

lncRNA CCAT2调控SIRT1蛋白表达激活 Wnt/ β -catenin通路影响非小细胞肺癌细胞 增殖和转移

芮文秀* 王亮歌

(泰康仙林鼓楼医院呼吸内科, 南京 210000)

摘要 该文旨在分析长链非编码RNA(lncRNA) CCAT2通过调控SIRT1蛋白的表达激活Wnt/ β -catenin信号通路进而影响非小细胞肺癌细胞增殖和转移的机制。采用qRT-PCR检测肺癌组织及肺癌细胞株中lncRNA CCAT2的表达。利用卡方检验分析lncRNA CCAT2表达与肺癌患者临床病理特征的关系。CCK-8实验、划痕实验及Transwell实验观察敲低lncRNA CCAT2表达对肺癌细胞增殖、迁移及浸润能力的影响。Western blot检测敲低lncRNA CCAT2表达对H1975细胞株中SIRT1蛋白及Wnt/ β -catenin信号通路蛋白表达的影响; 以及敲低或过表达SIRT1对Wnt/ β -catenin信号通路蛋白表达的影响。利用RNA免疫共沉淀(RIP)及RNA pull-down实验验证lncRNA CCAT2与SIRT1之间的相互作用。该研究得出, 癌组织及肺癌细胞株中lncRNA CCAT2表达显著较高($P < 0.05$), 敲低lncRNA CCAT2表达能够抑制H1975细胞的增殖、迁移及浸润。敲低lncRNA CCAT2表达后, H1975细胞株中SIRT1、 β -catenin、Cyclin D1、myc蛋白的表达降低; 敲低SIRT1后, 细胞核 β -catenin蛋白、Cyclin D1、myc蛋白的表达均降低。与非特异性抗体比较, SIRT1抗体呈明显的lncRNA CCAT2富集; lncRNA CCAT2的截短突变组细胞中SIRT1相对表达量明显低于lncRNA CCAT2组。lncRNA CCAT2通过调控SIRT1蛋白表达激活Wnt/ β -catenin信号通路进而促进肺癌细胞增殖、迁移及浸润, 有望成为新的肿瘤标志物。

关键词 肺癌; lncRNA CCAT2; SIRT1; Wnt/ β -catenin通路

lncRNA CCAT2 Affects Proliferation and Metastasis of NSCLC Cells by Activating Wnt/ β -catenin Pathway via Regulating SIRT1

RUI Wenxiu*, WANG Liangge

(Department of Respiratory Medicine, Taikang Xianlin Gulou Hospital, Nanjing 210000, China)

Abstract lncRNA CCAT2 affects the proliferation and metastasis of NSCLC cells by regulating the expression of SIRT1 protein and activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. In this study, the expression of lncRNA CCAT2 in lung cancer tissues and lung cancer cell lines was detected by qRT-PCR. The relationship between lncRNA CCAT2 expression and clinicopathological features of lung cancer was analyzed by chi-square test. CCK-8 assay, scratch test and Transwell assay were used to observe the effect of lncRNA CCAT2 knockdown on the proliferation, migration and infiltration of lung cancer cells. After knocking down the expression of lncRNA CCAT2

收稿日期: 2021-01-07 接受日期: 2021-03-11

*通讯作者。Tel: 18705177641, E-mail: 1150635626@qq.com

Received: January 7, 2021 Accepted: March 11, 2021

*Corresponding author. Tel: +86-18705177641, E-mail: 1150635626@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5531>

expression in H1975 cell line, Western blot was used to detect the expression change of SIRT1 protein and Wnt/ β -catenin signaling pathway. The effect of knockdown or overexpression of SIRT1 on Wnt/ β -catenin signaling pathway were also detected. RNA immunoprecipitation and RNA pull-down experiments were used to verify the interaction between lncRNA CCAT2 and SIRT1. The results showed that the expression of lncRNA CCAT2 was significantly higher in cancer tissues and lung cancer cell lines ($P < 0.05$). lncRNA CCAT2 knockdown inhibited the proliferation, migration and infiltration of H1975 cells. The expression of SIRT1, β -catenin, Cyclin D1, and myc proteins in H1975 cell line was decreased after the knockdown of lncRNA CCAT2. After knockdown of SIRT1, the expression of β -catenin, Cyclin D1 and myc proteins decreased. Compared with non-specific antibodies, SIRT1 antibodies were significantly enriched to lncRNA CCAT2. The expression of SIRT1 in truncated mutant cells of lncRNA CCAT2 was significantly lower than that of lncRNA CCAT2. lncRNA CCAT2 promotes lung cancer cell proliferation, migration and infiltration by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway via SIRT1, and lncRNA CCAT2 may become a new tumor marker.

Keywords lung cancer; lncRNA CCAT2; SIRT1; Wnt/ β -catenin pathway

肺癌是全球范围内癌症相关死亡的首要原因^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是最为常见的肺癌类型,约占肺癌总病例数的85%。从组织学方面,NSCLC主要分为肺腺癌(lung adenocarcinoma, LAC)、鳞状细胞癌和大细胞癌,其中LAC是NSCLC最常见的类型,其发病率和死亡率均较高^[2]。我国肺癌发病率有逐渐增高的趋势,近年来新的手术技术、放化疗方案及靶向治疗药物的临床应用在一定程度上改善了患者的预后,但肺癌患者病死率仍较高,5年生存率仅约为21%^[3]。因此,有必要深入研究肺癌发生发展的分子机制,为其寻找理想的肿瘤标志物。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是长度大于200个核苷酸的RNA分子,本身不具有编码蛋白质的功能,但其可调节编码基因的表达。结肠癌相关转录本2(colon cancer associated transcript 2, CCAT2)是位于细胞核中的lncRNA,定位于人类染色体的8q24区域。据报道,lncRNA CCAT2在结肠癌、乳腺癌等多种类型的癌症中过表达,其能够直接结合并调控下游靶基因,如细胞周期素激酶4、SRF盒转录因子4等,发挥促进肿瘤细胞增殖和转移的功能^[4]。SIRT1基因位于人类染色体10q21.3上,该基因编码蛋白作为一种组蛋白去乙酰化酶,能通过表观遗传学机制调控基因表达。SIRT1能够促进 β -catenin去乙酰化,激活Wnt/ β -catenin信号通路,导致细胞核内 β -catenin增多,而 β -catenin可促进下游癌基因的表达^[5]。有研究报道,SIRT家族成员受多种lncRNA的表达调控,而其亦可通过调控lncRNA

的表达水平,参与肿瘤的恶性进展^[6]。因此,两者之间可能存在相互作用。本文通过研究肺癌细胞中lncRNA CCAT2和SIRT1的表达,初步探索两者之间的关系,揭示lncRNA CCAT2影响肺癌细胞增殖和转移的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

CCAT2 siRNA及NC-siRNA由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。pcDNA3.1-SIRT1的干扰质粒及过表达质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。重组兔抗人SIRT1抗体(ab220807)、重组兔抗人 β -catenin抗体(ab32572)、重组兔抗人Cyclin D1抗体(ab181216)、重组兔抗人c-myc抗体(ab32072)均购自英国Abcam公司。Lipofectamine 3000购自美国Invitrogen公司。Transwell小室购自美国BD公司。正常肺上皮细胞BEAS-2B, NSCLC细胞系A549、H1299、H1975及H358均购自美国ATCC。

1.2 一般临床资料

选取2018年2月至2019年2月在我院诊治的97例NSCLC患者的临床资料。纳入标准:(1)经病理检查明确诊断为NSCLC;(2)所有患者既往未接受过放化疗等治疗;(3)临床病理资料完整。排除标准:(1)合并有呼吸道感染、结核菌感染等;(2)伴有其他器官恶性肿瘤病史;(3)合并心肝肾等器官功能障碍。患者年龄43~62岁,平均年龄(52.3 \pm 6.2)岁;男性50例,女性47例;有吸烟史61例,无吸烟史36例;肿瘤大小:<3 cm者42例, \geq 3 cm者55例;TNM分期:

I~II期74例, III~IV期23例; 肿瘤分化: 高分化49例, 中低分化48例; 伴淋巴结转移25例, 无淋巴结转移72例。所有患者及家属对本研究均知情同意并签字, 本研究经我院伦理委员会审核批准通过。

1.3 qRT-PCR及Western blot实验

收集新鲜获取的97例NSCLC患者的癌组织样本, 以距离癌组织边缘3 cm以上的肺组织作为癌旁正常组织, 置于 -80°C 冰箱保存。取约50 mg组织, 用匀浆机将组织匀碎后, $10\,000\text{ r/min}$ 离心10 min, 取上清应用TRIzol法提取组织中的总RNA。细胞培养基为含10%胎牛血清的DMEM培养基, 在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 当细胞长至80%以上时, 利用TRIzol法提取细胞中的总RNA。利用Narodrop分光光度计鉴定RNA的浓度及纯度。以RNA为模板, 反转录合成cDNA。以cDNA为模板, 进行qRT-PCR反应。总反应体系为10 μL , 包括1 μL cDNA、1 μL 上游引物、1 μL 下游引物、5 μL Taq Master Mix II及2 μL RNase-free水。lncRNA CCAT2上游引物序列: 5'-AGA CAG TGC CAG CCA ACC-3', 下游引物序列: 5'-TGC CAA ACC CTT CCC TTA-3'; 内参基因GAPDH上游引物序列: 5'-AAT GGA CAA CTG GTC GTG GAC-3', 下游引物序列: 5'-CCC TCC AGG GGA TCT GTT TG-3'。反应条件为: 94°C 预变性30 s; 94°C 变性5 min, 60°C 退火50 s, 70°C 延伸10 s, 共40个循环。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因相对表达量。

Western blot实验: 用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液裂解细胞, BCA法进行蛋白定量。加入 $5\times$ 上样缓冲液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转膜, 条件为300 mA、90 min。用5%脱脂奶粉在室温条件下封闭2 h, TBST洗膜3次, 室温孵育一抗(稀释比例为1:1 000) 2 h, TBST洗膜3次, 然后室温孵育二抗(稀释比1:5 000) 1 h, TBST洗膜3次, 化学发光法曝光。

1.4 细胞转染

si-CCAT2: 5'-GUG CAA CUC UGC AAU UUA AUU-3', lncRNA CCAT2 NC-siRNA(模拟物): 5'-AAT GGA CAA CTG GTC GTG GAC-3'。转染前24 h, 将H1975细胞以1 000个/孔的密度在96孔板中培养, 并根据Lipofectamine 3000说明书, 用1.0 μL siRNA或质粒转染H1975细胞, 转染48 h后进行后续实验。

1.5 CCK-8、Transwell迁移实验及Matrigel侵袭实验

用CCK-8法检测H1975细胞的增殖情况。将转染

RNA或质粒后的100 μL H1975细胞悬液以3 000个/孔的密度接种在96孔板中, 每组设3个复孔, 12 h后, 每孔加入10 μL CCK-8溶液。使用分光光度计在24、48、72 h测量450 nm波长处的吸光度(D)值, 评估细胞数。细胞迁移情况通过Transwell迁移实验测定, 细胞侵袭能力通过Matrigel侵袭实验测定, Matrigel实验中以1:3的比例将50 mg/L的Matrigel和无血清DMEM培养基混合, 每个上室铺100 μL 混合液, 37°C 过夜后使Matrigel凝固, 以10 000个/孔的密度将细胞悬液加入上室, Transwell实验中直接将细胞悬液加入24孔板的上腔室中, 每组设3个复孔, 将含有10%胎牛血清的DMEM培养基放入下腔室, 37°C 孵育48 h后, 使用棉签擦拭上腔室中的肿瘤细胞。侵入下室的细胞用4%甲醛固定20 min后, 结晶紫染色10 min, 通过倒置显微镜(40 \times)随机选取5个视野计算迁移入下腔室的细胞数, 每个区域中细胞的数量和平均值代表细胞的迁移或侵袭能力。

1.6 RNA免疫共沉淀(RIP)及RNA pull-down实验

RNA免疫共沉淀: 消化并通过离心收集H1975细胞, 用PBS清洗2次, 加入2 mL IP缓冲液, 重悬后于 4°C 、 $12\,000\text{ r/min}$ 条件下离心10 min, 保留上清, 加入20 μL 磁珠, 并分别加入5 μL 的IgG及抗SIRT1抗体, 混匀后于 4°C 过夜, 在 4°C 、 $12\,000\text{ r/min}$ 条件下离心10 min, 保留沉淀, 加入0.5 μL 洗脱缓冲液, 清洗3次。加入Trizol提取RNA, 然后将其逆转录为cDNA, 用qRT-PCR进行检测。RNA pull-down实验: 以生物素RNA标记混合液标记lncRNA CCAT2序列, 以截断突变的CCAT2序列作为对照(CCAT2-mut), 经DNA酶I消化后, 用RNA纯化试剂盒纯化。取1 μg 生物素标记的RNA, 加入RNA缓冲液中, 于 95°C 变性2 min, 冰上孵育5 min, 室温静置30 min。取H1975细胞, 加入细胞裂解液, $13\,000\text{ r/min}$ 离心10 min, 收集上清, 加入0.4 μg 生物素标记的RNA, 加入0.5 mL RIP缓冲液于 37°C 孵育1 h, 加入50 μL 琼脂糖磁珠室温孵育1 h。RIP缓冲液洗涤5次后, 进行PCR检测, 加入上样缓冲液后进行Western blot检测。

1.7 统计学方法

利用SPSS 19.0软件进行统计分析。计数资料以率(%)表示, 组间比较采用卡方检验, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA CCAT2在肺癌组织和肺癌细胞系中的表达

癌组织中的lncRNA CCAT2相对表达量明显高于癌旁组织(图1A);与正常肺上皮细胞BEAS-2B相比,肺癌A549、H1299、H1975及H358细胞中lncRNA CCAT2的相对表达量明显较高,其中H1975细胞中的表达水平最高(图1B)。

2.2 癌组织中lncRNA CCAT2表达与临床病理参数的关系

以lncRNA CCAT2相对表达量的中位数为界,将癌组织分为高lncRNA CCAT2表达组和低lncRNA CCAT2表达组,癌组织中lncRNA CCAT2相对表达量与肿瘤TNM分期、肿瘤直径及淋巴结转移有关($P < 0.05$),而与年龄、性别、吸烟史及病理分级无关($P > 0.05$)。肿瘤TNM分期III~IV期、肿瘤直径 ≥ 3 cm、伴淋巴结转移癌组织中lncRNA CCAT2水平较高(表1)。

2.3 siRNA敲除lncRNA CCAT2对肺癌细胞系H1975增殖及迁移能力的影响

由于H1975细胞中lncRNA CCAT2表达水平最高,因而用H1975细胞进行细胞功能实验。与转染NC si-CCAT2相比,转染si-CCAT2的H1975细胞中的lncRNA CCAT2相对表达量显著降低($t = 22.995$, $P < 0.000 1$)(图2A)。CCK-8实验结果表明,与转染

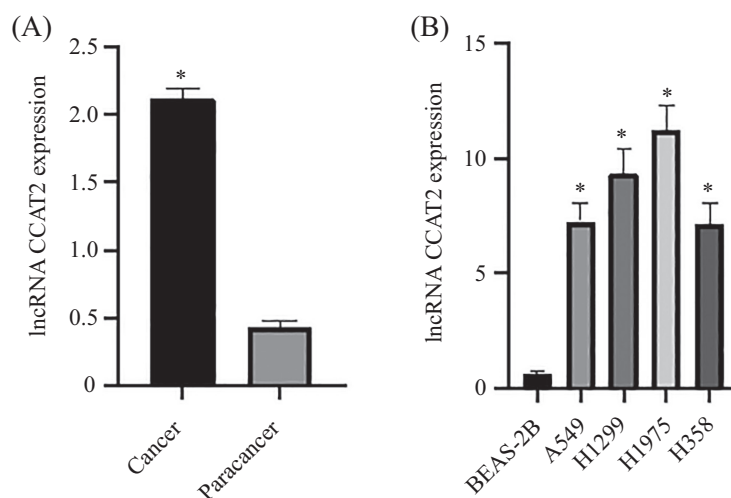
NC si-CCAT2的质粒相比,转染si-CCAT2的H1975细胞在第24、48、72 h的增殖能力均显著降低($P < 0.05$)(图2B)。Transwell小室及Matrigel侵袭实验表明,与转染NC si-CCAT2相比,转染si-CCAT2的H1975细胞迁移及浸润的数量明显较少,迁移及浸润能力明显较低(图2C~图2E)。

2.4 lncRNA CCAT2通过SIRT1对肺癌细胞系中Wnt/ β -catenin信号通路信号蛋白的影响

利用Western blot分析沉默lncRNA CCAT2表达对H1975细胞中Wnt/ β -catenin信号通路信号蛋白表达的影响。与NC si-CCAT2组相比,si-CCAT2组中SIRT1,细胞核中 β -catenin蛋白、Cyclin D1、myc蛋白的表达降低,而细胞质中 β -catenin蛋白表达升高(图3A)。与NC-SIRT1组相比,siRNA沉默SIRT1表达后,细胞核 β -catenin蛋白、Cyclin D1、myc蛋白的表达降低,而细胞质中 β -catenin蛋白表达升高;过表达SIRT1后,细胞核 β -catenin蛋白、Cyclin D1、myc蛋白的表达明显升高,而细胞质中 β -catenin蛋白表达降低(图3B)。

2.5 lncRNA CCAT2与SIRT1相互作用

本研究应用RIP及RNA pull-down实验验证lncRNA CCAT2与SIRT1相互作用,RIP实验中,与非特异性抗体比较,结合于SIRT1抗体的RNA呈明显的lncRNA CCAT2富集(图4A);而RNA pull-down实验中,lncRNA CCAT2的截短突变组细胞中SIRT1相



A: 癌组织与癌旁组织中lncRNA CCAT2表达比较。* $P < 0.05$,与癌组织相比。B: 肺癌各细胞系中lncRNA CCAT2表达比较。* $P < 0.05$,与肺癌细胞系相比。

A: comparison of lncRNA CCAT2 expression in cancer tissues and paracancer tissues. * $P < 0.05$ compared with cancer tissue. B: comparison of lncRNA CCAT2 expression in various lung cancer cell lines. * $P < 0.05$ compared with lung cancer cell line.

图1 lncRNA CCAT2在肺癌组织和肺癌细胞系的表达

Fig.1 Expression of lncRNA CCAT2 in lung cancer tissues and lung cancer cell lines

表1 肺癌组织中lncRNA CCAT2表达与临床病理参数关系

Table 1 The relationship between the expression of lncRNA CCAT2 and clinicopathological parameters in lung cancer tissues

参数 Parameter	例数 <i>n</i>	lncRNA CCAT2		χ^2	<i>P</i>
		高表达 High expression	低表达 Low expression		
Age				0.125	0.723
<60	51	27	24		
≥ 60	46	26	20		
Sex				0.290	0.590
Male	50	26	24		
Female	47	27	20		
Smoking history					
Yes	61	33	28	0.428	0.512
NO	36	17	19		
Tumor diameter /cm				4.738	0.030
≥ 3	55	37	18		
<3	42	19	23		
Pathological grading				0.514	0.473
High differentiation	49	24	25		
Medium low differentiation	48	27	21		
TNM staging				3.919	0.048
I-II	74	34	40		
III-IV	23	16	7		
Lymph node metastasis				5.152	0.023
Yes	25	17	8		
NO	72	30	42		

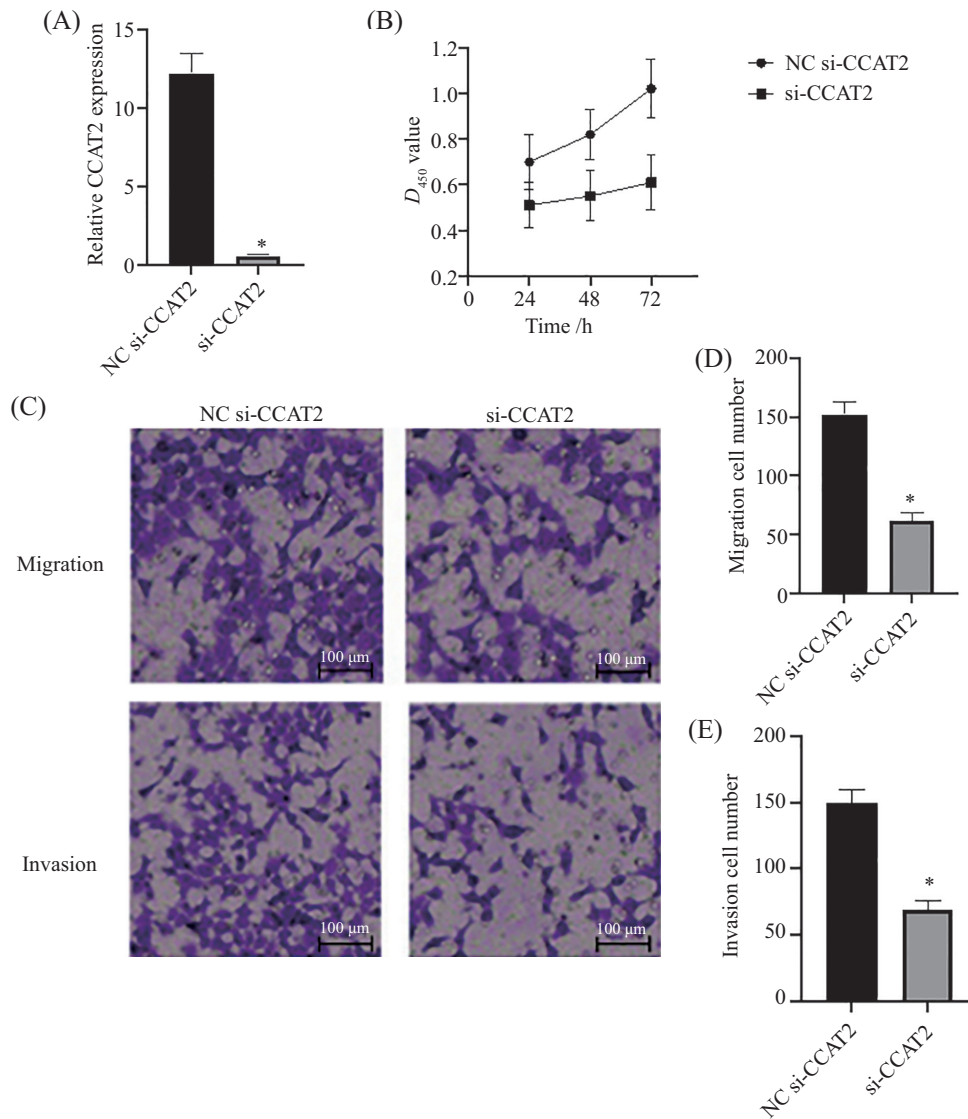
对表达量明显低于lncRNA CCAT2组, 结果表明lncRNA CCAT2与SIRT1蛋白存在相互结合的作用(图4B和图4C)。

3 讨论

非编码RNA如lncRNA、miRNA及环状RNA等在NSCLC的发生发展中发挥重要的调控作用, 可通过影响信号传导及癌基因的表达, 调控细胞增殖、凋亡及浸润转移等恶性生物学行为^[7-8]。近年来在NSCLC中已经发现多种lncRNA表达异常的现象, 检测异常表达的lncRNA有助于肿瘤的早期诊断、治疗及预后评估^[9]。因此, lncRNA有望成为NSCLC中新的肿瘤标志物。

CCAT2是一种定位于染色体8q24区域的新型非编码RNA, 最初是由LING等^[10]在结肠癌中鉴定的。近年来发现, CCAT2在多种肿瘤(包括NSCLC、食道癌、宫颈癌和膀胱癌)中高度表达, 这表明CCAT2在肿瘤中可能发挥癌基因的作用^[11]。在本研究中, 肺癌组织及肺癌细胞系中lncRNA CCAT2的相对表达

量明显高于癌旁组织及正常肺细胞系, 目前其机制尚不清楚, 可能与CCAT2基因启动子或增强子点激活活性突变有关。有研究表明, lncRNA CCAT2定位于8q24.21染色体区域的rs6983267位点的单核苷酸多态性与结直肠癌的风险增加相关^[12]。而在其他癌症类型, 包括前列腺癌、卵巢癌和炎症性乳腺癌中, 也观察到了这种单核苷酸多态性增加了肿瘤发生的风险^[13]。此外, 癌组织中lncRNA CCAT2相对表达量与肿瘤TNM分期、肿瘤直径及淋巴结转移有关, III~IV期、肿瘤直径 ≥ 3 cm、伴淋巴结转移癌组织中lncRNA CCAT2水平明显较高, 其机制与lncRNA CCAT2表达增加促进肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭有关^[14], 本研究在体外细胞实验中进一步证实, 敲除lncRNA CCAT2表达后, 肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭能力明显减弱。为进一步研究lncRNA CCAT2表达影响肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭能力的机制, 我们检测了改变lncRNA CCAT2表达对Wnt/ β -catenin信号通路的影响, 结果敲除lncRNA CCAT2后SIRT1, 细胞核中 β -catenin蛋白、Cyclin D1、myc蛋白的表达均



A: siRNA敲除H1975细胞中lncRNA CCAT2的效果。* $P < 0.05$, 与NC si-CCAT2组相比。B: siRNA敲除lncRNA CCAT2表达对H1975细胞增殖的影响。C~E: siRNA敲除lncRNA CCAT2表达对H1975细胞迁移和侵袭能力的影响。* $P < 0.05$, 与NC si-CCAT2组相比。

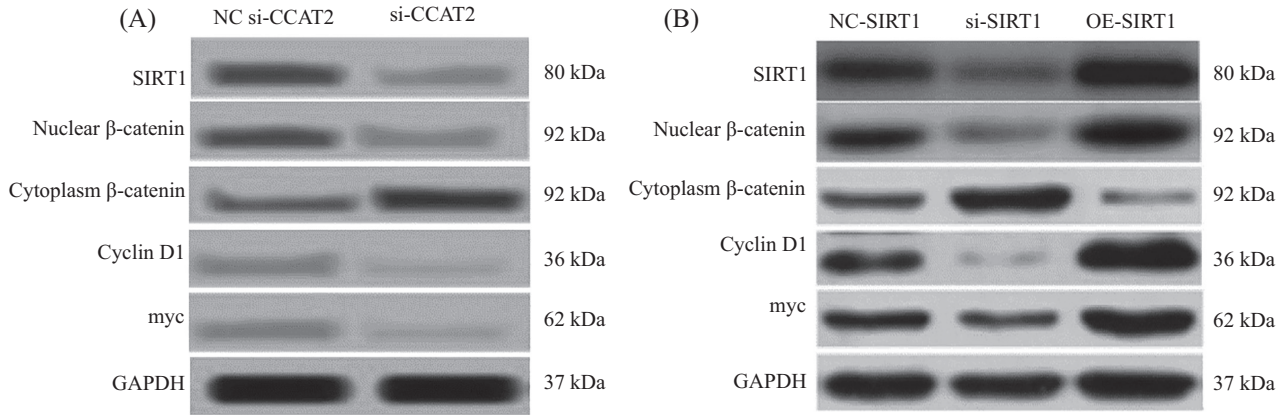
A: the knockout effect of lncRNA CCAT2 in H1975 cells by siRNA. * $P < 0.05$ compared with NC si-CCAT2 group. B: the effect of lncRNA CCAT2 knockout on the proliferation of H1975 cells. C-E: the effects of lncRNA CCAT2 knockout on the migration and invasion abilities of H1975 cells. * $P < 0.05$ compared with NC si-CCAT2 group.

图2 siRNA敲除lncRNA CCAT2对肺癌细胞系H1975增殖及迁移能力的影响

Fig.2 Effects of the siRNA knockout of lncRNA CCAT2 on the proliferation and migration of lung cancer cell line H1975

显著降低, 而细胞质中 β -catenin蛋白表达升高。分析其原因, 可能是敲除lncRNA CCAT2后, β -catenin蛋白的核转位被抑制, 导致细胞质中 β -catenin蛋白水平升高。Cyclin D1是影响细胞G₁/S转化的关键细胞周期蛋白, 其表达降低或升高后导致细胞增殖能力降低或增高, 进而导致肿瘤体积增大^[15]。此外, myc作为一种细胞内重要的转录因子, 可激活*Snail*等基因的表达, 促进肿瘤细胞发生上皮-间质转化, 并促进微血管生成, 导致肿瘤转移^[16]。为进一步挖掘lncRNA CCAT2影响Wnt/ β -catenin信号通路的关键分子, 我

们发现敲除lncRNA CCAT2表达后, SIRT1表达亦显著降低, 因而lncRNA CCAT2可能通过影响SIRT1的表达发挥作用, 本研究应用RIP及RNA pull-down实验进一步证实两者存在相互作用, 可能与lncRNA CCAT2结合到*SIRT1*启动子区并促进其表达有关, 但其具体作用机制有待深入研究。此外, lncRNA CCAT2还可通过影响miRNA的表达, 间接发挥调控SIRT1表达的作用。细胞中某些miRNA如miR-138-5p等能够结合于*SIRT1* mRNA的3'非编码区, 从而抑制*SIRT1*的表达^[17]。有研究报道, lncRNA CCAT2可

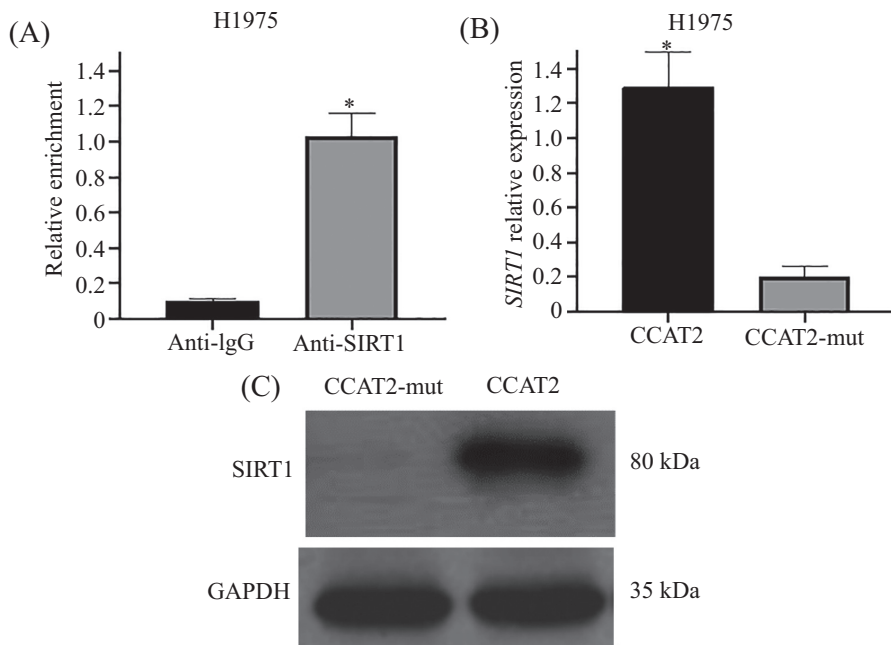


A: siRNA沉默lncRNA CCAT2表达对H1975细胞中SIRT1及Wnt/ β -catenin信号蛋白表达的影响。B: 沉默或过表达SIRT1对Wnt/ β -catenin信号蛋白表达的影响。

A: the effects of lncRNA CCAT2 silencing by siRNA on the expression of SIRT1 and Wnt/ β -catenin signaling proteins in H1975 cells. B: the effect of silencing or overexpressing SIRT1 on the expression of Wnt/ β -catenin signaling protein.

图3 lncRNA CCAT2通过SIRT1对肺癌细胞系Wnt/ β -catenin信号通路信号蛋白的影响

Fig.3 The effect of lncRNA CCAT2 on Wnt/ β -catenin signaling pathway proteins in lung cancer cell lines through SIRT1



A: RIP证实H1975细胞中lncRNA CCAT2与SIRT1相互作用。* P <0.05, 与Anti-SIRT1组相比。B: qRT-PCR检测CCAT2及CCAT2-mut组SIRT1的mRNA表达。* P <0.05, 与CCAT2组相比。C: Western blot检测CCAT2及CCAT2-mut组SIRT1的蛋白表达。

A: the binding of lncRNA CCAT2 and SIRT1 in H1975 cells was confirmed by RIP. * P <0.05 compared with Anti-SIRT1 group. B: the mRNA expression of SIRT1 in CCAT2 and CCAT2-mut groups was detected by qRT-PCR. * P <0.05 compared with CCAT2 group. C: the protein expression of SIRT1 in CCAT2 and CCAT2-mut groups was detected by Western blot.

图4 lncRNA CCAT2与 SIRT1相互作用

Fig.4 lncRNA CCAT2 interacts with SIRT1

抑制前体 miRNA 如 miR-145 转运到细胞质中, 选择性地阻断 miRNA 的成熟, 进而阻断 Dicer 在核外对前体 miRNA 的切割成熟过程^[18]。本研究中, 在过表达 SIRT1 后, 细胞核中 β -catenin 蛋白、Cyclin D1、myc 蛋白的表达均显著升高, 进一步证实 SIRT1 可能是

lncRNA CCAT2 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键分子。研究表明, SIRT1 能够与 β -catenin 结合并促进其去乙酰化, 导致 β -catenin 向细胞核内转位, 胞质中 β -catenin 水平降低, 进而激活下游信号通路, 促进细胞增殖及迁移^[19]。此外, 细胞内 β -catenin 的调控精细

而复杂,一般情况下,肿瘤细胞中由于*GSK3β*、*APC*、*AXIN*等抑癌基因的突变,导致胞质中 β -catenin不能被降解,胞质中 β -catenin水平显著增加并进入细胞核,进而促进下游癌基因如*Wnt*的转录,导致肿瘤的恶性进展。但也有研究报道,某些基因如*TRIM33*等,能够促进胞质中 β -catenin的降解^[20]。因此结合本研究,我们推测lncRNA CCAT2除了与SIRT1之间的相互作用外,还可能参与调控 β -catenin在胞质中的降解,因此有待深入研究。

综上所述,NSCLC中lncRNA CCAT2表达升高,lncRNA CCAT2通过调控SIRT1蛋白表达激活Wnt/ β -catenin信号通路,进而影响肺癌细胞增殖、迁移及浸润能力,有望成为NSCLC新的肿瘤标志物。

参考文献 (References)

- [1] FATHI Z, SYN N L, ZHOU J G, et al. Molecular epidemiology of lung cancer in Iran: implications for drug development and cancer prevention [J]. *J Hum Genet*, 2018, 63(7): 783-94.
- [2] LV S, XUE J, WU C, et al. Identification of a panel of serum microRNAs as biomarkers for early detection of lung adenocarcinoma [J]. *J Cancer*, 2017, 8(1): 48-56.
- [3] TORRE L A, SIRGEL R L, JEMAL A. Lung cancer statistics [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 893: 1-19.
- [4] YU Y, NANG P, FARHANA L, et al. A novel mechanism of lncRNA and miRNA interaction: CCAT2 regulates miR-145 expression by suppressing its maturation process in colon cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 155-62.
- [5] LIU S, YANG H, HU B, et al. Sirt1 regulates apoptosis and extracellular matrix degradation in resveratrol-treated osteoarthritis chondrocytes via the Wnt/ β -catenin signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 5057-62.
- [6] CHEN K L, LI L, WANG Y R, et al. Long noncoding RNA and mRNA profiling in MDA-MB-231 cells following RNAi-mediated knockdown of SIRT7 [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 5115-28.
- [7] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [8] WAT S I, NNKA K, SU K, et al. Lung Cancer Surgical Study Group (LCSSG) of the Japan Clinical Oncology Group (JCOG). Neoadjuvant and adjuvant therapy for stage III non-small cell lung cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2017, 47(12): 1112-8.
- [9] PENG W, WANG J, SHAN B, et al. Diagnostic and prognostic potential of circulating long non-coding RNAs in non small cell lung cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(2): 816-27.
- [10] CHEN B, DRAGOMIR M P, FABRIS L, et al. The long non-coding RNA CCAT2 induces chromosomal instability through BOP1-AURKB signaling [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(6): 2146-62, e33.
- [11] WANG D, CHEN Z, XU H, et al. Long noncoding RNA CCAT2 as a novel biomaker of metastasis and prognosis in human cancer: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 75664-74.
- [12] GAO P, SUN D, GUO H, et al. LncRNA CCAT2 promotes proliferation and suppresses apoptosis of colorectal cancer cells [J]. *J BUON*, 2020, 25(4): 1840-6.
- [13] YAN L, WU X, YIN X, et al. LncRNA CCAT2 promoted osteosarcoma cell proliferation and invasion [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(5): 2592-9.
- [14] CAI Y, LI X, SHEN P, et al. CCAT2 is an oncogenic long non-coding RNA in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 1-12.
- [15] JOHN R R, MALATHI N, RAVINDRAN C, et al. Mini review: multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior [J]. *Indian J Dent Res*, 2017, 28(2): 187-92.
- [16] LIN X, SUN R, ZHAO X, et al. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling [J]. *J Mol Med*, 2017, 95(1): 53-67.
- [17] TIAN S, GUO X, YU C, et al. miR-138-5p suppresses autophagy in pancreatic cancer by targeting SIRT1 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7): 11071-82.
- [18] YU Y, NANGGIA P, FARHANA L, et al. A novel mechanism of lncRNA and miRNA interaction: CCAT2 regulates miR-145 expression by suppressing its maturation process in colon cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 155-61.
- [19] XIN Y, LI Z, ZHENG H, et al. CCAT2: a novel oncogenic long non-coding RNA in human cancers [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(3): 123-42.
- [20] XUE J, CHEN Y, WU Y, et al. Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear β -catenin degradation [J]. *Nat Commun*, 2015, 6(4): 6156-71.