

DOI:10.13267/j.cnki.syzlzz.2022.052

· 基础研究 ·

lncRNA MALAT1 调控 miR-144-3p/ZEB1 对肺癌放射敏感性的影响

钟淙, 石琴, 章超

诸暨市中心医院放射科, 浙江 诸暨 311800

通信作者: 钟淙, E-mail: zchong833@163.com

摘要: 目的 探讨长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 调控 miR-144-3p/E 盒结合锌指蛋白 1 (zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1) 对肺癌放射敏感性的影响。方法 采用 RT-qPCR 检测人正常肺 HBE 细胞和肺癌 A549 细胞中 MALAT1 及 miR-144-3p 的表达情况。将 A549 细胞分别设置为 A549 组 (不进行处理)、放射组 (6 MV X 线垂直照射)、MALAT1 沉默对照组 (转染阴性对照慢病毒)、MALAT1 沉默组 (转染 sh-MALAT1 慢病毒)、过表达对照组 (转染过表达对照慢病毒)、miR-144-3p 过表达组 (转染 miR-144-3p 模拟物)、MALAT1 沉默 + 沉默对照组 (sh-MALAT1 慢病毒与沉默对照慢病毒共转染) 和 MALAT1 沉默 + miR-144-3p 沉默组 (sh-MALAT1 慢病毒与 miR-144-3p 抑制剂共转染), 经不同剂量 (0、2、4、6 和 8 Gy) 放射处理, 培养 48 h, 集落形成实验测定细胞放射敏感性。以 4 Gy 放射剂量处理各组细胞, 培养 48 h, MTT 法检测各组 A549 细胞增殖情况, 流式细胞仪检测 A549 细胞凋亡情况, 双荧光素酶报告基因检测 MALAT1、miR-144-3p 和 ZEB1 三者的靶向关系, Western blot 检测 ZEB1 以及增殖和凋亡相关蛋白表达情况。结果 与 HBE 细胞比较, A549 细胞中 MALAT1 表达水平增加, 而 miR-144-3p 表达水平降低 (均 $P < 0.05$)。抑制 MALAT1 或 miR-144-3p 过表达均增加 A549 细胞放射敏感性, 抑制细胞增殖及 c-Myc 表达, 促进细胞凋亡及 caspase-3 和 Bax 表达 (均 $P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因显示, MALAT1 与 miR-144-3p 存在靶向关系, miR-144-3p 与 ZEB1 存在靶向关系。miR-144-3p 抑制剂可逆转 sh-MALAT1 对细胞增殖、凋亡和放射敏感性的影响 (均 $P < 0.05$)。结论 lncRNA MALAT1 沉默通过促进 miR-144-3p/ZEB1 轴增强肺癌细胞的放射敏感性。

关键词: 肺癌; 长链非编码 RNA; 肺腺癌转移相关转录本 1; miR-144-3p; E 盒结合锌指蛋白 1; 放射敏感性

Effect of lncRNA MALAT1 regulating miR-144-3p/ZEB1 on radiosensitivity of lung cancer

Zhong Cong, Shi Qin, Zhang Chao

Department of Radiology, Zhuji Central Hospital, Zhuji 311800, China

Corresponding to: Zhong Cong, E-mail: zchong833@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA) metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) regulating miR-144-3p/zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) on the radiosensitivity of lung cancer. **Methods** The expression of MALAT1 and miR-144-3p in human normal lung HBE cells and lung cancer A549 cells were detected by RT-qPCR. A549 cells were set as the A549 group (no treatment), radiation group (6 MV X-ray vertical irradiation), MALAT1 silencing control group (transfection of negative control lentivirus), MALAT1 silencing group (transfection of sh-MALAT1 lentivirus), overexpression control group (transfection of overexpression control lentivirus), miR-144-3p overexpression group (transfection of miR-144-3p mimic), MALAT1 silencing + silencing control group (co-transfection of sh-MALAT1 lentivirus with silencing control lentivirus), and MALAT1 silencing + miR-144-3p silencing group (co-transfection of sh-MALAT1 lentivirus with miR-144-3p inhibitor), and were treated with different doses of radiation (0, 2, 4, 6, and 8 Gy) for 48 h. Colony formation assay was used to determine the radiosensitivity of cells. Cells in each group were treated with 4 Gy radiation and cultured for 48 h. MTT assay was used to detect the proliferation of A549 cells, and flow cytometry was used to detect the apoptosis of A549 cells. Dual-luciferase reporter genes were used to detect the targeting relationship among MALAT1, miR-144-3p and ZEB1. Western blot was used to detect the expression of ZEB1, and proliferation- and apoptosis-related proteins. **Results** Compared with HBE cells, the expression level of MALAT1 in A549 cells was significantly increased, while the expression level of

miR-144-3p was significantly decreased (both $P < 0.05$); inhibition of MALAT1 or overexpression of miR-144-3p increased radiosensitivity, inhibited cell proliferation and the expression of c-Myc, promoted cell apoptosis and the expression of caspase-3 and Bax (all $P < 0.05$). Dual luciferase reporter gene showed that MALAT1 was targeted to miR-144-3p, and miR-144-3p was targeted to ZEB1; miR-144-3p inhibitor could reverse the effects of sh-MALAT1 on cell proliferation, apoptosis and radiosensitivity (all $P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA MALAT1 silencing enhances the radiosensitivity of lung cancer cells by promoting miR-144-3p/ZEB1 axis.

Key words: lung cancer; long non-coding RNA; metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1; miR-144-3p; zinc finger E-box binding homeobox 1; radiosensitivity

肺癌是世界上与癌症相关死亡的第二大原因, 生存率低。放疗是肺癌的有效治疗方法, 但是其存在癌细胞的抗辐射性以及无差别攻击周围正常细胞的缺陷, 因此加强癌细胞的放射敏感性势在必行^[1-2]。非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 不仅能够通过调节基因表达来参与癌症的发生和侵袭, 还在癌细胞的放射敏感性方面及保护正常细胞免受辐射不良反应中起重要作用^[3-4]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 等多种 lncRNA 涉及对放疗的反应^[2]。除此之外, 包括 miR-144-3p 在内的多种 miRNA 能够赋予癌细胞放射增敏作用。miR-144-3p 通过抑制 E 盒结合锌指蛋白 1 (zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1) 表达提高胃癌细胞放射敏感性^[5-6]。MALAT1 在癌细胞放射敏感性中的作用是否与 miR-144-3p/ZEB1 相关还未可知, 因此本研究对其是否可通过调控 miR-144-3p/ZEB1 影响肺癌细胞放射敏感性进行探究, 以期能为肺癌放疗应用提供理论依据, 为加强肺癌细胞放射敏感性的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

肺癌 A549 细胞和 pmirGLO 质粒购自武汉益普生物科技有限公司。人正常肺 HBE 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent 购自美国赛默飞世尔科技。即用型荧光定量 PCR 试剂盒购自上海炬雅生物科技有限公司。总 RNA 提取试剂盒购自上海吉至生化科技有限公司。QIAGEN 反转录试剂盒购自上海科敏生物科技有限公司。青霉素-链霉素购自上海联迈生物工程有限公司。胰酶溶液购自武汉博士德生物工程有限公司。胎牛血清和 DMEM 培养液购自武汉益普生物科技有限公司。Annexin V-FITC/PI

Apoptosis Detection 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。阴性对照慢病毒、sh-MALAT1 慢病毒、过表达对照慢病毒、miR-144-3p 模拟物、沉默对照慢病毒、miR-144-3p 抑制剂由广州基迪奥生物公司合成; 兔抗人 ZEB1、caspase-3 和 Bax 抗体购自美国 Cell Signaling Technology。兔抗人 c-Myc 和 β -actin 抗体购自上海 Abcam; MTT 检测试剂盒、BCA 蛋白检测试剂盒和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗抗体购自北京百奥莱博科技有限公司。蛋白提取试剂盒购自武汉纯度生物科技有限公司。双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司。

Bio-Rad 伯乐荧光定量 PCR 仪 CFX Connect 购自南京贝登医疗股份有限公司。蛋白凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。CytoFLEX 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞与培养 A549 及 HBE 细胞接种到 DMEM 培养液中后均置于 37℃ 5%CO₂ 恒温培养箱中培养。培养液 2 d 更换 1 次, 细胞融合至 80% 左右时用胰酶消化进行传代培养。

1.2.2 A549 细胞瞬时转染 将 A549 细胞分为 A549 组 (不进行处理)、放射组 (6 MV X 线垂直照射)、MALAT1 沉默对照组 (转染阴性对照慢病毒)、MALAT1 沉默组 (转染 sh-MALAT1 慢病毒)、过表达对照组 (转染过表达对照慢病毒)、miR-144-3p 过表达组 (转染 miR-144-3p 模拟物)、MALAT1 沉默 + 沉默对照组 (sh-MALAT1 慢病毒与沉默对照慢病毒共转染) 和 MALAT1 沉默 + miR-144-3p 沉默组 (sh-MALAT1 慢病毒与 miR-144-3p 抑制剂共转染), 取 1 mL 对数生长期 A549 细胞以 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 每组设置 6 个复孔, 细胞贴壁后, 按 Lipofectamine™ 2000 说明书分别进行相应转染, 培养 48 h 后进行后续实验。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 MALAT1 及 miR-144-3p 的表达 miR-144-3p 及 MALAT1 通过 RNA 提取试剂盒提取其在细胞内的总 RNA 并反转录为 cDNA 后进行 RT-qPCR 检测二者表达水平 ($n=5$)。分别用 U6 和 GAPDH 为内参对 miR-144-3p 及 MALAT1 进行标准化, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析其表达水平。使用 Oligo 7 和 Primer 3.0 软件设计两者引物并送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。miR-144-3p 上游引物为 5'-AGAATCGCTTGAAC CCAGGA-3', 下游引物为 5'-AACAGGGAGAAGTGAGAGGC-3'。MALAT1 上游引物为 5'-AAAGCAAGGTCTCCCCACAAG-3', 下游引物为 5'-GGTCTGTGCTAGATCAAAAGGCA-3'。U6 上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。GAPDH 上游引物为 5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3', 下游引物为 5'-TGGACTCCACGACGTACT-3'。

1.2.4 集落形成实验测定细胞放射敏感性 取 1.2.2 中各组细胞, 进行 6 MV X 线垂直照射(剂量率为 3 Gy/min, 剂量为 0、2、4、6 和 8 Gy), 培养 48 h, A549 细胞经 15 min 甲醇固定, 吉姆萨染色 30 min 后计数细胞集落数 ($n=3$); 集落形成率 (plating efficiency, PE; %) = 集落数 / 接种数 $\times 100\%$; 存活分数 (survival fraction, SF) = (PE_{处理组} / PE_{对照组}) $\times 100\%$; 单击多靶模型对 A549 细胞存活曲线拟合, 计数放射生物学参数以及放射增敏比 (sensitizer enhancement ratio, SER) = 对照组 D_0 值 / 处理组 D_0 值; $SF=1-(1-e^{-D/D_0}) \times N$, $D_q=D_0 \times \ln N$, (D : 辐射剂量; D_0 : 平均致死剂量, 用于反映细胞对射线的敏感性; D_q : 准域剂量, 用于表示细胞亚致死性损伤修复能力; N : 外推数, 用于反映细胞内含有的放射敏感区域数或靶数)^[7]。

1.2.5 MTT 法检测细胞活力 选取 4 Gy 为最佳照射剂量分别处理 1.2.2 中各组细胞 (A549 组细胞不接受放射线照射) 后, 1×10^5 个 / 孔, 重复 5 孔, 每孔 100 μ L, 在 96 孔板中培养至对数生长期 (分别处理后培养 24 h)。添加 MTT 10 μ L / 孔 (5 g/L), 4 h 后弃上清培养液加入 DMSO 100 μ L, 震荡至 MTT 反应结晶充分溶解后, 在 570 nm 处测定吸光度 (absorbance, A) 值, 计算 A549 细胞存活率: ($A_{处理组} / A_{对照组}$) $\times 100\%$ 。

1.2.6 流式细胞仪检测 A549 细胞凋亡情况 将 4 Gy 照射剂量处理后的 1.2.2 中各组细胞 (A549 组细胞不接受放射线照射) 进行 PBS 洗涤, 胰酶消

化后, 调整细胞浓度为 1×10^6 个 / 孔加入 Annexin V-FITC 避光孵育 15 min 后, 流式仪观察 A549 细胞凋亡率 ($n=5$)。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测 MALAT1、miR-144-3p 和 ZEB1 的靶向关系 通过 TargetScan (<http://www.Targetscan.org/>) 确定 miR-144-3p 和 MALAT1 以及 miR-144-3p 和 ZEB1 结合位点, 分别验证二者的靶向关系。首先将与 miR-144-3p 靶向序列相结合的 MALAT1 和 ZEB1 的 3'-UTR 片段经扩增、酶切和连接后构建野生型和突变型 MALAT1 和 ZEB1 载体: pmirGLO-MALAT1-wt、pmirGLO-MALAT1-mut、pmirGLO-ZEB1-wt 和 pmirGLO-ZEB1-mut。将接种于 96 孔板的对数生长期 A549 细胞分为 pmirGLO-MALAT1-wt+miR-144-3p 过表达组、pmirGLO-MALAT1-wt+ 过表达对照组、pmirGLO-MALAT1-mut+miR-144-3p 过表达组、pmirGLO-MALAT1-mut+ 过表达对照组、pmirGLO-ZEB1-wt+miR-144-3p 过表达组、pmirGLO-ZEB1-wt+ 过表达对照组、pmirGLO-ZEB1-mut+miR-144-3p 过表达组和 pmirGLO-ZEB1-mut+ 过表达对照组。根据 Lipofectamine™ 2000 说明书分别进行相应转染 48 h 后检测荧光素酶活性: 加入 200 μ L 报告基因细胞裂解液及 50 μ L 荧光素酶反应液检测荧光强度 A 后再加入反应终止液检测荧光强度 B, 荧光素酶相对活性则为 A/B。

1.2.8 Western blot 检测 ZEB1 蛋白以及增殖和凋亡相关蛋白表达情况 使用 RIPA 裂解液对 A549 细胞进行裂解后, 用 BCA 蛋白试剂盒测定各组细胞总蛋白含量; SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 低温转至 PVDF 膜上, 脱脂奶粉进行为时 1 h 的封闭, 加入兔抗 ZEB1、caspase-3、Bax、c-Myc 和 β -actin 一抗孵育 (4 $^{\circ}$ C) 过夜后再用二抗孵育 2 h, 蛋白凝胶成像仪定量分析各蛋白含量 ($n=5$)。

1.3 统计学分析

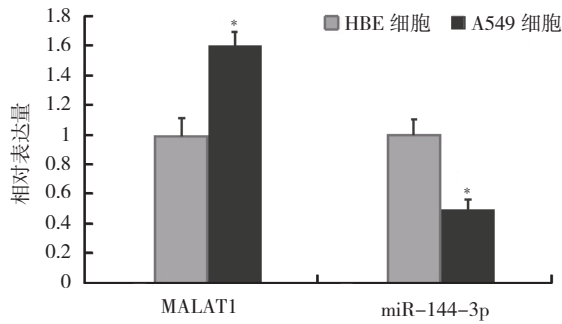
采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。图形采用 Origin 软件进行制作。

2 结果

2.1 MALAT1 和 miR-144-3p 在 A549 及 HBE 细胞中的表达情况

与 HBE 细胞比较, A549 细胞中 MALAT1

表达水平增加，而 miR-144-3p 表达水平降低 ($P<0.05$ ，图 1)。



注 * 与 HBE 细胞比较, $P<0.05$

图 1 MALAT1 和 miR-144-3p 在 A549 及 HBE 细胞中的表达情况

Fig. 1 Expression of MALAT1 and miR-144-3p in A549 and HBE cells

2.2 沉默 MALAT1 和过表达 miR-144-3p 对 A549 细胞放射敏感性的影响

随着放射剂量的增加, 各组细胞 PE 均逐渐降低。与 A549 组比较, MALAT1 沉默组以及 miR-144-3p 过表达组细胞在 2、4、6 和 8 Gy 放射剂量时 PE 均降低 (均 $P<0.05$)。单击多靶模型显示, MALAT1 沉默组与 miR-144-3p 过表达组 SER 分别为 1.762 和 1.992, 提示 MALAT1 沉默表达以及 miR-144-3p 过表达均对 A549 细胞具有放射增敏作用 (表 1, 图 2)。

2.3 MALAT1 和 miR-144-3p 与放射对 A549 细胞增殖和凋亡的影响

与 A549 组比较, 放射组 A549 细胞存活率和 c-Myc 表达均降低, 而凋亡率、caspase-3 和 Bax 表达均增加 (均 $P<0.05$)。与放射组比较, MALAT1 沉默组和 miR-144-3p 过表达组细胞存活率和 c-Myc 表达均降低, 凋亡率、caspase-3 和 Bax 表达均增加 (均 $P<0.05$, 表 2, 图 3~4)。

表 1 沉默 MALAT1 和过表达 miR-144-3p 后的单击多靶模型参数值

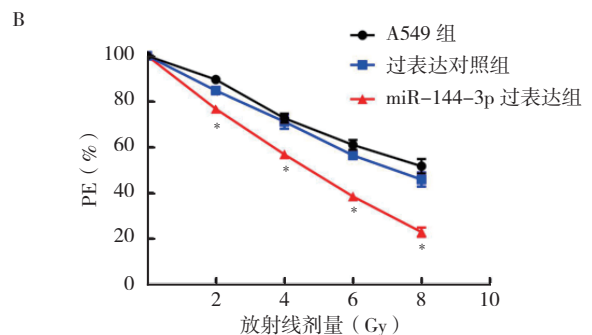
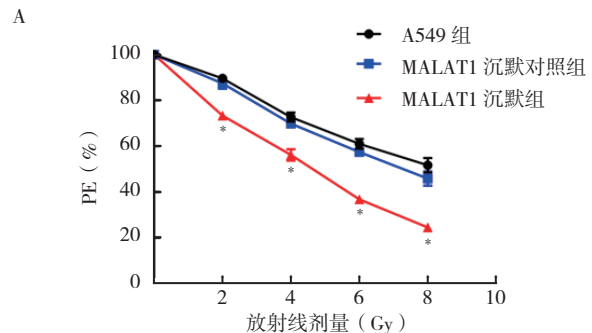
Table 1 Parameter values of single-click multi-target model after silencing MALAT1 and overexpressing miR-144-3p

组别	D_0 (Gy)	D_q (Gy)	N	SER
A549 组	9.233	2.401	1.297	-
MALAT1 沉默对照组	7.981	2.288	1.332	1.157
MALAT1 沉默组	5.241	1.006	1.212	1.762
过表达对照组	8.598	1.745	1.225	1.074
miR-144-3p 过表达组	4.636	1.758	1.461	1.992

注 D_0 : 平均致死剂量; D_q : 准域剂量; N: 外推数; SER: 放射增敏比 (sensitizer enhancement ratio)

2.4 MALAT1 和 miR-144-3p 间的靶向关系

通过 TargetScan (<http://www.Targetscan.org/>) 预测显示, MALAT1 和 miR-144-3p 间具有结合位点, miR-144-3p 是 MALAT1 的潜在靶基因 (图 5)。荧光素酶报告基因结果显示, 与 pmirGLO-MALAT1-wt+ 过表达对照组比较, pmirGLO-MALAT1-wt+miR-144-3p 过表达组荧光素酶活性降低, 其余荧光素酶活性无明显变化 (图 6)。与



注 A: MALAT1 沉默对 A549 细胞放射敏感性的影响; B: miR-144-3p 过表达对 A549 细胞放射敏感性的影响; * 与 A549 组比较, $P<0.05$; PE: 集落形成率 (plating efficiency)

图 2 沉默 MALAT1 和过表达 miR-144-3p 对 A549 细胞放射敏感性的影响

Fig. 2 Effect of silencing MALAT1 and overexpressing miR-144-3p on the radiosensitivity of A549 cells

表 2 沉默 MALAT1、过表达 miR-144-3p 与放射对 A549 细胞增殖和凋亡的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 Effects of silencing MALAT1, overexpressing miR-144-3p and radiation on the proliferation and apoptosis of A549 cells ($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	细胞存活率	细胞凋亡率
A549 组	100	2.37 ± 0.51
放射组	58.74 ± 4.30*	27.55 ± 2.15*
MALAT1 沉默对照组	58.30 ± 4.12	27.13 ± 3.24
MALAT1 沉默组	41.15 ± 3.15#	38.17 ± 3.45#
过表达对照组	59.03 ± 5.11	26.97 ± 2.22
miR-144-3p 过表达组	45.46 ± 4.52#	39.75 ± 3.40#

注 * 与 A549 组比较, $P<0.05$; # 与放射组比较, $P<0.05$

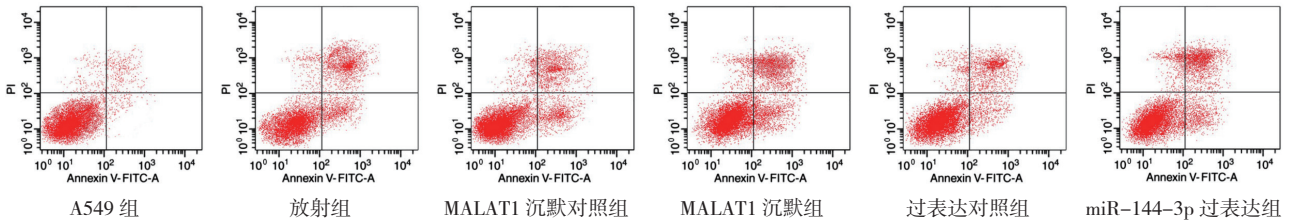
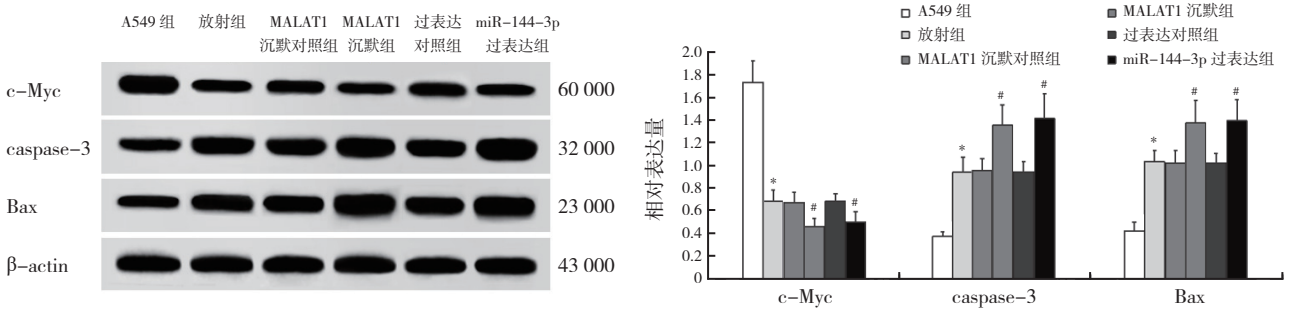


图 3 沉默 MALAT1、过表达 miR-144-3p 与放射对 A549 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effects of silencing MALAT1, overexpressing miR-144-3p and radiation on A549 cell apoptosis



注 * 与 A549 组比较, $P < 0.05$; # 与放射组比较, $P < 0.05$

图 4 沉默 MALAT1、过表达 miR-144-3p 与放射对 A549 细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of silencing MALAT1, overexpressing miR-144-3p and radiation on the expression of A549 cell proliferation- and apoptosis-related proteins

A549 组 (1.00 ± 0.11) 比较, MALAT1 沉默对照组 (1.01 ± 0.12) miR-144-3p 表达水平无变化 ($P > 0.05$), MALAT1 沉默组 (1.40 ± 0.19) miR-144-3p 表达水平增加 ($P < 0.05$)。

2.5 sh-MALAT1 与 miR-144-3p 抑制剂共转染对 A549 细胞放射敏感性的影响

根据单击多靶模型, MALAT1 沉默 +miR-

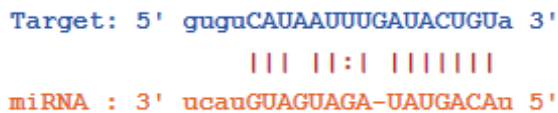
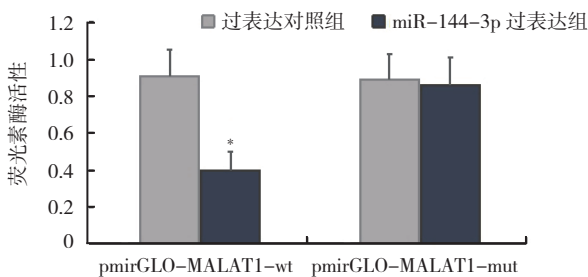


图 5 MALAT1 和 miR-144-3p 结合位点

Fig. 5 MALAT1 and miR-144-3p binding sites



注 * 与过表达对照组比较, $P < 0.05$

图 6 MALAT1 和 miR-144-3p 靶向关系验证

Fig. 6 Validation of the targeting relationship between MALAT1 and miR-144-3p

144-3p 沉默组 SER 为 0.867, 表明 miR-144-3p 沉默可逆转 MALAT1 沉默对 A549 细胞的放射敏感性 (表 3, 图 7)。

2.6 sh-MALAT1 与 miR-144-3p 抑制剂共转染联合放射对 A549 细胞增殖和凋亡的影响

与 MALAT1 沉默组比较, MALAT1 沉默 +miR-144-3p 沉默组细胞存活率和 c-Myc 表达均增加, 凋亡率、caspase-3 表达和 Bax 表达均降低 (均 $P < 0.05$, 表 4, 图 8~9)。

2.7 miR-144-3p 和 ZEB1 间的靶向关系

TargetScan (<http://www.Targetscan.org/>) 预测显示, miR-144-3p 和 ZEB1 间具有结合位点, ZEB1

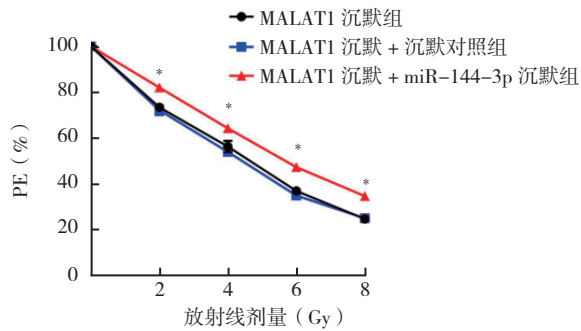
表 3 sh-MALAT1 与 miR-144-3p 抑制剂共转染后的单击多靶模型参数值

Table 3 Single-click multi-target model parameter values after co-transfection with sh-MALAT1 and miR-144-3p inhibitor

组别	D ₀ (Gy)	D _q (Gy)	N	SER
MALAT1 沉默组	5.241	1.006	1.212	-
MALAT1 沉默 + 沉默对照组	5.362	0.655	1.130	0.977
MALAT1 沉默 + miR-144-3p 沉默组	6.042	1.968	1.385	0.867

注 D₀: 平均致死剂量; D_q: 准域剂量; N: 外推数; SER: 放射增敏比 (sensitizer enhancement ratio)

是 miR-144-3p 的潜在靶基因 (图 10)。荧光素酶报告基因结果显示, 与 pmirGLO-ZEB1-wt+ 过表达对照组比较, pmirGLO-ZEB1-wt+miR-144-3p 过表达组荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$); 其余组荧光素酶活性无变化 ($P > 0.05$, 图 11)。与 A549 组 (1.26 ± 0.21) 比较, 过表达对照组 (1.25 ± 0.12) ZEB1 表达水平无变化 ($P > 0.05$, 图 12), miR-144-3p 过表达组 (0.50 ± 0.07) ZEB1 表达水平降低 ($P < 0.05$)。



注 * 与 MALAT1 沉默组比较, $P < 0.05$; PE: 集落形成率 (plating efficiency)

图 7 sh-MALAT1 与 miR-144-3p 抑制剂共转染对 A549 细胞放射敏感性的影响

Fig. 7 Effects of sh-MALAT1 co-transfection with miR-144-3p inhibitor on the radiosensitivity of A549 cells

表 4 sh-MALAT1 与 miR-144-3p 抑制剂共转染联合放射对 A549 细胞增殖和凋亡的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

Table 4 Effects of sh-MALAT1 and miR-144-3p inhibitor co-transfection combined with radiation on the proliferation and apoptosis of A549 cells ($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	细胞存活率	细胞凋亡率
MALAT1 沉默组	41.15 ± 3.15	38.17 ± 3.45
MALAT1 沉默 + 沉默对照组	40.91 ± 3.84	37.93 ± 4.01
MALAT1 沉默 + miR-144-3p 沉默组	52.10 ± 4.05*	28.25 ± 2.57*

注 * 与 MALAT1 沉默组比较, $P < 0.05$

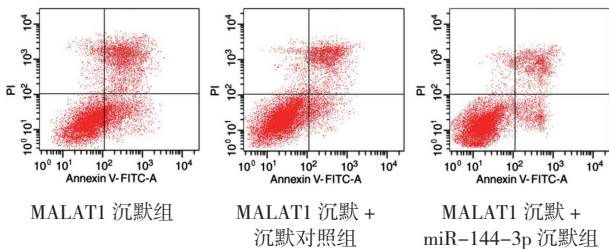
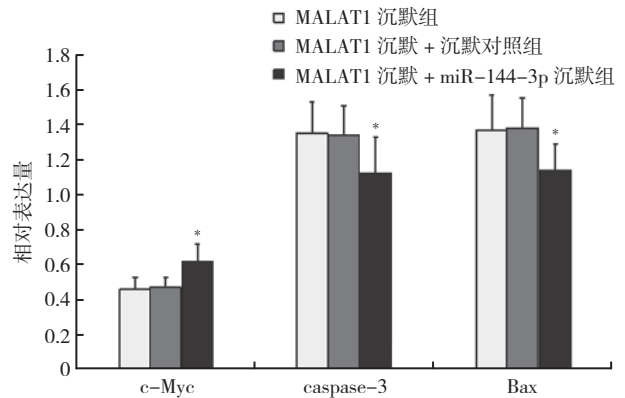
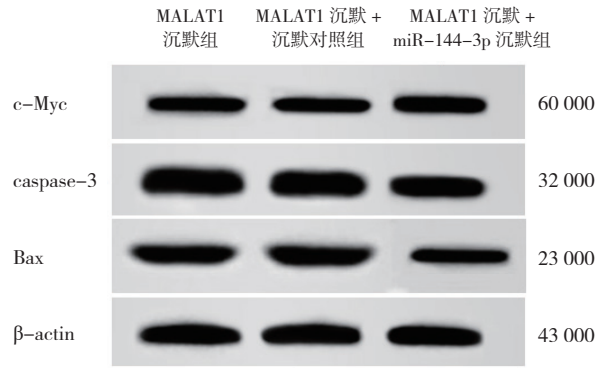


图 8 sh-MALAT1 与 miR-144-3p 抑制剂共转染对 A549 细胞凋亡的影响

Fig. 8 Effect of co-transfection of sh-MALAT1 and miR-144-3p inhibitor on A549 cell apoptosis



注 * 与 MALAT1 沉默组比较, $P < 0.05$

图 9 sh-MALAT1 与 miR-144-3p 抑制剂共转染对 A549 细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 9 Effects of sh-MALAT1 co-transfected with miR-144-3p inhibitor on the proliferation- and apoptosis-related protein expressions in A549 cells

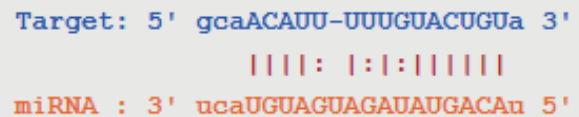
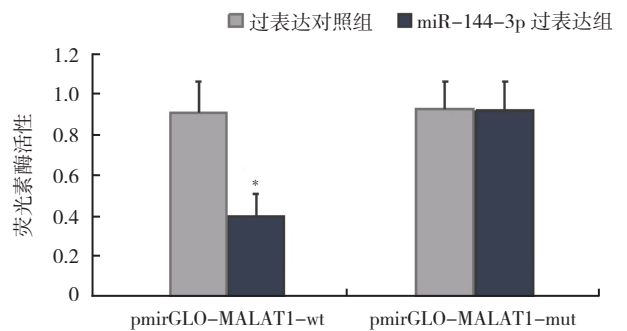


图 10 miR-144-3p 和 ZEB1 结合位点

Fig. 10 miR-144-3p and ZEB1 binding sites



注 * 与过表达对照组比较, $P < 0.05$

图 11 miR-144-3p 和 ZEB1 靶向关系验证

Fig. 11 Validation of targeting relationship between miR-144-3p and ZEB1

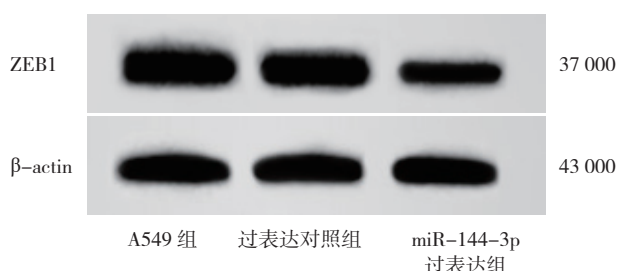


图 12 miR-144-3p 过表达对 ZEB1 蛋白表达的影响

Fig. 12 Effect of miR-144-3p overexpression on ZEB1 protein expression

3 讨论

肺癌是世界上癌症相关死亡的主要原因之一，其中主要以非小细胞肺癌为主，预后生存率 <15%，并且其发生率和死亡率还在逐年上升，放疗是除外科手术外的第二大有效治疗方法，但癌细胞的抗辐射性是导致癌症复发和不良预后的一大主要原因，因此有必要研究提高癌细胞放射敏感性的方法，以提高患者生存率^[8-11]。

已发现 lncRNA 通过调节细胞周期停滞、凋亡、癌症干细胞调节、上皮-间质转化和自噬等各种机制来影响癌细胞的放射敏感性，有望成为放疗潜在治疗靶标^[12-13]。MALAT1 是癌症中被广泛研究的 lncRNA，其对于癌症相关途径的调节十分重要^[14]。先前已有研究发现，lncRNA MALAT1 在子宫颈癌和肺癌等不同癌症中通过增强上皮-间质转化和血管生成促进癌症进展，而近些年 MALAT1 对癌细胞放射敏感性的影响作用被报道出来，抑制其表达可增强食管鳞状细胞癌的放射敏感性和化学敏感性^[15]。MALAT1 通过与 miR-143 相互作用来调节子宫颈癌细胞的存活和凋亡，从而影响放疗效果^[16]。miRNA 通过靶向降解或抑制 mRNA 表达发挥癌基因或抑癌基因。最近有研究表明，一些 miRNA 表达与放疗之间的联系，特别是在肺癌中^[8]。lncRNA 可以起 miRNA 海绵的作用，以调节癌细胞的放射敏感性^[13]。lncRNA 母系印记基因 3 (maternally imprinted genes 3, MEG3) 可通过下调 miR-7-5p 表达来促进鼻咽癌细胞的放射敏感性^[17]。miR-144-3p 具有抑癌作用，在包括肺癌在内的多种肿瘤中被下调。miR-144-5p 能够通过靶向活化转录因子 2 (activating transcription factor-2, ATF2) 增强非小细胞肺癌细胞的放射敏感性，而 miR-144-3p 可通过抑制 ZEB1 表达提高胃癌细胞放射敏感性^[5,18]。MALAT1 在骨肉瘤

细胞中通过充当 miR-144-3p 的竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 来促进肿瘤细胞的转移和增殖^[19]。本研究发现，在 A549 细胞中 MALAT1 表达水平增加，而 miR-144-3p 表达水平降低，抑制 MALAT1 表达或 miR-144-3p 过表达均能抑制细胞增殖，促进细胞凋亡，增加细胞放射敏感性。在肺癌中，MALAT1 和 miR-144-3p 与癌细胞的增殖、凋亡和放射敏感性有关。双荧光素酶报告基因结果显示，MALAT1 靶向下调 miR-144-3p 表达水平，其沉默促进 miR-144-3p 的表达，与已报道的研究结果一致^[20-21]；而且，miR-144-3p 沉默可逆转 MALAT1 沉默对细胞增殖、凋亡和放射敏感性的影响；表明 MALAT1 通过靶向抑制 miR-144-3p 表达来抑制肺癌细胞的放射敏感性。

ZEB1 在肿瘤内皮间质转化及癌症发展中具有重要作用，在肺癌中 ZEB1 高表达的肺腺癌患者转移率增加，总生存率降低。研究发现，抑制睾丸孤核受体 4 (testicular orphan nuclear receptor 4, TR4) 可通过调节蛋白振动 (quaking, QKI) / circZEB1/miR-141-3p/ZEB1 信号通路来促进细胞放射敏感性并更好地抑制前列腺癌的发生，ZEB1 已被作为放射敏感性调节剂^[22-23]。在胃癌中，ZEB1 是 miR-144-3p 的潜在靶基因，miR-144-3p 通过抑制 ZEB1 表达提高癌细胞的放射敏感性^[5]。有研究发现，MALAT1 可通过 miR-143-3p 调节 ZEB1 的表达，促进肝细胞癌的发展^[24]。本研究发现，miR-144-3p 靶向下调 ZEB1 表达水平，其过表达可降低 ZEB1 表达水平，提示 MALAT1 对肺癌细胞放射敏感性的影响可能与 miR-144-3p/ZEB1 有关。

综上所述，lncRNA MALAT1 沉默通过促进 miR-144-3p/ZEB1 轴增强肺癌细胞的放射敏感性。本研究为 MALAT1 在肺癌细胞放射敏感性中的主要机制研究提供了一定参考，在未来的研究中还需要在不同的细胞株中验证其可靠性。

参考文献：

- [1] Sui X, Geng JH, Yu HM, et al. Radiosensitivity of cancer stem cells in lung cancer cell lines[J]. J Vis Exp, 2019, 150: e60046.
- [2] Ebahimzadeh K, Shoorei H, Mousavinejad SA, et al. Emerging role of non-coding RNAs in response of cancer cells to radiotherapy[J]. Pathol Res Pract, 2021, 218:

- 153327.
- [3] Beermann J, Piccoli MT, Viereck J, et al. Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches[J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(4): 1297-1325.
- [4] Chen L, Ren P, Zhang YD, 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.
- [5] Gao ZY, Liu H, Zhang Z. miR-144-3p increases radiosensitivity of gastric cancer cells by targeting inhibition of ZEB1[J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(3): 491-500.
- [6] 孙献涛, 练延帮, 白杨, 等. LncRNA CRNDE 靶向 miR-384 影响结直肠癌细胞放射敏感性的研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2019, 39(12): 893-898.
- [7] 孙克康, 吴晓阳, 陈文, 等. ErbB2 转录因子 1 增加肺癌 A549 细胞的放射敏感性的实验研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(3): 584-586.
- [8] Wang J, Jiang MW, Xia SA. miR-339-5p increases radiosensitivity of lung cancer cells by targeting phosphatases of regenerating liver-1 (PRL-1)[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 8408-8416.
- [9] Sheng JX, Zhao QZ, Zhao JY, et al. SRSF₁ modulates PTPMT1 alternative splicing to regulate lung cancer cell radioresistance[J]. *EBioMedicine*, 2018, 38: 113-126.
- [10] Ding XF, Cheng JJ, Pang QS, et al. BIBR1532, a selective telomerase inhibitor, enhances radiosensitivity of non-small cell lung cancer through increasing telomere dysfunction and ATM/CHK₁ inhibition[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2019, 105(4): 861-874.
- [11] 黄旻然, 金娇悦, 吴映雪, 等. 吉非替尼耐药的低分化肺癌细胞系的建立及其生物学特征分析[J]. *实用肿瘤杂志*, 2020, 35(2): 127-133.
- [12] 谭化蛟, 廖琼. 自噬与非小细胞肺癌治疗研究进展[J]. *实用肿瘤杂志*, 2021, 36(3): 209-214.
- [13] Zhu JM, Chen SS, Yang BX, et al. Molecular mechanisms of lncRNAs in regulating cancer cell radiosensitivity[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(8): BSR20190590.
- [14] Goyal B, Yadav SRM, 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.
- [15] Yao Q, Yang J, Liu T, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes the stemness of esophageal squamous cell carcinoma by enhancing YAP transcriptional activity[J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(8): 1392-1402.
- [16] Zhu P, Wang FQ, Li QR. Correlation study between long non-coding RNA MALAT1 and radiotherapy efficiency on cervical carcinoma and generation of radiotherapy resistant model of cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(16): 5140-5148.
- [17] 孙旭, 孙丽芳, 于敏, 等. lncRNA MEG3 通过下调 miR-7-5p 表达对鼻咽癌细胞放射敏感性的影响[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2020, 29(3): 207-210.
- [18] Song L, Peng LP, Hua SC, et al. miR-144-5p enhances the radiosensitivity of non-small-cell lung cancer cells via targeting ATF₂[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 5109497.
- [19] Wang Y, Zhang YY, Yang T, et al. Long non-coding RNA MALAT1 for promoting metastasis and proliferation by acting as a CeRNA of miR-144-3p in osteosarcoma cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 59417-59434.
- [20] Ye W, Ma JY, Wang F, et al. LncRNA MALAT1 regulates miR-144-3p to facilitate epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells via the ROS/NRF2/Notch1/snail pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8184314.
- [21] Gong XH, Zhu Y, Chang HX, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes cardiomyocyte apoptosis after myocardial infarction via targeting miR-144-3p[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(8): BSR20191103.
- [22] Chen D, Chou FJ, Chen Y, et al. Targeting the radiation-induced TR4 nuclear receptor-mediated QKI/circ-ZEB1/miR-141-3p/ZEB1 signaling increases prostate cancer radiosensitivity[J]. *Cancer Lett*, 2020, 495: 100-111.
- [23] Zhang PJ, Wei YK, Wang L, et al. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK₁[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(9): 864-875.
- [24] Chen LS, Yao HB, Wang K, et al. Long non-coding RNA MALAT1 regulates ZEB1 expression by sponging miR-143-3p and promotes hepatocellular carcinoma progression[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(12): 4836-4843.

(收稿日期: 2021-04-07)