

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.02.004

· 基础研究 ·

FOXD2-AS1通过EZH2调控LATS1表达影响肾癌细胞的增殖与迁移

向威, 吕磊, 郑福鑫, 袁敬东(武汉市第一医院 泌尿外科, 湖北 武汉 430022)

[摘要] **目的:**探索 lncRNA FOXD2-AS1 通过 EZH2 调控 LATS1 表达影响肾透明细胞癌(ccRCC)细胞增殖与迁移的作用机理。**方法:**采用 GEPIA 2 软件在线分析 TCGA 数据库中 FOXD2-AS1 在 ccRCC 组织中的表达水平,评估其与患者总体生存率之间的关系。用 qPCR 法检测肾癌细胞及临床收集的 26 例 ccRCC 组织中 FOXD2-AS1 表达水平,用 CCK-8 法和 Transwell 小室实验观察敲减 FOXD2-AS1 表达对肾癌细胞增殖与迁移的影响;用 qPCR 与 WB 法检测敲减 FOXD2-AS1 表达对肾癌细胞 LATS1 mRNA 与蛋白表达的影响。用 RNA 免疫沉淀(RIP)和染色质免疫沉淀(ChIP)法分析 FOXD2-AS1 与 EZH2 及 LATS1 之间的作用。**结果:**GEPIA 2 软件分析结果显示,FOXD2-AS1 在 ccRCC 组织中呈明显高表达($P < 0.01$),FOXD2-AS1 高表达患者的总体生存率较低($P < 0.05$)。qPCR 法检测结果显示,相较于癌旁组织,FOXD2-AS1 在 26 例 ccRCC 组织中呈显著高表达($P < 0.01$)。相较于永生化肾小管上皮细胞 HK-2, FOXD2-AS1 在肾癌 786-O、ACHN 及 SN12-PM6 细胞中均显著高表达(均 $P < 0.01$)。敲减 FOXD2-AS1 表达,均可显著降低肾癌细胞的增殖与迁移能力(均 $P < 0.05$),并明显上调 LATS1 的 mRNA 与蛋白表达水平(均 $P < 0.01$)。RIP 与 ChIP 实验证实,FOXD2-AS1 可结合并招募 EZH2 至 LATS1 启动子区域而发挥作用。挽救实验显示,敲减 LATS1 或过表达 EZH2 可部分逆转敲减 FOXD2-AS1 对肾癌细胞增殖与迁移的抑制作用。**结论:**FOXD2-AS1 在 ccRCC 中高表达,其通过募集 EZH2 至 LATS1 基因启动子区域而负性调控 LATS1 的表达,进而促进肾癌细胞的增殖与迁移。

[关键词] 肾透明细胞癌;FOXD2-AS1;EZH2;LATS1

[中图分类号] R737.11;R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)02-0161-08

FOXD2-AS1 regulates the expression of LATS1 through EZH2 to affect the proliferation and migration ability of renal cancer cells

XIANG Wei, LYU Lei, ZHENG Fuxing, YUAN Jingdong (Department of Urology, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of lncRNA FOXD2-AS1 regulating the expression of LATS1 via EZH2 to affect the proliferation and migration of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) cells. **Methods:** The GEPIA 2 online tool was used to analyze the expression levels of FOXD2-AS1 in ccRCC tissues from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and their correlation with patients' overall survival rates was evaluated. Quantitative PCR (qPCR) was performed to analyze the expressions of FOXD2-AS1 in renal cancer cells and 26 clinically collected ccRCC tissue samples. CCK-8 cell proliferation assay and transwell chamber migration assay were employed to observe the effects of FOXD2-AS1 knockdown on the proliferation and migration of renal cancer cells. qPCR and Western blot analysis were utilized to assess the impact of FOXD2-AS1 knockdown on the expression of LATS1. RNA immunoprecipitation (RIP) and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed to analyze the interaction between FOXD2-AS1, EZH2, and LATS1. **Results:** The GEPIA 2 software analysis revealed that FOXD2-AS1 was significantly upregulated in ccRCC tissues ($P < 0.01$) and patients with high FOXD2-AS1 expression exhibited lower overall survival rates ($P < 0.05$). The qPCR analysis results showed that FOXD2-AS1 was significantly upregulated in 26 samples of ccRCC tissues compared with adjacent normal kidney tissues ($P < 0.01$). Compared with immortalized renal tubular epithelial cell line HK-2, the expression of FOXD2-AS1 was significantly elevated in three types of renal cancer cell lines (786-O, ACHN and SN12-PM6) ($P < 0.01$). Knockdown of FOXD2-AS1 expression significantly decreased the proliferation and migration abilities of renal cancer cells ($P < 0.05$), and markedly increased the mRNA and protein expression levels of LATS1 (all $P < 0.01$). RIP and ChIP assays confirmed that FOXD2-AS1 can bind and recruit EZH2 to the promoter region of LATS1 to exert its effect. Salvage experiments demonstrated that knocking down LATS1 or overexpressing EZH2 partially reversed the inhibitory effect of FOXD2-AS1 knockdown on the proliferation and migration of renal

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81502204;No.82002708)

[作者简介] 向威(1985—),男,博士,副主任医师,主要从事泌尿系肿瘤临床与基础的研究。E-mail: 274715045@qq.com

[通信作者] 袁敬东, E-mail: jingdongyuan97@hotmail.com

cancer cells. **Conclusion:** FOXD2-AS1 is highly expressed in ccRCC, and it negatively regulates the expression of LATS1 by recruiting EZH2 to the promoter region of the LATS1 gene, thereby facilitating the proliferation and migration of renal cancer cells.

[Key words] clear cell renal cell carcinoma (ccRCC); FOXD2-AS1; EZH2; LATS1

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(2): 161-168. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.02.004]

肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是肾恶性肿瘤中最常见的类型,因其高度侵袭性和隐匿性,常在晚期才被诊断,导致患者预后不佳^[1]。尽管以往对ccRCC的研究取得了显著进展,包括基因突变、表观遗传学变化及细胞信号转导通路等的发现^[2],但其病因和发病机制仍然不甚清楚。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在肿瘤发生发展过程中扮演着极为重要的角色,作为一类长度超过200个碱基的RNA分子,lncRNA通常不编码蛋白质,但可通过多种途径参与基因表达调控、染色质重塑、miRNA调控等关键生物学过程^[3]。在ccRCC中,一些lncRNA的异常表达与其发生发展及患者预后密切相关^[4-5]。FOXD2-AS1是一种在多种人类肿瘤中异常表达并与肿瘤发生发展密切相关的lncRNA^[6]。FOXD2-AS1在肝癌组织中呈高表达,其通过调控TWIST1表达而促进肝癌细胞的增殖与迁移^[7];在食管鳞状细胞癌中,FOXD2-AS1通过靶向miR-204-3p促进肿瘤细胞的恶性生物学行为^[8];在胃癌组织中FOXD2-AS1呈高表达且与胃癌患者的预后密切相关^[9];在膀胱癌组织中FOXD2-AS1也呈高表达,其通过调控E2F1和Akt的表达促进膀胱癌的进展与复发^[10]。然而,FOXD2-AS1在ccRCC组织中的表达水平及潜在作用机制尚不明晰。本研究通过数据库数据和qPCR技术分析FOXD2-AS1在ccRCC组织、癌旁组织及肾癌细胞表达情况,并通过分子生物学技术探究其对肾癌细胞增殖与迁移的作用及机制,旨在为临床治疗ccRCC提供潜在的靶点。

1 材料与方法

1.1 癌组织、细胞与主要试剂

收集2021年2月至2023年4月于武汉市第一医院泌尿外科行根治性肾切除术的26例ccRCC患者的癌组织与癌旁组织标本(距离癌肿边缘>5 cm),并对所纳入患者的一般资料及临床病理信息进行统计分析。其中男性19例,女性7例,平均年龄(67.73 ± 5.23)岁。纳入标准:(1)能全程配合研究;(2)术前未予以放化疗、免疫治疗或靶向治疗;(3)病理诊断为ccRCC。排除标准:(1)无法配合研究或中途退出者;(2)合并严重心脑血管或其他肿瘤疾病者。本研究获得医院伦理委员会的批准[审批号:2020IEC(A255)],所有患者均签署知情同意书。

肾癌细胞786-O、ACHN、SN12-PM6及人永生化

肾小管上皮细胞HK-2由本课题组保存。10%胎牛血清(FBS)和DMEM培养液均购自Gibco公司,胰酶、双抗(青霉素-链霉素溶液)、TRIzol试剂、核质分离试剂盒(PARIS™)及Lipofectamine 3000转染试剂均购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒和qRT-PCR试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司,CCK-8法和免疫组织化学(IHC)染色试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司,RNA免疫共沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)试剂盒(EZ-Magna RIP™)与染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, CHIP)试剂盒(EZ-ChIP™)均购自美国Millipore公司。引物设计及合成由上海生物工程公司完成,小干扰RNA由吉玛基因有限公司合成。FOXD2-AS1干扰序列:si-FOXD2-AS1#1:5'-GCGGATCTTAATT AAGTCAATTC-3'; si-FOXD2-AS1#2:5'-GAC TCC ACTCTTCGCTTATGT-3'; si-FOXD2-AS1#3:5'-GAA GAGTACGTTGCTATCAGT-3'; si-Con对照序列:5'-GTACCTTCGTTACCCCTCTAGT-3'; si-LATS1干扰序列:5'-GAATGGGTAGTTCGTCTATAT-3'; si-EZH2干扰序列:5'-GGTGAATGCCCTTGGTCA ATA-3'; si-NC对照序列:5'-GGGCTGTATAATTCG TTGTAA-3'。EZH2过表达载体(EZH2 OE)及空载体(vector)均购自吉凯基因生物公司,LATS1、EZH2、H3K27me3抗体均购自美国Abcam公司,二抗购自赛默飞世尔科技公司。

1.2 细胞培养、转染与分组

786-O、ACHN、SN12-PM6和HK-2细胞均用含10%胎牛血清的DMEM培养液,置于37℃、5% CO₂的培养箱中进行培养。

将处于对数生长期的各种细胞用胰酶消化后,按相应密度种入各培养板孔内,待其汇合度达到70%时,用Lipofectamine 3000分别将si-FOXD2-AS1#1、si-FOXD2-AS1#2、si-FOXD2-AS1#3、si-Con、si-LATS1、si-EZH2、si-NC、EZH2 OE及vector转染至肾癌786-O细胞中,实验为si-Con组、si-FOXD2-AS1组、si-NC组、si-LATS1组、si-EZH2组、si-FOXD2-AS1 + si-NC组、si-FOXD2-AS1 + si-LATS1组、si-FOXD2-AS1 + vector组和si-FOXD2-AS1 + EZH2 OE组。

1.3 CCK-8法检测各组细胞的增殖能力

将转染后各组细胞以 1.0×10^3 个/孔种入96孔板内,培养24、48、72及96 h后,按CCK-8法试剂盒的操作步骤分别检测450 nm波长处的吸光度(D)值,以

*D*值代表细胞的增殖能力。

1.4 Transwell小室实验检测各组细胞的迁移能力

将各组细胞悬浮于无血清的DMEM培养液中,调整细胞密度至 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$,取200 μL 细胞悬液接种入Transwell小室的上室中,下室加入含10% FBS的DMEM培养液600 μL ,将培养板置入培养箱中继续培养24 h,随后用4%多聚甲醛对下室贴壁细胞进行固定,继而用0.1%结晶紫溶液进行染色,最后在倒置显微镜下对迁移细胞进行拍照计数。

1.5 qPCR法检测各组组织和细胞中FOXD2-AS1、LATS1、LATS2、FHIT、SFRP1、CDH1及WIF1 mRNA的表达

用TRIzol法提取ccRCC组织、癌旁组织、各组细胞中的总RNA,纯化后测定RNA浓度,用逆转录试剂盒将其逆转录成cDNA,随后按照qRT-PCR试剂盒操作步骤进行PCR反应。GAPDH为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算FOXD2-AS1、LATS1的相对表达量。FOXD2-AS1的正向引物为5'-AAGCGATCAGCTCCCTTAGC-3',反向引物为5'-CAGACGCGTGGTGGTTATCT-3'; LATS1正向引物为5'-GGTGTTAAGGGGAGAGCCAG-3',反向引物为5'-GTCCCAGCAACCCCAAGTAT-3'; LATS2正向引物为5'-CTTGGGTCTGCGCTTTGGAA-3',反向引物为5'-TTATCACTCTCTCCAGGGGCG-3'; FHIT正向引物为5'-ACCTGCGTCTGATGAAGTG-3',反向引物为5'-TTCACAGTCTGTCCGGCTTC-3'; SFRP1正向引物为5'-TGGCCCCGAGATGCTTAAGTG-3',反向引物为5'-CTCGTTGTACAGGGAGGAC-3'; CDH1正向引物为5'-TGGACCGAGAGAGTTTCCCT-3',反向引物为5'-ACGACGTTAGCCTCGTTCTC; WIF1正向引物为5'-GCACAACAGAGAATGCCAGC-3',反向引物为5'-GACGGTTGGATCTGCCATGA-3'; GAPDH正向引物为5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3',反向引物为5'-CGTCAAAGGTGGAGGAGTG-3'。

1.6 WB法检测各组组织和细胞中LATS1、H3K27me3蛋白的表达

使用RIPA裂解液提取各组细胞中的总蛋白,并用BCA法测定其浓度。随后,进行SDS-PAGE、转膜、封闭、一抗4℃下处理过夜、二抗室温下处理1.5 h,最后用ECL超敏发光液显影,用成像系统进行拍照并对蛋白条带进行灰度值分析。

1.7 IHC法检测LATS1蛋白在ccRCC组织和癌变组织中的表达

将ccRCC组织与癌旁组织用4%多聚甲醛进行固定,继而按照IHC的操作步骤进行实验,最后在显微镜下观察拍照,并分析LATS1蛋白在ccRCC与癌

旁组织中的表达差异。

1.8 在肾癌细胞胞质和核中FOXD2-AS1的检测

用核质分离试剂盒分离并提取肾癌细胞的细胞核与细胞质中的RNA,经纯化、逆转录及qPCR检测,分析FOXD2-AS1在肾癌细胞胞质和核中分布情况。

1.9 RIP实验检测FOXD2-AS1与EZH2的结合情况

用RIP试剂盒提取肾癌786-O细胞的总RNA,然后用EZH2抗体预孵育的磁珠进行免疫沉淀反应,并对富集的RNA进行分离纯化、逆转录及qPCR检测,以此分析EZH2对FOXD2-AS1的富集程度。其中,裂解液总RNA组为input对照,而IgG组为阴性对照。

1.10 ChIP法检测EZH2、H3K27me3在LATS1启动子区的富集变化

按照ChIP试剂盒操作步骤处理肾癌细胞,经蛋白质与染色质交联、破碎、EZH2或H3K27me3抗体免疫沉淀、洗涤、解交联、DNA纯化提取出DNA,然后用qPCR检测染色质中LATS1基因启动子区域的DNA序列。LATS1启动子区域引物序列:正向引物为5'-CTCGCCCTACTTCACAGGAG-3',反向引物为5'-CTGCTTGCCCTATCCAAAAG-3'。用input组作为内参,IgG组为阴性对照。

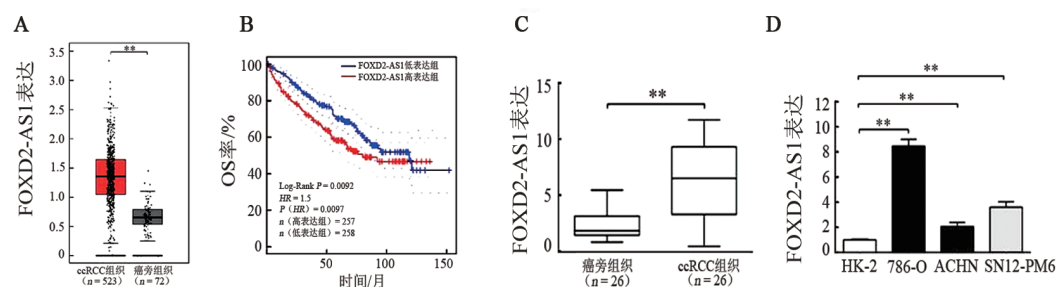
1.11 统计学处理

用SPSS 25.0软件对数据进行统计学处理分析。符号正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用独立样本 t 检验,计数资料以率表示,组间比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 数据库数据分析显示FOXD2-AS1在ccRCC组织及细胞中呈高表达且与患者的总生存期缩短有关联

应用GEPIA2软件(<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)对TCGA数据库进行分析的结果(图1A)显示,与癌旁组织比较,在ccRCC组织中FOXD2-AS1呈明显高表达($P < 0.01$);生存分析结果(图1B)显示,FOXD2-AS1高表达患者的总体生存率明显降低($P < 0.01$)。qPCR法检测结果(图1C)显示,与癌旁组织,ccRCC组织中FOXD2-AS1呈明显高表达($P < 0.01$),与TCGA数据库数据分析结果一致;相较HK-2细胞,FOXD2-AS1在786-O、ACHN及SN12-PM6细胞中均呈明显高表达($P < 0.01$,图1D)。由于786-O细胞中FOXD2-AS1高表达最明显,所以选其用于后续实验。实验结果说明,ccRCC组织和细胞中FOXD2-AS1呈高表达且与患者的总生存期缩短相关联。



A:TCGA数据库数据分析FOXD2-AS1在ccRCC和癌旁组织中的表达;B:TCGA数据库数据分析FOXD2-AS1表达对患者总生存率的影响;C:qPCR法检测中国人ccRCC组织与配对癌旁组织中FOXD2-AS1的表达;D:FOXD2-AS1在HK-2、786-O、ACHN和SN12-PM6中的表达。* $P < 0.01$ 。

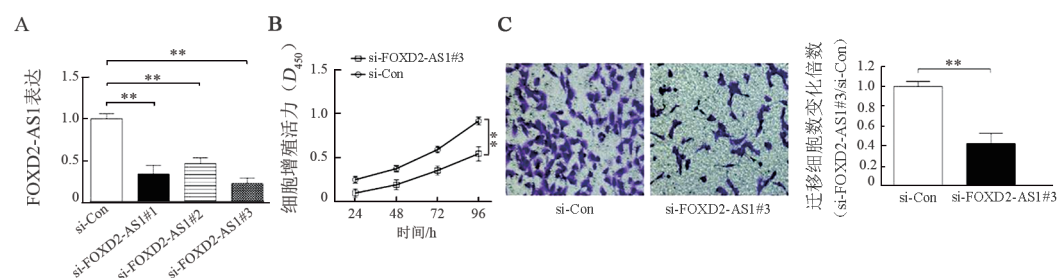
图1 FOXD2-AS1在ccRCC组织与细胞中的表达

2.2 敲减FOXD2-AS1表达可明显抑制786-O细胞的增殖和迁移能力

qPCR法检测结果(图2A)显示,与si-Con组比较,si-FOXD2-AS1#1~3组786-O细胞中FOXD2-AS1表达水平均明显降低($P < 0.01$),其中以si-FOXD2-AS1#3组786-O细胞中FOXD2-AS1降低最为明显,因此选择si-FOXD2-AS1#3进行后续的研究。实验结果说明,本实验成功地敲减了786-O细胞中FOXD2-AS1

的表达。

CCK-8法检测结果(图2B)显示,敲减FOXD2-AS1表达可显著抑制786-O细胞的增殖能力($P < 0.05$);Transwell小室实验检测结果(图2C)显示,敲减FOXD2-AS1表达可明显抑制786-O细胞的迁移能力($P < 0.01$)。实验结果说明,FOXD2-AS1能明显促进786-O细胞的增殖和迁移能力。



A:si-FOXD2-AS1#1~3在786-O细胞中敲减效率的检测;B:敲减FOXD2-AS1表达对786-O细胞增殖能力的影响;C:敲减FOXD2-AS1表达对786-O细胞迁移能力的影响($\times 100$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 敲减FOXD2-AS1表达对786-O细胞增殖与迁移能力的影响

2.3 FOXD2-AS1可结合EZH2并调控LATS1的表达

亚细胞定位分析结果(图3A)显示,FOXD2-AS1主要分布于786-O细胞的细胞核,提示FOXD2-AS1很可能在转录层面参与靶基因的转录调控。有研究^[11]表明,部分细胞核分布的lncRNA可通过与甲基化转移酶如EZH2等结合,从而介导对靶基因的转录抑制。生物信息学软件(<http://pridb.gdcdb.iastate.edu/RPISeq/index.html>)预测结果(图3B)提示,FOXD2-AS1与EZH2蛋白有较高的结合可能性。进一步行RIP实验,结果(图3C)显示,在肾癌786-O细胞中EZH2可明显富集FOXD2-AS1,提示二者可相互结合。作为多梳抑制性复合物2(PRC2)家族核心成员之一,组蛋白甲基转移酶EZH2被证实可通过甲基化调控作用抑制抑癌基因的转录从而促进多种人类肿瘤的进展^[12-15]。因此,推测FOXD2-AS1在肾癌中很

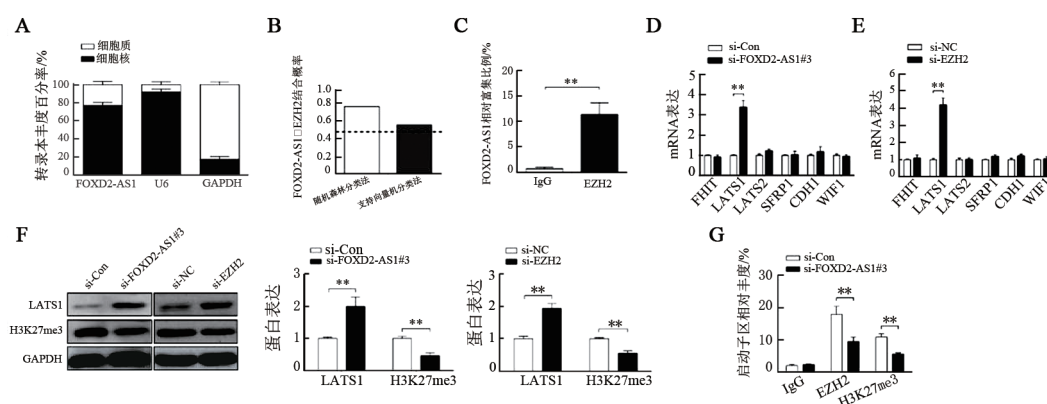
可能通过EZH2抑制下游抑癌基因的转录。通过分析肿瘤抑癌基因数据库(<https://bioinfo.uth.edu/TSGene/index.html>)和GeneCards生物信息数据库(<https://www.genecards.org/>),选取6个可能与组蛋白甲基化调控相关的肾癌抑癌基因(FHIT、LATS1、LATS2、SFRP1、CDH1及WIF1),用qPCR法对候选基因mRNA进行检测分析,结果(图3D、E)显示,敲减FOXD2-AS1或EZH2表达,可显著增加786-O细胞中LATS1基因的mRNA水平($P < 0.01$),而FHIT、LATS2、SFRP1、CDH1及WIF1 mRNA水平无显著变化,提示LATS1可能为FOXD2-AS1与EZH2共同的靶基因。WB法检测结果(图3F)显示,敲减FOXD2-AS1或EZH2表达,可显著增加786-O细胞中LATS1蛋白的表达水平,而显著降低H3K27me3蛋白的表达水平($P < 0.01$)。ChIP法检测结果(图3G)显示,敲减

FOXD2-AS1 表达可显著降低 786-O 细胞中 EZH2、H3K27me3 与 LATS1 启动子区域的富集量 ($P < 0.01$)。上述实验结果表明, FOXD2-AS1 可通过募集 EZH2 至 LATS1 基因启动子区域, 进而抑制 LATS1 的转录与翻译。

2.4 LATS1 在 ccRCC 组织中的表达及敲减其表达对 786-O 细胞增殖与迁移的影响

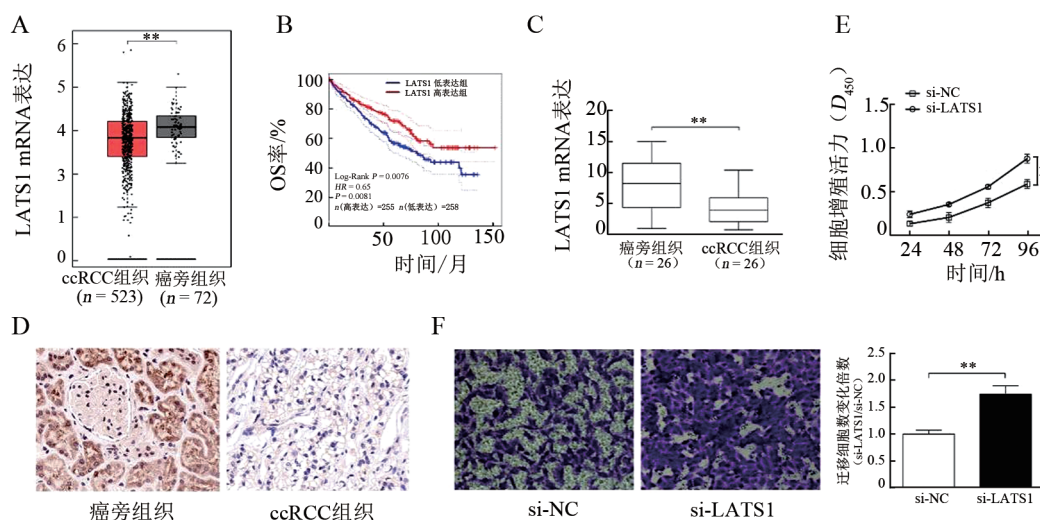
用 GEPIA 2 软件对 TCGA 数据库中基因表达数据进行分析, 结果(图 4A)显示, 相较于癌旁组织, ccRCC 组织中 LATS1 表达明显降低 ($P < 0.01$); 生存分析结果(图 4B)显示, LATS1 高表达患者的总生存率明显增加 ($P < 0.01$); qPCR 检测结果(图 4C)显示,

相较于癌旁组织, ccRCC 组织中 LATS1 mRNA 明显低表达 ($P < 0.01$)。IHC 检测结果(图 4D)也显示, LATS1 蛋白在癌旁组织的表达水平明显高于 ccRCC 组织, 其中癌旁组织肾小管上皮细胞胞质中 LATS1 阳性百分比为 84.6% (22/26), 癌组织细胞胞质中 LATS1 阳性百分比为 26.9% (7/26), 差异有统计学意义 ($\chi^2=17.54, P < 0.01$)。敲减 LATS1 表达可显著增强 786-O 细胞的增殖和迁移能力 ($P < 0.05$, 图 4E、F)。实验结果提示, LATS1 在 ccRCC 组织中呈低表达且与患者总生存率有关联, 敲减 LATS1 表达可明显提升 786-O 细胞的增殖与迁移能力。



A: FOXD2-AS1 在 786-O 细胞胞质和胞核中的定位分析; B: FOXD2-AS1 与 EZH2 结合的生物信息学分析; C: RIP 法检测 FOXD2-AS1 与 EZH2 之间的相互作用; D: 敲减 FOXD2-AS1 表达对 786-O 细胞各候选基因 mRNA 水平的影响; E: 敲减 EZH2 表达对 786-O 细胞各候选基因 mRNA 水平的影响; F: 敲减 FOXD2-AS1 对 786-O 细胞中 LATS1 与 H3K27me3 蛋白表达的影响; G: ChIP 法检测敲减 FOXD2-AS1 表达后, EZH2、H3K27me3 在 LATS1 启动子区的富集变化。与 si-Con 或 si-NC 比较, $^{**}P < 0.01$ 。

图3 FOXD2-AS1通过募集EZH2至LATS1启动子区域抑制LATS1的表达



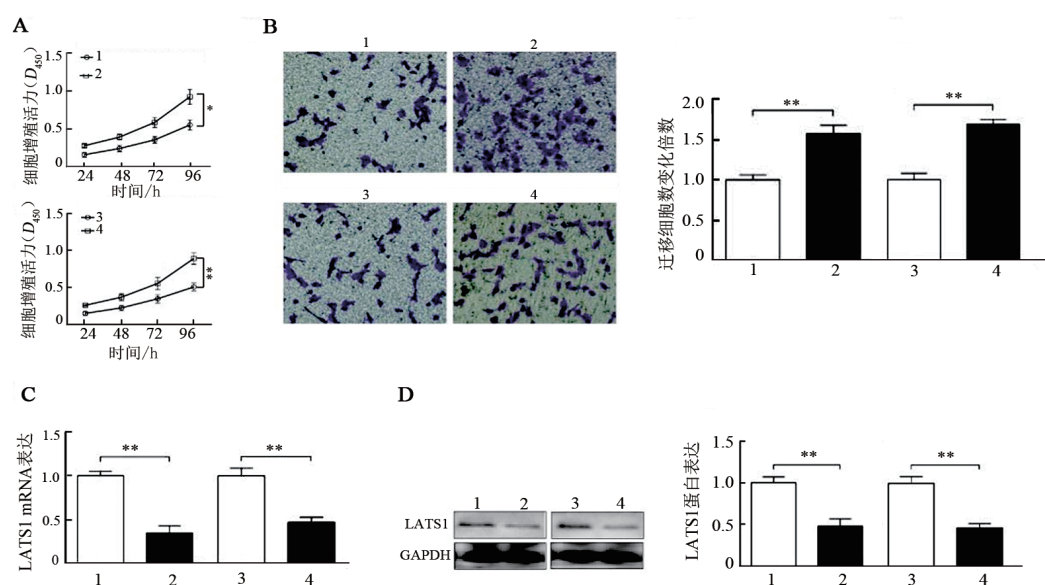
A: TCGA 数据库数据分析 LATS1 在 ccRCC 组织中的表达; B: TCGA 数据库数据分析 LATS1 表达对 ccRCC 患者总生存率的影响; C: qPCR 法分析 LATS1 在中国人 ccRCC 组织中的表达; D: IHC 法检测 LATS1 在 ccRCC 组织与癌旁组织中的表达 ($\times 100$); E: 敲减 LATS1 表达对 786-O 细胞增殖活性的影响; F: 敲减 LATS1 表达对 786-O 细胞迁移能力的影响 ($\times 100$)。* $P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图4 LATS1在ccRCC组织中表达与患者预后的关系及其对786-O细胞增殖与迁移的影响

2.5 FOXD2-AS1 通过 EZH2-LATS1 通路调控 786-O 细胞的增殖与迁移

CCK-8 法和 Transwell 小室实验检测结果(图 5A、B)显示,相较于 si-FOXD2-AS1#3 + si-NC 组, si-FOXD2-AS1#3 + si-LATS1 组 786-O 细胞的增殖与迁移能力均明显增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);相较于 si-FOXD2-AS1#3 + vector 组, si-FOXD2-AS1#3 + EZH2 OE 组 786-O 细胞的增殖与迁移能力也均显著增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。qPCR 和 WB 法检测结果

(图 5C、D)显示,相较于 si-FOXD2-AS1#3 + si-NC 组或 si-FOXD2-AS1#3 + vector 组, si-FOXD2-AS1#3 + si-LATS1 组或 si-FOXD2-AS1#3 + EZH2 OE 组 LATS1 mRNA 和蛋白表达显著降低(均 $P < 0.01$)。实验结果说明,敲减 LATS1 或过表达 EZH2 均可部分抑制由敲减 FOXD2-AS1 对 786-O 细胞中 LATS1 mRNA 与其蛋白表达的促进作用。上述挽救实验结果表明,FOXD2-AS1 通过调控 EZH2-LATS1 通路促进肾癌细胞的增殖与迁移。



1: si-FOXD2-AS1#3 + si-NC 组; 2: si-FOXD2-AS1#3 + si-LATS1 组; 3: si-FOXD2-AS1#3 + vector 组; 4: si-FOXD2-AS1#3 + EZH2 OE 组。A: 敲减 LATS1 或过表达 EZH2 可部分逆转敲减 FOXD2-AS1 对 786-O 细胞增殖的抑制作用; B: 敲减 LATS1 或过表达 EZH2 可部分逆转敲减 FOXD2-AS1 对 786-O 细胞迁移的抑制作用($\times 100$); C~D: 敲减 LATS1 或过表达 EZH2 可部分逆转敲减 FOXD2-AS1 对 786-O 细胞 LATS1 mRNA 与其蛋白表达的影响。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图5 FOXD2-AS1通过EZH2调控LATS1表达对786-O细胞增殖与迁移能力的影响

3 讨论

lncRNA 在恶性肿瘤生物学进展的研究中一直备受关注,而对其功能与作用机制的深入探索成为研究的热点。FOXD2-AS1 是一个新近发现的 lncRNA,位于人染色体 1p33,全长 2 527 bp,与多种人类肿瘤的发生发展密切相关,并被视为极具潜力的治疗靶点之一^[6]。在本研究中,通过对 TCGA 数据库数据进行分析,发现 FOXD2-AS1 在 ccRCC 组织中明显高表达,且 FOXD2-AS1 表达水平与患者总生存率呈显著负相关,提示 FOXD2-AS1 在 ccRCC 中可能发挥潜在的促癌作用。进一步通过对肾癌细胞及临床所收集的 ccRCC 组织样本进行检测,结果证实 FOXD2-AS1 在 ccRCC 中呈高表达,这与 FOXD2-AS1 在其他恶性肿瘤中高表达的报道一致^[7-10]。进一步探索 FOXD2-AS1 在肾癌细胞中的生物学功能,细胞增殖

与迁移实验证实敲减 FOXD2-AS1 表达可显著抑制 786-O 细胞的增殖与迁移,这些结果均提示 FOXD2-AS1 在 ccRCC 中扮演癌基因的角色。然而,FOXD2-AS1 在 ccRCC 中的作用机制待进一步探索。

一般而言,lncRNA 的作用机制往往与其亚细胞定位密切相关,细胞质分布的 lncRNA 可通过诸如“分子海绵”的方式结合 miRNA 或直接与 RNA 结合蛋白结合等方式调控靶基因的表达;而细胞核分布的 lncRNA 可通过与相关蛋白结合或作为转录调节因子来影响染色质的结合活性,或直接作用于 DNA 链从而在转录水平调节基因的转录,进而在肿瘤发生发展过程中发挥重要的调控作用^[11]。本研究观察到 FOXD2-AS1 主要在肾癌细胞核中分布,与此前研究关于 FOXD2-AS1 在肿瘤细胞核内高丰度表达的报道一致^[6],提示 FOXD2-AS1 很可能在转录层面参与对肾癌细胞生物学进展的调控。有研究^[15]指出,部

分细胞核分布的 lncRNA 可通过与组蛋白甲基转移酶 EZH2 结合从而在转录层面调控靶基因的表达。本研究结合生物信息学预测及 RIP 实验验证,证实 FOXD2-AS1 可与 EZH2 相互结合,与前述研究报道^[18-19]一致。在此基础上,本研究进一步探索了 ccRCC 中 FOXD2-AS1 与 EZH2 的下游靶基因。作为多梳抑制复合物 2 的催化亚单位, EZH2 在催化组蛋白 H3 赖氨酸 27 位点的甲基化修饰(H3K27me)过程中发挥关键作用,并介导对靶基因的转录抑制,而该调控过程在多种人类肿瘤中普遍存在,表现为 EZH2 对一些抑癌基因的转录抑制^[12]。据此推测,在 ccRCC 中, FOXD2-AS1 很可能通过 EZH2 参与对肾癌抑癌基因的转录调控。

在生物信息学预测筛选及 qPCR、WB 法验证的基础上, LATS1 被证实为 FOXD2-AS1 与 EZH2 的下游靶基因。值得注意的是, ChIP 实验进一步证实 FOXD2-AS1 可通过招募 EZH2 至 LATS1 基因启动子区域, 催化并上调 H3K27me3 的表达, 进而抑制 LATS1 基因的转录过程。作为拉特抑癌家族成员之一, LATS1 被证实通过多条信号转导通路参与了对肿瘤细胞生物学行为的调控^[20-21]。XU 等^[22]报道, PDS5B 通过上调 LATS1 表达进而抑制肺癌细胞的增殖、迁移与侵袭。QI 等^[23]指出, WWC 蛋白可直接结合 LATS1 并通过 MST1/2 激活 LATS1 表达, 从而抑制多种恶性肿瘤的发生。SHEN 等^[24]证实, 在结肠癌中 LATS1 通过靶向 Gli1 而发挥抑癌作用。在本研究中, LATS1 被证实存在 ccRCC 组织中低表达, 敲减 LATS1 表达可显著促进肾癌细胞的增殖与迁移。这些实验结果表明, LATS1 在 ccRCC 中发挥抑癌作用, 其为 ccRCC 潜在的抑癌基因。与此同时, EZH2 被证实可负性调控 LATS1 的表达, 这与此前研究报道^[25]的结论一致。更重要的是, 挽救实验进一步证实 FOXD2-AS1 可通过 EZH2 调控 LATS1 表达, 并影响 786-O 细胞的增殖与迁移。

综上所述, 本研究证实了 FOXD2-AS1 在 ccRCC 中的高表达水平及促癌功能, 并进一步证实 FOXD2-AS1 通过募集 EZH2 至 LATS1 启动子区域以负性调控 LATS1 表达, 进而促进 786-O 细胞增殖与迁移的作用机制。这为 ccRCC 的靶向治疗研究提供了新的靶点和参考依据。然而, 对于该调控通路的体内研究和临床应用研究仍需要深入探讨。

[参 考 文 献]

- [1] YOUNG M, JACKSON-SPENCE F, BELTRAN L, *et al.* Renal cell carcinoma. *Lancet*, 2024, 404(10451): 476-491. DOI: 10.1016/S0140-6736(24)00917-6.
- [2] JONASCH E, WALKER C L, RATHMELL W K. Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(4):245-261. DOI: 10.1038/s41581-020-00359-2.
- [3] NEMETH K, BAYRAKTAR R, FERRACIN M, *et al.* Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics[J]. *Nat Rev Genet*, 2024, 25(3):211-232. DOI:10.1038/s41576-023-00662-1.
- [4] RYSZ J, KONECKI T, FRANCZYK B, *et al.* The role of long noncoding RNA (lncRNAs) biomarkers in renal cell carcinoma[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 643[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36614082/>. DOI: 10.3390/ijms24010643.
- [5] 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): 161-167. DOI: 10.3870/j.issn.1672-0741.23.12.014.
- [6] GHAFOURI-FARD S, HARSIJ A, HUSSEN B M, *et al.* A review on the role of FOXD2-AS1 in human disorders[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2024, 254:155101[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38211387/>. DOI: 10.1016/j.prp.2024.155101.
- [7] CHEN G, ZHANG W L, ZHANG S M, *et al.* lncRNA FOXD2-AS1 facilitates the progression of hepatocellular carcinoma by regulating TWIST1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2023, 27(10): 4536-4543. DOI: 10.26355/eurev_202305_32460.
- [8] LUO D, SALAI A, LYU H, *et al.* FOXD2-AS1 acts an oncogene in esophageal squamous cell carcinoma through sponging miR-204-3p [J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(10): 1954-1963. DOI: 10.1007/s12094-022-02850-7.
- [9] RAJABI A, BASTANI S, MAYDANCHI M, *et al.* Moderate prognostic value of lncRNA FOXD2-AS1 in gastric cancer with helicobacter pylori infection[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2022, 53(3): 687-691. DOI: 10.1007/s12029-021-00686-y.
- [10] SU F, HE W, CHEN C, *et al.* The long non-coding RNA FOXD2-AS1 promotes bladder cancer progression and recurrence through a positive feedback loop with Akt and E2F1[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 233[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29445134/>. DOI: 10.1038/s41419-018-0275-9.
- [11] BRIDGES M C, DAULAGALA A C, KOURTIDIS A. LNCcation: lncRNA localization and function[J/OL]. *J Cell Biol*, 2021, 220(2): e202009045[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33464299/>. DOI: 10.1083/jcb.202009045.
- [12] KAUR P, SHANKAR E, GUPTA S. EZH2-mediated development of therapeutic resistance in cancer[J/OL]. *Cancer Lett*, 2024, 586: 216706[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38331087/>. DOI: 10.1016/j.canlet.2024.216706.
- [13] CHENG Y, SONG Z, FANG X, *et al.* Polycomb repressive complex 2 and its core component EZH2: potential targeted therapeutic strategies for head and neck squamous cell carcinoma[J/OL]. *Clin Epigenetics*, 2024, 16(1): 54[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38600608/>. DOI: 10.1186/s13148-024-01666-2.
- [14] MOHEBBI H, ESBATI R, HAMID RA, *et al.* EZH2-interacting lncRNAs contribute to gastric tumorigenesis; a review on the mechanisms of action[J/OL]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 334[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38393645/>. DOI: 10.1007/s11033-024-09237-7.
- [15] QIU T, DING Y, QIN J, *et al.* Epigenetic reactivation of PEG3 by EZH2 inhibitors suppresses renal clear cell carcinoma progress[J/OL]. *Cell Signal*, 2023, 107: 110662[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37001595/>. DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110662.

- [16] ZHAO Q S, YING J B, JING J J, *et al.* lncRNA FOXD2-AS1 stimulates glioma progression through inhibiting P53[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(8): 4382-4388. DOI: 10.26355/eurrev_202004_21019.
- [17] MIRZAEI S, GHOLAMI M H, HUSHMANDI K, *et al.* The long and short non-coding RNAs modulating EZH2 signaling in cancer [J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 18[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35236381/>. DOI: 10.1186/s13045-022-01235-1.
- [18] REN Z, HU Y, LI G, *et al.* HIF-1 α induced long noncoding RNA FOXD2-AS1 promotes the osteosarcoma through repressing p21[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109104[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31228799/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109104.
- [19] XU T P, WANG W Y, MA P, *et al.* Upregulation of the long noncoding RNA FOXD2-AS1 promotes carcinogenesis by epigenetically silencing EphB3 through EZH2 and LSD1, and predicts poor prognosis in gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2018, 37(36):5020-5036. DOI: 10.1038/s41388-018-0308-y.
- [20] ZHAO Y, SHELDON M, SUN Y, *et al.* New Insights into YAP/TAZ-TEAD-mediated gene regulation and biological processes in cancer[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(23): 5497[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38067201/>. DOI: 10.3390/cancers15235497.
- [21] CASTILLO C, GRIECO M, D'AMONE S, *et al.* Hypoxia effects on glioblastoma progression through YAP/TAZ pathway regulation [J/OL]. *Cancer Lett*, 2024, 588:216792[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38453044/>. DOI: 10.1016/j.canlet.2024.216792.
- [22] XU H, ZHOU W, ZHANG F, *et al.* PDS5B inhibits cell proliferation, migration, and invasion via upregulation of LATS1 in lung cancer cells [J/OL]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 168[2024-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34226509/>. DOI: 10.1038/s41420-021-00537-6.
- [23] QI S, ZHU Y, LIU X, *et al.* WWC proteins mediate LATS1/2 activation by Hippo kinases and imply a tumor suppression strategy[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(10): 1850-1864. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.03.027.
- [24] SHEN Z, PAN Y, CHEN P, *et al.* LATS1 exerts tumor suppressor functions via targeting Gli1 in colorectal cancer[J]. *J Cancer*, 2021, 12(24):7311-7319. DOI: 10.7150/jca.62211.
- [25] HONG S, HWANG H, SON D, *et al.* Inhibition of EZH2 exerts antitumorigenic effects in renal cell carcinoma via LATS1[J]. *FEBS Open Bio*, 2023, 13(4): 724-735. DOI: 10.1002/2211-5463.13579.

[收稿日期] 2024-11-11

[修回日期] 2025-01-14

[本文编辑] 向正华