

网络出版时间: 2024-12-26 16:51:59 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1134.006>

LncRNA *SFTA1P* 通过调控 *miR-182-5p/FNI* 通路促进肾透明细胞癌细胞增殖与迁移

向威 吕磊 郑福鑫 袁敬东

(武汉市第一医院泌尿外科 武汉 430022)

摘要 目的 探讨长链非编码 RNA 表面活性剂相关 1 假基因(*SFTA1P*)通过调控微小 RNA-182-5p(*miR-182-5p*)/纤连蛋白 1(*FNI*)通路促进肾透明细胞癌(ccRCC)细胞增殖与迁移的分子机制。方法 应用 GEPIA2 软件探究 TCGA 数据库中 *SFTA1P* 在 ccRCC 组织中的表达;实时定量 PCR(qPCR)检测 *SFTA1P* 在 ccRCC 组织、正常肾脏组织及 ccRCC 细胞系中的表达;亚细胞定位实验探究 *SFTA1P* 在 ccRCC 细胞系人肾细胞腺癌细胞(ACHN)中的定位;将 ACHN 细胞分为 si-Con 组、si-*SFTA1P* #2 组、mimic NC 组、*miR-182-5p* mimic 组、anti-*miR-Con* 组、anti-*miR-182-5p* 组、anti-*miR-182-5p* + si-*FNI* 组、si-Con + anti-*miR-Con* 组、si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR-Con* 组及 si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR-182-5p* 组;CCK-8 与 transwell 小室实验检测细胞增殖与迁移能力;qPCR、Western blot 和双荧光素酶报告基因实验检测 *SFTA1P*、*miR-182-5p* 和 *FNI* 的调控关系。结果 TCGA 数据库分析显示,*SFTA1P* 在 ccRCC 组织中高表达($P < 0.05$);与正常肾脏组织比较,*SFTA1P* 在 ccRCC 组织中表达升高($P < 0.01$);ccRCC 细胞系 786-O、SN12-PM6、ACHN 及 A498 中 *SFTA1P* 表达明显高于人肾近曲小管细胞 HK-2(均 $P < 0.01$);亚细胞定位实验显示 *SFTA1P* 主要分布于 ACHN 细胞的细胞质中;与 si-Con 组比较,si-*SFTA1P* #2 组 ACHN 细胞增殖与迁移能力降低,*FNI* mRNA 及蛋白表达降低($P < 0.05$);与 mimic NC 组比较,*miR-182-5p* mimic 组 ACHN 细胞 *FNI* mRNA 及蛋白表达降低($P < 0.01$);与 anti-*miR-Con* 组比较,anti-*miR-182-5p* 组 ACHN 细胞 *FNI* mRNA 及蛋白表达增加,细胞增殖与迁移能力增强($P < 0.05$);与 anti-*miR-182-5p* 组相比,anti-*miR-182-5p* + si-*FNI* 组 ACHN 细胞增殖与迁移能力降低($P < 0.05$);与 si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR-Con* 组比较,si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR-182-5p* 组 ACHN 细胞增殖与迁移能力增强,*FNI* mRNA 及蛋白表达增加($P < 0.05$)。结论 *SFTA1P* 在 ccRCC 中高表达,其通过调控 *miR-182-5p/FNI* 通路促进 ccRCC 细胞的增殖与迁移。

关键词 肾透明细胞癌;*SFTA1P*; *miR-182-5p*; *FNI*; 增殖; 迁移

中图分类号 R 737.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0041-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.006

肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是人类肾脏恶性肿瘤中最常见的一种病理类型,具有高复发、高转移的特征,早期或局限性肿瘤患者一般通过手术治疗,而晚期患者则主要依赖靶向或免疫治疗。然而,这类晚期患者常因耐药而疗效不佳,导致预后较差^[1-2]。因此,研究 ccRCC 发生发展的分子机制,并探寻新的标志物或靶标,对肿瘤患者的早期诊断、治疗及预后改善具有潜在的重要意义。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度超过 200 个核苷酸的功能性 RNA,被证实调控肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移或血管生成等关键过程^[3]。表面活性剂相关 1 假基因

(surfactant associated 1 pseudogene, *SFTA1P*)是近年来新被研究的一个 lncRNA,被发现在多种肿瘤中发挥抑癌或促癌作用^[4-7]。然而,*SFTA1P* 在 ccRCC 中的作用尚不明晰。该研究结合生物信息学分析和细胞功能实验,探索 *SFTA1P* 对 ccRCC 细胞增殖与迁移的影响,并验证 *SFTA1P*、*miR-182-5p*、纤连蛋白 1(fibronectin 1, *FNI*) 在 ccRCC 中的调控关系。

1 材料与方法

1.1 临床标本收集 收集 2021 年 3 月—2023 年 1 月在武汉市第一医院泌尿外科接受根治性肾脏切除的 22 例患者的癌组织(Tumor 组),同时收集距肿瘤边缘大于 5 cm 的正常肾脏组织(Normal 组),并对这些患者的一般资料和病理信息进行统计分析。研究对象包括 17 名男性和 5 名女性,年龄 59 ~ 78 (67.36 ± 5.85) 岁,均最终病理确诊为 ccRCC,且术前未接受放化疗或其它辅助治疗。所有研究对象均签署知情同意。本研究获得了医院伦理委员会的批

2024-11-15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81502204);湖北省卫生健康委员会科研项目(编号:WJ2021Q001)

作者简介:向威,男,博士,副主任医师;

袁敬东,男,硕士,主任医师,通信作者,E-mail: jingdongyuan97@hotmail.com

准,所有标本在离体后立即置于液氮中保存。

1.2 主要试剂 TRIzol 总 RNA 提取试剂、胰酶、Lipofectamine 2000 转染试剂及细胞核质分离试剂盒由美国 Invitrogen 公司购入;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Sigma 公司;高糖型杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养基购自美国 Hyclone 公司;逆转录试剂盒与实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;RIPA 液、ECL 液及 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;RNA 结合蛋白免疫沉淀检测(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)试剂盒购自美国 Millipore 公司;*SFTA1P*、*FNI* 及 *GAPDH* 引物由上海生工公司提供;*U6* 引物、*miR-182-5p* 引物、*miR-182-5p* 模拟物(*miR-182-5p* mimic)/抑制剂(*anti-miR-182-5p*)及阴性对照(*mimic NC*、*anti-miR-Con*)购自广州锐博生物科技有限公司;*SFTA1P* 小干扰 RNA 由上海吉玛基因公司购入,干扰序列分别为: *si-SFTA1P* #1: 5'-GGAAAGGCATTCACCATCAAT-3'; *si-SFTA1P* #2: 5'-GTTGCCAGTCAAAGAAACAAT-3'; *si-SFTA1P* #3: 5'-GGATGGTCAGAGAGGAGATTA-3'; *FNI* 干扰序列为: *si-FNI*: GTGTCTTACCATTACCTACA; *siRNA* 阴性对照序列(*si-Con*): 5'-GAACGGATTAAACCGATTACA-3';野生型/突变型双荧光素酶载体(*wt SFTA1P*、*mut SFTA1P*、*wt FNI* 3'UTR、*mut FNI* 3'UTR)均由上海吉玛制药技术有限公司构建并提供;双荧光素酶报告基因实验试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司;*GAPDH* 与 *FNI* 一抗购自美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司(货号: #2118、#26836) *Ago2* 一抗由美国 Abcam 公司提供(货号: ab186733),二抗由上海碧云天生物技术有限公司提供(货号: A0208)。

1.3 细胞培养 ccRCC 细胞系 786-O、人肾细胞腺癌细胞(human renal cell adenocarcinoma cell, ACHN)来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,ccRCC 细胞系 SN12-PM6、A498 及人肾近曲小管细胞 HK-2 由本课题组保存。所有细胞系均用含 10% FBS 的 DMEM 培养液进行培养,培养环境为含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱。

1.4 细胞转染与实验分组 将处于对数生长期的 ccRCC 细胞经胰酶消化后按照各实验所需密度种入各培养板孔板内,待细胞生长至 70% 融合度时进行转染操作,分组如下: *si-Con* 组(转染 *si-Con*)、*si-*

SFTA1P #2 组(转染 *si-SFTA1P* #2)、*mimic NC* 组(转染 *mimic NC*)、*miR-182-5p* *mimic* 组(转染 *miR-182-5p* *mimic*)、*anti-miR-Con* 组(转染 *anti-miR-Con*)、*anti-miR-182-5p* 组(转染 *anti-miR-182-5p*)、*anti-miR-182-5p* + *si-FNI* 组(*anti-miR-182-5p* 与 *si-FNI* 共转染)、*si-Con* + *anti-miR-Con* 组(*si-Con* 与 *anti-miR-Con* 共转染)、*si-SFTA1P* #2 + *anti-miR-Con* 组(*si-SFTA1P* #2 与 *anti-miR-Con* 共转染)及 *si-SFTA1P* #2 + *anti-miR-182-5p* 组(*si-SFTA1P* #2 与 *anti-miR-182-5p* 共转染)。

1.5 CCK-8 细胞增殖实验 将消化后的 ccRCC 细胞以 1.0×10^3 个/孔的密度种入 96 孔板内,在转染 24、48、72、96 h 后分别收集各转染组细胞,按照 CCK-8 试剂盒的操作说明检测 450 nm 波长处的吸光度值,继而进行数据统计分析。

1.6 Transwell 细胞迁移实验 将转染后的各组 ccRCC 细胞消化重悬于无血清的 DMEM 培养液中,以 2.0×10^4 /孔的量(200 μ l 细胞悬液)加入 Transwell 上室内,而在下室内加入 600 μ l 含 10% FBS 的 DMEM 培养液。在培养箱内继续培养 24 h 后,先用 4% 多聚甲醛对下室底壁细胞进行固定,继而用 0.1% 结晶紫溶液对贴壁细胞进行染色,随后在倒置显微镜下进行观测和拍照。

1.7 qPCR 检测 按照 TRIzol 法提取 ccRCC 组织、正常肾脏组织及 ccRCC 细胞系的总 RNA,在测定 RNA 浓度后,使用逆转录试剂盒生成 cDNA,随后应用 qPCR 试剂盒进行检测分析。各引物序列为: *SFTA1P*, Forward 5'-AATTACAACGAGAAAAAGCACCT-3', Reverse 5'-AGTAGAGAGGGGGATGAAGAAAT-3'; *FNI*, Forward 5'-GGTCCGGGACTCAATC-CAAA-3', Reverse 5'-GACAGAGTTGCCACGGTAA-3'; *GAPDH*, Forward 5'-TTCTTTTTCGCTCGCCAGCC-3', Reverse 5'-TCCCCTTCTCAGCCTTGAC-3'。 *GAPDH*、*U6* 被分别用于内参对照,并使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算各基因的相对表达量。

1.8 蛋白质印迹(Western blot)实验 应用 RIPA 法分离并纯化各组细胞的总蛋白,BCA 法测定其浓度,继而按照 Western blot 操作步骤分别进行电泳、转膜、封闭、洗膜及一抗、二抗孵育等过程,最后使用 ECL 液对膜带进行化学发光检测。

1.9 亚细胞定位实验 应用细胞核质分离试剂盒分别提取 ccRCC 细胞的细胞核与细胞质 RNA,经浓度测定、逆转录成 cDNA 及 qPCR 上机检测,分析 *SFTA1P* 在 ccRCC 细胞中的亚细胞定位。

1.10 RIP 检测 收集处于对数生长期的 ccRCC 细胞,按照 RIP 试剂盒操作流程提取总 RNA,随后用 Ago2 抗体预孵育的磁珠与所提取 RNA 进行沉淀反应,继而对富集的 RNA 进行纯化,并逆转录成 cDNA,最后采用 qPCR 法进行检测,以分析 Ago2 对 *SFTA1P*、*miR-182-5p* 的富集程度。其中,裂解液总 RNA 组为 Input 对照, IgG 组为阴性对照。

1.11 双荧光素酶报告基因实验 采用生物信息学在线数据库 miRcode(<http://www.mircode.org/>) 预测 *SFTA1P* 靶基因 *miR-182-5p* 与 *SFTA1P* 具有互补结合位点,构建野生型(wt *SFTA1P*) 和突变型(mut *SFTA1P*) 双荧光素酶报告基因质粒。应用生物信息学在线数据库 starBase(<https://rnasysu.com/encori/index.php>) 预测 *miR-182-5p* 靶基因 *FNI* 基因 3' UTR 与 *miR-182-5p* 具有互补结合位点,构建野生型(wt *FNI* 3'UTR) 和突变型(mut *FNI* 3'UTR) 双荧光素酶报告基因质粒。将 wt *SFTA1P* 或 mut *SFTA1P* 双荧光素酶报告基因质粒分别与 *miR-182-5p* mimic 或 mimic NC 共转至 ACHN 细胞中;将 wt *FNI* 3'UTR 或 mut *FNI* 3'UTR 双荧光素酶报告基因质粒分别与 *miR-182-5p* mimic 或 mimic NC 共转至 ACHN 细胞中。在转染 48 h 后,利用双荧光素酶报告基因实验试剂盒检测 ACHN 细胞中荧光素酶的活性。

1.12 统计学处理 应用 SPSS 27.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,其中独立样本 *t* 检验被用于两组间资料数据的比较,而多组间差异比较采用单

因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *SFTA1P* 在 ccRCC 组织及细胞系中的表达情况 GEPIA2 软件分析结果显示,与 Normal 组相比, *SFTA1P* 在 Tumor 组中高表达($P < 0.05$) (图 1A)。qPCR 检测结果显示,与 Normal 组比较, *SFTA1P* 在 Tumor 组中表达上调($t = 4.803$, $P < 0.01$) (图 1B)。此外, qPCR 检测结果显示,相比肾近曲小管细胞 HK-2, *SFTA1P* 在 ccRCC 细胞系 ACHN、786-O、A498 及 SN12-PM6 中表达均增加($t = 12.64、5.157、7.196、8.962$, 均 $P < 0.01$) (图 1C)。上述结果表明 *SFTA1P* 在 ccRCC 组织及细胞系中高表达,提示其很可能在 ccRCC 中发挥促癌作用。

2.2 下调 *SFTA1P* 对 ccRCC 细胞增殖与迁移的影响 qPCR 检测结果显示,与 si-Con 组比较, si-*SFTA1P* #1 组、si-*SFTA1P* #2 组及 si-*SFTA1P* #3 组 ACHN 细胞中 *SFTA1P* 表达均降低($t = 13.03、19.44、9.203$, 均 $P < 0.01$) (图 2A),其中 si-*SFTA1P* #2 干扰序列对 *SFTA1P* 表达具有最高的沉默效率。CCK-8 检测结果显示,与 si-Con 组相比, si-*SFTA1P* #2 组 ACHN 细胞在 48、72、96 h 的增殖活力降低($t = 3.995、3.983、4.68$, 均 $P < 0.05$) (图 2B)。Transwell 细胞迁移实验结果显示,与 si-Con 组相较, si-*SFTA1P* #2 组 ACHN 细胞的迁移能力降低($t = 9.511$, $P < 0.01$) (图 2C)。上述结果表明,下调 *SFTA1P* 抑制 ccRCC 细胞的增殖与迁移。

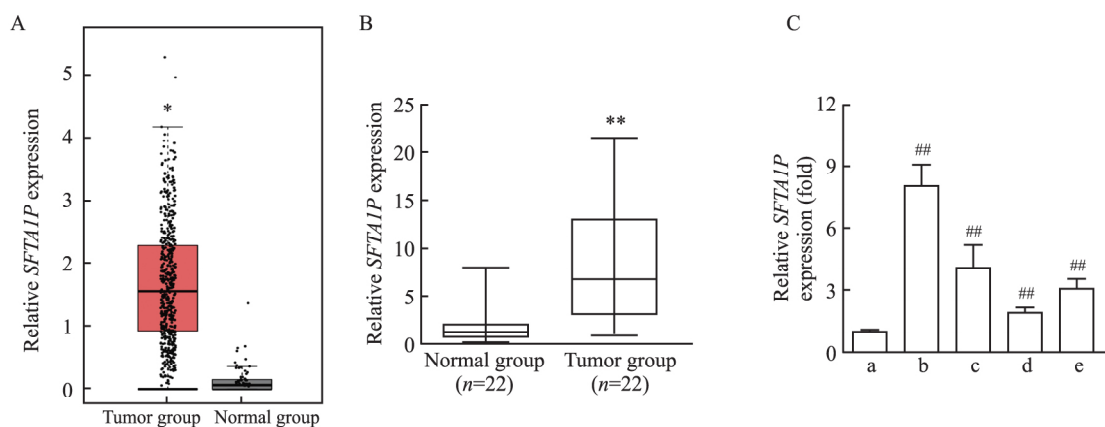
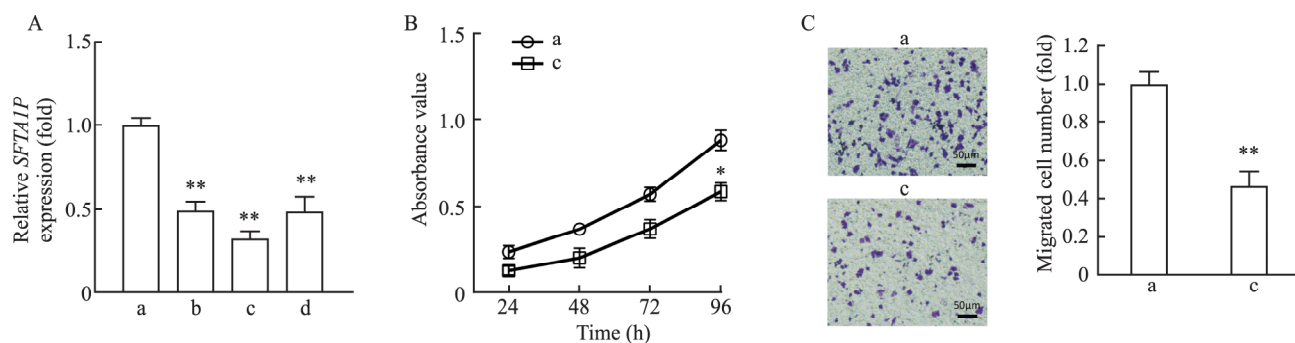


图 1 *SFTA1P* 在肾透明细胞癌组织与细胞系中的表达

Fig. 1 Expression of *SFTA1P* in ccRCC tissues and cell lines

A: Expression of *SFTA1P* in ccRCC tissues from the TCGA database; B: The level of *SFTA1P* in clinical ccRCC samples was verified by qPCR; C: Detection of *SFTA1P* expression in ccRCC cell lines through qPCR; a: HK-2 group; b: ACHN group; c: 786-O group; d: A498 group; e: SN12-PM6 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normal group; ## $P < 0.01$ vs HK-2 group.

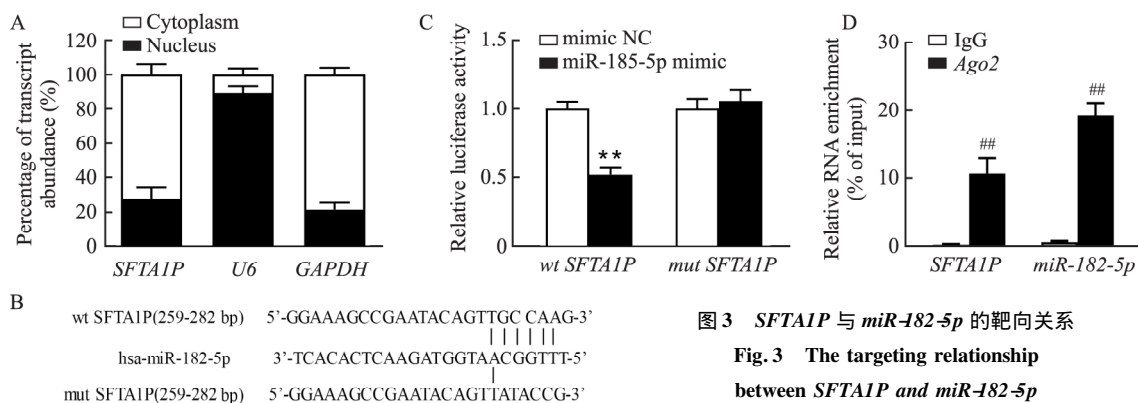
图2 *SFTA1P* 对 ACHN 细胞增殖与迁移的影响Fig. 2 *SFTA1P* affected the proliferation and migration of ACHN cells

A: Detection of *SFTA1P* siRNA interference efficiency using qPCR; B: Detection of cellular viability using CCK-8 assay; C: Detection of cell migration ability using Transwell migration assay in each group; a: si-Con group; b: si-SFTA1P #1 group; c: si-SFTA1P #2 group; d: si-SFTA1P #3 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs si-Con group.

2.3 *SFTA1P* 与 *miR-182-5p* 的靶向关系 亚细胞定位实验结果显示, *SFTA1P* 主要分布于 ACHN 细胞的细胞质中(图 3A), 提示 *SFTA1P* 可能在转录后层面参与基因的表达调控。生物信息学在线数据库 miRcode (<http://www.mircode.org/>) 分析显示, *SFTA1P* 与 *miR-182-5p* 具有互补序列(图 3B)。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 在 ACHN 细胞中 *miR-182-5p* mimic 降低了 wt *SFTA1P* 组的荧光素酶活性($t = 11.06$, $P < 0.01$), 而 mut *SFTA1P* 组的荧光素酶活性无显著变化(图 3C)。RIP 实验结果显示, 与 IgG 组相比, Ago2 组 ACHN 细胞中的 *SFTA1P* 或 *miR-182-5p* 富集量增加($t = 7.685$, 17.28 , 均 $P < 0.01$)(图 3D)。以上结果表明, 在 ccRCC 细胞中, *SFTA1P* 可靶向结合 *miR-182-5p*。

2.4 *miR-182-5p* 靶向 *FNI* 对 ccRCC 细胞增殖与迁移的影响 qPCR 与 Western blot 检测结果显示, 与 mimic NC 组比较, *miR-182-5p* mimic 组 ACHN 细

胞中 *FNI* mRNA 和蛋白表达降低($t = 6.783$, 9.464 , 均 $P < 0.01$); 与 anti-miR-Con 组相比, anti-miR-182-5p 组 ACHN 细胞中 *FNI* mRNA 和蛋白表达增加($t = 5.349$, 4.701 , 均 $P < 0.01$)(图 4A、B)。生物信息学在线数据库 starBase(<https://rnasysu.com/encori/index.php>) 分析显示, *miR-182-5p* 与 *FNI* 3'UTR 具有互补序列(图 4C)。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 在 ACHN 细胞中 *miR-182-5p* mimic 降低了 wt *FNI* 3'UTR 组的荧光素酶活性($t = 7.850$, $P < 0.01$), 而 mut *FNI* 3'UTR 组的荧光素酶活性无显著变化(图 4C)。CCK-8 实验结果显示, 相较于 anti-miR-Con 组, anti-miR-182-5p 组 ACHN 细胞在 48、72、96 h 的增殖活力均增强($t = 5.477$, 6.548 , 6.376 , 均 $P < 0.05$); 相较于 anti-miR-182-5p 组, anti-miR-182-5p 与 si-FNI 共转染组 ACHN 细胞在 48、72、96 h 的增殖活力均降低($t = 3.475$, 3.967 , 3.997 , 均 $P < 0.05$)(图 4D)。Transwell 细胞迁移实

图3 *SFTA1P* 与 *miR-182-5p* 的靶向关系Fig. 3 The targeting relationship between *SFTA1P* and *miR-182-5p*

A: Subcellular localization test; B: Binding sites between *SFTA1P* and *miR-182-5p* predicted using miRcode online database; C: The relationship between *SFTA1P* and *miR-182-5p* evaluated by dual luciferase gene reporter assay; D: The binding activity between *SFTA1P*, *miR-182-5p* and Ago2 was validated using RIP assay; ** $P < 0.01$ vs the mimic NC group; ## $P < 0.01$ vs IgG group.

验结果显示, 相较 anti-miR-Con 组, anti-miR-182-5p 组 ACHN 细胞的迁移能力增强 ($t = 6.997, P < 0.01$); 相较 anti-miR-182-5p 组, anti-miR-182-5p 与 si-FN1 共转染组 ACHN 细胞的迁移能力降低 ($t = 5.269, P < 0.01$) (图 4E)。上述结果表明, miR-182-5p 通过靶向调控 FN1 表达, 影响 ccRCC 细胞的增殖与迁移。

2.5 SFTA1P 调控 miR-182-5p/FN1 通路对 ccRCC 细胞增殖与迁移的影响 qPCR 与 Western blot 检测结果显示, 与 si-Con 组比较, si-SFTA1P #2 组 ACHN 细胞中 FN1 mRNA 和蛋白表达降低 ($t = 9.108, 9.460$, 均 $P < 0.01$) (图 5A、B)。CCK-8 实验结果显示, 相较 si-Con 与 anti-miR-Con 共转染组, si-SFTA1P #2 与 anti-miR-Con 共转染组 ACHN 细胞在 48、72、96 h 的增殖活力降低 ($t = 5.19、5.254、10.46$, 均 $P < 0.05$); 而相较 si-SFTA1P #2 与 anti-miR-Con 共转染组, si-SFTA1P #2 与 anti-miR-182-5p 共转染组 ACHN 细胞在 48、72、96 h 的增殖活力

增强 ($t = 5.877、4.279、5.786$, 均 $P < 0.05$) (图 5C)。Transwell 细胞迁移实验结果显示, si-SFTA1P #2 与 anti-miR-Con 共转染组 ACHN 细胞较 si-Con 与 anti-miR-Con 共转染组的迁移能力降低 ($t = 12.26, P < 0.01$); si-SFTA1P #2 与 anti-miR-182-5p 共转染组 ACHN 细胞较 si-SFTA1P #2 与 anti-miR-Con 共转染组的迁移能力增强 ($t = 5.874, P < 0.01$) (图 5D)。qPCR 与 Western blot 检测结果显示, si-SFTA1P #2 与 anti-miR-Con 共转染组 ACHN 细胞较 si-Con 与 anti-miR-Con 共转染组细胞中 FN1 mRNA 和蛋白表达降低 ($t = 17.15、12.08$, 均 $P < 0.01$); si-SFTA1P #2 与 anti-miR-182-5p 共转染组 ACHN 细胞较 si-SFTA1P #2 与 anti-miR-Con 共转染组细胞中 FN1 mRNA 和蛋白表达增加 ($t = 6.823、4.812$, 均 $P < 0.01$) (图 5E、F)。以上结果表明, SFTA1P 通过调控 miR-182-5p/FN1 通路促进 ccRCC 细胞的增殖与迁移。

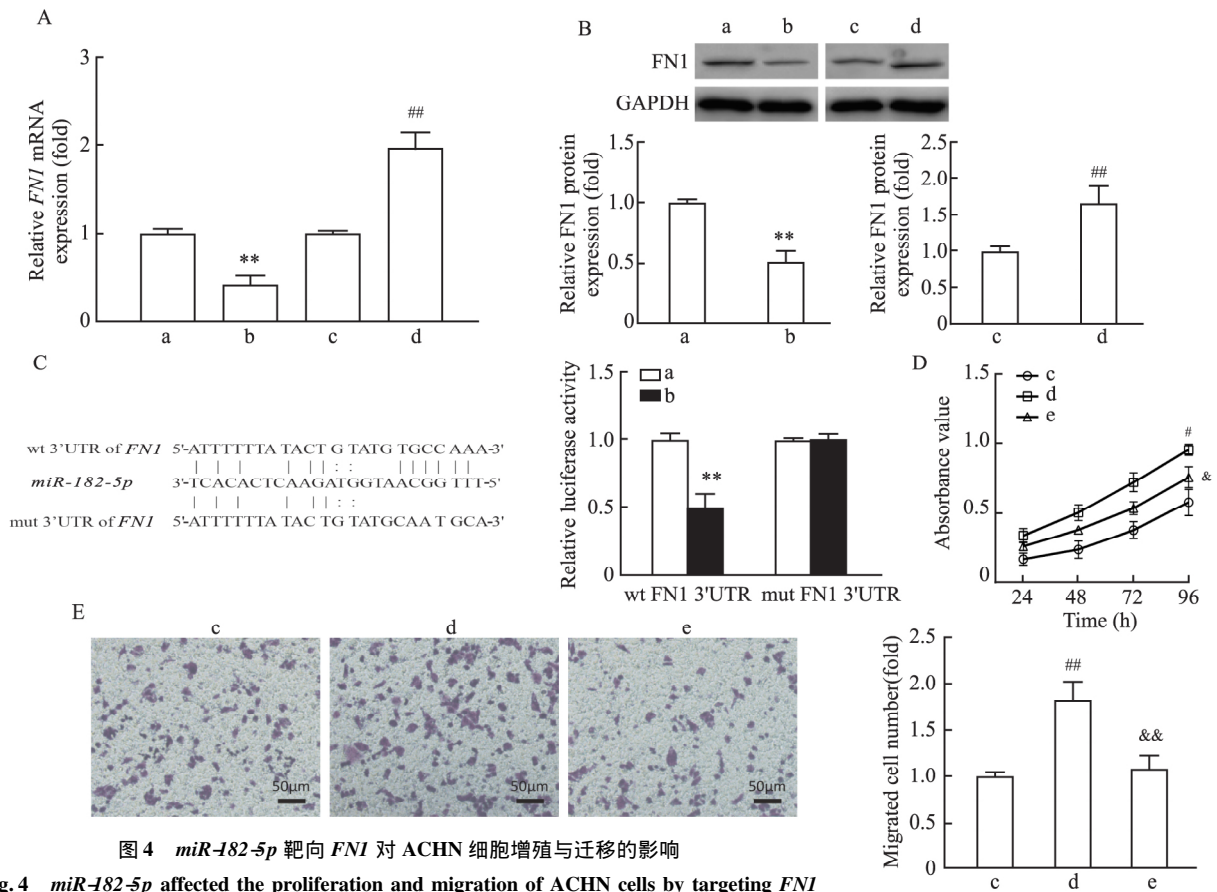


图4 miR-182-5p 靶向 FN1 对 ACHN 细胞增殖与迁移的影响

Fig.4 miR-182-5p affected the proliferation and migration of ACHN cells by targeting FN1

A: Detection of mRNA expression of FN1 using qPCR; B: Detection of FN1 protein expression using Western blot; C: Binding sites between miR-182-5p and FN1 3'UTR predicted using the starBase database, and the binding relationship between miR-182-5p and FN1 was evaluated by dual luciferase gene reporter assay; D: Detection of cellular proliferation using CCK-8 assay; E: Detection of cell migration using Transwell assay in each group $\times 100$; a: mimic NC group; b: miR-182-5p group; c: anti-miR-Con group; d: anti-miR-182-5p group; e: anti-miR-182-5p + si-FN1 group; ** $P < 0.01$ vs mimic NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs anti-miR-Con group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs anti-miR-182-5p group.

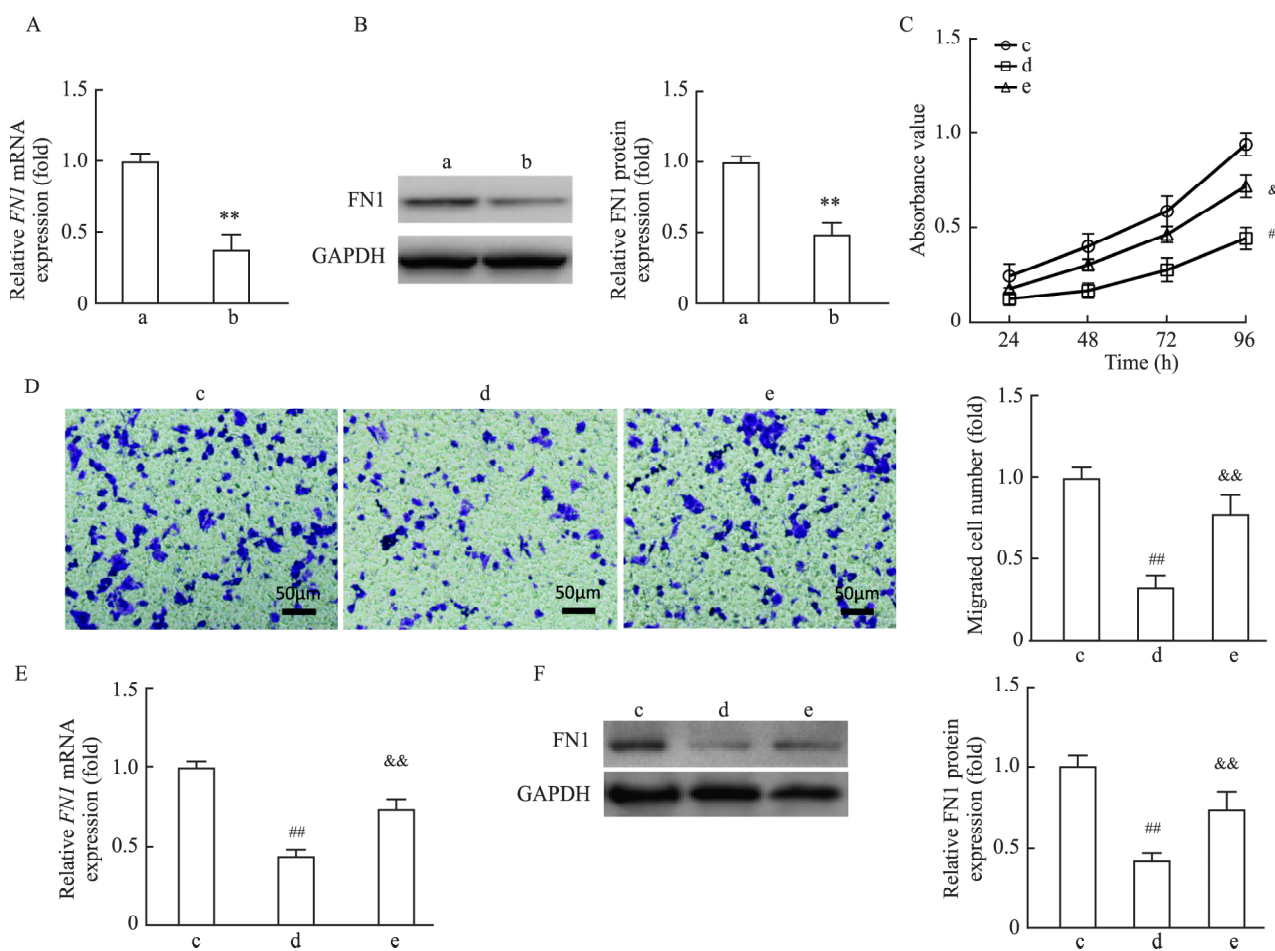


图5 *SFTA1P* 调控 *miR-182-5p*/*FN1* 通路对 *ACHN* 细胞增殖与迁移的影响

Fig. 5 The effect of *SFTA1P* on *ACHN* cell proliferation and migration was mediated through the regulation of the *miR-182-5p*/*FN1* pathway

A, E: Expression level of *FN1* was measured in groups by qPCR; B, F: Detection of *FN1* protein expression in groups using Western blot; C: Detection of cellular proliferation using CCK-8 assay; D: Detection of cell migration ability using Transwell assay in each group $\times 100$; a: si-Con group; b: si-*SFTA1P* #2 group; c: si-Con + anti-*miR*-Con group; d: si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR*-Con group; e: si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR-182-5p* group; ** $P < 0.01$ vs si-Con group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs si-Con + anti-*miR*-Con group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR*-Con group.

3 讨论

近年来, lncRNA 因其在细胞生物学功能调控中的重要作用受到人们的广泛关注^[3]。有报道指出, lncRNA 与多种人类肿瘤如乳腺癌、骨髓瘤、白血病、胰腺癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、ccRCC 等的生物学进展密切相关^[8-9]。此前的研究^[4-7, 10]表明, lncRNA *SFTA1P* 在非小细胞肺癌、肝癌、宫颈癌中高表达, 而在胃癌、肺鳞状细胞癌中低表达。本研究显示, *SFTA1P* 在 ccRCC 组织及细胞系中高表达, 而下调 *SFTA1P* 表达可显著抑制 ccRCC 细胞的增殖与迁移, 表明 *SFTA1P* 在 ccRCC 中发挥癌基因的作用。

有报道指出, lncRNA 的功能与其亚细胞定位密切相关^[11]。在亚细胞定位实验里, *SFTA1P* 被发现主要分布于 ccRCC 细胞的细胞质中。而作为 miR-

NA 分子“海绵”是许多细胞质分布 lncRNA 发挥作用的一种重要作用方式^[12]。据此, 本研究在生物信息学软件预测的基础上, 通过双荧光素酶报告基因实验和 RIP 实验证实 *SFTA1P* 在 ccRCC 细胞中可作为分子“海绵”结合 *miR-182-5p*, 并发挥潜在的调控作用。针对 *miR-182-5p*, 已有研究^[13]证实其在 ccRCC 中低表达, 并通过调控下游靶基因或相关信号通路而发挥抑癌作用。为进一步探索 *miR-182-5p* 的功能并鉴定其下游靶基因, 本研究通过生物软件预测、qPCR 及 Western blot 检测, 发现 *miR-182-5p* 可负性调控 *FN1* 的 mRNA 及蛋白表达, 提示 *FN1* 很可能是 *miR-182-5p* 的靶基因。基于此, 本研究继续深入探索了 *miR-182-5p* 调控 *FN1* 表达的作用机制。一般而言, 通过与靶基因 mRNA 的 3'UTR 区结合从而调控靶基因的表达是 miRNA 发挥作用的一

种经典调控方式^[3]。针对 *miR-182-5p* 与 *FN1* 的潜在结合位点,本研究设计并构建了包含野生型或突变型结合位点的 *FN1* 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体,双荧光素酶报告基因实验表明 *miR-182-5p* 可靶向结合 *FN1* 3'UTR,进一步证实 *FN1* 是 *miR-182-5p* 的直接靶基因。

FN1 是纤连蛋白家族成员之一,其作为糖蛋白参与了细胞外基质的组成,从而在介导细胞外基质重塑、细胞黏附、迁移及信号转导等方面起着至关重要的作用^[14]。有研究指出,*FN1* 在多种人类肿瘤中高表达,发挥促瘤效应并驱动肿瘤的恶性生物学进展^[14-15]。在肝癌中,肿瘤相关巨噬细胞和成纤维细胞来源的 *FN1* 可通过 JUN 途径促进肝癌细胞转移^[16]。在 ccRCC 中,*FN1* 被发现高表达,并与肿瘤的进展与预后密切相关^[17]。此外,Zhang et al^[15] 发现 *FN1* 介导了 circ_0101692/*miR-384* 通路对 ccRCC 细胞恶性生物学进展的调控过程,在此过程中 *FN1* 扮演癌基因的角色。本研究中,细胞功能实验显示下调 *FN1* 可部分逆转沉默 *miR-182-5p* 对 ccRCC 细胞增殖与迁移的促进作用,研究证实了 *miR-182-5p* 通过靶向调控 *FN1* 表达从而促进 ccRCC 细胞的增殖与迁移。此外,本研究显示下调 *miR-182-5p* 可部分逆转沉默 *SFTA1P* 对 ccRCC 细胞增殖与迁移的抑制效应,而 *FN1* 表达亦受到类似的影响。这些证据更进一步证实了 *SFTA1P* 调控 *miR-182-5p*/*FN1* 通路在促进 ccRCC 细胞生物学进展中发挥重要作用。

综上所述,*SFTA1P* 在 ccRCC 中高表达,其作为分子“海绵”可特异性结合 *miR-182-5p*,并进一步调控 *miR-182-5p*/*FN1* 通路,从而促进 ccRCC 细胞的增殖与迁移。后续可通过动物实验和扩大临床样本的研究,进一步探索 *SFTA1P* 调控 *miR-182-5p*/*FN1* 通路的深层机制及其潜在分子靶标,以期为 ccRCC 的分子靶向治疗提供新的研究参考。

参考文献

- [1] Young M, Jackson-Spence F, Beltran L, et al. Renal cell carcinoma [J]. Lancet. 2024, 404(10451): 476–91. doi: 10.1016/S0140-6736(24)00917-6.
- [2] 胡庆庆,刘浩然,王建忠. SETD2 在肾透明细胞癌中的表达及对患者预后的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(6): 925–31. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.015.
- [2] Hu Q Q, Liu H R, Wang J Z. The expression of SETD2 in ccRCC and its effect on prognosis of patients [J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(6): 925–31. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.015.
- [3] Mattick J S, Amaral P P, Carninci P, et al. Long non-coding RNAs: Definitions, functions, challenges and recommendations [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(6): 430–47. doi: 10.1038/s41580-022-00566-8.
- [4] Ma H, Ma T, Chen M, et al. The pseudogene-derived long non-coding RNA SFTA1P suppresses cell proliferation, migration, and invasion in gastric cancer [J]. Biosci Rep, 2018, 38(2): BSR20171193. doi: 10.1042/BSR20171193.
- [5] Zhu B, Finch-Edmondson M, Leong K W, et al. LncRNA SFTA1P mediates positive feedback regulation of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 369. doi: 10.1038/s41420-021-00761-0.
- [6] Huang G, Yang Y, Lv M, et al. Novel lncRNA SFTA1P promotes tumor growth by down-regulating miR-4766-5p via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 9759–70. doi: 10.2147/OTT.S248660.
- [7] Luo A, Lan X, Qiu Q, et al. LncRNA SFTA1P promotes cervical cancer progression by interaction with PTBP1 to facilitate TPM4 mRNA degradation [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(11): 936. doi: 10.1038/s41419-022-05359-7.
- [8] Goyal B, Yadav S R M, Awasthee N, et al. Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of long non-coding RNA MALAT1 in cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1875(2): 188502. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188502.
- [9] 向威,吕磊,郑福鑫,等. SLC9A3-AS1 调控 miR-148a-3p/ROCK1 信号轴影响肾癌细胞生物学功能[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2024, 53(2): 161–7. doi: 10.3870/j.issn.1672-0741.23.12.014.
- [9] Xiang W, Lv L, Zheng F X, et al. SLC9A3-AS1 regulates miR-148a-3p/ROCK1 axis to affect biological function of renal carcinoma cells [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2024, 53(2): 161–7. doi: 10.3870/j.issn.1672-0741.23.12.014.
- [10] Zhang W, Bai M, Liu K, et al. LncRNA surfactant associated 1 activates large tumor suppressor kinase 1/Yes-associated protein pathway via modulating hypoxic exosome-delivered miR-4766-5p to inhibit lung adenocarcinoma metastasis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2022, 153: 106317. doi: 10.1016/j.biocel.2022.106317.
- [11] Bridges M C, Daulagala A C, Kourtidis A. LNCation: LncRNA localization and function [J]. J Cell Biol, 2021, 220(2): e202009045. doi: 10.1083/jcb.202009045.
- [12] Alkan A H, Akgül B. Endogenous miRNA sponges [M]//Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2021: 91–104. doi: 10.1007/978-1-0716-1170-8_5.
- [13] Wu Y, Zhang C, Peng D, et al. miR-182-5p inhibits the tumorigenesis of clear cell renal cell carcinoma by repressing UBE2T [J]. Hum Cell, 2022, 35(2): 542–56. doi: 10.1007/s13577-021-00661-6.
- [14] Efthymiou G, Saint A, Ruff M, et al. Shaping up the tumor microenvironment with cellular fibronectin [J]. Front Oncol, 2020, 10: 641. doi: 10.3389/fonc.2020.00641.
- [15] Zhang H, Ma M. Circ_0101692 knockdown retards the development of clear cell renal cell carcinoma through miR-384/*FN1* path-

- way [J]. *Transl Oncol*, 2023, 28: 101612. doi: 10.1016/j.tranon.2022.101612.
- [16] Zhang L, Zhang C, Xing Z, et al. Fibronectin 1 derived from tumor-associated macrophages and fibroblasts promotes metastasis through the JUN pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113 (Pt A): 109420. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109420.
- [17] Dong Y, Ma W M, Yang W, et al. Identification of C3 and FN1 as potential biomarkers associated with progression and prognosis for clear cell renal cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21 (1): 1135. doi: 10.1186/s12885-021-08818-0.

LncRNA *SFTA1P* modulates the *miR-182-5p/FN1* pathway to promote the proliferation and migration of clear cell renal carcinoma cells

Xiang Wei, Lv Lei, Zheng Fuxin, Yuan Jingdong

(Dept of Urology, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022)

Abstract Objective To explore the molecular mechanism by which long non-coding RNA Surfactant Associated 1 Pseudogene (*SFTA1P*) promotes the proliferation and migration of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) cells by regulating the microRNA-182-5p (*miR-182-5p*) /fibronectin 1 (*FN1*) pathway. **Methods** GEPIA2 software was utilized to analyze the expression of *SFTA1P* in ccRCC tissues from the TCGA database. Quantitative real-time PCR (qPCR) was employed to detect the expression of *SFTA1P* in ccRCC tissues, normal kidney tissues and ccRCC cell lines. A subcellular localization experiment was performed to explore the localization of *SFTA1P* within the human renal cell adenocarcinoma cell line (ACHN) derived from ccRCC. ACHN cells were then divided into the following groups: si-Con group, si-*SFTA1P* #2 group, mimic NC group, *miR-182-5p* mimic group, anti-*miR-Con* group, anti-*miR-182-5p* group, anti-*miR-182-5p* + si-*FN1* group, si-Con + anti-*miR-Con* group, si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR-Con* group, and si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR-182-5p* group. CCK-8 and Transwell chamber experiments were conducted to assess cell proliferation and migration abilities. qPCR, Western blot, and dual-luciferase reporter assays were employed to elucidate the regulatory interactions among *SFTA1P*, *miR-182-5p*, and *FN1*. **Results** Analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) database indicated that *SFTA1P* was overexpressed in ccRCC tissues ($P < 0.05$). When compared to normal kidney tissues, *SFTA1P* expression was markedly elevated in ccRCC tissues ($P < 0.01$). Furthermore, the expression levels of *SFTA1P* in ccRCC cell lines 786-O, SN12-PM6, ACHN, and A498 were significantly higher than those in human renal proximal tubule cells (HK-2) (all $P < 0.01$). Subcellular localization experiments revealed that *SFTA1P* predominantly localized in the cytoplasm of ACHN cells. Compared to the si-Con group, the si-*SFTA1P* #2 group exhibited a significant reduction in proliferation and migration abilities of ACHN cells, accompanied by a decrease in *FN1* mRNA and protein expression ($P < 0.05$). Compared to the mimic NC group, the expression of *FN1* mRNA and protein in ACHN cells in the *miR-182-5p* mimic group reduced ($P < 0.01$). In comparison to the anti-*miR-Con* group, the expression levels of *FN1* mRNA and protein in ACHN cells were significantly elevated in the anti-*miR-182-5p* group. Additionally, there was a significant enhancement in both cell proliferation and migration capabilities ($P < 0.05$). Conversely, the proliferation and migration abilities of ACHN cells in the anti-*miR-182-5p* + si-*FN1* group were significantly reduced compared to the anti-*miR-182-5p* group ($P < 0.05$). Furthermore, relative to the si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR-Con* group, the ACHN cells in the si-*SFTA1P* #2 + anti-*miR-182-5p* group demonstrated increased proliferation and migration abilities, along with elevated *FN1* mRNA and protein expression levels ($P < 0.05$). **Conclusion** *SFTA1P* exhibits elevated expression levels in ccRCC and facilitates the proliferation and migration of ccRCC cells through the modulation of the *miR-182-5p/FN1* signaling pathway.

Key words clear cell renal cell carcinoma; *SFTA1P*; *miR-182-5p*; *FN1*; proliferation; migration

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81502204); Scientific Research Project of Hubei Health Commission (No. WJ2021Q001)

Corresponding author Yuan Jingdong, E-mail: jingdongyuan97@hotmail.com