

circFAT1 在非小细胞肺癌组织中表达及对细胞增殖和侵袭力的影响

徐至珺¹,王 炯¹,解明然²,颜 宇³,张 倩¹,周文勤¹

摘要 目的 探讨 circFAT1 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中表达情况及沉默 circFAT1 对 NSCLC 细胞 A549 增殖和侵袭力的影响。方法 选取行手术切除治疗的 NSCLC 患者 107 例,RT-qPCR 检测 NSCLC 和癌旁组织中 circFAT1 表达,培养 A549 细胞,分别转染 siRNA-circFAT1 (si-circFAT1 组)、无关序列 (si-control 组),另外设未转染细胞作为空白组(blank 组),RT-qPCR 检测细胞中 circFAT1 表达量,CCK-8 检测细胞增殖情况,Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭情况。结果 NSCLC 组织中 circFAT1 相对表达量高于癌旁组织[(2.47 ± 0.27) vs (1.02 ± 0.15), $t = 48.959$, $P < 0.001$];与 TNM 分期 I ~ II 期、中高分化、未发生淋巴结转移比较,TNM 分期 III ~ IV 期、低分化和发生淋巴结转移的 NSCLC 组织中 circFAT1 相对表达量升高($P < 0.05$);与 si-control 组和 blank 组比较,si-circFAT1 组细胞中 circFAT1 相对表达量明显降低($P < 0.05$),迁移细胞数和侵袭细胞数减少($P < 0.05$)。结论 NSCLC 组织中 circFAT1 相对表达量升高,沉默 circFAT1 可抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

关键词 非小细胞肺癌;circFAT1;临床指标;细胞增殖;细胞侵袭

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0464-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.024

肺癌已成为我国发病率和死亡率位居首位的恶性肿瘤,其中,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是其主要病理学类型,约占 80% 以上^[1],由于该肿瘤早期症状不典型,多数患者确诊时已进展至中晚期,患者总体预后较差^[2]。近年来,随着靶向药物治疗技术的推广应用,为攻克肺癌

提供了新的契机^[3]。因此,积极寻找 NSCLC 发生、进展中相关敏感基因,对 NSCLC 治疗意义重大。环状 RNA(circular RNA, circRNA)作为广泛存在于真核生物体内的一类带有封闭共价环的非编码 RNA,可稳定的存在于生物体,不易被 RNA 酶降解,且具有组织表达相对特异的特点,在调控机体发育、代谢及多种疾病发生进展中发挥重要作用^[4],近来发现, circRNA 参与了恶性肿瘤侵袭转移及多药耐药等过程^[5]。circFAT1 作为一种 circRNA,已被发现在结直肠癌组织及细胞系中呈高表达^[6],参与了骨肉瘤发生发展过程^[7]。但其与 NSCLC 相关性鲜有报道。该研究分析 NSCLC 组织中 circFAT1 表达,并利用小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)技术沉默人 NSCLC 细胞系 A549 中 circFAT1 表达,评价其对细胞生物学功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 选取 2018 年 3 月—2020 年 9 月在安徽医科大学第一附属医院行手术切除治疗的 NSCLC 患者 107 例,其中,男 65 例,女 42 例,年龄 35 ~ 74 (55.85 ± 11.37) 岁;病理学类型:鳞状细胞癌 38 例,腺癌 69 例;TNM 分期: I ~ II 期 57 例, III ~ IV 期 50 例;分化程度:低分化 43 例,中高分化 64 例;发生淋巴结转移 48 例。术中留取 NSCLC 组织及距离肿瘤边缘 > 5 cm 的正常癌旁组织,迅速置于液氮中, -70 °C 保存。纳入标准:① 术前未行任何治疗;② 术后病理学检查确诊为 NSCLC。排除标准:① 肺部严重感染者;② 继发性肺癌及其他系统恶性肿瘤者;③ 心肝肾等重要脏器严重功能障碍者;④ 临床资料不全者。本研究通过医院伦理委员会批准,所有患者均行知情同意。

1.1.2 主要试剂与设备 Trizol 总 RNA 提取试剂和 Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司,逆转录和扩增试剂盒购自大连宝生物工程有 限 公 司, circFAT1 及 内 参 引 物 序 列 由 上 海 捷 瑞 生 物 工 程 有 限 公 司 设 计 合 成, UV1800 紫 外 分 光 光 度 计

2021-09-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81973643);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:006143314006)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院老年呼吸与危重症医学科, 合肥 230022

² 中国科学技术大学附属第一医院胸外科,合肥 230001

³ 安徽省儿童医院呼吸科,合肥 230022

作者简介:徐至珺,女,住院医师;

王 炯,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: wangjiong7286@163.com

购自上海奥析科学仪器有限公司,人 NSCLC 细胞系 A549 购自南京科佰生物科技有限公司,DMEM 培养液、胎牛血清、青-链霉素和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,CCK-8 试剂购自天津迈基生物科技有限公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,基质胶购自美国 BD 公司,Q5 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-qPCR 检测 NSCLC 和癌旁组织中 circFAT1 表达 取 NSCLC 和癌旁组织,剪碎、超声匀浆,用 Trizol 总 RNA 提取试剂提取总 RNA,使用紫外分光光度计检测其纯度及浓度。按逆转录试剂盒说明进行逆转录获得 cDNA,使用 Q5 实时荧光定量 PCR 仪按扩增试剂盒说明对引物扩增,序列:circFAT1:上游 5'-AACAGAAGAGAACTGGGGCG-3',下游 5'-GATCAGGGTGCCAATGGTGA-3'; GAPDH:上游 5'-GATCAGGGTGCCAATGGTGA-3',下游 5'-TTTCTAGACGGCAGGTCAGG-3'。反应条件:94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,连续 38 个循环,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法获得 circFAT1 相对表达量。

1.2.2 细胞培养与转染 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液(含 1% 青-链霉素)对 A549 细胞培养,条件:5% CO₂,37 ℃。待细胞密度在 70% 以上时,胰酶消化,接种于 6 孔板,每孔 2.5×10^6 个细胞,细胞融合度在 80% 以上时,使用 Lipofectamine 2000 转染试剂分别对细胞转染 siRNA-circFAT1 (si-circFAT1 组)、无关序列 (si-control 组),另外设未转染细胞作为空白组 (blank 组)。各组处理后继续培养 48 h。

1.2.3 RT-qPCR 术检测细胞中 circFAT1 表达量 取各组转染后培养 48 h 细胞,滴加细胞裂解液,其余步骤同“1.2.1”项下方法。

1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖情况 各组在转染 24 h 后,胰酶消化,收集细胞,接种在 96 孔板,每孔 2×10^3 个细胞,在培养箱中分别于培养 0、24、48、72 和 96 h 时,向各孔加入 CCK-8 试剂 10 μ l,恒温培养 4 h,用酶标仪取 450 nm 波长处测定各孔光密度 (optical density, OD) 值。

1.2.5 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭情况 取各组转染后培养 48 h 细胞,胰酶消化,用无血清培养液对细胞重悬,密度调整为 2.5×10^5 个/ml,取细胞悬液 200 μ l 加到 Transwell 小室上室,下室则加入正常培养液 600 μ l,用培养箱培养 24 h,弃上室培养液,PBS 冲洗,4% 多聚甲醛固定,PBS 再次冲洗,

0.5% 结晶紫染色 15 min,显微镜下随机取 5 个视野计数染色细胞数,取均数作为迁移细胞数。在检测细胞侵袭情况时,将基质胶用培养液稀释后对 Transwell 小室进行包被,过夜风干,其余步骤同检测细胞迁移。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组资料比较采用 *t* 检验,多组资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 和癌旁组织中 circFAT1 表达量

NSCLC 组织中 circFAT1 相对表达量为 (2.47 ± 0.27),高于癌旁组织 (1.02 ± 0.15),差异有统计学意义 ($t = 48.959, P < 0.001$)。

2.2 circFAT1 在不同病理指标 NSCLC 组织中表达比较 circFAT1 在不同性别、年龄、病理学类型和肿瘤直径的 NSCLC 组织中相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),与 TNM 分期 I ~ II 期、中高分化、未发生淋巴结转移比较,TNM 分期 III ~ IV 期、低分化和发生淋巴结转移的 NSCLC 组织中 circFAT1 相对表达量升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 circFAT1 在不同病理指标 NSCLC 组织中表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

临床项目	n	circFAT1 相对表达量	t 值	P 值
性别			0.649	0.517
男	65	2.49 ± 0.28		
女	42	2.45 ± 0.26		
年龄(岁)			1.881	0.063
>56	63	2.43 ± 0.25		
≤56	44	2.53 ± 0.28		
病理学类型			1.331	0.186
鳞状细胞癌	38	2.52 ± 0.25		
腺癌	69	2.45 ± 0.28		
肿瘤直径(cm)			0.617	0.538
>3	37	2.49 ± 0.28		
≤3	70	2.46 ± 0.27		
TNM 分期			2.677	0.009
I ~ II	57	2.41 ± 0.24		
III ~ IV	50	2.54 ± 0.28		
分化程度			3.105	0.002
低	43	2.57 ± 0.29		
中高	64	2.41 ± 0.23		
淋巴结转移			2.784	0.006
是	48	2.55 ± 0.28		
否	59	2.41 ± 0.25		

2.3 细胞中 circFAT1 表达量 与 si-control 组和

blank 组比较, si-circFAT1 组细胞中 circFAT1 相对表达量明显降低, 差异有统计学意义 ($F = 138.245$, $P < 0.001$), 见图 1。

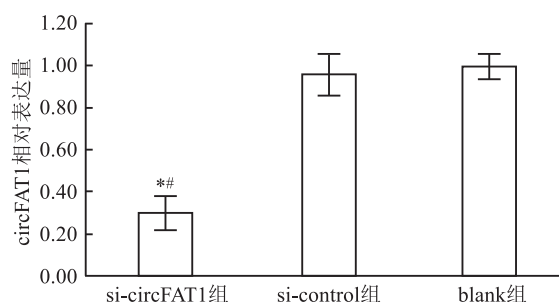


图1 三组细胞中 circFAT1 的相对表达量

与 si-control 组比较: * $P < 0.05$; 与 blank 组比较: # $P < 0.05$

2.4 沉默 A549 细胞中 circFAT1 表达对增殖活性的影响 与 si-control 组和 blank 组比较, si-circFAT1 组细胞 24、48、72 和 96 h 时 OD 值均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示沉默 circFAT1 表达抑制 A549 细胞增殖活性。见图 2。

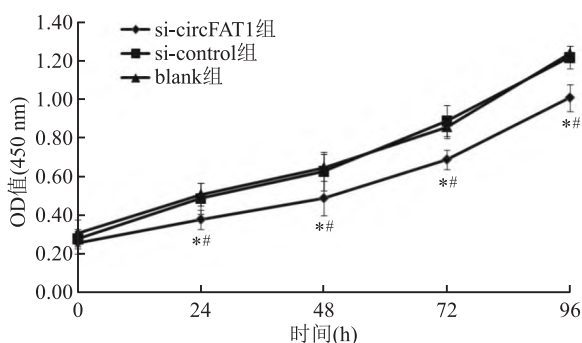


图2 沉默 A549 细胞中 circFAT1 表达对增殖活性的影响

与 si-control 组比较: * $P < 0.05$; 与 blank 组比较: # $P < 0.05$

2.5 沉默 A549 细胞中 circFAT1 表达对迁移和侵袭能力的影响 与 si-control 组和 blank 组比较, si-circFAT1 组迁移细胞数和侵袭细胞数减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示沉默 circFAT1 表达可

抑制 A549 细胞迁移和侵袭能力。见表 2, 图 3、4。

表2 三组细胞迁移和侵袭细胞数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
si-circFAT1	104.17 ± 9.41	88.33 ± 6.71
si-control	126.83 ± 5.46	120.67 ± 7.20
blank	131.67 ± 6.28	118.00 ± 6.90
<i>F</i> 值	24.589	40.115
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001

3 讨论

研究^[8]发现, 高侵袭性和易转移是 NSCLC 细胞的主要特征, 且是导致患者死亡的重要因素。因此, 有必要针对 NSCLC 侵袭和转移的相关机制开展研究, 以指导临床诊疗。circRNA 是一类具有圆形结构且可稳定存在于细胞内的非编码 RNA, 参与调控了小 RNA 的吸附、转录和剪切, 同时在核糖体 RNA 处理及蛋白质与蛋白质间相互作用中发挥重要作用^[9]。目前, 其在恶性肿瘤中的作用开始受到重视。circFAT1 作为一种 circRNA, 研究^[10]发现, 其可作为结直肠癌肝转移的潜在预测指标。陈靖等^[11]报道, 结直肠癌组织中 circFAT1 高表达且参与了癌细胞迁移和侵袭。亦有研究^[12]发现, circFAT1 促进了原发性肝癌进展。本研究显示, NSCLC 组织中 circFAT1 相对表达量高于癌旁组织, 提示 circFAT1 可能参与了肿瘤发生。本研究结果显示, TNM 分期 III ~ IV 期、低分化和发生淋巴结转移的 NSCLC 组织中 circFAT1 相对表达量较 TNM 分期 I ~ II 期、中高分化、未发生淋巴结转移明显升高, 进一步说明随着 NSCLC 进展, circFAT1 表达水平升高, 提示 circFAT1 可能发挥癌基因功能参与了该肿瘤进展。

为进一步观察 circFAT1 在 NSCLC 发生、进展中的作用, 本研究采用 siRNA 技术沉默 A549 细胞中 circFAT1 基因表达, 结果显示, 与 si-control 组和 blank 组比较, si-circFAT1 组细胞中 circFAT1 相对

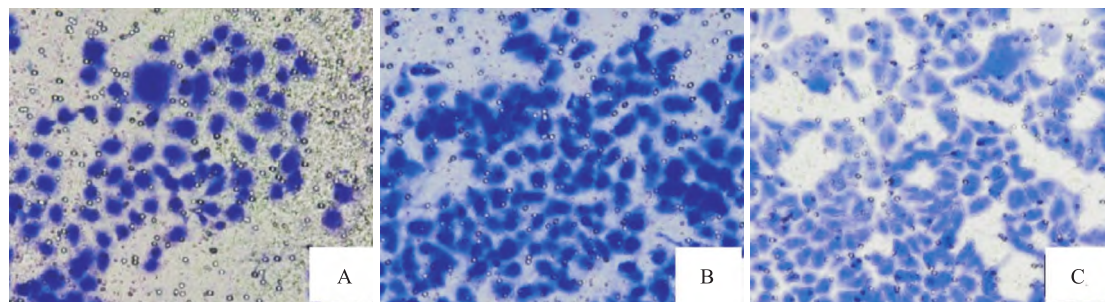


图3 Transwell 法检测沉默 A549 细胞中 circFAT1 表达对迁移能力的影响 结晶紫染色 × 100

A: si-circFAT1 组; B: si-control 组; C: blank 组

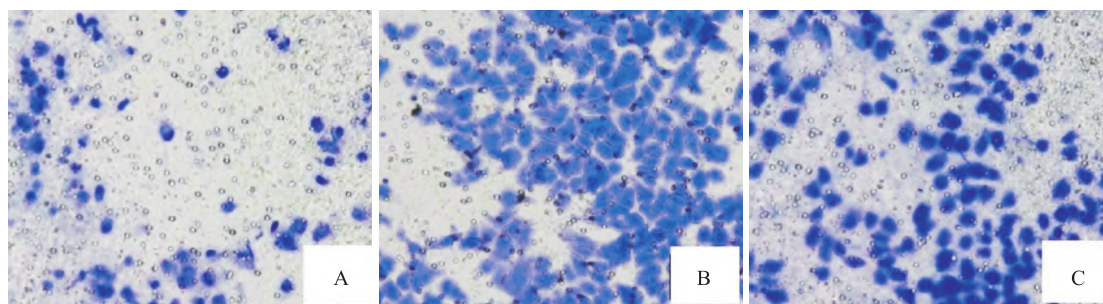


图4 Transwell 法检测沉默 A549 细胞中 circFAT1 表达对侵袭能力的影响 结晶紫染色 $\times 100$

A: si-circFAT1 组; B: si-control 组; C: blank 组

表达量明显降低,表明成功构建 circFAT1 低表达的细胞。有研究^[6]报道, circFAT1 可影响结直肠癌细胞增殖、凋亡和糖酵解。Liu et al^[13]报道, circFAT1 参与了骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭。亦有研究^[14]指出, circFAT1 可通过 miR-873/ZEB1 轴促进甲状腺癌增殖、迁移和侵袭。本研究结果显示,与 si-control 组和 blank 组比较, si-circFAT1 组细胞 24、48、72 和 96 h 时 OD 值均降低, 迁移细胞数和侵袭细胞数减少, 表明沉默 circFAT1 可抑制 A549 细胞增殖、迁移和侵袭能力, 提示 circFAT1 可能参与了 A549 细胞增殖、迁移和侵袭过程,

参考文献

- [1] 辛雯艳, 黄磊, 闫贻忠, 等. 2005-2014 年中国老年人肺癌发病的时间趋势分析[J]. 现代预防医学, 2020, 47(12): 2113-6.
- [2] Duma N, Santana-Davila R, Molina J R. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, screening, diagnosis, and treatment [J]. Mayo Clin Proc, 2019, 94(8): 1623-40.
- [3] 赵子慧, 王绪华. 非小细胞肺癌伴随诊断的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2021, 33(1): 66-71.
- [4] 郑帅龙, 李利, 张红平. 环状 RNA 翻译能力研究进展[J]. 遗传, 2020, 42(5): 423-34.
- [5] 张浩然, 王搏, 申占龙, 等. 环状 RNA 的功能及其在结直肠癌中的研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(2): 382-6.
- [6] Hu B, Xian Z, Zou Q, et al. CircFAT1 suppresses colorectal cancer development through regulating miR-520b/UHRF1 axis or miR-302c-3p/UHRF1 axis [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2021, 36(1): 45-57.
- [7] 刘刚. CircFAT1 吸附 miR-375 从而增加骨肉瘤细胞中 YAP1 蛋白表达机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- [8] Ahn Y H, Ko Y H. Diagnostic and therapeutic implications of microRNAs in non-small cell lung cancer [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8782-99.
- [9] Zang J, Lu D, Xu A. The interaction of circRNAs and RNA binding proteins: An important part of circRNA maintenance and function [J]. J Neurosci Res, 2020, 98(1): 87-97.
- [10] 徐咏强, 叶伟标, 陈靖, 等. 血清 circFAT1 在结直肠癌肝转移中的预测价值[J]. 系统医学, 2020, 5(12): 24-6.
- [11] 陈靖, 叶伟标, 徐咏强, 等. circFAT1 在结直肠癌中的表达及其对肠癌细胞迁移和侵袭的影响[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(7): 859-62.
- [12] Wei H, Yan S, Hui Y, et al. CircFAT1 promotes hepatocellular carcinoma progression via miR-30a-5p/REEP3 pathway [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(24): 14561-70.
- [13] Liu G, Huang K, Jie Z, et al. CircFAT1 sponges miR-375 to promote the expression of Yes-associated protein 1 in osteosarcoma cells [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 170-86.
- [14] Liu J, Li H, Wei C, et al. circFAT1(e2) promotes papillary thyroid cancer proliferation, migration, and invasion via the miRNA-873/ZEB1 axis [J]. Comput Math Methods Med, 2020, 2020: 1459368.

Expression of circFAT1 in non-small cell lung cancer tissues and its effect on cell proliferation and invasiveness

Xu Zhijun¹, Wang Jiong¹, Xie Mingran², Yan Yu³, Zhang Qian¹, Zhou Wenqin¹

(¹Dept of Geriatric Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ²Dept of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001; ³Dept of Respiratory Medicine, Anhui Children's Hospital, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of circFAT1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues

动脉穿支分层皮瓣在各种体表深度创面修复治疗中的应用研究

王春华¹, 李心怡², 方林森³, 徐庆连¹

摘要 目的 评价动脉穿支分层皮瓣对于修复各种体表深度创面的效果及机制。方法 选择 90 例深度创面患者,随机分为动脉穿支分层皮瓣组和传统皮瓣组,前者给予知名动脉穿支分层皮瓣修复创面,后者给予传统皮瓣修复,观察两组患者住院时间、治疗费用、出院时患者满意度、患者日常生活能力评分、创面一期愈合率、并发症发生率、创面复发率、创面愈合总优良率方面的差异。结果 与传统皮瓣组比较,动脉穿支分层皮瓣组在创面一期愈合率、并发症发生率及总优良率方面具有优势,差异有统计学意义($P < 0.05$),在创面复发率方面比较两组差异无统计学意义($P > 0.05$);与传统皮瓣组比较,动脉穿支分层皮瓣组在治疗费用、住院时间、生活能力评分及患者满意度方面具有优势,差异有统计学意义

($P < 0.05$)。结论 动脉穿支分层皮瓣是修复体表深度创面的理想措施,按照个性化原则灵活设计分层皮瓣,充分的创面基底床准备、精细的手术操作和术后管理是成功的关键。

关键词 穿支分层皮瓣;创面;修复

中图分类号 R 622+.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0468-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.025

各种原因导致的深度创面的治疗通常是在综合治疗的基础上以皮瓣修复创面,传统皮瓣在修复这类创面时经常出现各种并发症,导致创面愈合时间延长,影响肢体功能,导致患者生活质量降低。该研究应用动脉穿支分层皮瓣修复难愈创面,发现较传统皮瓣具有愈合时间短且并发症少的优点,具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 病例资料

1.1.1 纳入标准 收集安徽医科大学第一附属医院烧伤科 2014 年 1 月—2021 年 3 月治疗的 90 例深度创面患者,其中男 71 例,女 19 例,年龄 2~83 岁,致伤原因如电烧伤、车祸伤、撕脱伤、骨折内固定术

2021-09-23 接收

基金项目:安徽省自然科学基金青年项目(编号:9021548201);安徽医科大学临床医学基金项目(编号:2019xkj156);人口健康与优生安徽省重点实验室项目(编号:JKYS201822)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 烧伤科、² 整形外科,合肥 230022

³ 安徽医科大学第四附属医院烧伤整形科,合肥 230041

作者简介:王春华,男,副主任医师;

李心怡,女,主治医师,责任作者,E-mail:lixinyi2023@163.com

方林森,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:shaoshangke@126.com

and the effect of silencing circFAT1 on the proliferation and invasiveness of NSCLC cell A549. **Methods** A total of 107 patients with NSCLC who underwent surgical resection were selected. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expressions of circFAT1 in NSCLC and adjacent tissues. A549 cells were cultured and transfected with siRNA-circFAT1 (si-circFAT1 group) and irrelevant sequences (si-control group), respectively, and in addition, the untransfected cells were set as the blank group. RT-qPCR was used to detect the expression of circFAT1 in cells, CCK-8 was used to detect cell proliferation, and Transwell chamber was used to detect cell migration and invasion. **Results** The relative expression level of circFAT1 in NSCLC tissues was higher than that in the adjacent tissues [(2.47 ± 0.27) vs (1.02 ± 0.15) , $t = 48.959$, $P < 0.001$]. Compared with TNM stages I-II, moderately well differentiated and no lymph node metastasis, the relative expression levels of circFAT1 in NSCLC tissues with TNM stages III-IV, poorly differentiated and lymph node metastasis increased ($P < 0.05$). Compared with the si-control group and the blank group, the relative expression level of circFAT1 in the cells of the si-circFAT1 group was significantly reduced ($P < 0.05$), and the numbers of migrating cells and invading cells were reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** The relative expression level of circFAT1 in NSCLC tissues increased. Silencing circFAT1 can inhibit the proliferation, migration and invasion of A549 cells.

Key words non-small cell lung cancer; circFAT1; clinical indicators; cell proliferation; cell invasion