

lncRNA LUCAT1通过miR-199b-5p/AKAP1信号轴促进肝癌进展的机制

金璞¹, 谷从阳², 陈涛³ (1. 成都市新都区人民医院 病理科, 四川 成都 610500; 2. 内江市第一人民医院 病理科, 四川 内江 641000; 3. 成都市新都区人民医院 检验科, 四川 成都 610500)

摘要: **目的** 探究长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 肺癌相关转录物1 (lung cancer associated transcript 1, LUCAT1) 通过miR-199b-5p/A激酶锚定蛋白1 (A-kinase anchoring protein 1, AKAP1) 信号轴促进肝癌转移的机制。**方法** 收集2020年1月至2021年10月在成都市新都区人民医院进行手术治疗的80例肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者的肝癌及癌旁组织标本, 采用RT-qPCR检测LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA水平。将Huh7、HepG2细胞进行不同转染, pHRI-si-NC、pHRI-si-LUCAT1分别转染至Huh7、HepG2细胞, pHRI-si-LUCAT1和pHRI-anti-miR-NC、pHRI-si-LUCAT1和pHRI-anti-miR-199b-5p、pHRI-si-LUCAT1和pHRI-NC、pHRI-si-LUCAT1和pHRI-AKAP1分别共转染至Huh7、HepG2细胞。双荧光素酶报告验证LUCAT1对miR-199b-5p、miR-199b-5p对AKAP1的调控关系; EdU染色、划痕实验和Transwell实验检测细胞增殖、迁移和侵袭能力; RT-qPCR检测细胞LUCAT1、miR-199b-5p和AKAP1 mRNA水平; Western blot检测细胞Ki67、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) -2、MMP-9水平。向20只裸鼠皮下注射已转染pHRI-si-LUCAT1的Huh7细胞悬液, 30 d后测定移植瘤体积、质量、LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA、Ki67、MMP-2、MMP-9水平。**结果** ①与癌旁组织相比, HCC组织LUCAT1 (1.51 ± 0.53 比 1.13 ± 0.72 ; $t = 3.802$, $P < 0.001$)、AKAP1 mRNA (3.73 ± 0.97 比 1.28 ± 0.76 ; $t = 17.783$, $P < 0.001$) 水平显著升高, miR-199b-5p (1.21 ± 0.53 比 3.56 ± 1.02 ; $t = 18.286$, $P < 0.001$) 水平显著降低。②转染pHRI-si-LUCAT1后, miR-199b-5p水平显著升高 (Huh7: 3.71 ± 0.28 比 1.00 ± 0.10 , $t = 15.787$, $P = 0.004$; HepG2: 3.49 ± 0.25 比 1.00 ± 0.11 , $t = 15.790$, $P = 0.004$), LUCAT1 (Huh7: 0.34 ± 0.05 比 1.00 ± 0.06 , $t = 14.637$, $P = 0.005$; HepG2: 0.41 ± 0.06 比 1.00 ± 0.07 , $t = 11.084$, $P = 0.008$) 和AKAP1 mRNA水平显著降低 (Huh7: 0.52 ± 0.05 比 1.00 ± 0.09 , $t = 8.075$, $P = 0.015$; HepG2: 0.55 ± 0.06 比 1.00 ± 0.13 , $t = 5.444$, $P = 0.032$); 细胞EdU阳性率、划痕愈合率和细胞侵袭数均显著降低 (P 均 < 0.05); Ki67 (Huh7: 0.24 ± 0.03 比 0.92 ± 0.06 , $t = 17.558$, $P = 0.003$; HepG2: 0.10 ± 0.03 比 0.51 ± 0.03 , $t = 16.738$, $P = 0.004$)、MMP-2 (Huh7: 0.20 ± 0.03 比 0.90 ± 0.05 , $t = 20.793$, $P = 0.002$; HepG2: 0.05 ± 0.02 比 0.21 ± 0.02 , $t = 9.798$, $P = 0.010$)、MMP-9 (Huh7: 0.25 ± 0.04 比 0.75 ± 0.05 , $t = 13.525$, $P = 0.005$; HepG2: 0.15 ± 0.03 比 0.59 ± 0.04 , $t = 15.242$, $P = 0.004$) 表达水平显著降低; 共转染pHRI-si-LUCAT1和pHRI-anti-miR-199b-5p后, miR-199b-5p水平显著降低 (Huh7: 1.42 ± 0.11 比 3.65 ± 0.25 , $t = 14.142$, $P = 0.005$; HepG2: 1.30 ± 0.05 比 3.71 ± 0.20 , $t = 20.248$, $P = 0.002$), LUCAT1 (Huh7: 0.85 ± 0.10 比 0.40 ± 0.06 , $t = 6.683$, $P = 0.022$; HepG2: 0.90 ± 0.08 比 0.45 ± 0.04 , $t = 8.714$, $P = 0.013$) 和AKAP1 mRNA水平显著升高 (Huh7: 0.80 ± 0.07 比 0.55 ± 0.04 , $t = 5.371$, $P = 0.033$; HepG2: 0.85 ± 0.08 比 0.51 ± 0.04 , $t = 6.584$, $P = 0.022$); 细胞EdU阳性率、划痕愈合

率和细胞侵袭数均显著升高 (P 均 < 0.05) ; Ki67 (Huh7: 0.91 ± 0.06 比 0.25 ± 0.04 , $t = 15.853$, $P = 0.004$; HepG2: 0.92 ± 0.07 比 0.18 ± 0.03 , $t = 16.830$, $P = 0.004$) 、MMP-2 (Huh7: 0.62 ± 0.05 比 0.22 ± 0.03 , $t = 11.882$, $P = 0.007$; HepG2: 0.75 ± 0.05 比 0.39 ± 0.05 , $t = 8.818$, $P = 0.013$) 、MMP-9 (Huh7: 0.51 ± 0.05 比 0.18 ± 0.02 , $t = 10.614$, $P = 0.009$; HepG2: 0.89 ± 0.06 比 0.34 ± 0.04 , $t = 13.211$, $P = 0.006$) 表达水平显著升高; 共转染pHRi-si-LUCAT1和pHRi-AKAP1后, miR-199b-5p水平显著降低 (Huh7: 1.82 ± 0.12 比 3.55 ± 0.30 , $t = 9.274$, $P = 0.011$; HepG2: 1.70 ± 0.14 比 3.62 ± 0.25 , $t = 11.606$, $P = 0.007$) , LUCAT1 (Huh7: 0.71 ± 0.03 比 0.30 ± 0.03 , $t = 16.738$, $P = 0.004$; HepG2: 0.75 ± 0.05 比 0.35 ± 0.04 , $t = 10.820$, $P = 0.008$) 和AKAP1 mRNA水平显著升高 (Huh7: 0.87 ± 0.05 比 0.51 ± 0.03 , $t = 10.694$, $P = 0.009$; HepG2: 0.90 ± 0.09 比 0.54 ± 0.04 , $t = 6.331$, $P = 0.024$) ; 细胞EdU阳性率、划痕愈合率和细胞侵袭数均显著升高 (P 均 < 0.05) ; Ki67 (Huh7: 0.64 ± 0.06 比 0.30 ± 0.03 , $t = 8.779$, $P = 0.013$; HepG2: 0.75 ± 0.06 比 0.25 ± 0.03 , $t = 12.910$, $P = 0.006$) 、MMP-2 (Huh7: 0.80 ± 0.05 比 0.34 ± 0.04 , $t = 12.443$, $P = 0.002$; HepG2: 0.84 ± 0.08 比 0.40 ± 0.03 , $t = 8.920$, $P = 0.012$) 、MMP-9 (Huh7: 0.76 ± 0.05 比 0.23 ± 0.04 , $t = 14.337$, $P = 0.005$; HepG2: 0.76 ± 0.05 比 0.31 ± 0.04 , $t = 12.173$, $P = 0.007$) 表达水平显著升高; ③转染pHRi-si-LUCAT1后, 肿瘤体积 [(523.67 ± 64.33) mm^3 比 (1542.21 ± 201.51) mm^3 , $t = 8.340$, $P = 0.014$] 和质量 [(0.67 ± 0.15) g比 (1.87 ± 0.22) g, $t = 7.806$, $P = 0.016$] 均显著减小, LUCAT1 (0.47 ± 0.10 比 1.00 ± 0.14 , $t = 5.336$, $P = 0.033$) 、AKAP1 (0.12 ± 0.03 比 0.51 ± 0.05 , $t = 11.585$, $P = 0.007$) 、Ki67 (2.45 ± 0.28 比 5.93 ± 0.55 , $t = 9.766$, $P = 0.010$) 、MMP-2 (2.35 ± 0.25 比 5.74 ± 0.51 , $t = 10.338$, $P = 0.009$) 、MMP-9 (3.55 ± 0.34 比 6.42 ± 0.84 , $t = 5.486$, $P = 0.032$) 蛋白水平均显著降低, miR-199b-5p (1.68 ± 0.17 比 1.00 ± 0.16 , $t = 5.045$, $P = 0.037$) 水平显著升高。结论 LncRNA LUCAT1通过miR-199b-5p/AKAP1信号轴促进HCC细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词: 肺癌相关转录物1; miR-199b-5p; A激酶锚定蛋白1; 肝细胞癌; 转移

Mechanism of lncRNA LUCAT1 on promoting metastasis of liver cancer through miR-199b-5p/AKAP1 signal axis

Jin Pu¹, Gu Congyang², Chen Tao³ (1. Department of Pathology, Xindu District People's Hospital of Chengdu, Sichuan Chengdu 610500, China; 2. Department of Pathology, The First People's Hospital of Neijiang, Sichuan Neijiang 641000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Xindu District People's Hospital of Chengdu, Sichuan Chengdu 610500, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) lung cancer associated transcript 1 (LUCAT1) promoted liver cancer metastasis through miR-199b-5p/A-kinase anchoring protein 1 (AKAP1) signal axis. **Methods** HCC tissues and paracancerous tissues of 80 patients with HCC in Xindu District People's Hospital of Chengdu from January 2020 to October 2021 were selected. RT-qPCR was used to detect the expression of LUCAT1, miR-199b-5p and AKAP1 mRNA. Huh7 and HepG2 cells were transfected differently, pHRi-si-NC and pHRi-si-LUCAT1 were transfected into Huh7 and HepG2 cells, respectively, pHRi-si-LUCAT1 and pHRi-anti-miR-NC, pHRi-si-LUCAT1 and pHRi-anti-miR-199b-5p, pHRi-si-LUCAT1 and pHRi-NC, pHRi-si-LUCAT1 and pHRi-AKAP1 were co-transfected into Huh7, HepG2 cells, respectively. Double luciferase report was used to verify the regulatory relationship of LUCAT1 on miR-199b-5p and miR-199b-5p

on AKAP1. EdU staining, scratch test and Transwell test were used to detect the proliferation, migration and invasion ability. RT-qPCR was used to detect the LUCAT1, miR-199b-5p and AKAP1 mRNA levels. Western blot was used to detect Ki67, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 levels. Total of 20 nude mice were subcutaneously injected with Huh7 cell suspension transfected with pHRI-si-LUCAT1, and the tumor volume, weight, LUCAT1, miR-199b-5p, AKAP1, Ki67, MMP-2 and MMP-9 protein levels of transplanted tumor were detected 30 days later. **Results** ①Compared with paracancerous tissues, the expression of LUCAT1 (1.51 ± 0.53 vs. 1.13 ± 0.72 ; $t = 3.802$, $P < 0.001$) and AKAP1 mRNA (3.73 ± 0.97 vs. 1.28 ± 0.76 ; $t = 17.783$, $P < 0.001$) in HCC tissues increased significantly, the expression of miR-199b-5p decreased significantly (1.21 ± 0.53 vs. 3.56 ± 1.02 ; $t = 18.286$, $P < 0.001$). ②After transfection of pHRI-si-LUCAT1, the levels of miR-199b-5p increased significantly (Huh7: 3.71 ± 0.28 vs. 1.00 ± 0.10 , $t = 15.787$, $P = 0.004$; HepG2: 3.49 ± 0.2 vs. 1.00 ± 0.11 , $t = 15.790$, $P = 0.004$), the levels of LUCAT1 (Huh7: 0.34 ± 0.05 vs. 1.00 ± 0.06 , $t = 14.637$, $P = 0.005$; HepG2: 0.41 ± 0.06 vs. 1.00 ± 0.07 , $t = 11.084$, $P = 0.008$) and AKAP1 mRNA (Huh7: 0.52 ± 0.05 vs. 1.00 ± 0.09 , $t = 8.075$, $P = 0.015$; HepG2: 0.55 ± 0.06 vs. 1.00 ± 0.13 , $t = 5.444$, $P = 0.032$) decreased significantly. EdU positive rate of cells, the scratch healing rate and the number of invasion cells decreased significantly (all $P < 0.05$). The expression of Ki67 (Huh7: 0.24 ± 0.03 vs. 0.92 ± 0.06 , $t = 17.558$, $P = 0.003$; HepG2: 0.10 ± 0.03 vs. 0.51 ± 0.03 , $t = 16.738$, $P = 0.004$), MMP-2 (Huh7: 0.20 ± 0.03 vs. 0.90 ± 0.05 , $t = 20.793$, $P = 0.002$; HepG2: 0.05 ± 0.02 vs. 0.21 ± 0.02 , $t = 9.798$, $P = 0.010$) and MMP-9 (Huh7: 0.25 ± 0.04 vs. 0.75 ± 0.05 , $t = 13.525$, $P = 0.005$; HepG2: 0.15 ± 0.03 vs. 0.59 ± 0.04 , $t = 15.242$, $P = 0.004$) decreased significantly. After cotransfection of pHRI-si-LUCAT1 and pHRI-anti-miR-199b-5p, the levels of miR-199b-5p decreased significantly (Huh7: 1.42 ± 0.11 vs. 3.65 ± 0.25 , $t = 14.142$, $P = 0.005$; HepG2: 1.30 ± 0.05 vs. 3.71 ± 0.20 , $t = 20.248$, $P = 0.002$), the levels of LUCAT1 (Huh7: 0.85 ± 0.10 vs. 0.40 ± 0.06 , $t = 6.683$, $P = 0.022$; HepG2: 0.90 ± 0.08 vs. 0.45 ± 0.04 , $t = 8.714$, $P = 0.013$) and AKAP1 mRNA (Huh7: 0.80 ± 0.07 vs. 0.55 ± 0.04 , $t = 5.371$, $P = 0.033$; HepG2: 0.85 ± 0.08 vs. 0.51 ± 0.04 , $t = 6.584$, $P = 0.022$) increased significantly. EdU positive rate of cells, the scratch healing rate and the number of invasion cells increased significantly (all $P < 0.05$). The expression of Ki67 (Huh7: 0.91 ± 0.06 vs. 0.25 ± 0.04 , $t = 15.853$, $P = 0.004$; HepG2: 0.92 ± 0.07 vs. 0.18 ± 0.03 , $t = 16.830$, $P = 0.004$), MMP-2 (Huh7: 0.62 ± 0.05 vs. 0.22 ± 0.03 , $t = 11.882$, $P = 0.007$; HepG2: 0.75 ± 0.05 vs. 0.39 ± 0.05 , $t = 8.818$, $P = 0.013$) and MMP-9 (Huh7: 0.51 ± 0.05 vs. 0.18 ± 0.02 , $t = 10.614$, $P = 0.009$; HepG2: 0.89 ± 0.06 vs. 0.34 ± 0.04 , $t = 13.211$, $P = 0.006$) increased significantly. After cotransfection of pHRI-si-LUCAT1 and pHRI-AKAP1, the levels of miR-199b-5p decreased significantly (Huh7: 1.82 ± 0.12 vs. 3.55 ± 0.30 , $t = 9.274$, $P = 0.011$; HepG2: 1.70 ± 0.14 vs. 3.62 ± 0.25 , $t = 11.606$, $P = 0.007$), the levels of LUCAT1 (Huh7: 0.71 ± 0.03 vs. 0.30 ± 0.03 , $t = 16.738$, $P = 0.004$; HepG2: 0.75 ± 0.05 vs. 0.35 ± 0.04 , $t = 10.820$, $P = 0.008$) and AKAP1 mRNA (Huh7: 0.87 ± 0.05 vs. 0.51 ± 0.03 , $t = 10.694$, $P = 0.009$; HepG2: 0.90 ± 0.09 vs. 0.54 ± 0.04 , $t = 6.331$, $P = 0.024$) increased significantly. EdU positive rate of cells, the scratch healing rate and the number of invasion cells increased significantly (all $P < 0.05$). The expression of Ki67 (Huh7: 0.64 ± 0.06 vs. 0.30 ± 0.03 , $t = 8.779$, $P = 0.013$; HepG2: 0.75 ± 0.06 vs. 0.25 ± 0.03 , $t = 12.910$, $P = 0.006$), MMP-2 (Huh7: 0.80 ± 0.05 vs. 0.34 ± 0.04 , $t = 12.443$, $P = 0.002$; HepG2: 0.84 ± 0.08 vs. 0.40 ± 0.03 , $t = 8.920$, $P = 0.012$) and MMP-9 (Huh7: 0.76 ± 0.05 vs. 0.23 ± 0.04 , $t = 14.337$, $P = 0.005$; HepG2: 0.76 ± 0.05 vs. 0.31 ± 0.04 , $t = 12.173$, $P = 0.007$)

increased significantly. ③After transfection of pHRI-si-LUCAT1, the tumor volume $[(523.67 \pm 64.33) \text{ mm}^3 \text{ vs. } (1542.21 \pm 201.51) \text{ mm}^3, t = 8.340, P = 0.014]$ and weight $[(0.67 \pm 0.15) \text{ g vs. } (1.87 \pm 0.22) \text{ g}, t = 7.806, P = 0.016]$ reduced significantly. LUCAT1 $(0.47 \pm 0.10 \text{ vs. } 1.00 \pm 0.14, t = 5.336, P = 0.033)$, AKAP1 $(0.12 \pm 0.03 \text{ vs. } 0.51 \pm 0.05, t = 11.585, P = 0.007)$, Ki67 $(2.45 \pm 0.28 \text{ vs. } 5.93 \pm 0.55, t = 9.766, P = 0.010)$, MMP-2 $(2.35 \pm 0.25 \text{ vs. } 5.74 \pm 0.51, t = 10.338, P = 0.009)$ and MMP-9 $(3.55 \pm 0.34 \text{ vs. } 6.42 \pm 0.84, t = 5.486, P = 0.032)$ protein levels reduced significantly, while miR-199b-5p levels $(1.68 \pm 0.17 \text{ vs. } 1.00 \pm 0.16, t = 5.045, P = 0.037)$ increased significantly. **Conclusions** LncRNA LUCAT1 promoted the proliferation, migration, and invasion ability of HCC cells through miR-199b-5p/AKAP1 signal axis.

Keywords: Lung cancer associated transcript 1; miR-199b-5p; A-kinase anchoring protein 1; Hepatocellular carcinoma; Metastasis

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 属于原发性肝癌, 是一种常见的消化系统恶性肿瘤, 已成为中国癌症相关死亡的第2大原因^[1,2]。由于HCC缺乏明显的早期症状, 大多数患者在就诊时已进入中晚期, 总体生存率显著降低^[3,4]。深入了解HCC进展的分子机制, 寻找有效的治疗靶点对改善患者预后尤为重要。长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度大于200 nt且无蛋白编码功能的RNA, 其通过调节miRNA的表达参与癌症进展^[5]。研究发现lncRNA肺癌相关转录物1 (lung cancer associated transcript 1, LUCAT1) 在结直肠癌^[6]、乳腺癌^[7]、肺癌^[8]和HCC^[9]等多种恶性肿瘤中表达异常。Jiao等^[10]发现lncRNA LUCAT1在HCC组织中表达升高, 且LUCAT1水平与患者TNM分期、肿瘤分化程度等显著相关, LUCAT1高表达是肝癌的独立预后因素。Lou等^[11]研究表明lncRNA LUCAT1在体外和体内均可促进HCC细胞的增殖和转移。miRNA是一类长度约为20 nt的非编码RNA, 通过结合靶分子的3'非翻译区 (3' untranslated area, 3'UTR) 抑制mRNA的翻译^[12]。研究表明miR-199b-5p在HCC中发挥抑癌基因作用^[13]。miR-199b-5p在HCC组织中表达下调, 其通过与N-钙粘蛋白3'UTR结合抑制HCC细胞的迁移和侵袭, 并抑制裸鼠移植瘤转移^[14]。CircKIAA1429通过抑制miR-199b-5p的表达, 促进HCC细胞的增殖、迁移和侵袭, 并抑制其凋亡^[15]。A激酶锚定蛋白1 (A-kinase anchoring protein 1, AKAP1) 是一种将蛋白激酶A和其他信号成分整合到线粒体外膜的支架蛋白^[16]。研究发现AKAP1在大多数HCC患者中过表达, 且AKAP1水平与患者预后不良相关^[17]。生物信息学分析表明LUCAT1和miR-199b-5p, miR-199b-5p和AKAP1间存在结合位点, 但LUCAT1通过miR-

199b-5p/AKAP1信号轴在HCC中的调节机制尚不明确。本研究探讨lncRNA LUCAT1、miR-199b-5p和AKAP1在HCC组织和细胞中的表达水平及对HCC细胞增殖、转移的影响以期HCC的治疗提供新策略。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2020年1月至2021年10月在成都市新都区人民医院进行手术治疗的80例HCC患者为研究对象。80例患者中, 男性50例, 女性30例, 年龄35~80岁, 平均 (61.5 ± 6.4) 岁。收集患者肝癌及癌旁组织 (距肿瘤边缘至少5 cm) 标本。纳入标准: ①组织病理学诊断为HCC; ②术前未经放疗、化疗。排除标准: ①伴有其他恶性肿瘤者; ②合并其他肝病者。患者均自愿提供肝癌及癌旁组织标本。本研究经过成都市新都区人民医院伦理委员会批准 (20210126)。

1.2 材料、仪器与试剂 人正常肝细胞系 (L-02) 及HCC细胞系 (Huh7、HepG2、Hep3B、MHCC-97H) (长沙艾碧维生物科技有限公司); Trizol溶液、反转录试剂盒 (美国Invitgen公司); SYBR Green (宝生物工程(大连)有限公司); 荧光素酶报告试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); LUCAT1、miR-199b-5p和AKAP1、GAPDH引物 (金斯瑞生物科技股份有限公司); miR-199b-5p模拟物 (miR-199b-5p mimic) 及其阴性对照 (mimic NC)、低表达慢病毒质粒pHRI-si-LUCAT1及其阴性对照 (pHRI-si-NC)、低表达慢病毒质粒pHRI-anti-miR-199b-5p及其阴性对照 (pHRI-anti-miR-NC)、过表达慢病毒质粒pHRI-AKAP1及其阴性对照 (pHRI-NC) (上海吉玛制药有限公司); Ki67、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9、甘油三磷

酸脱氢酶(glycerol 3 phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(美国Cell Signaling Technology公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);低温高速离心机(德国Sigma公司);酶标仪(美国Fermentas公司)。

1.3 方法

1.3.1 RT-qPCR检测HCC组织和细胞系中LUCAT1、miR-199b-5p和AKAP1 mRNA水平 采用Trizol试剂分别从肝癌及癌旁组织、正常肝细胞系L-02及HCC细胞系L-02、Huh7、HepG2、Hep3B、MHCC-97H中提取总RNA并反转录为cDNA,使用SYBR Green法进行扩增,U6、GAPDH作内参。反应条件:95℃预变性60 s,95℃10 s,60℃40 s,共40个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA相对表达量。PCR引物序列如下:LUCAT1-F:5'-AGCTCCACCTCCCGGGTTCACG-3',LUCAT1-R:5'-CGTGAACCCGGGAGG-TGGAGCT-3';miR-199b-5p-F:5'-CATGCG-ATATACGATACTTAGGAG-3',miR-199b-5p-R:5'-CGGTAATCAGGATCATAAC-3';AKAP1-F:5'-TCAGGTCCAGGTACAGACGACG-3',AKAP1-R:5'-GGATCGATCAGTACTAAC-CCAGG-3'。

1.3.2 细胞转染与分组 将Huh7、HepG2细胞分为si-NC组(转染pHRI-si-NC)、si-LUCAT1组(转染pHRI-si-LUCAT1)、si-LUCAT1 + anti-miR-NC组(转染pHRI-si-LUCAT1 + pHRI-anti-miR-NC)、si-LUCAT1 + anti-miR-199b-5p组(转染pHRI-si-LUCAT1 + pHRI-anti-miR-199b-5p)、si-LUCAT1 + NC组(转染pHRI-si-LUCAT1 + pHRI-NC)、si-LUCAT1 + AKAP1组(转染pHRI-si-LUCAT1 + pHRI-AKAP1)。干扰序列如下:si-LUCAT1: CCTATCTGGTCAACACGTATT; anti-miR-199b-5p: GGGCTTCAATTTACAAGCATT。根据Lipofectamine™3000说明书,将质粒和Lipofectamine 3000混合溶液加入Huh7、HepG2细胞。转染4 h后更换培养基,24 h后通过RT-qPCR检测是否转染成功。

1.3.3 靶标预测及双荧光素酶实验 使用StarBase数据库预测LUCAT1和miR-199b-5p的结合位点,使用Targetscan数据库预测miR-199b-5p和AKAP1的结合位点,扩增上述片段。将上述片段插入psi-CHECK荧光素酶载体,分别构建野生型质粒psi-CHECK-LUCAT1-WT、psi-CHECK-AKAP1-WT和突变

型质粒psi-CHECK-LUCAT1-MUT、psi-CHECK-AKAP1-MUT。将两种质粒分别与miR-199b-5p mimic及mimic NC混合,利用Lipofectamine 3000分别将其转染至Huh7、HepG2细胞,转染48 h后,按试剂盒要求检测各组细胞裂解物的荧光素酶活性。

1.3.4 EdU染色检测细胞增殖能力 将各组Huh7、HepG2细胞培养24 h后,按照EdU染色试剂盒说明书,EdU标记2 h、4%多聚甲醛固定30 min、0.5% Triton-100透化10 min、Apollo染色30 min、DAPI染色20 min,荧光显微镜下进行拍照,Image J进行细胞计数。

1.3.5 划痕实验检测细胞迁移能力 将各组Huh7、HepG2细胞接种于6孔板,当细胞单壁生长时用枪头划痕,PBS去除划掉的细胞,记录0 h的划痕宽度。培养24 h后再次记录划痕宽度,计算划痕愈合率。

1.3.6 Transwell实验检测细胞侵袭能力 Transwell小室平铺一层Matrigel基质胶,上室加入无血清培养基培养的各组Huh7、HepG2细胞,下室加入含有10%胎牛血清的培养基,并置于37℃下孵育24 h。经甲醛固定,结晶紫染色后,显微镜下对穿膜细胞进行观察和统计。

1.3.7 RT-qPCR检测细胞LUCAT1、miR-199b-5p和AKAP1 mRNA水平 采用Trizol试剂从各组Huh7、HepG2细胞中提取总RNA,测定细胞LUCAT1、miR-199b-5p和AKAP1 mRNA相对表达水平。

1.3.8 Western blot检测细胞Ki67、MMP-2/9水平 取各组Huh7、HepG2细胞,提取并测定蛋白浓度,蛋白稀释后进行电泳,转PVDF膜,脱脂牛奶中封闭2 h,分别加入Ki67、MMP-2/9一抗(1:2000)4℃过夜。经TBST洗涤后,加入二抗(1:5000)4℃孵育2 h,加入ECL显色剂显色,凝胶成像仪拍照,分析各组蛋白相对GAPDH的表达量。

1.3.9 动物模型构建及指标检测 将20只8周龄、体重20~22 g的SPF级雄性裸鼠随机分为si-NC组(转染pHRI-si-NC的Huh7细胞)和si-LUCAT1组(转染pHRI-si-LUCAT1的Huh7细胞),每组各10只。右肩皮下注射0.2 ml已转染pHRI-si-LUCAT1的Huh7细胞悬液(1×10^7 个/ml)。1个月后处死裸鼠,取出肿瘤组织。RT-qPCR、Western blot检测移植瘤中LUCAT1、miR-199b-5p和AKAP1 mRNA和蛋白水平。免疫组化染色检测移植瘤组织Ki67、MMP-2水平,步骤如下:各组取5只裸鼠肿瘤组织,经固定、包埋制作石蜡切片(5 μm),切片经脱蜡、脱水、高温抗原修复、血清封闭、加入Ki67、MMP-2一抗(1:400)4℃孵育过夜,二抗37℃孵育

1 h, 滴加DAB显色液、苏木精复染、脱水、透明、封片、显微镜($\times 400$)下观察染色情况。结果判定: 随机选择5个区域, 由2名病理医师对切片进行评分。细胞出现棕黄色染色为阳性表达, 根据染色强度(0分, 无着色; 1分, 淡黄色; 2分, 棕黄色; 3分, 棕褐色)及阳性细胞率(0分, 无阳性细胞; 1分, 1%~25%; 2分, 26%~50%; 3分, 51%~75%; 4分, 76%~100%)进行评分。2项总分 ≥ 3 分判为阳性。

1.4 统计学处理 采用SPSS16.0软件进行统计学分析, 细胞EdU阳性率、划痕愈合率、细胞侵袭数、LUCAT1、miR-199b-5p及各蛋白相对表达量均为计量资料, 符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD- t 检验, LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1之间的相关性采用Pearson分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1在HCC组织和细胞系中的表达 RT-qPCR结果显示, 与癌旁组织相比, HCC组织中LUCAT1、AKAP1 mRNA水平显著升高, miR-199b-5p水平显著降低(P 均 < 0.05)。见表1。LUCAT1与miR-199b-5p水平呈负相关($r = -0.6054, P < 0.001$), miR-199b-5p与AKAP1 mRNA水平呈负相关($r = -0.7607, P < 0.001$), LUCAT1与AKAP1 mRNA水平呈正相关($r = 0.7245, P < 0.001$), 见图1。与L-02相比, Huh7、HepG2、Hep3B、MHCC-97H中LUCAT1、AKAP1 mRNA水平显著升高, miR-199b-5p水平显著降低(P 均 < 0.05), 见表2。

2.2 LUCAT1低表达抑制HCC细胞增殖和转移 EdU染色、划痕实验及Transwell实验结果显示, 与si-NC组相比, si-LUCAT1组细胞EdU阳性率显著

降低, 划痕愈合率及细胞侵袭数显著减少(均 $P < 0.05$); Western blot结果显示, 与si-NC组相比, si-LUCAT1组细胞Ki67、MMP-2/9水平显著降低(P 均 < 0.05), 见图2、表3、表4。

2.3 LUCAT1靶向调控miR-199b-5p及miR-199b-5p靶向调控AKAP1 StarBase和TargetScan结果显示, LncRNA LUCAT1与miR-199b-5p, miR-199b-5p与AKAP1存在结合位点。荧光素酶报告基因实验显示, 与miR-NC组相比, miR-199b-5p组野生型LUCAT1、AKAP1荧光素酶活性显著降低(P 均 < 0.05), 而突变型LUCAT1、AKAP1荧光素酶活性

表1 HCC组织和癌旁组织中LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	LUCAT1	miR-199b-5p	AKAP1 mRNA
癌旁组织	1.13 \pm 0.72	3.56 \pm 1.02	1.28 \pm 0.76
HCC组织	1.51 \pm 0.53	1.21 \pm 0.53	3.73 \pm 0.97
t 值	3.802	18.286	17.783
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表2 HCC细胞系中LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	LUCAT1	miR-199b-5p	AKAP1 mRNA
L-02	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.11
Huh7	2.71 \pm 0.22	0.40 \pm 0.09	3.82 \pm 0.33
HepG2	2.83 \pm 0.17	0.44 \pm 0.08	3.65 \pm 0.22
Hep3B	2.32 \pm 0.18	0.53 \pm 0.07	3.41 \pm 0.24
MHCC-97H	2.43 \pm 0.15	0.54 \pm 0.06	3.15 \pm 0.19
F 值	62.502	45.472	85.423
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与L-02组相比, Huh7、HepG2、Hep3B、MHCC-97H细胞LUCAT1 t 值分别为12.256、16.071、11.103、13.739, P 值分别为0.007、0.004、0.008、0.005; miR-199b-5p t 值分别为6.928、6.725、5.860、5.939, P 值分别为0.020、0.021、0.028、0.027; AKAP1 mRNA t 值分别为14.042、18.661、15.811、16.962, P 值分别为0.005、0.003、0.004、0.003。

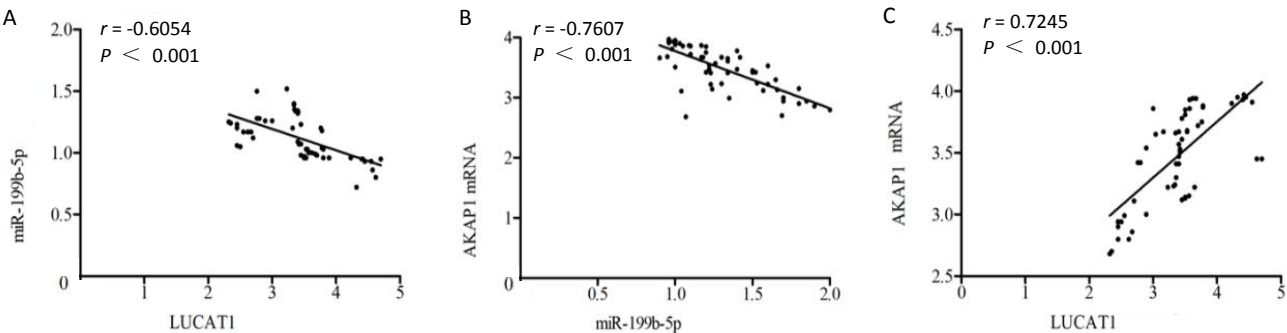


图1 LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA相关性分析散点图

注: A为LUCAT1与miR-199b-5p相关性分析, B为miR-199b-5p与AKAP1 mRNA相关性分析, C为LUCAT1与AKAP1 mRNA相关性分析。

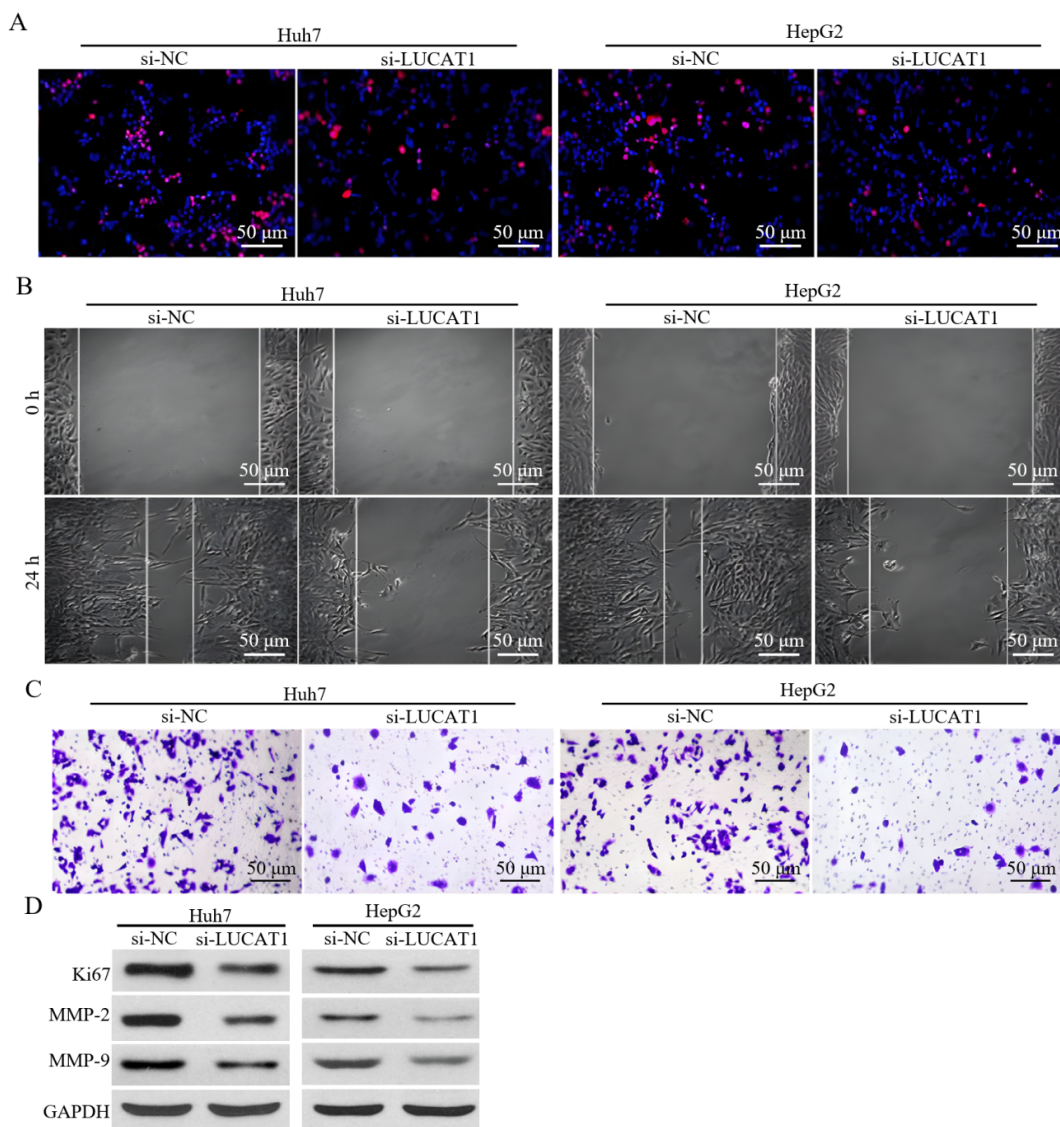


图2 LUCAT1低表达抑制HCC细胞的增殖和转移

注：A为EdU染色；B为划痕实验；C为Transwell实验（结晶紫染色）；D为Western blot检测细胞Ki67、MMP-2/9表达。

表3 各组Huh7、HepG2细胞单克隆形成数、划痕愈合率及细胞侵袭数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Huh7			HepG2		
	EdU阳性率 (%)	划痕愈合率 (%)	细胞侵袭数 (个)	EdU阳性率 (%)	划痕愈合率 (%)	细胞侵袭数 (个)
si-NC组	1.00 ± 0.12	73.96 ± 5.21	183.62 ± 30.54	1.00 ± 0.08	76.32 ± 5.03	155.41 ± 26.84
si-LUCAT1组	0.31 ± 0.05	19.24 ± 3.10	42.46 ± 14.11	0.33 ± 0.06	18.85 ± 4.21	35.47 ± 10.68
si-LUCAT1 + anti-miR-NC组	0.28 ± 0.04	18.25 ± 5.13	44.32 ± 7.46	0.31 ± 0.04	20.13 ± 3.31	41.10 ± 18.32
si-LUCAT1 + anti-miR-199b-5p组	0.92 ± 0.11	63.21 ± 6.03	183.53 ± 22.34	0.95 ± 0.13	60.32 ± 5.97	162.35 ± 26.74
si-LUCAT1 + NC组	0.31 ± 0.06	21.24 ± 3.01	36.52 ± 12.65	0.30 ± 0.04	20.96 ± 4.04	43.67 ± 10.65
si-LUCAT1 + AKAP1组	0.98 ± 0.09	66.12 ± 6.76	120.63 ± 18.32	0.95 ± 0.15	62.86 ± 5.24	142.41 ± 24.85
F值	45.745	69.007	71.905	42.124	64.233	53.019
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注：与 si-NC 组相比，si-LUCAT1 组 Huh7 细胞 EdU 阳性率、划痕愈合率、细胞侵袭数 t 值分别为 9.193、15.633、7.268， P 值分别为 0.012、0.004、0.018；HepG2 细胞 EdU 阳性率、划痕愈合率、细胞侵袭数 t 值分别为 11.605、15.175、7.192， P 值分别为 0.007、0.004、0.019；与 si-LUCAT1 + anti-miR-NC 组相比，si-LUCAT1 + anti-miR-199b-5p 组 Huh7 细胞 EdU 阳性率、划痕愈合率、细胞侵袭数 t 值分别为 9.471、9.836、10.237， P 值分别为 0.011、0.010、0.009；HepG2 细胞 EdU 阳性率、划痕愈合率、细胞侵袭数 t 值分别为 8.150、10.198、6.479， P 值分别为 0.015、0.009、0.023；与 si-LUCAT1 + NC 组相比，si-LUCAT1 + AKAP1 组 Huh7 细胞 EdU 阳性率、划痕愈合率、细胞侵袭数 t 值分别为 10.729、10.505、6.544， P 值分别为 0.009、0.009、0.023；HepG2 细胞 EdU 阳性率、划痕愈合率、细胞侵袭数 t 值分别为 7.252、10.968、6.326， P 值分别为 0.018、0.008、0.024。

无明显变化（ P 均 > 0.05 ）。RT-qPCR结果显示，与si-NC组相比，si-LUCAT1组miR-199b-5p水平显著升高，LUCAT1、AKAP1 mRNA水平显著降低（ P 均 < 0.05 ）；与si-LUCAT1 + anti-miR-NC组相比，si-LUCAT1 + anti-miR-199b-5p组miR-199b-5p水平显著降低，LUCAT1、AKAP1 mRNA水平显著升高（ P 均 < 0.05 ）；与si-LUCAT1 + NC组相比，si-LUCAT1 + AKAP1组miR-199b-5p水平显著降低，LUCAT1、AKAP1 mRNA水平显著升高（ P 均 < 0.05 ）。见图3、表5、表6。

2.4 miR-199b-5p低表达部分逆转LUCAT1低表达对HCC细胞增殖和转移能力的影响 EdU染色、划痕实验及Transwell实验结果显示，与si-LUCAT1 + anti-miR-NC组相比，si-LUCAT1 + anti-miR-199b-5p组

细胞EdU阳性率、划痕愈合率及细胞侵袭数均显著增加（ P 均 < 0.05 ）；Western blot结果显示，与si-LUCAT1 + anti-miR-NC组相比，si-LUCAT1 + anti-miR-199b-5p组细胞Ki67、MMP-2/9水平显著升高（ P 均 < 0.05 ）。见图4、表3、表4。

2.5 AKAP1过表达部分逆转LUCAT1低表达对HCC细胞增殖和转移能力的影响 EdU染色、划痕实验及Transwell实验结果显示，与si-LUCAT1 + NC组相比，si-LUCAT1 + AKAP1组细胞EdU阳性率、划痕愈合率及细胞侵袭数显著增加（ P 均 < 0.05 ）；Western blot结果显示，与si-LUCAT1 + NC组相比，si-LUCAT1 + AKAP1组细胞Ki67、MMP-2/9水平显著升高（ P 均 < 0.05 ）。见图5、表3、表4。

2.6 低表达LUCAT1抑制裸鼠移植瘤生长 与si-NC组

表 4 各组 Huh7、HepG2 细胞 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	Huh7			HepG2		
	Ki67	MMP-2	MMP-9	Ki67	MMP-2	MMP-9
si-NC组	0.92 ± 0.06	0.90 ± 0.05	0.75 ± 0.05	0.51 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.59 ± 0.04
si-LUCAT1组	0.24 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.10 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.15 ± 0.03
si-LUCAT1 + anti-miR-NC组	0.25 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.34 ± 0.04
si-LUCAT1 + anti-miR-199b-5p组	0.91 ± 0.06	0.62 ± 0.05	0.51 ± 0.05	0.92 ± 0.07	0.75 ± 0.05	0.89 ± 0.06
si-LUCAT1 + NC组	0.30 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.31 ± 0.04
si-LUCAT1 + AKAP1组	0.64 ± 0.06	0.80 ± 0.05	0.76 ± 0.05	0.75 ± 0.06	0.84 ± 0.08	0.76 ± 0.05
F 值	62.341	55.269	61.416	73.545	66.374	78.354
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注：与 si-NC 组相比，si-LUCAT1 组 Huh7 细胞 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白相对水平 t 值分别为 17.558、20.793、13.525， P 值分别为 0.003、0.002、0.005；HepG2 细胞 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白相对水平 t 值分别为 16.738、9.798、15.242， P 值分别为 0.004、0.010、0.004；与 si-LUCAT1+anti-miR-NC 组相比，si-LUCAT1+anti-miR-199b-5p 组 Huh7 细胞 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白相对水平 t 值分别为 15.853、11.882、10.614， P 值分别为 0.004、0.007、0.009；HepG2 细胞 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白相对水平 t 值分别为 16.830、8.818、13.211， P 值分别为 0.004、0.013、0.006；与 si-LUCAT1+NC 组相比，si-LUCAT1+AKAP1 组 Huh7 细胞 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白相对水平 t 值分别为 8.779、12.443、14.337， P 值分别为 0.013、0.006、0.005；HepG2 细胞 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白相对水平 t 值分别为 12.910、8.920、12.173， P 值分别为 0.006、0.012、0.007。

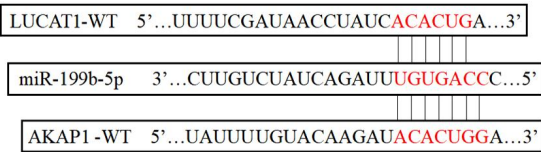


图 3 LUCAT1 和 miR-199b-5p，miR-199b-5p 和 AKAP1 的结合示意图

表 5 各组 Huh7、HepG2 细胞荧光素酶活性（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	Huh7				HepG2			
	野生型 LUCAT1	突变型 LUCAT1	野生型 AKAP1	突变型 AKAP1	野生型 LUCAT1	突变型 LUCAT1	野生型 AKAP1	突变型 AKAP1
miR-NC组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.08
miR-199b-5p组	0.42 ± 0.04	0.93 ± 0.07	0.44 ± 0.06	0.93 ± 0.11	0.49 ± 0.08	0.95 ± 0.14	0.52 ± 0.06	0.98 ± 0.09
t 值	12.460	0.775	8.317	0.745	5.787	0.569	5.146	0.288
P 值	0.006	0.520	0.014	0.534	0.029	0.627	0.036	0.801

表6 各组 Huh7、HepG2 细胞中 LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Huh7			HepG2		
	LUCAT1	miR-199b-5p	AKAP1 mRNA	LUCAT1	miR-199b-5p	AKAP1 mRNA
si-NC组	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.13
si-LUCAT1组	0.34 ± 0.05	3.71 ± 0.28	0.52 ± 0.05	0.41 ± 0.06	3.49 ± 0.25	0.55 ± 0.06
si-LUCAT1 + anti-miR-NC组	0.40 ± 0.06	3.65 ± 0.25	0.55 ± 0.04	0.45 ± 0.04	3.71 ± 0.20	0.51 ± 0.04
si-LUCAT1 + anti-miR-199b-5p组	0.85 ± 0.10	1.42 ± 0.11	0.80 ± 0.07	0.90 ± 0.08	1.30 ± 0.05	0.85 ± 0.08
si-LUCAT1 + NC组	0.30 ± 0.03	3.55 ± 0.30	0.51 ± 0.03	0.35 ± 0.04	3.62 ± 0.25	0.54 ± 0.04
si-LUCAT1 + AKAP1组	0.71 ± 0.03	1.82 ± 0.12	0.87 ± 0.05	0.75 ± 0.05	1.70 ± 0.14	0.90 ± 0.09
F值	78.744	59.845	66.214	49.295	52.675	44.321
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注：与 si-NC 组相比，si-LUCAT1 组 Huh7 细胞 LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA t 值分别为 14.637、15.787、8.075， P 值分别为 0.005、0.004、0.015；HepG2 细胞 LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA t 值分别为 11.084、15.790、5.444， P 值分别为 0.008、0.004、0.032；与 si-LUCAT1 + anti-miR-NC 组相比，si-LUCAT1 + anti-miR-199b-5p 组 Huh7 细胞 LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA t 值分别为 6.683、14.142、5.371， P 值分别为 0.022、0.005、0.033；HepG2 细胞 LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA t 值分别为 8.714、20.248、6.584， P 值分别为 0.013、0.002、0.022；与 si-LUCAT1 + NC 组相比，si-LUCAT1 + AKAP1 组 Huh7 细胞 LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA t 值分别为 16.738、9.274、10.694， P 值分别为 0.004、0.011、0.009；HepG2 细胞 LUCAT1、miR-199b-5p、AKAP1 mRNA t 值分别为 10.820、11.606、6.331， P 值分别为 0.008、0.007、0.024。

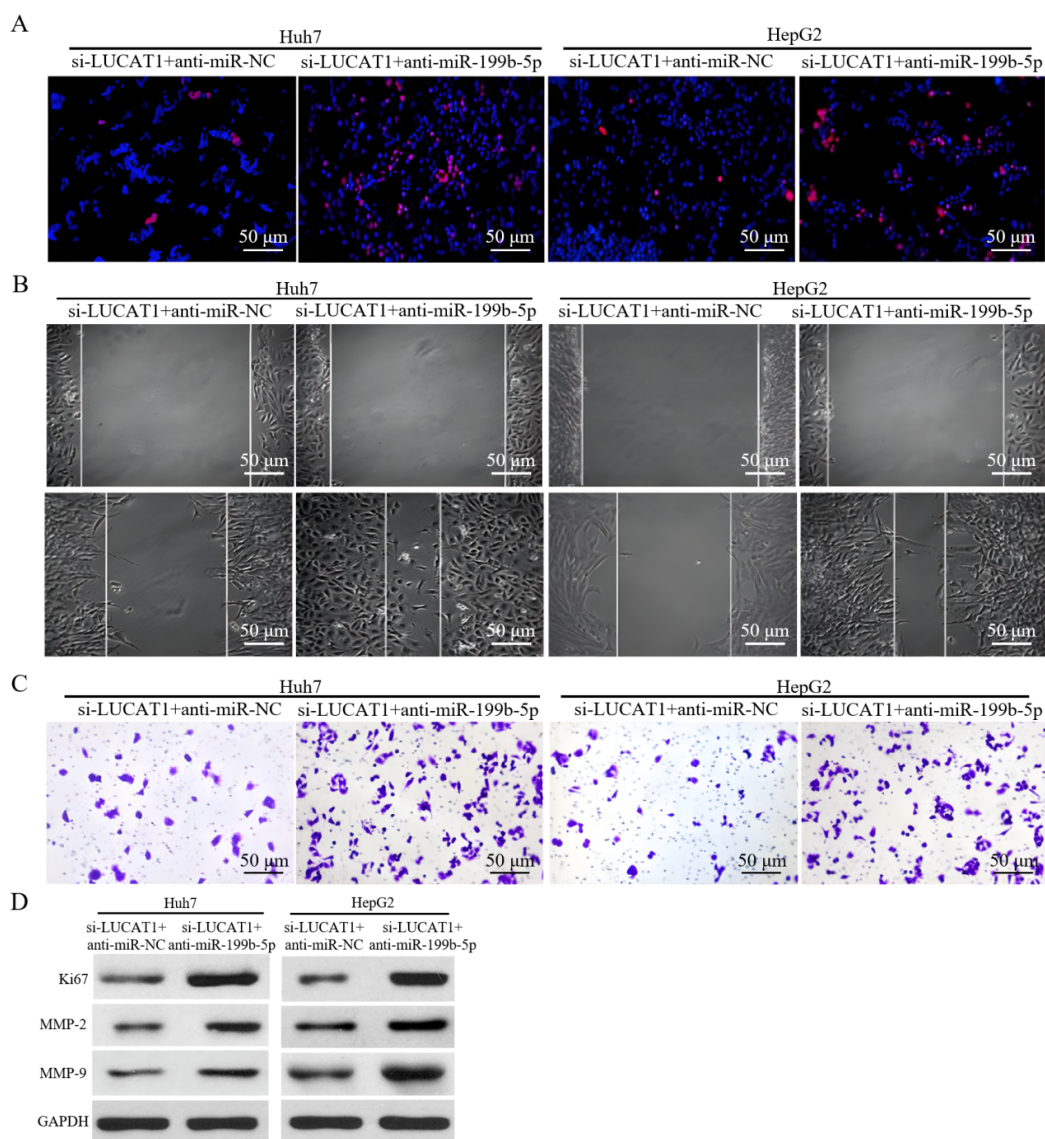


图4 miR-199b-5p低表达部分逆转LUCAT1低表达对HCC细胞增殖和转移能力的影响

注：A为EdU染色；B为划痕实验；C为Transwell实验（结晶紫染色）；D为Western blot检测细胞Ki67、MMP-2/9表达。

相比，si-LUCAT1组肿瘤体积明显减小，重量明显减轻，LUCAT1、AKAP1、Ki67、MMP-2/9蛋白水平明显降低，miR-199b-5p水平明显升高（均 $P < 0.05$ ）。见图6、表7。

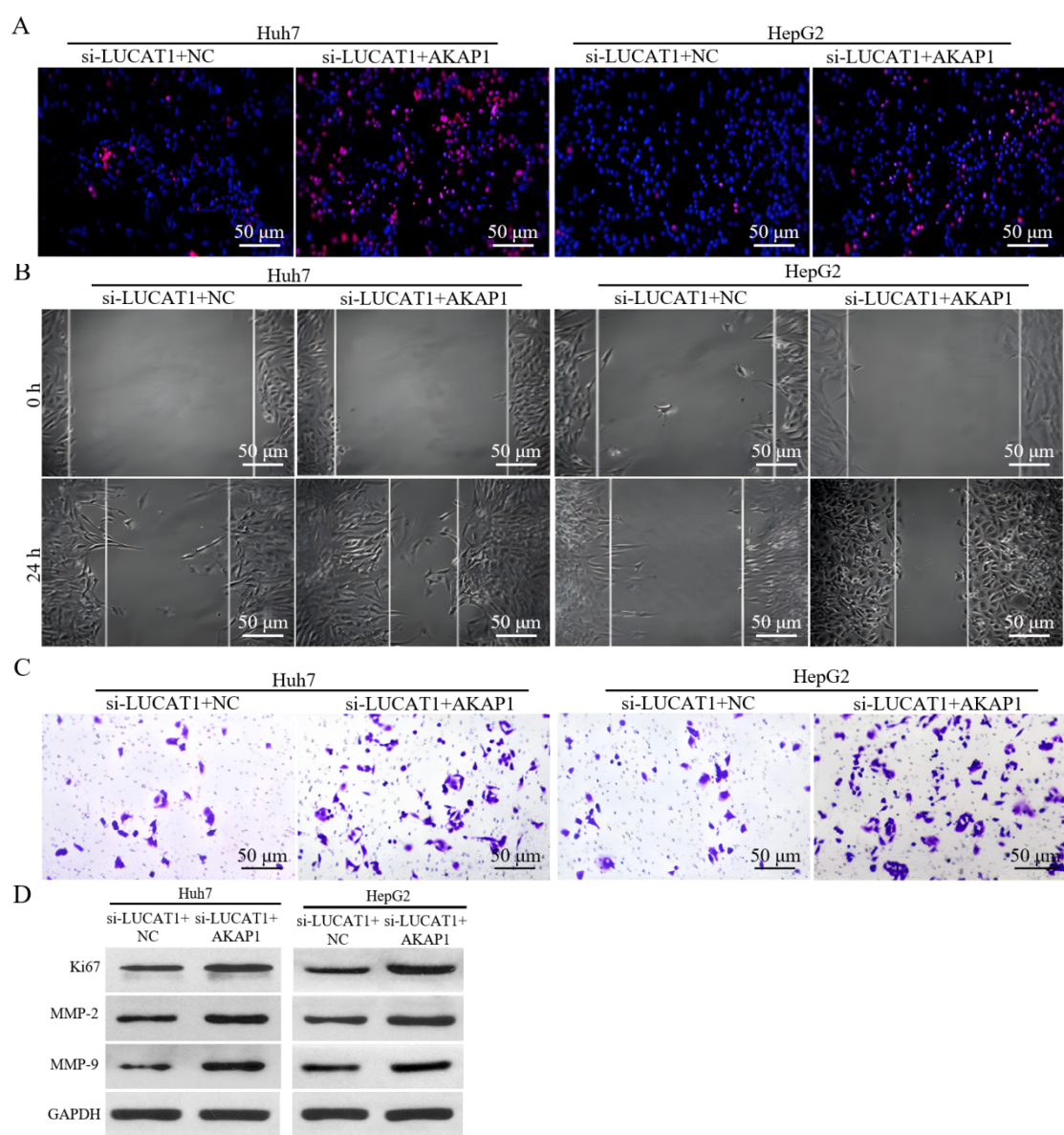


图5 AKAP1 过表达部分逆转 LUCAT1 低表达对 HCC 细胞增殖和转移能力的影响

注：A 为 EdU 染色；B 为划痕实验；C 为 Transwell 实验（结晶紫染色）；D 为 Western blot 检测细胞 Ki67、MMP-2/9 表达。

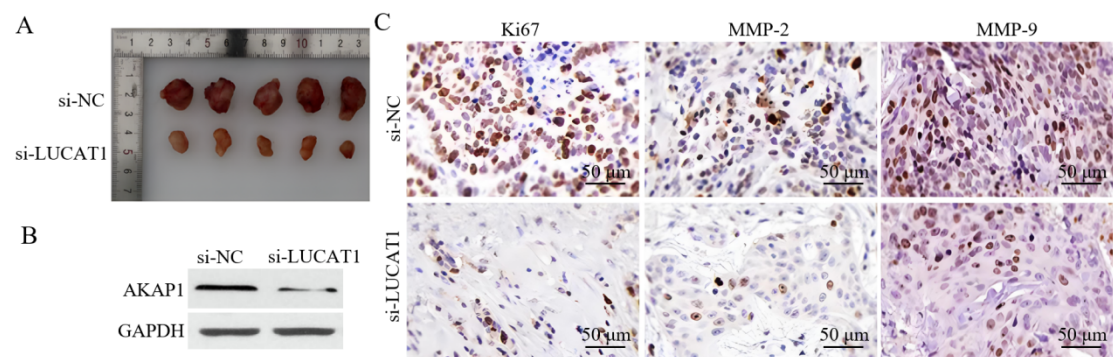


图6 LUCAT1 低表达抑制裸鼠移植瘤生长

注：A 为裸鼠移植瘤；B 为 Western blot 检测移植瘤 AKAP1 表达；C 为免疫组化染色检测移植瘤 Ki67、MMP-2/9 表达。

表7 各组移植瘤体积、质量及瘤组织 Ki67、MMP-2/9 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	瘤体积 (mm ³)	瘤质量 (g)	LUCAT1	miR-199b-5p	AKAP1 蛋白	Ki67得分 (分)	MMP-2得分 (分)	MMP-9得分 (分)
si-NC组	1542.21 ± 201.51	1.87 ± 0.22	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.16	0.51 ± 0.05	5.93 ± 0.55	5.74 ± 0.51	6.42 ± 0.84
si-LUCAT1组	523.67 ± 64.33	0.67 ± 0.15	0.47 ± 0.10	1.68 ± 0.17	0.12 ± 0.03	2.45 ± 0.28	2.35 ± 0.25	3.55 ± 0.34
t值	8.340	7.806	5.336	5.045	11.585	9.766	10.338	5.486
P值	0.014	0.016	0.033	0.037	0.007	0.010	0.009	0.032

3 讨论

近年来许多研究表明lncRNA在肿瘤中发挥重要作用，LUCAT1作为多种肿瘤的促癌因子，能够促进癌细胞的增殖和转移，并降低化疗敏感性^[18-20]。研究发现LUCAT1在HCC患者中表达水平升高，与HCC患者的化疗药物敏感性和免疫治疗效果相关^[21]。同时LUCAT1与肿瘤体积和术后HCC复发相关，沉默LUCAT1能够增加HCC细胞的活力和侵袭能力，并抑制其上皮间质转化（epithelial mesenchymal transformation, EMT）^[22]。本研究HCC组织（和细胞系）中LUCAT1水平高于癌旁组织（和正常肝细胞）。为了验证LUCAT1对HCC细胞增殖和转移能力的影响，本研究构建了低表达LUCAT1的Huh7、HepG2细胞模型，结果显示与NC组相比，LUCAT1低表达后，细胞24 h EdU阳性率、划痕愈合率及细胞侵袭数降低，Ki67、MMP-2/9水平降低。同时LUCAT1在裸鼠移植瘤模型中也具有相同作用。说明LUCAT1低表达能够抑制HCC细胞增殖和转移能力，LUCAT1起到促癌基因作用。

lncRNA作为天然的海绵通过竞争性结合miRNA以消除miRNA的抑制活性。miR-199b-5p具有表达稳定性，在细胞增殖、分化、凋亡及侵袭等过程中发挥重要作用^[23]。Wang等^[24]研究发现miR-199b-5p在HCC组织中表达降低，与HCC患者的生存率呈负相关，并与肿瘤恶性程度直接相关。Liu等^[25]发现miR-199b-5p表达在HCC细胞和裸鼠移植瘤中受到抑制，抑制miR-199b-5p表达能够促进HCC细胞的增殖、迁移和侵袭，并抑制其凋亡。另外在肌肉浸润性膀胱癌中，LUCAT1通过抑制miR-199b-5p表达促进T24细胞增殖、迁移、侵袭和EMT^[26]。本研究显示，HCC组织（和细胞系）中miR-199b-5p水平降低。通过StarBase预测发现LUCAT1与miR-199b-5p具有结合位点，且双荧光素酶报告实验验证了LUCAT1与miR-199b-5p的靶向调控关系。在同时敲低LUCAT1和miR-199b-5p的Huh7、HepG2细胞模型中，与si-LUCAT1 + anti-miR-NC组相比，si-LUCAT1 + anti-miR-199b-5p组

LUCAT1水平升高，细胞增殖、迁移和侵袭能力提高，说明LUCAT1通过调控miR-199b-5p促进HCC进展。

AKAP1是一种将蛋白激酶A和其他信号成分整合到线粒体外膜的支架蛋白，是控制线粒体功能的关键调节分子。研究发现降低AKAP1水平能够增加胃癌细胞对顺铂的敏感性^[27]。在非小细胞肺癌中，miR-199a-5p通过靶向抑制AKAP1表达，抑制肺癌细胞的增殖和致瘤性，而AKAP1的过表达部分恢复了其恶性表型^[28]。在低密度脂蛋白处理的人脐静脉内皮细胞中，miR-199b-5p通过靶向抑制AKAP1表达降低细胞凋亡、活性氧水平和线粒体分裂^[29]。本研究显示，HCC组织（和细胞系）中AKAP1水平升高。通过TargetScan预测发现miR-199b-5p与AKAP1具有结合位点，且双荧光素酶报告实验验证了miR-199b-5p与AKAP1的靶向调控关系。在敲低LUCAT1的Huh7、HepG2细胞模型中，与si-LUCAT1 + NC组相比，si-LUCAT1 + AKAP1组LUCAT1水平升高，细胞增殖和转移能力提高。说明LUCAT1通过调控miR-199b-5p/AKAP1轴促进HCC进展。

综上，lncRNA LUCAT1通过miR-199b-5p/AKAP1信号轴促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。这为lncRNA治疗HCC的分子机制提供了新见解，干预LUCAT1/miR-199b-5p/AKAP1组合可能成为HCC治疗的一种更有效的方法。

参考文献

- [1] KOMOLL R M, HU Q, OLAREWAJU O, et al. MicroRNA-342-3p is a potent tumour suppressor in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2021, 74(1): 122-134.
- [2] 崔雅菁, 陈京龙. 不同糖代谢状态肝细胞癌患者肾功能指标分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2022, 14(3): 68-72.
- [3] 张馨月, 韩巍, 吕哲昊, 等. FAPI PET/CT在肝脏恶性肿瘤诊断中的研究进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31(6): 664-667.
- [4] 柯小丽, 朱倩, 田德安, 等. 神经生长因子受体p75NTR对肝癌细胞凋亡的影响及其关键功能域[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2021, 13(2): 6-12.
- [5] TAN Y T, LIN J F, LI T, et al. LncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer[J].

- Cancer Commun (Lond),2021,41(2):109-120.
- [6] 谢容, 沈忠. lncRNA lucat1在结直肠癌组织中的表达水平与意义[J]. 中国肿瘤临床与康复,2022,29(7):790-793.
 - [7] XIA L, WANG H. lncRNA LUCAT1/ELAVL1/LIN28B/SOX2 positive feedback loop promotes cell stemness in triple-negative breast cancer[J]. Breast J,2022,2022:7689718.
 - [8] WANG L S, XIE Y, WANG J, et al. Characterization of a novel LUCAT1/miR-4316/VEGF-A axis in metastasis and glycolysis of lung adenocarcinoma[J]. Front Cell Dev Biol,2022,10:833579.
 - [9] XU M J, MA T, SHI S P, et al. Development and validation of a mutational burden-associated lncRNA signature for improving the clinical outcome of hepatocellular carcinoma[J]. Life (Basel),2021,11(12):1312.
 - [10] JIAO Y, LI Y Q, JI B, et al. Clinical value of lncRNA LUCAT1 expression in liver cancer and its potential pathways[J]. J Gastrointest Liver Dis,2019,28(4):439-447.
 - [11] LOU Y, YU Y, XU X L, et al. Long non-coding RNA LUCAT1 promotes tumorigenesis by inhibiting ANXA2 phosphorylation in hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Mol Med,2019,23(3):1873-1884.
 - [12] ZHANG Y, LUO M, CUI X, et al. Long noncoding RNA NEAT1 promotes ferroptosis by modulating the miR-362-3p/MIOX axis as a ceRNA[J]. Cell Death Differ,2022,29(9):1850-1863.
 - [13] YUAN P, YANG T, MU J, et al. Circadian clock gene NPAS2 promotes reprogramming of glucose metabolism in hepatocellular carcinoma cells[J]. Cancer Lett,2020,469:498-509.
 - [14] ZHOU S J, LIU F Y, ZHANG A H, et al. MicroRNA-199b-5p attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer,2017,117(2):233-244.
 - [15] LU B, CHENG M, WANG T. CircKIAA1429 accelerates hepatocellular carcinoma advancement by miR-199b-5p/OTX1 pathway[J]. J Viral Hepat,2023,30(8):713.
 - [16] FENG J, CHEN Z W, MA Y Q, et al. AKAP1 contributes to impaired mtDNA replication and mitochondrial dysfunction in podocytes of diabetic kidney disease[J]. Int J Biol Sci,2022,18(10):4026-4042.
 - [17] LI X, CHEN W, LI R, et al. Bladder cancer diagnosis with a four-miRNA panel in serum[J]. Future Oncol,2022,18(29):3311-3322.
 - [18] 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):738-748.
 - [19] PANG J Y, YU Q, CHEN Y Z, et al. Integrating single-cell RNA-seq to construct a neutrophil prognostic model for predicting immune responses in non-small cell lung cancer[J]. J Transl Med,2022,20(1):531.
 - [20] TAO Y, LIU Q N, WU R R, et al. Erratum: long noncoding RNA LUCAT1 enhances the survival and therapeutic effects of mesenchymal stromal cells post-myocardial infarction[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2022,28:875-876.
 - [21] ZHU J, HUANG Q, LIU S, et al. Construction of a novel lncRNA signature related to genomic instability to predict the prognosis and immune activity of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Front Immunol,2022,13:856186.
 - [22] GRAMANTIERI L, BAGLIONI M, FORNARI F, et al. lncRNAs as novel players in hepatocellular carcinoma recurrence[J]. Oncotarget, 2018,9(80):35085-35099.
 - [23] ZHAO Z G, ZHAO S K, LUO L M, et al. miR-199b-5p-DDR1-ERK signalling axis suppresses prostate cancer metastasis via inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. Br J Cancer,2021,124(5):982-994.
 - [24] WANG C X, SONG B, SONG W, et al. Underexpressed microRNA-199b-5p targets hypoxia-inducible factor-1 α in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients[J]. J Gastroenterol Hepatol,2011,26(11):1630-1637.
 - [25] LIU J, LIU B J. CircTNPO3 promotes hepatocellular carcinoma progression by sponging miR-199b-5p and regulating STRN expression[J]. Kaohsiung J Med Sci,2023,39(3):221-233.
 - [26] ZHOU Y, SONG X J, LI X M, et al. Serum LUCAT1 implicates the pathogenesis of muscle-invasive bladder cancer via targeting miR-199a-5p and miR-199b-5p[J]. J Mol Histol,2020,51(5):583-591.
 - [27] LI B W, WANG W Z, LI Z, et al. MicroRNA-148a-3p enhances cisplatin cytotoxicity in gastric cancer through mitochondrial fission induction and cyto-protective autophagy suppression[J]. Cancer Lett,2017,410:212-227.
 - [28] YANG N L, LIANG Y F, ZHU T Q, et al. Epigenetic silencing of microRNA-199a-5p promotes the proliferation of non-small cell lung cancer cells by increasing AKAP1 expression[J]. Oncol Lett,2021,21(6):434.
 - [29] CUI X, TIAN Y, ZHAO Y, et al. miR-199b-5p-AKAP1-DRP1 pathway plays a key role in ox-LDL-induced mitochondrial fission and endothelial apoptosis[J]. Curr Pharm Biotechnol,2022,23(13):1612-1622.

收稿日期: 2023-02-22

金璞, 谷从阳, 陈涛. lncRNA LUCAT1通过miR-199b-5p/AKAP1信号轴促进肝癌进展的机制[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2024,16(2): 61-72.