

文章编号 1006-8147(2021)05-0467-05

论著

LncRNA *PTCSC3* 过表达诱导非小细胞肺癌 A549 凋亡和氧化损伤并抑制细胞增殖和迁移

陈鸿运, 李晓明, 黄国胜, 杨金华, 乔飞

(南阳医学高等专科学校第一附属医院普胸外科, 南阳 473000)

摘要 目的:探究 LncRNA *PTCSC3* 过表达对非小细胞肺癌 A549 的影响。方法:将 A549 细胞分为对照组、pcDNA 组和 pcDNA-LncRNA *PTCSC3* 组,采用聚合酶链反应检测 lnc *PTCSC3*、Ki67 和 p21mRNA 表达,流式细胞仪检测细胞凋亡,试剂盒检测活性氧簇含量,克隆形成检测细胞增殖,Transwell 小室实验检测细胞侵袭,蛋白印迹法检测凋亡(caspase-3 和 caspase-9)和侵袭(E-cadherin 和 N-cadherin)相关蛋白的表达。结果:与 pcDNA 组相比,pcDNA-LncRNA *PTCSC3* 组 *PTCSC3* 基因、细胞凋亡率、cleaved caspase-3/caspase-3、cleaved caspase-9/caspase-9、p21 mRNA 及 E-cadherin 蛋白水平均显著升高($t=14.758$ 、 12.188 、 9.905 、 7.320 、 13.975 、 7.443 ,均 $P<0.05$),活性氧簇含量、克隆形成率、Ki67 mRNA、单位面积侵袭细胞数目及 N-cadherin 蛋白水平均显著降低($t=10.276$ 、 9.615 、 20.444 、 6.576 、 14.992 ,均 $P<0.05$)。结论:过表达 LncRNA *PTCSC3* 通过调控氧化应激和相关蛋白表达水平,抑制非小细胞肺癌 A549 的增殖和迁移并促进其凋亡。

关键词 LncRNA *PTCSC3*;肺癌;A549 细胞;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号 R734.2

文献标志码 A

Overexpression of LncRNA *PTCSC3* induces apoptosis and oxidative damage of non-small cell lung cancer A549 and inhibits their proliferation and migration

CHEN Hong-yun, LI Xiao-ming, HUANG Guo-sheng, YANG Jin-hua, QIAO Fei

(Department of General Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, China)

Abstract **Objective:** To explore the effects of LncRNA *PTCSC3* overexpression on non-small cell lung cancer (NSCLC) A549. **Methods:** A549 cells were divided into control group, pcDNA group and pcDNA-LncRNA *PTCSC3* group. The expression of lnc *PTCSC3*, Ki67 and p21mRNA was detected by polymerase chain reaction. The apoptosis was detected by flow cytometry. The contents of reactive oxygen species (ROS) were detected by kits. The proliferation of cells was detected by clone formation assay. The invasion of cells was detected by Transwell chamber assay. The expression of apoptosis related proteins (caspase-3, caspase-9) and invasion related proteins (E-cadherin, N-cadherin) were detected by Western blotting. **Results:** Compared with pcDNA group, *PTCSC3* gene, apoptosis rate, levels of cleaved caspase-3/caspase-3, cleaved caspase-9/caspase-9, p21mRNA and E-cadherin protein in pcDNA-LncRNA *PTCSC3* group were significantly increased ($t=14.758$, 12.188 , 9.905 , 7.320 , 13.975 , 7.443 , all $P<0.05$), while contents of ROS, clone formation rate, Ki67 mRNA, number of invasion cells per unit area and level of N-cadherin protein were significantly decreased ($t=10.276$, 9.615 , 20.444 , 6.576 , 14.992 , all $P<0.05$). **Conclusion:** LncRNA *PTCSC3* overexpression inhibits the proliferation and migration of NSCLC A549, and promotes its apoptosis by regulating oxidative stress and expression levels of related proteins.

Key words lncRNA *PTCSC3*; lung cancer; A549 cell; cell proliferation; apoptosis

近年来环境恶化、吸烟人数急剧上升导致肺癌患者逐年增加,目前非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)已经成为我国最常见的肺癌之一^[1]。肺癌的治疗方式主要包括手术治疗和药物化疗^[2]。随着科技的发展,使用长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lnc RNA) 基因治疗成为目前研究的热点,目前 lncRNA 在众多疾病中均发挥着重要的作用^[3]。XIA 等^[4]研究表明, lncRNA *PTCSC3* 可以通过

抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制胶质瘤细胞增殖和侵袭。WANG 等^[5]研究表明, lncRNA *PTCSC3* 可以抑制乳腺癌细胞增殖。因此笔者推测 lncRNA *PTCSC3* 对肺癌 A549 细胞也有一定的抑制效果,但目前关于 lncRNA *PTCSC3* 对肺癌细胞的抑制研究较少,作用机制也尚不确定。因此本文旨在探究 lncRNA *PTCSC3* 对 A549 细胞的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料 A549 细胞由中国科学院细胞库提供; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; caspase-3 抗体(货号:ab32351)、caspase-9 抗体(货号:ab32539)、

基金项目 2017 年河南省医学科技攻关计划(201702257)

作者简介 陈鸿运(1981-),男,主治医师,学士,研究方向:普胸外科;
E-mail:chenhongyun_88@163.com。

Ki67 抗体(货号:ab92742)、p21 抗体(货号:ab109520)、E-cadherin 抗体(货号:ab1416)、N-cadherin 抗体(货号:ab76011)购自艾博抗有限公司;凋亡检测试剂盒(货号:P-CA-201)购自武汉普罗塞生命科技有限公司;流式细胞仪购自 BD 公司;Transwell 小室购自美国 Corning Coseter 公司;流式细胞仪(型号:CyoFLE)购自贝克曼有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代 快速取出 A549 细胞解冻,以 1 000 r/min 离心 5 min,将培养箱温度设置为 37 ℃,CO₂ 浓度调节为 5%,将细胞放入 FBS、青霉素和链霉素混合的 RPMI1640 培养基中,待细胞融合到 90%左右时,加入 1 mL 的胰蛋白酶消化传代培养,进行后续实验。

1.2.2 pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 重组质粒构建 根据引物设计软件设计 lncRNA *PTCSC3* 引物,使用 PCR 扩增产物,待 pcDNA3.1-lncRNA *PTCSC3* 的载体建立成功后,使用内切酶对 *PTCSC3* 基因进行双酶切处理,切后的产物应用琼脂糖凝胶电泳进行目的基因鉴定并将目的基因克隆到 pc-DNA3.1 质粒载体上,取出冷藏的感受态细胞,将感受态细胞和链接产物细胞于 EP 管中置于 37℃培养箱中培养 16 h,使用内切酶酶进行质粒重组,并对基因进行序列对比和鉴定。

1.2.3 细胞的分组和转染 将细胞分为对照组、pcDNA 组和 pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组;其中 pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组将 lncRNA *PTCSC3* 导入到 pc-DNA3.1 载体中,再根据试剂盒说明书将质粒转染构建过表达的细胞株;pcDNA 组加入转染试剂和 vector 瞬时转染 A549 细胞;对照组仅加入转染试剂。

1.2.4 RT-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测相关基因表达量 取各组 A549 细胞总 RNA,测定 RNA 浓度和纯度后,反转录合成 cDNA 后 PCR 扩增,逆转录条件:30℃ 10 min,42℃ 30 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min;检测各 RNA 表达水平,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 RNA 的相对表达量,本实验以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)为内参。基因引物序列见表 1。

1.2.5 流式细胞仪检测 收集完成离心后的 A549 细胞,加入 100 μL Binding Buffer 重悬细胞,完成后分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 PI,轻轻混匀,避光下孵育 15 min,完成孵育后加入 400 μL Binding Buffer 上机检测。

1.2.6 蛋白质印迹法检测蛋白表达水平 收集完成离心后的 A549 细胞,加入裂解液裂解后加入 Loading Buffer 缓冲液。测定蛋白浓度,将蛋白转移到

PVDF 膜上,保持在 37℃的条件下,将脱脂奶粉调整浓度至 5%并加入其中封闭 2 h,完成封闭后加入 caspase-3、caspase-9、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白的抗体(稀释比例 1:500),常规孵育。使用 TBS 洗净后上机检测,内参蛋白选定 ACTIN(稀释比例 1:1 000),根据目的蛋白和内参蛋白的灰度值相比确定为目的蛋白的相对表达水平。

表 1 基因引物序列

Tab 1 Primer sequences of genes

基因	引物序列
GADPH	上游引物:5'-CTCAGACACCATGGGAGCTGA-3' 下游引物:5'-ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA-3'
Ki67	上游引物:5'-CGCCTGTTACTATCAAAAG-3' 下游引物:5'-CAGACCCATTTACTTGTGTGG-3'
p21	上游引物:5'-GTCTAGACAAGAGAAAACCTGAAG-3' 下游引物:5'-GTCTAGATTAAGTTTGAGACTGGG-3'
PTCSC3	上游引物:5'-GTACGGTACCCCTTCAGACTTCTCAGTACTC-3' 下游引物:5'-CGACTCGAGATTGCTACTGTGACATAACCTAC-3'

注:GADPH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

1.2.7 试剂盒检测活性氧簇含量 收集完成离心后的 A549 细胞,使用无血清的 DMEM 培养液培养 A549 细胞,加入 10 μm/L 的 DCF-DA,置于 37℃恒温箱中孵育 20 min,洗涤后在光学显微镜下观察;同时收获细胞,每孔加入 100 μL 细胞悬液,将 A549 细胞浓度调至 2×10⁶ /mL,使用荧光酶标仪测 525 nm 处的 OD 值。

1.2.8 细胞增殖能力检测 将细胞制成密度为 1×10³ 个/mL 的单细胞悬液后,每孔加入 0.4 mL 的细胞悬液,放入细胞培养箱中培养 2 周,使用结晶紫染色,观察细胞生长情况并计算细胞克隆形成率。克隆形成率(%)=(克隆数/所种细胞数)×100%。

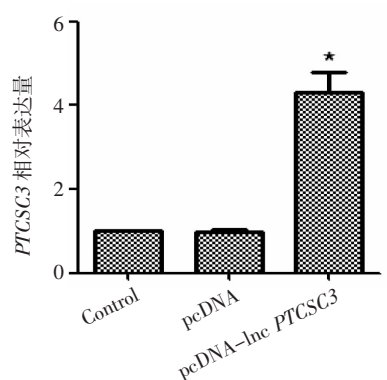
1.2.9 细胞侵袭能力检测 将细胞制成密度为 1×10⁵ 个/mL 的单细胞悬液,将细胞加入 Transwell 小室上层中,在小室下层加入正常 RPMI 1640 培养液,调整培养温度为 37 ℃,培养 24 h 后擦去小室内细胞,使用结晶紫对侵袭至小室下层的细胞进行染色,在光学显微镜下随机选择 5 个视野对细胞进行观察,统计侵袭细胞数目,本研究每组实验均重复 3 次。

1.3 统计学处理 数据分析采用软件 SPSS 22.0,作图采用软件 Graph Pad Prism 5,正态分布的数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 各组 lnc *PTCSC3* 的表达水平检测结果 与对照组相比,pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 *PTCSC3* 基因表达水平显著升高($t=14.758$, $P<0.05$),但 pcDNA 组

PTCSC3 基因表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), 见图 1。



注:与 pcDNA 组相比,* $P<0.05$

图 1 各组 lnc *PTCSC3* 的表达水平检测结果

Fig 1 Expression of lnc *PTCSC3* in each group

2.2 各组 A549 细胞凋亡情况及相关蛋白检测结果 与对照组相比,pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 A549 细胞凋亡率显著升高($t=12.188, P<0.05$),但 pcDNA 组 A549 细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组相比,pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 cleaved caspase-3/caspase-3 蛋白和 cleaved caspase-9/caspase-9 蛋白相对表达水平显著升高($t=9.905, 7.320$, 均 $P<0.05$),但 pcDNA 组 cleaved caspase-3/caspase-3 蛋白和 cleaved caspase-9/caspase-9 蛋白相对表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。

2.3 各组 A549 细胞活性氧簇的含量检测结果 与对照组相比,pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 A549 细胞活性氧簇水平显著降低($t=10.276, P<0.05$),但 pcDNA 组 A549 细胞活性氧簇水平差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。

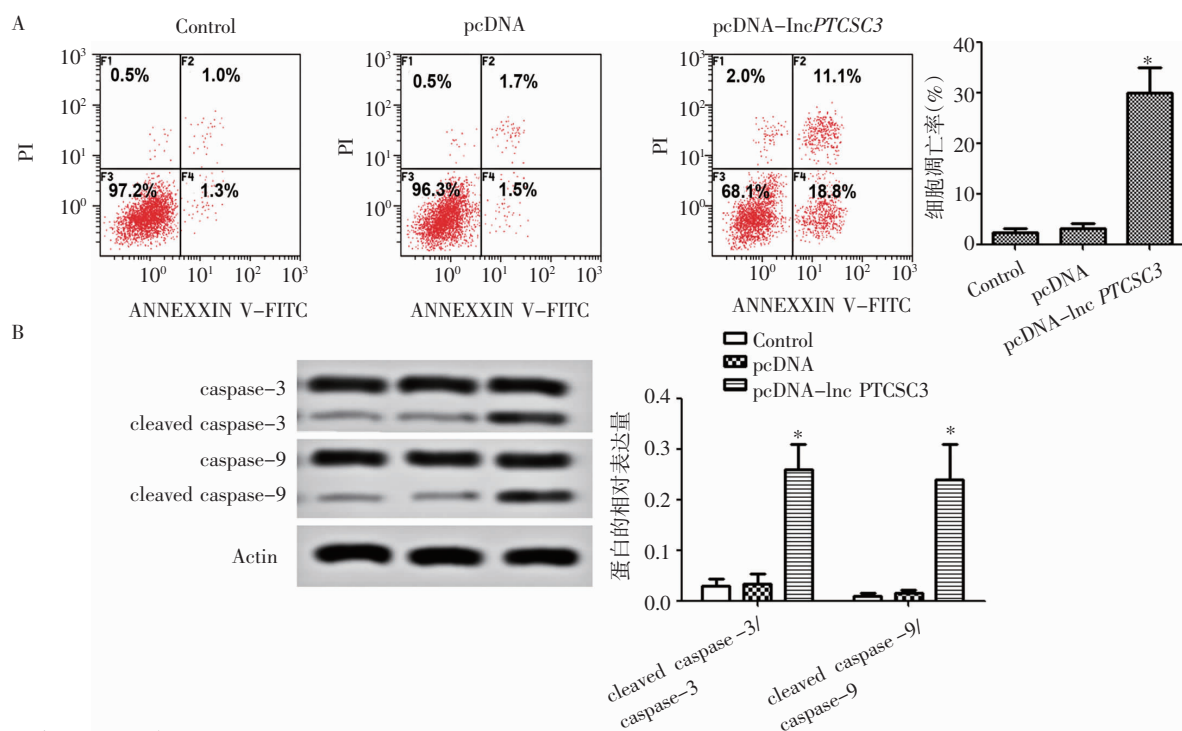


图 2 各组 A549 细胞凋亡情况及相关蛋白检测结果

Fig 2 Apoptosis of A549 cells and related proteins in each group

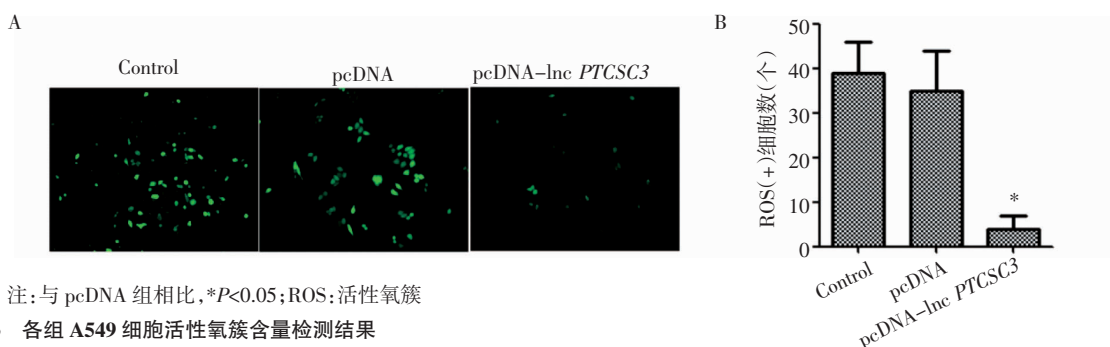
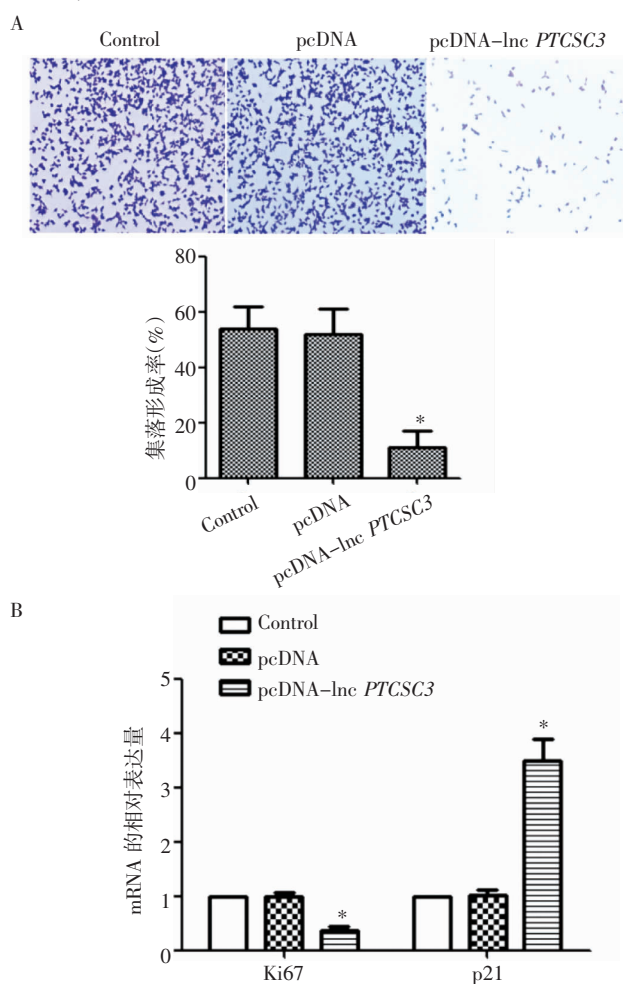


图 3 各组 A549 细胞活性氧簇含量检测结果

Fig 3 Contents of reactive oxygen species in A549 cells of each group

2.4 各组 A549 细胞增殖情况及 mRNA 表达水平 与对照组相比, pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 A549 细胞克隆形成率显著降低 ($t=9.615, P<0.05$), 但 pcDNA 组 A549 细胞克隆形成率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与对照组相比, pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 A549 细胞中 Ki67 mRNA 表达水平显著降低 ($t=20.444, P<0.05$), p21 mRNA 表达水平显著升高 ($t=13.975, P<0.05$), 但 pcDNA 组 A549 细胞中 Ki67 mRNA 和 p21 mRNA 表达水平差异无统计学意义 (均 $P>0.05$), 见图 4。



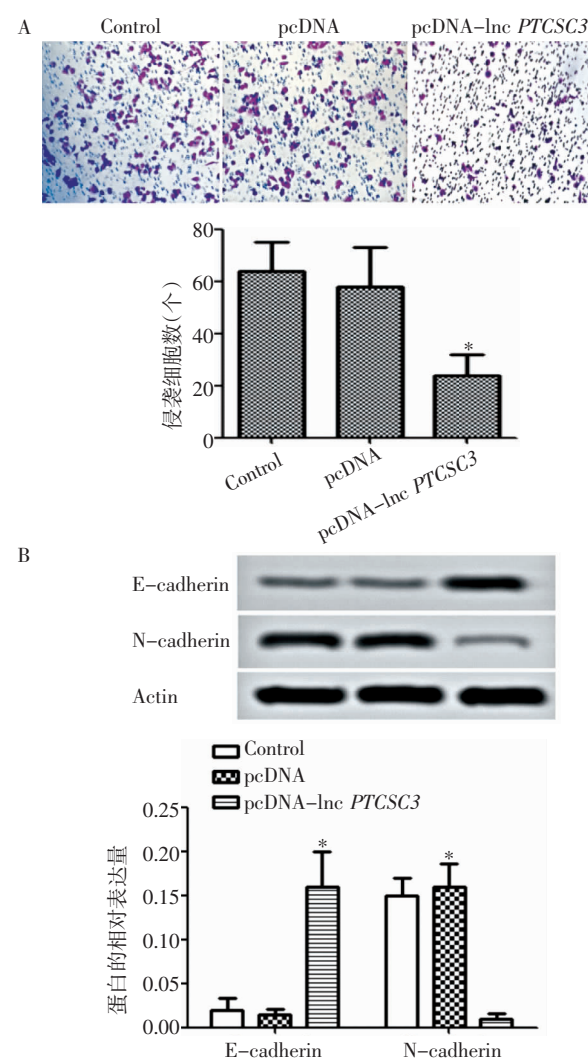
注: 与 pcDNA 组相比, * $P<0.05$

图4 各组 A549 细胞增殖情况及 mRNA 表达水平

Fig 4 Proliferation of A549 cells and related proteins in each group

2.5 各组 A549 细胞侵袭情况及相关蛋白检测结果 与对照组相比, pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 A549 细胞单位面积侵袭细胞数目显著降低 ($t=6.576, P<0.05$), 但 pcDNA 组 A549 细胞单位面积侵袭细胞数目差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与对照组相比, pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 E-cadherin 蛋白相对表达水平显著升高 ($t=7.443, P<0.05$), N-cadherin 蛋白相对表达水平显著降低 ($t=14.992, P<0.05$), 但 pcDNA 组 E-cadherin 蛋白和 N-cadherin 蛋白相对

表达水平差异无统计学意义 (均 $P>0.05$), 见图 5。



注: 与 pcDNA 组相比, * $P<0.05$

图5 各组 A549 细胞侵袭情况及相关蛋白检测结果

Fig 5 Invasion of A549 cells and related proteins in each group

3 讨论

LncRNA *PTCSC3* 与多种肿瘤关系密切, 本研究采用 pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 将 *PTCSC3* 基因导入肺癌 A549 细胞中, 与对照组相比, pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 *PTCSC3* 基因表达水平显著升高, 说明细胞转染成功, 为后续实验奠定了基础。氧化应激损伤是一种常见的细胞损伤, 当细胞出现氧化应激损伤后会产生大量的活性氧簇, 损伤细胞膜^[6]。本研究检测各组细胞的氧化物质水平发现, 与对照组相比, pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 A549 细胞活性氧簇含量显著降低, 证明表达 *PTCSC3* 基因对 A549 细胞氧化活性具有一定的调节作用。

细胞凋亡是指由基因调控的细胞自主性的程序性死亡, 细胞主要通过细胞的凋亡调控内环境。目前研究较多的细胞凋亡相关蛋白家族主要包括 caspase 家族和 Bcl-2 家族。Caspase 家族中 caspase-3 是常见

的启动者,caspase-9 是常见的执行者^[7]。当细胞接收到凋亡信号后,会激活 caspase-3 并将凋亡信号传递至caspase-9,使得 caspase-9 活化,促进细胞的凋亡^[8-9]。本研究中,与对照组相比,pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 A549 细胞凋亡率显著升高,cleaved caspase-3/caspase-3 蛋白和 cleaved caspase-9/caspase-9 蛋白相对表达水平显著升高。说明过表达 *PTCSC3* 基因可以激活 caspase 家族中的凋亡起始子 caspase-3, 并通过其激活凋亡执行子 caspase-9, 使得细胞进入凋亡状态。王俭等^[10]研究表明,通过 A549 细胞中细胞凋亡蛋白 caspase-3 的表达,从而促进细胞凋亡。

肿瘤的恶性生物学特征主要包括失控性增生、浸润和转移^[11]。Ki67 是一种与细胞增殖关系密切的增殖蛋白,其高表达表明细胞增殖加速,处于快速增殖阶段^[12-13]。P21 是 Clp 家族中的一员,p21 与克隆及其在细胞周期控制与肿瘤发生中有重要作用,同时也与肿瘤的分化、浸润深度、增生和转移有关^[14]。本研究结果显示,相比对照组,pcDNA-lncRNA *PTCSC3* 组 A549 细胞克隆形成率、Ki67 mRNA 表达显著降低,p21mRNA 表达水平显著升高。说明当细胞过表达 *PTCSC3* 基因后,A549 细胞中增殖相关基因 Ki67 受到了抑制,同时抑制了调控细胞周期的 p21 基因表达升高,表明肿瘤细胞的细胞周期受到了抑制,导致肿瘤细胞合成相关蛋白受阻,抑制了肿瘤细胞的增殖过程。金文静等^[15]研究表明,调节肺癌 A549 中的长链非编码 RNA 的表达可以调控肿瘤组织中 Ki67 的表达,实现影响肿瘤细胞的增殖。

肿瘤的浸润和转移是其重要的恶性生物学特征之一,其中上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是影响肿瘤细胞极性的重要过程,可以影响肿瘤细胞的侵袭和迁移能力^[16]。EMT 过程受到相关蛋白的调控,N-cadherin 是 N-钙黏蛋白,可以增强细胞的黏附能力,其高表达会使细胞的黏附能力增强,运动能力减弱^[17]。E-cadherin 也是调节 EMT 过程的重要蛋白,当 E-cadherin 减少会使间质细胞标志物如波形蛋白、纤连蛋白表达上调,诱导 EMT 的细胞因子、转录因子及辅助作用的一些酶表达上调。同时还会使得上皮细胞失去黏附连接的作用,导致组织结构松散,呈现梭形纤维细胞样形态,此时细胞会获得较强的侵袭及转移能力^[18]。本研究发现,过表达 *PTCSC3* 基因可以通过减少 E-cadherin 蛋白,导致组织结构松散,使得上皮细胞失去了黏附连接的作用,增强细胞 EMT,减弱细胞与细胞之间的黏附性,使得 A549 细胞的侵袭和迁移能力增强。

综上所述,过表达 lncRNA *PTCSC3* 通过调节氧

化应激和相关蛋白表达水平,抑制 NSCLS A549 的增殖和迁移并促进其凋亡。

参考文献:

- [1] SUN D M, TANG B F, LI Z X, et al. MiR-29c reduces the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells by negatively regulating the PI3K/Akt pathway[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 8007
- [2] ZHE W, SHU G. Non-small cell lung cancer(NSCLC) local surgical treatment oligometastasis[J]. J Thor Dis, 2018, 6(7): 22
- [3] LIU S, YAN G, ZHANG J, et al. Knockdown of long noncoding RNA (lncRNA) metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) inhibits proliferation, migration, and invasion and promoted apoptosis by targeting miR-124 in retinoblastoma[J]. Oncol Res, 2018, 26(4): 581
- [4] XIA S, JI R, ZHAN W. Long noncoding RNA papillary thyroid carcinoma susceptibility candidate 3(PTCSC3) inhibits proliferation and invasion of glioma cells by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. BMC Neurol, 2017, 17(1): 30
- [5] WANG N, HOU M, ZHAN Y, et al. lncRNA PTCSC3 inhibits triple-negative breast cancer cell proliferation by downregulating lncRNA H19[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 15083
- [6] 袁晔, 费蓓蓓, 俞晨, 等. 铁蓄积通过还原型烟酰胺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 激活活性氧自由基抑制间充质干细胞与体内成骨功能[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(11): 1991
- [7] 李厚忠, 郭金兴, 张胜强, 等. FGF-1 对 TGF- β 1 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡与 Caspase-3, Caspase-8 和 Caspase-9 表达的关系研究[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(7): 30
- [8] 杨涛, 费振海, 钟兴明. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展[J]. 浙江医学, 2018, 40(18): 2083
- [9] 郭卉, 张龙岩, 鄢华, 等. 尼可地尔调控半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 对猪冠状动脉微栓塞后心肌凋亡的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(1): 63
- [10] 王俭, 韩忠学, 刘静, 等. miR23a 促进肺癌细胞株 A549 细胞凋亡蛋白 Caspase-3 表达的分子机制[J]. 解剖学研究, 2018, 40(6): 38
- [11] 孙鹏玉, 王靖宇, 张雁钢. 肿瘤相关中性粒细胞对恶性肿瘤生物学特性的影响及机制研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2019, 31(4): 285
- [12] 杨松, 魏风, 刘海峰. 颅内良性脑膜瘤全切术后复发的临床病理特征及血管内皮生长因子、细胞周期相关核抗原 Ki-67 抗体和 p53 的表达分析[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2019, 26(4): 58
- [13] 严立冬, 桂卉, 杨卓顺, 等. 上调细胞周期相关蛋白-1 的表达对脑胶质瘤 U251 细胞的增殖和迁移能力的影响[J]. 医学研究生学报, 2018, 5(1): 13
- [14] 胡观丽, 张晶波, 董洁, 等. 雌激素受体 α 、 β 及细胞周期蛋白 D1、癌基因蛋白质 P21 在子宫内膜癌组织中的表达及临床意义[J]. 安徽医药, 2019, 23(9): 1769
- [15] 金文静, 任涛, 卢青纯, 等. lncRNA H19 对人非小细胞肺癌增殖及转移的影响[J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(4): 247
- [16] 阮越勇, 张浩军, 疏欣杨, 等. 三七总皂苷对肺癌 A549 细胞上皮间质转化的抑制作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(1): 76
- [17] 卢小妹, 付杰军. E-钙黏蛋白在人非小细胞肺癌细胞多西他赛耐药中的作用[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(10): 36
- [18] 陈子豪, 李仙, 贾静, 等. 三羧基取代夹心型 Mn III As2W18 对非小细胞肺癌细胞株 A549 上皮-间充质转化的影响及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(9): 1536

(2020-11-11 收稿)