

崔文洁,袁杰清,施海,等. lncRNA KTN1-AS1 调节 miR-153-3p/NFAT5 轴对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(2): 22-30.

Cui WJ, Yuan JQ, Shi H, et al. Long non-coding RNA KTN1-AS1 affects proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by regulating miR-153-3p/NFAT5 axis [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(2): 22-30.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.02.004

lncRNA KTN1-AS1 调节 miR-153-3p/NFAT5 轴对 非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

崔文洁,袁杰清,施海,吴思燕,韩玉,陈云峰*

(徐州市第一人民医院,徐州医科大学附属徐州市立医院,江苏 徐州 221116)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA Kinectin 1 反义 RNA 1(lncRNA KTN1-AS1)调控 miR-153-3p/活化 T 细胞核因子 5(NFAT5)轴对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法** 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)、Western blot 分别检测 NSCLC 组织、癌旁组织、人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 及 NSCLC 细胞系 A549、HCC827、H1299 中 KTN1-AS1、miR-153-3p 表达及 NFAT5 蛋白表达;将 A549 细胞分为 Ct 组、si-NC 组、si-KTN1-AS1 组、mimic NC 组、miR-153-3p mimic 组、miR-153-3p mimic+pcDNA 组、miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组,qRT-PCR 检测细胞中 KTN1-AS1、miR-153-3p 表达;CCK-8 法检测细胞增殖;平板克隆实验检测细胞克隆形成能力;划痕愈合实验检测细胞迁移;Transwell 检测细胞侵袭;Western blot 检测 NFAT5、细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 蛋白表达;双荧光素酶验证 KTN1-AS1 与 miR-153-3p、miR-153-3p 与 NFAT5 的关系。**结果** 在 NSCLC 组织和细胞中,KTN1-AS1、NFAT5 蛋白高表达,miR-153-3p 低表达,且在 A549 细胞中 KTN1-AS1、NFAT5 蛋白表达最高,miR-153-3p 表达最低($P < 0.05$),因此,选择 A549 细胞为研究对象;与 si-NC 组比较,si-KTN1-AS1 组 KTN1-AS1、NFAT5 蛋白表达降低,miR-153-3p 表达升高($P < 0.05$);与 mimic NC 组比较,miR-153-3p mimic 组 KTN1-AS1 表达量变化差异不显著($P > 0.05$),NFAT5 蛋白表达降低,miR-153-3p 表达升高($P < 0.05$);与 miR-153-3p mimic 组、miR-153-3p mimic+pcDNA 组比较,miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组 KTN1-AS1、miR-153-3p 表达量变化差异不显著($P > 0.05$),NFAT5 蛋白表达升高($P < 0.05$);下调 KTN1-AS1 或上调 miR-153-3p 均可抑制 A549 细胞增殖、迁移、侵袭及 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达;过表达 NFAT5 减弱了上调 miR-153-3p 对 A549 细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用;KTN1-AS1 靶向调控 miR-153-3p/NFAT5 轴。**结论** 沉默 KTN1-AS1 可能通过上调 miR-153-3p 来抑制 NFAT5 表达,进而抑制 A549 细胞增殖、迁移和侵袭。

【关键词】 Kinectin 1 反义 RNA 1;miR-153-3p;非小细胞肺癌;增殖;侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 02-0022-09

Long non-coding RNA KTN1-AS1 affects proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by regulating miR-153-3p/NFAT5 axis

CUI Wenjie, YUAN Jieqing, SHI Hai, WU Siyan, HAN Yu, CHEN Yunfeng*

(Xuzhou First People's Hospital, the Affiliated Xuzhou Municipal Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221116, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of long non-coding RNA Kinectin 1 antisense RNA 1 (lncRNA KTN1-AS1) on the proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells and its mechanism of regulating the miR-153-3p/activated T cell nuclear factor 5 (NFAT5) axis. **Methods** Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to measure KTN1-AS1 and miR-153-3p expression and NFAT5 protein expression

【基金项目】江苏省重点实验室开放课题(XZSYSKF2021002);徐州医科大学附属医院发展基金(XYFM2020007)。

【作者简介】崔文洁(1970—),女,硕士,研究方向:肺恶性肿瘤。E-mail:tiank2022@126.com

【通信作者】陈云峰(1985—),男,硕士,研究方向:肺恶性肿瘤。E-mail:cloudwindchen@163.com

in NSCLC and adjacent tissues; human normal lung epithelial cells BEAS-2B; and NSCLC cell lines A549, HCC827, and H1299. A549 cells were divided into a Ct group, si-NC group, si-KTN1-AS1 group, mimic NC group, miR-153-3p mimic group, miR-153-3p mimic+pcDNA group, and miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 group. qRT-PCR was applied to detect the expressions of KTN1-AS1 and miR-153-3p in cells. CCK-8 assay was applied to detect cell proliferation, and a plate cloning assay was used to detect the ability of cells to form clones. A scratch-healing assay was applied to detect cell migration, and a Transwell assay was used to detect cell invasion. Western blot was applied to detect NFAT5, CyclinD1, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 protein expression. Dual luciferase was applied to verify the relationships between KTN1-AS1 and miR-153-3p, and NFAT5. **Results** In NSCLC tissues and cells, KTN1-AS1 and NFAT5 proteins were expressed at high levels, and miR-153-3p was expressed at low levels. In A549 cells, KTN1-AS1 and NFAT5 protein expression levels were the highest, and miR-153-3p levels were the lowest ($P < 0.05$); therefore, A549 cells were selected as the research subject. Compared with the si-NC group, the si-KTN1-AS1 group showed decreased expression levels of KTN1-AS1 and NFAT5 protein and increased expression levels of miR-153-3p ($P < 0.05$). Compared with the mimic NC group, the miR-153-3p mimic group showed statistically comparable KTN1-AS1 expression ($P > 0.05$), decreased NFAT5 protein expression, and increased miR-153-3p expression ($P < 0.05$). Compared with the miR-153-3p mimic and miR-153-3p mimic + pcDNA groups, the miR-153-3p mimic + pcDNA-NFAT5 group had statistically comparable expression of KTN1-AS1 and miR-153-3p in ($P > 0.05$) and increased protein expression of NFAT5 ($P < 0.05$). Down-regulation of KTN1-AS1 or up-regulation of miR-153-3p inhibited the proliferation, migration, invasion, and protein expression of CyclinD1, MMP-2, and MMP-9 in A549 cells. Overexpression of NFAT5 attenuated the inhibitory effect of upregulating miR-153-3p on the proliferation, migration, and invasion of A549 cells. KTN1-AS1 targeted the miR-153-3p/NFAT5 axis. **Conclusions** Silencing KTN1-AS1 may inhibit the expression of NFAT5 by upregulating miR-153-3p, thereby inhibiting the proliferation, migration, and invasion of A549 cells.

【Keywords】 Kinectin 1-antisense RNA 1; miR-153-3p; non-small cell lung cancer; proliferation; invasion

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是肺癌的主要病理类型, 占肺癌病例的 80% 以上^[1]。目前, NSCLC 的主要治疗技术是手术切除、放化疗、靶向治疗和免疫治疗^[2]。尽管近年来在诊断和治疗方面取得了很大进展, 但全球 NSCLC 患者的 5 年生存率仍然低于 18%, 这主要归因于高复发率和高转移率^[3]。因此, 全面了解 NSCLC 发病机制可能有助于确定潜在的诊断生物标志物和治疗策略。大量研究表明长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 参与了 NSCLC 的进展^[4-5]。Kinectin 1 反义 RNA 1 (Kinectin 1-Antisense RNA 1, KTN1-AS1) 是一种新发现的肿瘤相关 lncRNA, 已有研究报道, KTN1-AS1 在 NSCLC 组织和细胞中高表达, 过表达 KTN1-AS1 可促进 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭^[6]。表明 KTN1-AS1 可促进 NSCLC 细胞恶性生物学行为, 但具体机制尚不完全清楚。据报道, lncRNA 可作为 ceRNA 发挥作用, 通过竞争性海绵化 miRNA 介导 mRNA 表达来促进癌症进展^[7]。本研究通过生物信息学分析发现 KTN1-AS1 与 miR-153-3p、miR-153-3p 与活化 T 细胞核因子 5 (nuclear factor of activated T cell 5, NFAT5) 存在结合位点。相关研究报道, 上调 miR-

153-3p 抑制了 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭^[8]; 过表达 NFAT5 促进了 NSCLC 的恶性进展^[9]。而 KTN1-AS1 能否通过调节 miR-153-3p/NFAT5 轴影响 NSCLC 细胞恶性生物学行为尚未见报道。因此, 本研究主要探究 KTN1-AS1 对 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响以及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 及 NSCLC 细胞系 A549、HCC827、H1299 均购自北京普非生物公司。

1.1.2 临床组织

收集 2019 年 6 月~2021 年 6 月期间在本院首次确诊为 NSCLC 的 21 例患者的 NSCLC 组织, 以及距离癌组织 4 cm 处的癌旁组织。所有患者均提供了知情同意书, 本研究得到本院伦理委员会的批准。

1.2 主要试剂与仪器

KTN1-AS1 小干扰 RNA (si-KTN1-AS1) 及其阴性对照 (si-NC)、NFAT5 过表达物 (pcDNA-NFAT5) 及其阴性对照 (pcDNA)、miR-153-3p 过表达物 (miR-153-3p mimic) 及其阴性对照 (mimic NC) 均购

自上海善然生物公司; CCK-8 试剂盒(批号: 20201201)购自深圳市纽邦生物公司; 兔源一抗 NFAT5(批号: ab3446)、细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)(批号: ab16663)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)-2(批号: ab181286)、MMP-9(批号: ab137867)、GAPDH(批号: ab9484)及羊抗兔 IgG 二抗(批号: ab6721)均购自英国 Abcam 公司。

DG5031 酶标仪购自上海巴玖实业有限公司; TS2009 光学显微镜购自北京海富达科技有限公司; DYCZ-24DH 型蛋白电泳仪购自北京六一生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与分组

在 37℃、5% CO₂ 条件下,将 BEAS-2B、A549、HCC827、H1299 细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中。取对数生长期的 A549 细胞,将 si-NC、si-KTN1-AS1、mimic NC、miR-153-3p mimic、miR-153-3p mimic+pcDNA、miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 分别转染于 A549 细胞,并命名为 si-NC 组、si-KTN1-AS1 组、mimic NC 组、miR-153-3p mimic 组、miR-153-3p mimic+pcDNA 组、miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组。另取正常培养的 A549 细胞作为 Ct 组,转染 48 h 后,用于后续实验。

1.3.2 qRT-PCR 检测组织和细胞中 KTN1-AS1、miR-153-3p 表达

TRIzol 试剂用于提取总 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA 后,以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应。GAPDH、U6 分别用作 KTN1-AS1、miR-153-3p 内参,通过 2^{-ΔΔCt} 法计算基因的表达水平。引物序列: GAPDH: 正向 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', 反向 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'; KTN1-AS1: 正向 5'-ATGCACACTTCTCGGCTAAGAGTC-3', 反向 5'-CTACAATGCCACAAGTGATTCCAGC-3'; U6: 正向 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; miR-153-3p: 正向 5'-TTGCATAGTCACAAAAGTGAT-3', 反向 5'-CAGTGCGTGTCTGCTGGAGT-3'。

1.3.3 CCK-8 法检测 A549 细胞增殖

将各组细胞(1×10⁴ 个/孔)接种在含有 100 μL RPMI 1640 培养基的 96 孔板中,在 37℃、5% CO₂ 下培养 48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37℃ 孵育 2 h。将 96 板置于酶标仪上并测量每个孔在

450 nm 波长下的光密度(OD)值。

1.3.4 平板克隆实验检测 A549 细胞克隆形成能力

将 300 个 A549 细胞接种于 6 cm 细胞培养板中,在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养 14 d。然后除去培养液,将细胞用甲醇固定、0.1% 结晶紫染色。观察克隆形成情况,并统计克隆形成率,克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.3.5 划痕愈合实验检测 A549 细胞迁移

将细胞接种于 6 孔板(1×10⁶ 个/孔)中,37℃、5% CO₂ 培养。当细胞汇合度达到 100% 时,使用 200 μL 移液器吸头刮擦细胞层以制造划痕,并将含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基更换为无 FBS 的 RPMI 1640 培养基,通过光学显微镜观察细胞在 0、48 h 时的划痕愈合图像。划痕愈合率(%)=(0 h 划痕宽度-48 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%。

1.3.6 Transwell 检测 A549 细胞侵袭

Transwell 上室预涂有 Matrigel,将 2×10⁵ 个细胞接种在含无血清 RPMI 1640 培养基的上室中。将含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基添加到下室中。孵育 48 h 后,用棉签除去上室下表面未侵袭的细胞,将侵袭的细胞用 4% 多聚甲醛固定,0.1% 结晶紫染色,随机选择 5 个视野通过光学显微镜观察细胞侵袭情况。

1.3.7 Western blot 检测 NFAT5、CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达

RIPA 裂解缓冲液用于提取组织和细胞中的总蛋白,将蛋白质定量、电泳分离、转膜、封闭后,将 PVDF 膜与一抗 NFAT5、CyclinD1、MMP-2、MMP-9,均为 1:1000 稀释,在 4℃ 下过夜孵育,再加入二抗(1:2000)在室温下孵育 2 h。加入 ECL 试剂观察蛋白显色情况,通过 Quantity One 软件评估蛋白灰度值。

1.3.8 双荧光素酶报告基因实验

构建 KTN1-AS1 野生型质粒(KTN1-AS1-WT)和突变型质粒(KTN1-AS1-MUT),将 KTN1-AS1-WT 和 KTN1-AS1-MUT 分别与 mimic NC 或 miR-153-3p mimic 共转染于 A549 细胞,48 h 后检测荧光素酶活性。

构建 NFAT5 野生型质粒(NFAT5-WT)和突变型质粒(NFAT5-MUT),将 NFAT5-WT 和 NFAT5-MUT 分别与 mimic NC 或 miR-153-3p mimic 共转染

于 A549 细胞,48 h 后评估荧光素酶活性变化。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析,计量资料表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)。单因素方差分析用于多组间的比较,进一步两组间的比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

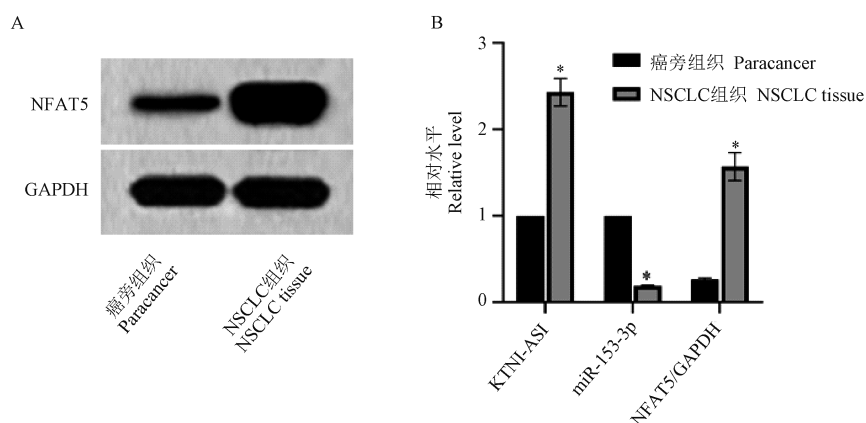
2.1 KTN1-AS1、miR-153-3p、NFAT5 蛋白在组织和细胞中的表达

与癌旁组织比较,NSCLC 组织中 KTN1-AS1、NFAT5 蛋白表达升高,miR-153-3p 表达降低($P < 0.05$),见图 1;与 BEAS-2B 细胞比较,A549、HCC827、H1299 细胞中 KTN1-AS1、NFAT5 蛋白表达升高,miR-153-3p 表达降低,且 A549 细胞中

KTN1-AS1、NFAT5 蛋白表达量最高,miR-153-3p 表达量最低,因此,选择 A549 细胞为研究对象,见图 2。

2.2 KTN1-AS1、miR-153-3p、NFAT5 蛋白在 A549 细胞中的表达

与 Ct 组、si-NC 组比较,si-KTN1-AS1 组 KTN1-AS1、NFAT5 蛋白表达降低,miR-153-3p 表达升高($P < 0.05$);与 Ct 组、mimic NC 组比较,miR-153-3p mimic 组 KTN1-AS1 表达量变化差异不显著($P > 0.05$),NFAT5 蛋白表达降低,miR-153-3p 表达升高($P < 0.05$);与 miR-153-3p mimic 组、miR-153-3p mimic+pcDNA 组比较,miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组 KTN1-AS1、miR-153-3p 表达量变化差异不显著($P > 0.05$),NFAT5 蛋白表达升高($P < 0.05$),见图 3 和表 1。

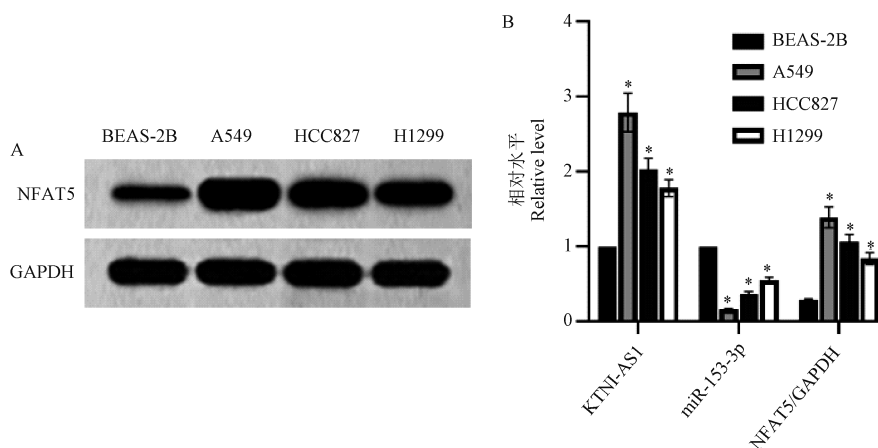


注:与癌旁组织比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 KTN1-AS1、miR-153-3p 和 NFAT5 蛋白在组织中的表达($\bar{x}\pm s, n=21$)

Note. Compared with paracancer, * $P < 0.05$.

Figure 1 Expression of KTN1-AS1, miR-153-3p and NFAT5 proteins in tissues



注:与 BEAS-2B 细胞比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 KTN1-AS1、miR-153-3p 和 NFAT5 蛋白在细胞中的表达($\bar{x}\pm s, n=6$)

Note. Compared with BEAS-2B cells, * $P < 0.05$.

Figure 2 Expression of KTN1-AS1, miR-153-3p and NFAT5 proteins in cells

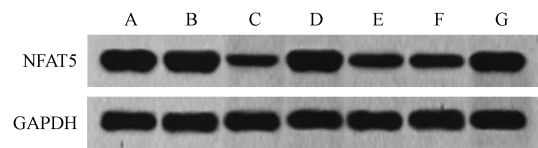
2.3 各组 A549 细胞增殖能力的影响

与 Ct 组、si-NC 组比较, si-KTN1-AS1 组 A549 细胞 OD₄₅₀ 值、克隆形成率降低 ($P < 0.05$); 与 Ct 组、mimic NC 组比较, miR-153-3p mimic 组 A549 细胞 OD₄₅₀ 值、克隆形成率降低 ($P < 0.05$); 与 miR-153-3p mimic 组、miR-153-3p mimic+pcDNA 组比较, miR-153-3p mimic + pcDNA-NFAT5 组 A549 细胞 OD₄₅₀ 值、克隆形成率升高 ($P < 0.05$), 见图 4 和表 2。

2.4 各组 A549 细胞迁移能力的比较

与 Ct 组 (56.62 ± 4.17)、si-NC 组 (55.78 ± 5.03) 比较, si-KTN1-AS1 组 (24.45 ± 2.08) A549 细胞划痕愈合率降低 ($P < 0.05$); 与 Ct 组 (56.62 ± 4.17)、mimic NC 组 (57.12 ± 4.67) 比较, miR-153-3p mimic 组 (23.92 ± 2.26) A549 细胞划痕愈合率降低 ($P < 0.05$); 与 miR-153-3p mimic 组 (23.92 ± 2.26)、miR-

153-3p mimic + pcDNA 组 (24.45 ± 2.36) 比较, miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组 (40.52 ± 2.78) A549 细胞划痕愈合率升高 ($P < 0.05$), 见图 5。



注: A: Ct 组; B: si-NC 组; C: si-KTN1-AS1 组; D: mimic NC 组; E: miR-153-3p mimic 组; F: miR-153-3p mimic + pcDNA 组; G: miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组。

图 3 Western blot 检测 A549 细胞中 NFAT5 蛋白表达

Note. A, Ct group. B, si-NC group. C, si-KTN1-AS1 group. D, mimic NC group. E, miR-153-3p mimic group. F, miR-153-3p mimic + pcDNA group. G, miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 group.

Figure 3 Western blot detect NFAT5 protein expression in A549 cells

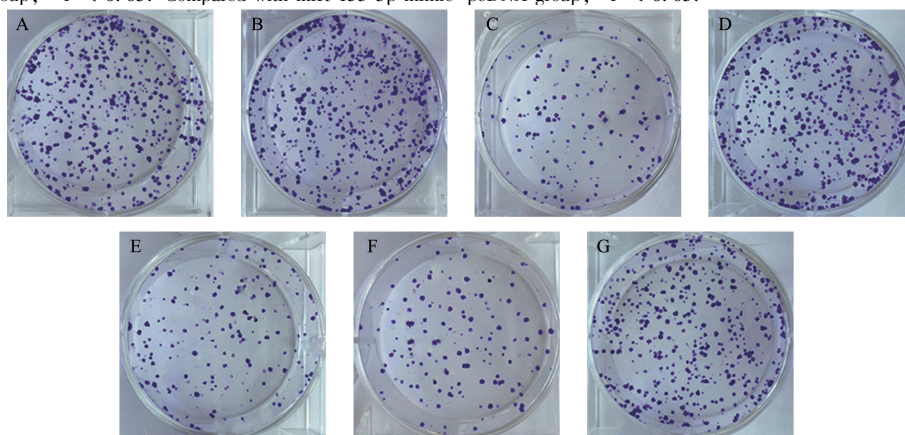
表 1 KTN1-AS1、miR-153-3p 和 NFAT5 蛋白在 A549 细胞中的表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Expression of KTN1-AS1, miR-153-3p and NFAT5 proteins in A549 cells

分组 Groups	KTN1-AS1	miR-153-3p	NFAT5/GAPDH
Ct 组 Ct group	1.00±0.00	1.00±0.00	1.42±0.12
si-NC 组 si-NC group	1.01±0.12	1.02±0.12	1.43±0.14
si-KTN1-AS1 组 si-KTN1-AS1 group	0.24±0.02 ^{*#}	1.94±0.15 ^{**}	0.44±0.04 ^{*#}
mimic NC 组 mimic NC group	1.02±0.13	1.03±0.12	1.44±0.15
miR-153-3p mimic 组 miR-153-3p mimic group	0.27±0.02 ^{*&}	2.48±0.16 ^{*&}	0.52±0.04 ^{*&}
miR-153-3p mimic+pcDNA 组	0.28±0.02	2.49±0.15	0.53±0.05
miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组	0.28±0.03	2.50±0.17	1.23±0.11 ^{@Δ}
miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 group			

注: 与 Ct 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 mimic NC 组比较, [&] $P < 0.05$; 与 miR-153-3p mimic 组比较, [@] $P < 0.05$; 与 miR-153-3p mimic+pcDNA 组比较, ^Δ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Ct group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with si-NC group, [#] $P < 0.05$. Compared with mimic NC group, [&] $P < 0.05$. Compared with miR-153-3p mimic group, [@] $P < 0.05$. Compared with miR-153-3p mimic+pcDNA group, ^Δ $P < 0.05$.



注: A: Ct 组; B: si-NC 组; C: si-KTN1-AS1 组; D: mimic NC 组; E: miR-153-3p mimic 组; F: miR-153-3p mimic+pcDNA 组; G: miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组。

图 4 各组 A549 细胞克隆形成比较

Note. A, Ct group. B, si-NC group. C, si-KTN1-AS1 group. D, mimic NC group. E, miR-153-3p mimic group. F, miR-153-3p mimic + pcDNA group. G, miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 group.

Figure 4 Comparison of A549 cell clone formation in each group

2.5 各组 A549 细胞侵袭能力比较

与 Ct 组 (79.63 ± 6.51)、si-NC 组 (79.84 ± 6.27) 比较, si-KTN1-AS1 组 (28.73 ± 2.15) 侵袭细胞数目降低 ($P < 0.05$); 与 Ct 组 (79.63 ± 6.51)、mimic NC 组 (78.45 ± 6.17) 比较, miR-153-3p mimic 组 (30.67 ± 2.26) 侵袭细胞数目降低 ($P < 0.05$); 与 miR-153-3p mimic 组 (30.67 ± 2.26)、miR-153-3p mimic + pcDNA 组 (31.17 ± 2.34) 比较, miR-153-3p mimic + pcDNA-NFAT5 组 (57.73 ± 4.05) 侵袭细胞数目升高 ($P < 0.05$), 见图 6。

2.6 各组 A549 细胞中 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达比较

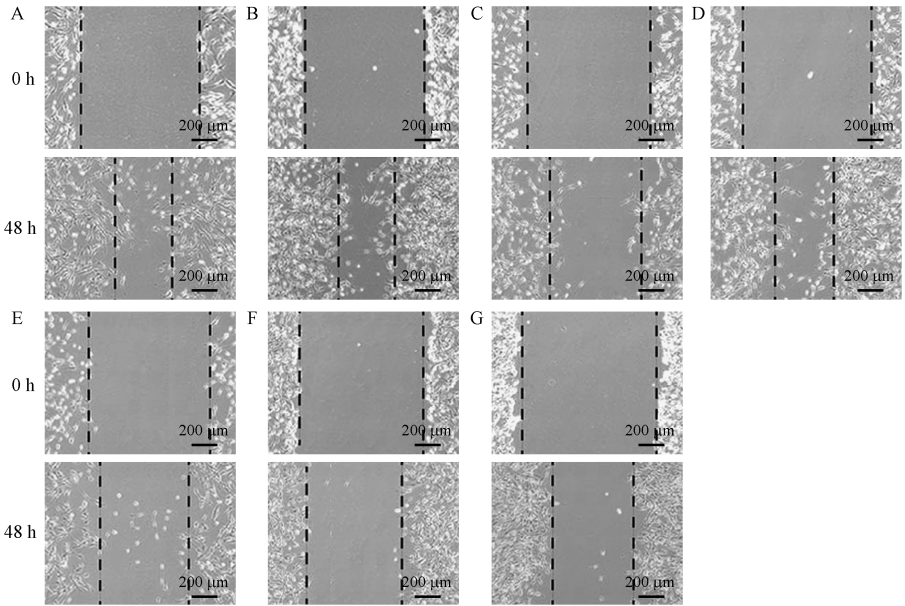
与 Ct 组、si-NC 组比较, si-KTN1-AS1 组 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与 Ct 组、mimic NC 组比较, miR-153-3p mimic 组 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与 miR-153-3p mimic 组、miR-153-3p mimic + pcDNA 组比较, miR-153-3p mimic + pcDNA-NFAT5 组 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 见图 7 和表 3。

表 2 各组 A549 细胞 OD₄₅₀ 值、克隆形成率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Comparison of OD₄₅₀ value and clone formation rate of A549 cells in each group

分组 Groups	OD ₄₅₀ 值 OD ₄₅₀ value	克隆形成率 (%) Clone formation rate
Ct 组 Ct group	0.87 ± 0.08	63.85 ± 5.21
si-NC 组 si-NC group	0.86 ± 0.08	64.07 ± 5.11
si-KTN1-AS1 组 si-KTN1-AS1 group	$0.32 \pm 0.03^{* \#}$	$26.69 \pm 2.26^{* \#}$
mimic NC 组 mimic NC group	0.85 ± 0.07	63.44 ± 5.17
miR-153-3p mimic 组 miR-153-3p mimic group	$0.33 \pm 0.03^{* \&}$	$27.12 \pm 2.08^{* \&}$
miR-153-3p mimic+pcDNA 组 miR-153-3p mimic+pcDNA group	0.34 ± 0.03	27.86 ± 2.16
miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组 miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 group	$0.72 \pm 0.06^{\Delta}$	$52.24 \pm 4.58^{\Delta}$

注: 与 Ct 组比较, $^{*}P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与 mimic NC 组比较, $^{\&}P < 0.05$; 与 miR-153-3p mimic 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 miR-153-3p mimic+pcDNA 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

Note. Compared with Ct group, $^{*}P < 0.05$. Compared with si-NC group, $^{\#}P < 0.05$. Compared with mimic NC group, $^{\&}P < 0.05$. Compared with miR-153-3p mimic group, $^{\Delta}P < 0.05$. Compared with miR-153-3p mimic+pcDNA group, $^{\Delta}P < 0.05$.

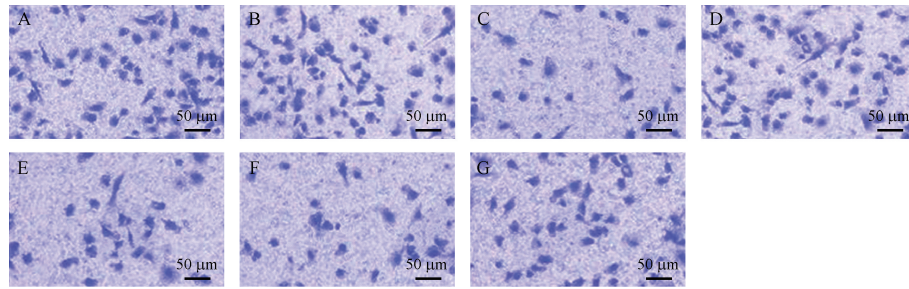


注: A: Ct 组; B: si-NC 组; C: si-KTN1-AS1 组; D: mimic NC 组; E: miR-153-3p mimic 组; F: miR-153-3p mimic+pcDNA 组; G: miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组。

图 5 各组 A549 细胞迁移能力比较

Note. A, Ct group. B, si-NC group. C, si-KTN1-AS1 group. D, mimic NC group. E, miR-153-3p mimic group. F, miR-153-3p mimic+pcDNA group. G, miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 group.

Figure 5 Comparison of migration ability of A549 cells in each group



注: A: Ct 组; B: si-NC 组; C: si-KTN1-AS1 组; D: mimic NC 组; E: miR-153-3p mimic 组; F: miR-153-3p mimic+pcDNA 组; G: miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组。

图 6 各组 A549 细胞侵袭能力比较

Note. A, Ct group. B, si-NC group. C, si-KTN1-AS1 group. D, mimic NC group. E, miR-153-3p mimic group. F, miR-153-3p mimic+pcDNA group. G, miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 group.

Figure 6 Comparison of invasive ability of A549 cells in each group

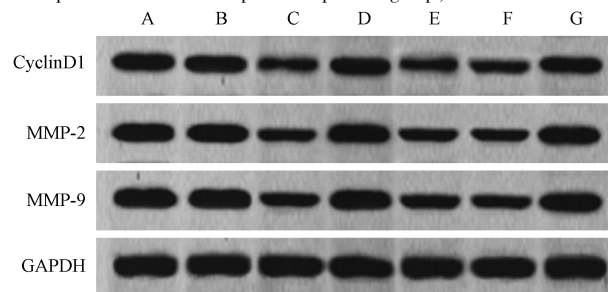
表 3 各组 A549 细胞中 CyclinD1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of CyclinD1, MMP-2 and MMP-9 protein expressions in A549 cells in each group

分组 Groups	CyclinD1/GAPDH	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH
Ct 组 Ct group	0.69±0.07	0.85±0.07	0.97±0.08
si-NC 组 si-NC group	0.68±0.06	0.86±0.08	0.96±0.09
si-KTN1-AS1 组 si-KTN1-AS1 group	0.23±0.02 ^{**}	0.30±0.03 ^{**}	0.37±0.03 ^{**}
mimic NC 组 mimic NC group	0.70±0.06	0.87±0.08	0.95±0.08
miR-153-3p mimic 组 miR-153-3p mimic group	0.26±0.01 ^{* &}	0.34±0.03 ^{* &}	0.36±0.03 ^{* &}
miR-153-3p mimic+pcDNA 组	0.27±0.03	0.33±0.02	0.35±0.02
miR-153-3p mimic+pcDNA group			
miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组	0.54±0.04 ^{@ Δ}	0.71±0.06 ^{@ Δ}	0.74±0.06 ^{@ Δ}
miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 group			

注: 与 Ct 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 mimic NC 组比较, [&] $P < 0.05$; 与 miR-153-3p mimic 组比较, [@] $P < 0.05$; 与 miR-153-3p mimic+pcDNA 组比较, ^Δ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Ct group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with si-NC group, [#] $P < 0.05$. Compared with mimic NC group, [&] $P < 0.05$. Compared with miR-153-3p mimic group, [@] $P < 0.05$. Compared with miR-153-3p mimic+pcDNA group, ^Δ $P < 0.05$.



注: A: Ct 组; B: si-NC 组; C: si-KTN1-AS1 组; D: mimic NC 组; E: miR-153-3p mimic 组; F: miR-153-3p mimic+pcDNA 组; G: miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 组。

图 7 各组 A549 细胞中 CyclinD1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达比较

Note. A, Ct group. B, si-NC group. C, si-KTN1-AS1 group. D, mimic NC group. E, miR-153-3p mimic group. F, miR-153-3p mimic+pcDNA group. G, miR-153-3p mimic+pcDNA-NFAT5 group.

Figure 7 Comparison of protein expression of CyclinD1, MMP-2 and MMP-9 in A549 cells in each group

2.7 KTN1-AS1 靶向调控 miR-153-3p/NFAT5 轴

Starbase 预测 lncRNA KTN1-AS1 与 miR-153-3p、miR-153-3p 与 NFAT5 的结合位点, 见图 8。与 mimic NC 和 KTN1-AS1-WT 共转染组比较, miR-153-3p mimic 和 KTN1-AS1-WT 共转染组的荧光素酶活性降低($P < 0.05$); 与 mimic NC 和 KTN1-AS1-MUT 共转染组比较, miR-153-3p mimic 和 KTN1-

AS1-MUT 共转染组荧光素酶活性无显著变化($P > 0.05$)。与 mimic NC 和 NFAT5-WT 共转染组比较, miR-153-3p mimic 和 NFAT5-WT 共转染组的荧光素酶活性降低($P < 0.05$); 与 mimic NC 和 NFAT5-MUT 共转染组比较, miR-153-3p mimic 和 NFAT5-MUT 共转染组荧光素酶活性变化差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 4。

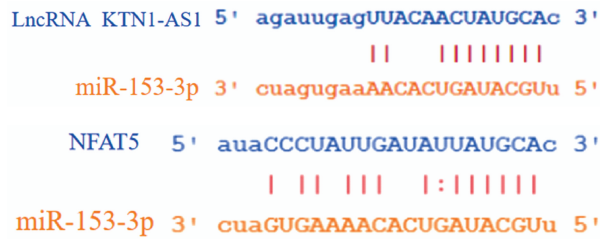


图 8 Starbase 预测 lncRNA KTN1-AS1 与 miR-153-3p、miR-153-3p 与 NFAT5 的结合位点

Figure 8 Starbase predicts the binding sites of lncRNA KTN1-AS1 and miR-153-3p, miR-153-3p and NFAT5

表 4 荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Comparison of luciferase activities

组别 Groups	KTN1-AS1-WT	KTN1-AS1-MUT	NFAT5-WT	NFAT5-MUT
mimic NC	1.03±0.14	1.06±0.15	1.01±0.18	1.05±0.12
miR-153-3p mimic	0.22±0.01	1.04±0.16	0.36±0.02	1.08±0.14
<i>t</i>	14.136	0.223	8.791	0.399
<i>P</i>	0.000	0.828	0.000	0.699

3 讨论

近年来,越来越多的证据揭示了 lncRNA 在调节细胞分化、增殖、凋亡以及人类癌症的发生和发展等众多生理和病理过程中的基本作用^[10-11]。目前,人们普遍认为许多 lncRNA 参与了肿瘤的进展。KTN1-AS1 是位于 14 号染色体上的 lncRNA,已有研究报道,敲低 KTN1-AS1 可抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭能力^[12]。KTN1-AS1 在 NSCLC 组织中上调表达,沉默 KTN1-AS1 抑制了 NSCLC 细胞增殖^[13]。下调 KTN1-AS1 抑制了肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[14]。以上研究表明 KTN1-AS1 在胶质瘤、NSCLC 等肿瘤中发挥致癌作用。本研究结果与其一致,本研究显示,KTN1-AS1 在 NSCLC 组织和 NSCLC 细胞 A549、HCC827、H1299 中高表达,且在 A549 细胞中表达量最高,因此,选择 A549 细胞为研究对象。此外本研究还发现沉默 KTN1-AS1 抑制了 A549 细胞增殖、迁移、侵袭。另有研究阐明,Cyclin D1 作为衡量细胞增殖能力的指标,其可通过调节细胞周期蛋白依赖性激酶的活性来调节细胞周期从 G1 期到 S 期的进程^[15];MMP-2 和 MMP-9 是主要的基质金属蛋白酶,它们在细胞外基质和基底膜的水解中起关键作用,从而促进肿瘤的侵袭和转移^[16]。本研究证实了沉默 KTN1-AS1 则抑制 A549 细胞中 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达,再次从蛋白质水平上证实了 KTN1-AS1 在 A549 细胞中的致癌作用。

ceRNA 理论,即 miRNA 被 lncRNA 作为分子海绵干扰,引起了越来越多的关注。本研究通过生物

信息学分析发现 KTN1-AS1 与 miR-153-3p 可靶向结合。miR-153-3p 被认为是多种癌症中的抑癌基因,如过表达 miR-153-3p 可抑制甲状腺癌细胞增殖、侵袭与迁移^[17];下调 miR-153-3p 促进肝癌细胞增殖、迁移与侵袭^[18]。本研究结果与其是一致的,本研究显示,miR-153-3p 在 NSCLC 组织和细胞中低表达,上调 miR-153-3p 抑制 A549 细胞增殖、迁移与侵袭,下调 KTN1-AS1 可促进 A549 细胞中 miR-153-3p 的表达,且双荧光素酶报告基因实验证实了 KTN1-AS1 可与 miR-153-3p 靶向结合,表明沉默 KTN1-AS1 可能通过上调 miR-153-3p 抑制 A549 细胞增殖、迁移与侵袭。这与 Jiang 等^[19]的研究结果是一致的。

miRNA 通过与靶基因 3' 非翻译区的部分序列互补来调节其靶基因,从而导致 mRNA 降解或翻译抑制^[20]。为了进一步探究 KTN1-AS1/miR-153-3p 调控 A549 细胞增殖、迁移与侵袭的分子机制,本研究通过双荧光素酶报告基因实验证实了 miR-153-3p 与 NFAT5 可靶向结合。NFAT5 是一种可调控细胞生长和分化的基因。据报道 NFAT5 在 NSCLC 组织和细胞中高表达,过表达促进 NSCLC 细胞增殖和侵袭^[21];过表达 NFAT5 可促进口腔鳞状细胞癌的进展^[22]。提示 NFAT5 在 NSCLC、口腔鳞状细胞癌等肿瘤中具有促癌作用。本研究结果与其是一致的,本研究显示,NFAT5 蛋白在 NSCLC 组织和细胞中高表达,下调 KTN1-AS1 可促进 A549 细胞中 miR-153-3p 的表达,抑制 NFAT5 蛋白表达,过表达 miR-153-3p 可抑制 A549 细胞中 NFAT5 蛋白表达,推测过表

达 miR-153-3p 可能通过靶向抑制 NFAT5 表达抑制 A549 细胞增殖、迁移与侵袭。为了验证该推测,本研究在过表达 miR-153-3p 的基础上再加上 pcDNA-NFAT5 来干预 A549 细胞,结果显示,过表达 NFAT5 减弱了上调 miR-153-3p 对 A549 细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用。证实了过表达 miR-153-3p 可能通过靶向抑制 NFAT5 表达抑制 A549 细胞增殖、迁移与侵袭。

综上所述,沉默 KTN1-AS1 可能通过海绵化 miR-153-3p 来下调 NFAT5 表达进而抑制 A549 细胞增殖、迁移与侵袭。KTN1-AS1/miR-153-3p/NFAT5 轴可能成为治疗 NSCLC 的潜在靶点。然而本研究尚存在不足之处,本研究仅仅进行了体外研究,尚未进行体内实验验证,这将是本研究后续研究的重点。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. Nature, 2018, 553(7689): 446-454.
- [3] Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment [J]. Mayo Clin Proc, 2019, 94(8): 1623-1640.
- [4] Guan Y, Yang J, Liu X, et al. Long noncoding RNA CBR3 antisense RNA 1 promotes the aggressive phenotypes of non-small-cell lung cancer by sponging microRNA-509-3p and competitively upregulating HDAC9 expression [J]. Oncol Rep, 2020, 44(4): 1403-1414.
- [5] Dai J, Wang B, Zhao Y, et al. Long noncoding RNA LINC01426 sequesters microRNA-519d-5p to promote non-small cell lung cancer progression by increasing ETS1 expression [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 12697-12708.
- [6] Liu C, Li X, Hao Y, et al. STAT1-induced upregulation of lncRNA KTN1-AS1 predicts poor prognosis and facilitates non-small cell lung cancer progression via miR-23b/DEPDC1 axis [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(9): 8680-8701.
- [7] Deng Y, Zhang L, Luo R. LINC01783 facilitates cell proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer by targeting miR-432-5p to activate the Notch pathway [J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 234.
- [8] Zhao L, Bi M, Zhang H, et al. Downregulation of NEAT1 suppresses cell proliferation, migration, and invasion in NSCLC via sponging miR-153-3p [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2020, 35(5): 362-370.
- [9] Dou Y, Tian W, Wang H, et al. Circ_0001944 contributes to glycolysis and tumor growth by upregulating NFAT5 through acting as a decoy for miR-142-5p in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Manag Res, 2021, 13: 3775-3787.
- [10] Liu Y, Chen X, Chen X, et al. Long non-coding RNA HOTAIR knockdown enhances radiosensitivity through regulating microRNA-93/ATG12 axis in colorectal cancer [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(3): 175.
- [11] Chen L, Ren P, Zhang Y, et al. Long non-coding RNA GAS5 increases the radiosensitivity of A549 cells through interaction with the miR-21/PTEN/Akt axis [J]. Oncol Rep, 2020, 43(3): 897-907.
- [12] Mu Y, Tang Q, Feng H, et al. lncRNA KTN1-AS1 promotes glioma cell proliferation and invasion by negatively regulating miR-505-3p [J]. Oncol Rep, 2020, 44(6): 2645-2655.
- [13] Li C, Zhao W, Pan X, et al. lncRNA KTN1-AS1 promotes the progression of non-small cell lung cancer via sponging of miR-130a-5p and activation of PDPK1 [J]. Oncogene, 2020, 39(39): 6157-6171.
- [14] Li YY, Li W, Chang GZ, et al. Long noncoding RNA KTN1 antisense RNA 1 exerts an oncogenic function in lung adenocarcinoma by regulating DEP domain containing 1 expression via activating epithelial-mesenchymal transition [J]. Anticancer Drugs, 2021, 32(6): 614-625.
- [15] Liu W, Yang Y, He B, et al. ESM1 promotes triple-negative breast cancer cell proliferation through activating AKT/NF- κ B/Cyclin D1 pathway [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(7): 533.
- [16] Shimoda M, Ohtsuka T, Okada Y, et al. Stromal metalloproteinases: crucial contributors to the tumor microenvironment [J]. Pathol Int, 2021, 71(1): 1-14.
- [17] Deng X, Guo B, Fan Y. miR-153-3p suppresses cell proliferation, invasion and glycolysis of thyroid cancer through inhibiting E3F3 expression [J]. Onco Targets Ther, 2021, 14: 519-529.
- [18] Yang G, Li X, Liu J, et al. Hsa_circ_0008537 facilitates liver carcinogenesis by upregulating MCL1 and Snail1 expression via miR-153-3p [J]. Oncol Rep, 2021, 45(3): 1072-1082.
- [19] Jiang Y, Wu K, Cao W, et al. Long noncoding RNA KTN1-AS1 promotes head and neck squamous cell carcinoma cell epithelial-mesenchymal transition by targeting miR-153-3p [J]. Epigenomics, 2020, 12(6): 487-505.
- [20] Ku GW, Kang Y, Yu SL, et al. lncRNA LINC00240 suppresses invasion and migration in non-small cell lung cancer by sponging miR-7-5p [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 44.
- [21] Yang M, Ke H, Zhou W. lncRNA RMRP promotes cell proliferation and invasion through miR-613/NFAT5 axis in non-small cell lung cancer [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 8941-8950.
- [22] Fu SW, Zhang Y, Li S, et al. lncRNA TTN-AS1 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma via miR-411-3p/NFAT5 axis [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 415.

[收稿日期] 2022-06-25