细胞术

将实验组及对照组 PTC 细胞 (每孔 3,000 个细胞) 播种在 6 孔板中,培养 24 小时。在 37°C 、5% CO_2 的湿润空气中培养 7 天。用 4% 多聚甲醛固定细胞菌落,用 0.1% 结晶紫染色。在显微镜 (Olympus, Tokyo, Japan) 下计算实验组及对照组的细胞菌落。

1.7 Transwell

细胞侵袭实验使用膜孔大小为 8.0 微米的转孔室 (Corning Inc., Union City, CA, USA) 进行。上腔加入已经转染 sh-lncRNA-LUCAT1 的 TPC-1 细胞 (1×10^5 个细胞),将含有 10% FBS 的 DMEM 培养基加入至下腔。细胞培养 48 小时后,下层室的细胞使用 4% 多聚甲醛进行固定,并用 0.1% 结晶紫对其进行染色。sh-NC 组以同样的实验方法进行实验,在显微镜 (Olympus, Tokyo, Japan) 下,分别在实验组及对照组的五个随机区域计算侵袭细胞,记录结果。

1.8 划痕实验

将培养到 70% 左右的 TPC-1 细胞,在培养板上分别转染 sh-lncR

NA-LUCAT1 和 sh-NC。转染 2h 后, 进一步在培养板上使用 200 毫升无菌枪头做“一”字型划痕, 用 PBS 漂洗使用倒置相差显微镜并且设置倍数为 100 来观察实验组及对照组培养基上的划痕, 并拍照测量培养板上划痕宽度。在六孔板中加入不含血清的培养基, 24h 后用 PBS 清洗后, 继续用显微镜在此处观察并拍照以及测量实验组及对照组培养基的划痕宽度, 并进一步计算细胞的迁移率, 记录结果。

1.9 Western blot 检测 TPC-1 细胞的上皮间质转化相关蛋白的表达

用 sh-lncRNA-LUCAT1 和 sh-NC 分别转染 TPC-1 细胞, 分为 sh-lncRNA-LUCAT1 组和 sh-NC 组, 转染的细胞使用 RIPA 裂解缓冲液来提取总蛋白。在 14, 000g, 4℃ 下离心 15 分钟后, 收集上清液。使用 BCA 蛋白测定试剂盒 (Thermo Fisher Scientific Inc.) 检测蛋白浓度。30ug 的蛋白质在 SDS-PAGE 中分离, 然后转移到 PVDF 膜上 (Millipore, Billerica MA, USA)。用 5% 的脱脂牛奶封闭, 用一抗孵育, 包括 anti-E-cadherin (1: 1, 000, anti-N-cadherin (1: 1, 000), anti-Vimentin (1: 1, 000), anti-GAPDH (1: 1, 000, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)。用 HRP 结合的二抗孵育 2 小时后, 用化学发光检测系统 (Amersham, Little Chalfont, UK) 检测印迹。GAPDH 被用来作为内部对照。计算实验组及对照组的灰度值, 记录结果。

1.10 统计分析

采用 SPSS 进行计算及统计分析, 数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间差异采用独立样本 t 检验比较, 多组间差异采用单因素方差分析比较, 且各组间两两比较采用 Tukey 事后检验进行, P<0.05 代表差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 LncRNA 在 PTC 组织和血液中的表达情况

二代测序结果发现多种 LncRNA 在 PTC 组织、PTC 患者血液中出现差异表达: lncRNA-OG, lncRNA-w42, lncRNA-HEIH, lncRNA-H19, lncRNA-LUCAT1 在 PTC 组织和 PTC 患者血液均表达上调; 其中 lncRNA-LUCAT1 在 PTC 组织和 PTC 患者血液均是相对表达水平最高的 (图 1A 和图 1B, P<0.05)。

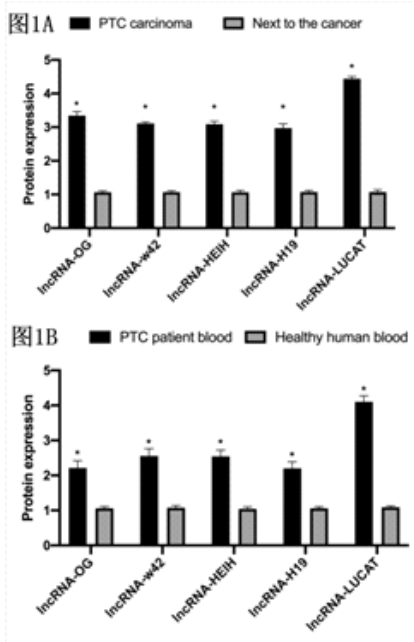


图 1 lncRNA-LUCAT1 在 PTC 组织和 PTC 患者血液中的表达情况

2.2 LncRNA 在 PTC 细胞中表达上调

与人类甲状腺上皮细胞系 Nthy-ori3-1 相比, 在三个不同的 PTC 细胞系 (TPC-1、K1 和 IHH-4) 中也观察到 lncRNA-LUCAT1 表达升高 (如图 2, P<0.05)。

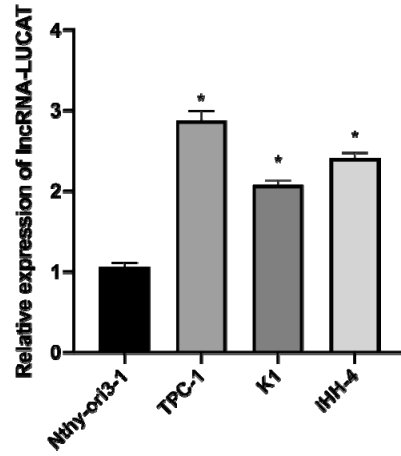


图 2 lncRNA-LUCAT1 在 PTC 细胞系 (TPC-1、K1 和 IHH-4) 中的表达水平与人类甲状腺上皮细胞系 Nthy-ori3-1 表达水平的比较

2.3 LncRNA LUCAT1 敲减后抑制 TPC-1 细胞增殖

经过 CCK-8 实验检测 PTC 细胞系 TPC-1 细胞中敲减 lncRNA-LUCAT1 后的细胞增殖情况, 结果表明与 sh-NC 组相比, sh-LUCAT1 组中的 TPC-1 细胞在 24h, 48h 和 72h 三个时间点的细胞增殖情况均出现显著降低, 同时对细胞 lncRNA-LUCAT1 敲减后, TPC-1 细胞的克隆形成进行检测, 结果表明不同组的细胞培养 48h 后, 与 sh-NC 组相比, sh-LUCAT1 组中的细胞克隆数量显著减少 (如图 4, P<0.05)。

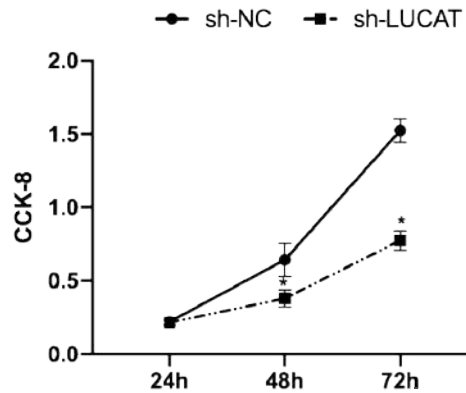


图 3 CCK-8 实验细胞系 TPC-1 中敲减 lncRNA-LUCAT1 后的 sh-LUCAT1 组细胞在 24h、48h、72h 的增殖情况与 sh-NC 组的对比

2.4 LncRNA LUCAT1 敲减后促进 TPC-1 细胞凋亡

结果如图 5 所示, 与对照组相比, 沉默 lncRNA-LUCAT1 后细胞凋亡率升高 (P<0.05)。

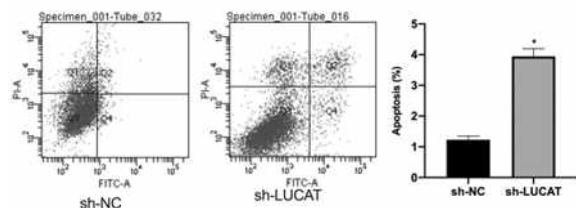


图 5 通过流式细胞术检测细胞系 TPC-1 的 sh-LUCAT1 组与 sh-NC 组细胞凋亡变化的对比情况及凋亡率

2.5 LncRNA LUCAT1 敲减后可抑制 TPC-1 细胞侵袭

结果如图 6 所示, sh-NC 转染组 24 小时后发生侵袭的细胞数为 243.33 ± 24.12 , 而 sh-LUCAT1 组细胞发生侵袭的细胞数量为 143.34 ± 15.44 , 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

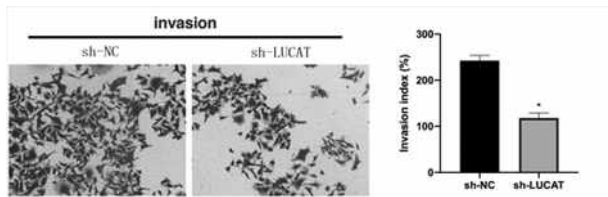


图 6 通过 Transwell 实验评价细胞系 TPC-1 的 sh-LUCAT1 组与 sh-NC 组侵袭能力的对比情况及侵袭率

2.6 LncRNA LUCAT1 敲减后可抑制 TPC-1 细胞的上皮间质转化

结果如图 7 所示, 与 sh-NC 组相比, 转染 sh-LUCAT1 组细胞中 E-cadherin 表达升高, N-cadherin 和波形蛋白 Vimentin 表达减少 ($P < 0.05$)。

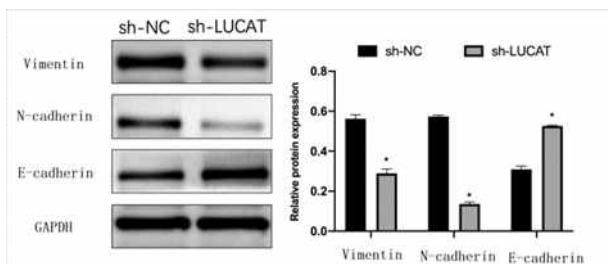


图 7 通过 Western blot 实验检测细胞系 TPC-1 的 sh-LUCAT1 组与 sh-NC 组中 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 表达水平的对比情况

讨论

LncRNA 作为一类具有重要肿瘤生物学作用的调控性分子, 近年来, 越来越多研究报道 LncRNAs 在 TC 中表达失调, 并在 TC 的发生和进展中发挥重要的调控作用。例如 TC 可以通过 lncRNA-n340790 调节 miR-1254 来促进其发生发展^[5]。敲除 lncRNA-PANDAR 可抑制 TC 细胞的增殖、干扰细胞周期并促进细胞凋亡^[6]。TC 细胞的侵袭和转移可以由 lncRNA-ANRIL 通过 TGF- β /Smad 信号通路进行调控^[7]。越来越多的 LncRNA 在 PTC 展示出非常有前景的临床应用价值, 为肿瘤的预防、诊断、治疗提供了一系列生物标志物及治疗靶点。本研究通过二代测序分析 PTC 患者组织和血液 lncRNAs 的表达, 我们发现 lncRNA LUCAT1 表达显著增加, 下调 LUCAT1 抑制甲状腺乳头状癌细胞增殖和侵袭并促进细胞凋亡。这提示我们 Lnc RNA LUCAT1 可能在 PTC 中发挥着促癌分子的作用, 但是具体生物学作用及相关机制还需进一步探讨。

上皮间质转化 (EMT) 指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间质细胞转化的现象, 上皮细胞表型的缺失及间质特性的获得是其主要特征。E-钙粘蛋白表达的缺失以及 N-钙粘蛋白的表达上调是其特点, 通过检测二者的缺失或上调可以用来确定肿瘤组织中 EMT 的存在。EMT 的发生与多种蛋白分子、微环境及 MicroRNA 等有关, 涉及到多个信号转导通路和

复杂的分子机制, 在肿瘤细胞的侵袭和转移过程中扮演了重要的角色。因此, EMT 已成为恶性肿瘤的一个特定指标, 并被确定为不良临床结果的一个核心驱动因素。但在 PTC 中关于 lncRNA 与 EMT 的研究报道较少。本研究发现 lnc RNA LUCAT1 敲减后可抑制 PTC 细胞 EMT, 这将为 PTC 的侵袭和转移等研究奠定实验基础。

总之, 我们研究发现 PTC 组织和血液中 lnc RNA LUCAT1 表达上调, 下调 lncRNA LUCAT1 表达可以抑制 TPC-1 细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT, 这都提示我们 lnc RNA LUCAT1 有可能成为 PTC 治疗中的新的基因靶点。但是 lncRNA LUCAT1 在 PTC 中的具体生物学作用及是否通过调控相关基因影响相关信号通路而发挥作用仍需进一步证实。

参考文献:

- [1]Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May; 71 (3): 209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
- [2]Rinn JL, Chang HY. Long Noncoding RNAs: Molecular Modalities to Organismal Functions. *Annu Rev Biochem.* 2020 Jun20; 89: 283-308. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012708.
- [3]Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell.* 2016 Apr 11; 29 (4): 452-463. doi: 10.1016/j.ccr.2016.03.010.
- [4]Nai Y, Pan C, Hu X, Ma Y. LncRNA LUCAT1 contributes to cell proliferation and migration in human pancreatic ductal adenocarcinoma via sponging miR-539. *Cancer Med.* 2020 Jan; 9 (2): 757-767. doi: 10.1002/cam4.2724.
- [5]Li Q, Shen W, Li X, Zhang L, Jin X. The lncRNA n340790 accelerates carcinogenesis of thyroid cancer by regulating miR-1254. *Am J Transl Res.* 2017 May 15; 9 (5): 2181-2194.
- [6]Li Z, Gao B, Hao S, Tian W, Chen Y, Wang L, Zhang X, Luo D. Knockdown of lncRNA-PANDAR suppresses the proliferation, cell cycle and promotes apoptosis in thyroid cancer cells. *EXCLI J.* 2017 Mar 23; 16: 354-362. doi: 10.17179/excli2017-113.
- [7]Zhao JJ, Hao S, Wang LL, Hu CY, Zhang S, Guo LJ, Zhang G, Gao B, Jiang Y, Tian WG, Luo DL. Long non-coding RNA ANRIL promotes the invasion and metastasis of thyroid cancer cells through TGF- β /Smad signaling pathway. *Oncotarget.* 2016 Sep 6; 7 (36): 57903-57918. doi: 10.18632/oncotarget.11087.

项目基金: 沈阳市科学技术计划项目基金 (21-173-9-18)