

长链非编码 RNA HEATR3 反义 RNA 1 参与结直肠癌发生发展的功能及其临床意义

李梓绮¹, 魏闫若雪¹, 刘晓晗¹, 刘春铖¹, 赵然^{1,2}, 刘玉昆^{1,2}

(1.山东大学齐鲁医学院, 山东 济南 250012; 2.济宁医学院附属医院病理科, 山东 济宁 272029)

摘要:目的 探讨长链非编码 RNA HEATR3 反义 RNA 1 (lncRNA HEATR3 Antisense RNA 1, HEATR3-AS1) 在结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 中的表达特征、亚细胞定位模式、分子功能、临床病理意义及预后评估价值。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 法检测结直肠癌组织中 HEATR3-AS1 的表达水平, 荧光原位杂交技术明确其亚细胞定位, 并分析 HEATR3-AS1 表达与 HEATR3 mRNA 表达水平的相关性。通过分子克隆技术构建 HEATR3-AS1 的真核表达载体, 并构建其过表达细胞模型, 从而明确其对 HEATR3 mRNA 表达的影响。采用原位杂交技术检测其在结直肠癌患者肿瘤组织中的表达, 并探讨其表达与结直肠癌患者临床病理特征及不良生存预后的关联性。**结果** HEATR3-AS1 在结直肠癌组织中的表达量较正常组织显著上调 ($P=0.0192$), 且定位于结直肠癌细胞的细胞核。其表达水平与 HEATR3 mRNA 表达水平呈显著正相关 ($P=0.0202$), 且其过表达促进 HEATR3 mRNA 的表达 ($P=0.0077$)。其高表达与 TNM 分期 ($P=0.029$) 及淋巴结转移 ($P=0.036$) 存在显著统计学关联。生存分析表明, 相较于 HEATR3-AS1 低表达的结直肠癌患者群体, 其高表达结直肠癌患者的总生存期 (overall survival, OS) 显著缩短 ($P=0.0011$)。多因素 Cox 分析显示, HEATR3-AS1 高表达可作为结直肠癌患者独立的不良预后因素 ($HR=3.355, 95\%CI:1.632\sim7.193, P=0.0013$)。**结论** HEATR3-AS1 在结直肠癌中表达上调且特异性定位于细胞核, 其过表达可能参与 HEATR3 的转录调控过程, 其异常高表达可作为评估结直肠癌患者预后的独立危险因素, 有望成为结直肠癌分子分型和生存预测的新分子靶标。

关键词: 结直肠癌; 长链非编码 RNA HEATR3-AS1; 原位杂交; 荧光原位杂交; 预后

中图分类号: R735.3

文献标志码: A

The functional role and clinical significance of lncRNA HEATR3-AS1 in colorectal cancer tumorigenesis and progression

LI Ziqi¹, WEI Yanruoxue¹, LIU Xiaohan¹, LIU Chuncheng¹, ZHAO Ran^{1,2}, LIU Yukun^{1,2}

(1. Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China;

2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the expression characteristics, subcellular localization, molecular functions, clinicopathological significance, and prognostic evaluation value of long non-coding RNA HEATR3-AS1 in colorectal cancer (CRC). **Methods** Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression level of HEATR3-AS1 in CRC tissues, and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was used to clarify its subcellular localization. The correlation between the expression of HEATR3-AS1 and HEATR3 mRNA was analyzed. The eukaryotic expression vector containing HEATR3-AS1 was constructed using molecular cloning techniques and the HEATR3-AS1-overexpressed cell model was constructed to elucidate the effect of its overexpression on HEATR3 mRNA expression. *In situ* hybridization (ISH) was employed to analyze the correlation of its expression in CRC tissues with clinicopathological features and poor prognosis in CRC patients. **Results** The expression of HEATR3-AS1 in CRC tissues demonstrated a marked upregulation compared with paracancerous normal tissues ($P=0.0192$) and was explicitly localized in the nucleus of CRC cells. A significant positive correlation was observed between HEATR3-AS1 and HEATR3 mRNA

expression levels ($P=0.0202$), and its overexpression promoted the expression of HEATR3 mRNA ($P=0.0077$). High expression of HEATR3-AS1 was significantly associated with advanced TNM stage ($P=0.029$) and lymph node metastasis ($P=0.036$). Survival curve analysis revealed that colorectal cancer patients with elevated HEATR3-AS1 expression experienced a marked reduction in overall survival (OS) compared to those with low expression ($P=0.0011$). Multivariate Cox analysis confirmed that high expression of HEATR3-AS1 could serve as an independent poor prognostic factor in CRC patients (HR=3.355, 95% CI=1.632-7.193, $P=0.0013$). **Conclusion** HEATR3-AS1 is overexpressed and specifically localized in the nucleus of CRC cells. Its overexpression may regulate the transcription of HEATR3, and its aberrantly high expression serves as an independent prognostic factor for colorectal cancer, highlighting its potential as a novel biomarker for molecular classification and survival prediction in CRC.

Key words: Colorectal cancer; lncRNA HEATR3 Antisense RNA 1; In situ hybridization; Fluorescence in situ hybridization; Prognosis

结直肠癌在恶性肿瘤发病率中位居第三位,其发病机制涉及遗传变异、表观遗传调控异常及信号通路失调^[1-4]。手术联合放化疗虽可显著改善早期患者的预后,但晚期结直肠癌患者仍面临高转移率、耐药性及生存率低等严峻挑战^[5-7]。因此,深入阐明结直肠癌的分子发病机制,筛选具有诊断和预后价值的新型结直肠癌生物标志物及潜在治疗干预靶点,仍是当前亟待解决的重要科学问题。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 通过调控基因表达、染色质重塑及 miRNA 海绵作用参与肿瘤进展^[8-11]。例如, lncRNA HOTAIR 通过招募 Polycomb 抑制复合物促进乳腺癌转移^[12]; 肺腺癌相关转录子 1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 则通过调控基因表达主动驱动肺癌转移, 可作为肺癌转移发展的预测标志物^[13-14]。研究表明, lncRNA 具有成为肿瘤诊断标志物或治疗靶点的巨大潜力。HEAT 重复包含蛋白 3 (HEAT repeat containing 3, HEATR3) 是一个位于人类染色体 16q12.1 上的蛋白编码基因, HEATR3 蛋白作为分子伴侣参与核糖体生物合成^[15]。近年研究表明, HEATR3 在恶性肿瘤中异常表达并参与肿瘤进展, HEATR3 与甘露糖结合凝集素 2 (mannose-binding lectin 2, LMAN2) 相互作用, 通过对蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的激活, 推动人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 阳性乳腺癌的疾病进展及加剧炎症反应^[16]。长链非编码 RNA HEATR3 反义 RNA 1 (lncRNA HEATR3-AS1, HEATR3-AS1) 是位于 HEATR3 基因反义链的 lncRNA, 现有研究尚未明确其在结直肠癌中的表达模式及临床相关性。

本研究通过检测结直肠癌组织中 HEATR3-AS1 的表达水平、亚细胞定位, 分析其表达与 HEATR3 mRNA 表达的相关性以及其过表达对

HEATR3 mRNA 表达水平的影响, 同时评估其与结直肠癌患者临床病理特征及生存预后的相关性, 并借助 Cox 回归模型评估其作为独立预后标志物的潜在价值。旨在初步探讨其在结直肠癌发生及恶性进展过程中的功能角色, 并为结直肠癌的分子分型、生存预后预测、个体化靶向治疗方案及靶向药物研发提供新的理论视角。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 组织标本

回顾性分析收集 2008 年 12 月至 2017 年 12 月济宁医学院附属医院病理科存档的 151 例结直肠癌石蜡包埋组织样本, 其中男 73 例, 女 78 例, 36~84 岁, 中位年龄 62 岁。随访时间约为 109 个月。本研究经济宁医学院附属医院伦理委员会批准 (2023-11-B002)。

1.1.2 主要试剂

HEATR3-AS1 地高辛标记的寡核苷酸探针 (5'-ACAGACCACCGAGAGAGGGAGGGCAACAGCA-DIG-3')、原位杂交专用 PBS 缓冲液、原位杂交检测试剂盒 V (fluorescein isothiocyanate, FITC)、原位杂交检测试剂盒 I (peroxidase, POD)、焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC)、原位杂交 2 \times 氯化钠-柠檬酸钠缓冲液 (saline-sodium citrate buffer, SSC) 购自武汉博士德生物工程有限公司, 3,3'-二氨基联苯胺 (3,3'-Diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司, 苏木精染色液购自上海碧云天生物技术有限公司, 无水乙醇、二甲苯等试剂均购自国药济宁有限公司, 中性树胶封片剂以及抗荧光衰减封片剂购自北京索莱宝科技有限公司, TRIzol 购自英潍捷基 (上海) 贸易有限公司, 逆转录试剂盒及 Lipofectamine 3000 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自康为世纪生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HEATR3-AS1 表达载体构建及转染

抽提正常组织细胞的基因组 DNA, 并利用 HEATR3-AS1 上游克隆引物序列为 5'-GAATTC-CGTCTCGCCTCCCGGCCCGAC-3', 下游克隆引物序列为 5'-AAGCTTAAGAAGTTAATGCCTGTTT-TAATCACAACCAC-3' 对其全长序列进行克隆, 并在引物末端分别添加 EcoR I 和 Hind III 酶切位点, 经 PCR 扩增后, 用 EcoR I 和 Hind III 对 PCR 产物及 pcDNA3.1 载体进行双酶切, 回收后连接。用 Lipo3000 转染细胞, 6 h 后更换完全培养基, 36 h 后检测过表达水平。

1.2.2 采用 RT-qPCR 法检测组织及细胞中 HEATR3-AS1 与 HEATR3 的表达

采用 TRIzol 法(按说明书操作)提取患者结直肠癌组织与癌旁正常组织样本、对照组与 HEATR3-AS1 过表达组细胞总 RNA, 借助 NanoDrop 分光光度计进行 RNA 提取物的浓度定量分析。利用逆转录试剂盒, 通过逆转录过程合成 cDNA。按照 Ultra-SYBR Mixture 说明书, 以 U6 为内参基因进行 RT-qPCR。HEATR3-AS1 的上游引物序列为 5'-CG-TAGGGGAGAAGTGGAGTC-3', 下游引物序列为 5'-CTGGACAGCAGAGTGAGACT-3'; U6 的上游引物序列为 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3', 下游引物序列为 5'-GGAACGCTTCACGAA-TTTG-3'; HEATR3 的上游引物序列为 5'-AAAAG-GCCCAATCCCAGTA-3', 下游引物序列为 5'-GGGCTGGGAAACAATCTTGG-3', GAPDH 的上游引物序列为 5'-AATCCCATCACCATCTTC-3', 下游引物序列为 5'-AGGCTGTTGTCATACTTC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 HEATR3-AS1 及 HEATR3 mRNA 的相对表达量。

1.2.3 采用荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 法检测结直肠癌细胞中 HEATR3-AS1 定位

细胞接种于经多聚赖氨酸处理的盖玻片表面, 利用 0.5 mol/L PBS (PH7.4) 洗涤 2 min, 3 次, 用 4% 多聚甲醛 (含 1/1 000 DEPC) 室温固定 30 min, 经去离子水漂洗, 滴加现用现配的 3% 柠檬酸稀释胃蛋白酶溶液, 于 37 °C 条件下消化 30 s, 0.5 mol/L PBS 洗 3 次, 5 min/次, 去离子水单次漂洗。37 °C 预杂交 3 h, 地高辛标记的寡核苷酸探针使用杂交液适当稀释, 置于 37 °C 环境中过夜, 2×SSC 漂洗 2 次, 5 min/次; 0.5×SSC 溶液漂洗 1 次, 持续 15 min; 0.2×SSC 溶液漂洗 1 次, 持续 15 min; 于 37 °C 环境下封

闭处理 30 min。逐滴滴入生物素化鼠抗地高辛抗体, 于 37 °C 条件下孵育 1 h。0.5 mol/L PBS 洗 4 次, 5 min/次。滴加 SABC-FITC 37 °C 孵育 30 min。0.5 mol/L PBS 洗 5 min, 3 次。DAPI 复染, 用抗荧光衰减封片剂封片后, 荧光显微镜观察。

1.2.4 采用原位杂交技术 (in situ hybridization, ISH) 检测结直肠癌组织及正常组织中 HEATR3-AS1 的表达水平及模式

经标准石蜡切片脱蜡至水, 用 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 去离子水漂洗 2 次, 将现配现用的 3% 柠檬酸稀释胃蛋白酶溶液逐滴滴加至样本表面, 于 37 °C 恒温消化 3 min。依次进行 0.5 mol/L PBS 漂洗 3 次, 5 min/次, 并用去离子水单次漂洗。随后 37 °C 恒温箱预杂交 3 h, 杂交液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针, 37 °C 过夜杂交。37 °C 条件下, 2×SSC 溶液漂洗 2 次, 5 min/次; 0.5×SSC 溶液单次漂洗 15 min; 0.2×SSC 漂洗 15 min。将样本置于 37 °C 环境中封闭处理 0.5 h。缓慢加入生物素标记的鼠抗地高辛抗体, 37 °C 孵育 1 h。0.5 mol/L PBS 漂洗 4 次, 5 min/次。滴入链霉亲和素-生物素复合物, 37 °C 反应 20 min。0.5 mol/L PBS 漂洗 3 次, 5 min/次, 滴入生物素化过氧化物酶, 37 °C 孵育 20 min。0.5 mol/L PBS 漂洗 4 次, 5 min/次。DAB 显色系统完成显色反应, 流水冲去显色剂, 苏木精复染细胞核。随后经梯度乙醇脱水处理, 进行二甲苯透明化, 封片。200×明场显微镜下, 根据 DAB 染色强度 (0~3 分) 及阳性细胞比例 (0~4 分) 评分, ISH 得分 = 染色强度 + 阳性细胞比, 总分 ≥ 4 分为高表达。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 10 及 SPSS 29.0.1.0 统计学软件。组间比较采用两独立样本 *t* 检验。HEATR3-AS1 与 HEATR3 mRNA 表达的相关性采用 Pearson 直线相关与回归分析。采用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率法对 HEATR3-AS1 的表达水平与临床病理学特点之间的关系展开分析。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 组间生存差异比较采用 Log-rank 检验。多因素 Cox 回归模型筛选独立预后预测因子。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HEATR3-AS1 在结直肠癌组织细胞中的表达及定位

与正常对照组织相比, HEATR3-AS1 的表达水平在结直肠癌组织中显著上调 ($t = 2.502, P = 0.0192$),

见图 1A。FISH 结果表明,HEATR3-AS1 (绿色) 主要定位于结直肠癌细胞的细胞核内(图 1B,黑色箭头指示核内信号)。

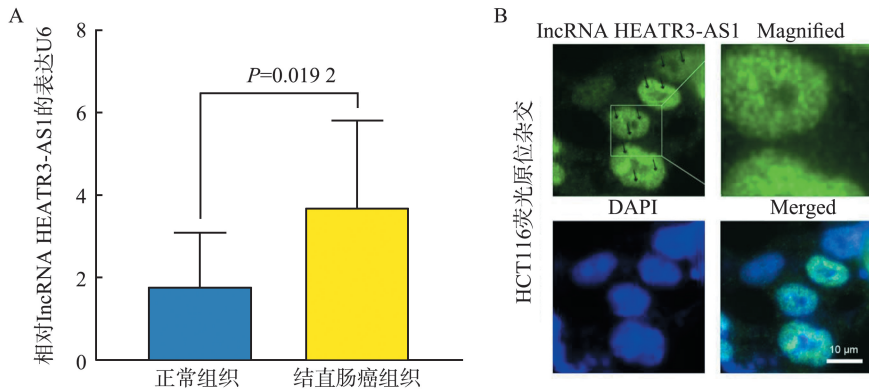


图 1 HEATR3-AS1 在结直肠癌组织中的表达(A)及结直肠癌细胞中的定位(B)

Figure 1 The expression (A) and the localization (B) of HEATR3-AS1 in CRC tissues and cells

2.2 HEATR3-AS1 与 HEATR3 mRNA 的表达相关性

HEATR3-AS1 与 HEATR3 mRNA 的表达水平呈显著正相关($r^2=0.2936$, $P=0.0202$),见图 2。

2.3 HEATR3-AS1 过表达对 HEATR3 mRNA 表达的影响

与对照组相比,过表达组 HEATR3-AS1 成功过表达($P<0.001$),表明 HEATR3-AS1 过表达细胞模型构建成功,见图 3A。而且 HEATR3-AS1 过表达组的 HEATR3 mRNA 相对表达水平显著上调($P=0.0077$),表明 HEATR3-AS1 过表达能够促进 HEATR3 mRNA 表达,见图 3B。

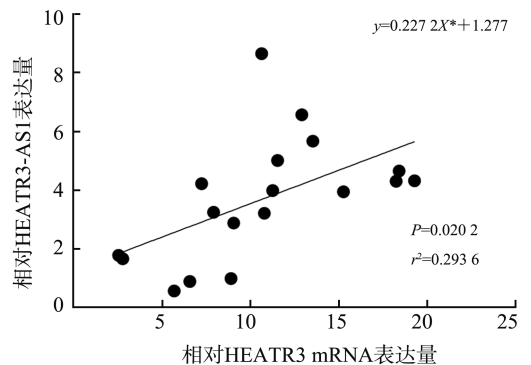


图 2 结直肠癌组织中 HEATR3-AS1 与 HEATR3 mRNA 的表达相关性

Figure 2 The correlation between the expression of HEATR3-AS1 and HEATR3 mRNA in CRC tissues

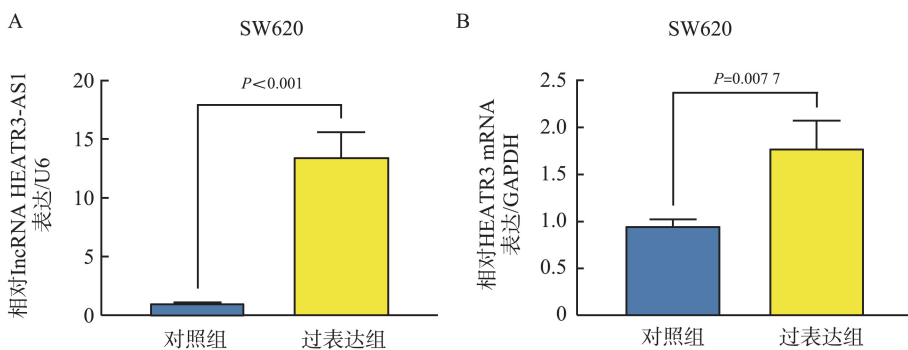


图 3 HEATR3-AS1 过表达对 HEATR3 mRNA 表达水平的影响

A: HEATR3-AS1 过表达 SW620 细胞系的鉴定;B: HEATR3-AS1 过表达促进 HEATR3 mRNA 表达。

Figure.3 The influence of HEATR3-AS1 overexpression on the expression level of HEATR3 mRNA

A: Identification of the SW620 Cell Line with Overexpressed HEATR3-AS1; B: HEATR3-AS1 overexpression promote the expression of HEATR3 mRNA.

2.4 结直肠癌组织中 HEATR3-AS1 的表达特征及其临床病理意义分析

ISH 数据表明,与正常组织相比较,HEATR3-AS1 在结直肠癌组织内的表达水平显著提高

(图 4),淋巴结转移($P=0.036$)以及 TNM 分期($P=0.029$)均与 HEATR3-AS1 的上调表达呈显著相关性,见表 1。

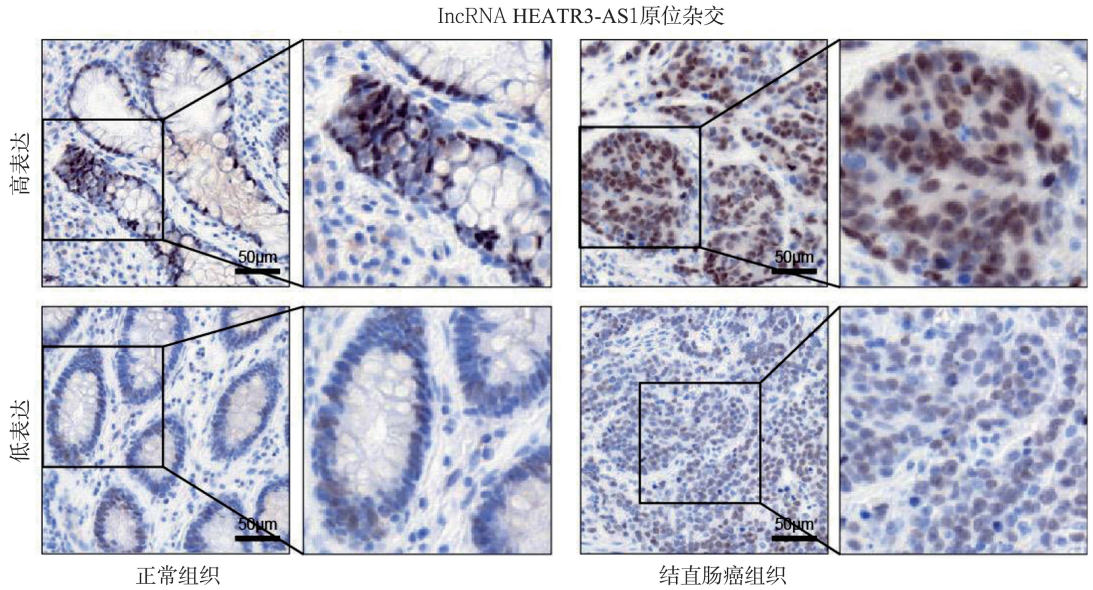


图4 结直肠癌组织与配对正常组织中 HEATR3-AS1 的差异表达

Figure 4 The dysregulated expression of HEATR3-AS1 in CRC tissues relative to adjacent non-malignant tissues

表1 结直肠癌患者 HEATR3-AS1 的表达特征与临床病理特点的相关性

Table 1 The association between the expression of HEATR3-AS1 and the clinicopathological features of patients with CRC

临床病理参数	HEATR3-AS1 的表达水平		χ^2	<i>P</i>
	高表达(<i>n</i> = 77)	低表达(<i>n</i> = 74)		
年龄/岁			0.011	0.915
>60(<i>n</i> = 83)	42(50.60)	41(49.40)		
≤60(<i>n</i> = 68)	35(51.47)	33(48.53)		
性别			1.104	0.293
女(<i>n</i> = 78)	43(55.13)	35(44.87)		
男(<i>n</i> = 73)	34(46.58)	39(53.42)		
肿瘤部位			0.052	0.820
结肠(<i>n</i> = 70)	35(50.00)	35(50.00)		
直肠(<i>n</i> = 81)	42(51.85)	39(48.15)		
肿瘤大小/cm			1.889	0.169
>4(<i>n</i> = 100)	47(47.00)	53(53.00)		
≤4(<i>n</i> = 51)	30(58.82)	21(41.18)		
淋巴结转移			4.395	0.036
有(<i>n</i> = 64)	39(60.94)	25(39.06)		
无(<i>n</i> = 87)	38(43.68)	49(56.32)		
分化程度			—	0.121 ^a
高(<i>n</i> = 5)	1(20.00)	4(80.00)		
中(<i>n</i> = 61)	27(44.26)	34(55.74)		
低(<i>n</i> = 85)	49(57.65)	36(42.35)		
TNM 分期			4.771	0.029
I + II(<i>n</i> = 68)	28(41.18)	40(58.82)		
III + IV(<i>n</i> = 83)	49(59.04)	34(40.96)		

注:^a 表示采用 Fisher 确切概率法。

2.5 HEATR3-AS1 的表达水平与结直肠癌患者预后的关系

在结直肠癌患者中,HEATR3-AS1 高表达组总生存率相较于低表达组显著降低($P=0.0011$),见图5。单因素 Cox 回归分析显示,患者年龄(>60 岁, $HR=2.036$, $95\%CI=1.032\sim4.299$, $P=0.0484$)、淋巴结转移($HR=3.673$, $95\%CI=1.890\sim7.467$, $P=0.0002$)、TNM 分期(III+IV期, $HR=2.064$, $95\%CI=1.061\sim4.132$, $P=0.0351$)及 HEATR3-AS1 高表达($HR=2.962$, $95\%CI=1.514\sim5.987$, $P=0.0018$)与结直肠癌患者不良预后相关(表2),差异有统计学意义。进一步多因素 Cox 回归分析表明,患者淋巴结转移($HR=3.834$, $95\%CI=1.735\sim8.939$, $P=0.0013$)及 HEATR3-AS1 高表达($HR=3.355$, $95\%CI=1.632\sim7.193$,

$P=0.0013$)是结直肠癌患者预后不良的独立危险因素(表2),差异有统计学意义。

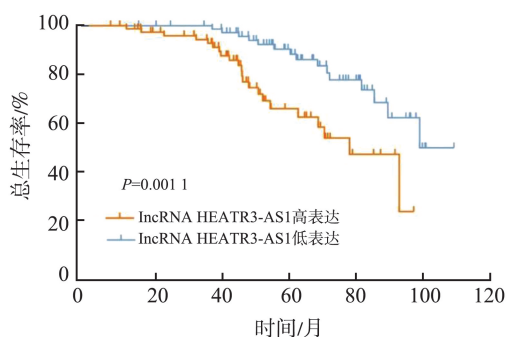


图5 Kaplan-Meier 生存曲线评估 HEATR3-AS1 的 RNA 水平与结直肠癌患者总生存期的比较

Figure 5 Kaplan-Meier survival curve evaluates the relationship between the levels of HEATR3-AS1 and the OS of CRC patients

表2 单因素和多因素 Cox 回归分析结直肠癌患者总生存期的预测因素

Table 2 Univariate and multivariate Cox regression analysis of predictors of OS in patients with CRC

临床病理参数	单因素分析		多因素分析	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
lncRNA HEATR3-AS1 的表达水平 (高表达 vs. 低表达)	2.962 (1.514~5.987)	0.0018	3.355 (1.632~7.193)	0.0013
年龄(>60岁 vs. ≤60岁)	2.036 (1.032~4.299)	0.0484	2.030 (1.006~4.362)	0.0559
性别(女 vs. 男)	0.929 (0.482~1.783)	0.8230		
肿瘤部位(结肠 vs. 直肠)	0.695 (0.349~1.335)	0.2831		
肿瘤大小(>4 cm vs. ≤4 cm)	0.963 (0.493~1.990)	0.9158		
淋巴结转移(有 vs. 无)	3.673 (1.890~7.467)	0.0002	3.834 (1.735~8.939)	0.0013
分化程度(低 vs. 高-中)	1.763 (0.915~3.519)	0.0958		
TNM 分期(III+IV vs. I+II)	2.064 (1.061~4.132)	0.0351	0.8093 (0.341~1.920)	0.6304

3 讨论

已有研究表明,lncRNA 在恶性肿瘤的发生及恶性进展过程中发挥重要调控作用,其广泛地异常表达与恶性肿瘤的异常增殖、凋亡信号通路的抑制、侵袭转移能力增强以及免疫微环境重塑等过程相关。比如,lncRNA DSCAM-AS1 在多种肿瘤中异常表达,其表达上调可通过参与调控肿瘤细胞增殖能力、侵袭能力、远处转移潜能及化疗耐药性等过程驱动肿瘤恶性进展^[17]。本研究首次检测了 HEATR3-AS1 在结直肠癌组织及其癌旁对照组织中的表达,在肿瘤组织中该分子的表达水平呈现显著上调趋势,提示其可能作为潜在的致癌因子参与结直肠癌的发生发展。因此推断 HEATR3-AS1 异常高表达可能参与结直肠癌恶性进展。

研究表明,lncRNA 的亚细胞定位是决定其分子功能的核心机制,其在细胞质和细胞核中均呈现

广泛分布特征。比如,lncRNA PYCARD-AS1 在细胞质和细胞核中均呈显著表达,亚细胞定位模式不同,其分子功能也不同,在细胞质中能够通过和 PYCARD mRNA 间的互作抑制核糖体组装及 PYCARD 的转录。LncRNA PYCARD-AS1 定位于细胞核时,主要募集 DNMT1 及 G9a 至 PYCARD 启动子,从而促进 DNA 甲基化和 H3K9me2 修饰^[18]。lncRNA HOTAIR 主要定位于宫颈癌细胞的细胞质中,具有海绵吸附功能,通过靶向 miR-331-3p/RCC2 轴在宫颈癌中发挥致癌作用^[19]。本研究结果发现,HEATR3-AS1 主要定位于结直肠癌细胞核内,而且作为 HEATR3 基因的反义 RNA,其与 HEATR3 mRNA 的表达呈显著正相关,在结直肠癌细胞中过表达,能够显著促进 HEATR3 mRNA 的表达。由此提示,HEATR3-AS1 可能通过调控 HEATR3 基因的转录或表观遗传修饰,参与结直肠癌的发生及进展。这一基因组特征提示 HEATR3-AS1 可能通过顺式调控机制影响邻近基

因(HEATR3)的表达。

HEATR3 是位于人类染色体 16q12.1 上的蛋白编码基因,其在多种正常组织中均广泛表达,而且在多种恶性肿瘤组织中异常高表达,其不仅参与机体正常生理活动的稳态调节,也广泛地参与恶性肿瘤的发生发展。HEATR3 突变及核糖体生物合成相关核输入蛋白的不稳定驱动先天性纯红细胞再生障碍性贫血的发生发展^[15,20]。HEATR3 在德系犹太人群中可通过 NOD2 介导的 NF- κ B 信号传导通路驱动克罗恩病的发生发展^[21]。HEATR3 同样通过调控 Akt/ERK 信号通路促进膀胱癌的发生发展^[22]。本研究结果发现,结直肠癌组织中 HEATR3-AS1 表达与 HEATR3 mRNA 表达呈显著正相关。进一步通过构建 HEATR3-AS1 稳定过表达细胞模型证实,HEATR3-AS1 过表达可显著上调 HEATR3 mRNA 水平,提示 HEATR3-AS1 可能通过参与 HEATR3 的表达调控,最终再参与机体的各种病理生理活动,其中包括恶性肿瘤的发生发展。

近年研究发现,lncRNA 在血液中具有较好的稳定性,常作为肿瘤早期检测及不良预后预测的生物标志物。LncRNA H19 在肝癌等多种恶性肿瘤组织中异常高表达,从而促进肿瘤细胞增殖与转移,诱导肿瘤细胞产生耐药性,并且其高表达与患者不良预后相关^[23]。在乳腺癌中 lncRNA HOTAIR 表达水平作为转移及预后的预测因素^[12,24]。lncRNA MALAT1 在肺癌中被视为转移预测因素及治疗靶点,通过反义寡核苷酸沉默核内 lncRNA MALAT1 可成功抑制肿瘤转移^[12];其与胃癌、声门上型喉癌、乳腺癌及非小细胞肺癌患者的化疗耐药和不良预后相关^[25-29];其在肝癌及三阴性乳腺癌中可作为术后复发的独立预测因素^[30-31]。本研究统计分析显示,HEATR3-AS1 高表达状态与淋巴结转移、TNM 分期及结直肠癌患者的不良临床结局显著相关。此外,通过单因素和多因素 Cox 回归评估显示,HEATR3-AS1 可作为结直肠癌患者不良预后的独立风险标志物(HR = 3.355, P = 0.001 3)。由此提示,HEATR3-AS1 可作为现有临床分层的补充标志物,优化患者风险分层。此外,HEATR3-AS1 的核定位特性为开发靶向治疗策略提供了方向。

然而,本研究尚存在一定局限性。首先,样本均来源于单一医疗中心,可能存在选择偏倚,未来需通过多中心队列验证结果的普适性;其次,HEATR3-AS1 的功能机制尚未明确,其过表达及敲除对结直肠癌细胞增殖、细胞周期进程及上皮-间质转化

(EMT)等的具体调控分子机制存在研究空白,仍需通过体外敲除和过表达实验结合转录组学分析,系统解析其下游靶基因及调控网络;最后,HEATR3-AS1 是否通过调控 HEATR3 基因或其他远端信号通路(如 Wnt/ β -catenin)影响结直肠癌进展,仍需进一步探索。

综上所述,核内 lncRNA HEATR3-AS1 在结直肠癌组织中异常高表达,提示其具有促癌功能;其主要定位于细胞核内,而且其过表达能够促进 HEATR3 mRNA 的表达,提示 HEATR3-AS1 可能作为表观遗传调控因子调控 HEATR3 转录过程;此外,HEATR3-AS1 高表达与患者淋巴结转移以及 TNM 分期均显著相关,表明其促进结直肠癌的发生及恶性进展;最后,单因素和多因素分析结果进一步证实 lncRNA HEATR3 能够作为一个独立的预测因素预测结直肠癌患者的不良预后。本研究为解析结直肠癌分子发病机制,完善分子分型体系及预后评估等提供了新的方向和生物标志物。

参考文献:

- [1] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [2] Li Q, Geng S, Luo H, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 266. doi: 10.1038/s41392-024-01953-7
- [3] Johdi NA, Sukor NF. Colorectal cancer immunotherapy: options and strategies [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1624. doi: 10.3389/fimmu.2020.01624
- [4] 魏闫若雪,李梓绮,刘春铨,等.结直肠癌中 SP1 的瘤内异质性表达及其临床意义[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2024, 62(5): 89-94.
WEI Yanruoxue, LI Ziqi, LIU Chuncheng, et al. Intratumor heterogeneity of SP1 expression in colorectal cancer and its clinical significance [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2024, 62(5): 89-94.
- [5] Brody H. Colorectal cancer [J]. *Nature*, 2015, 521(7551): S1. doi:10.1038/521s1a
- [6] Hussen BM, Sulaiman SHA, Abdullah SR, et al. MiRNA-155: a double-edged sword in colorectal cancer progression and drug resistance mechanisms [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 299: 140134. doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.140134
- [7] Shin AE, Giancotti FG, Rustgi AK. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, 44(4): 222-236.

- [8] Herman AB, Tsitsipatis D, Gorospe M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12): 2252-2266.
- [9] Ali T, Grote P. Beyond the RNA-dependent function of lncRNA genes [J]. *eLife*, 2020, 9: e60583. doi: 10.7554/elife.60583
- [10] Lin XT, Zhuang SW, Chen X, et al. lncRNA ITGB8-AS1 functions as a CeRNA to promote colorectal cancer growth and migration through integrin-mediated focal adhesion signaling[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(2): 688-702.
- [11] Entezari M, Taheriazam A, Orouei S, et al. lncRNA-miRNA axis in tumor progression and therapy response: an emphasis on molecular interactions and therapeutic interventions [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154: 113609. doi:10.1016/j.biopha.2022.113609
- [12] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 1071-1076.
- [13] Gutschner T, Hämmerle M, Eissmann M, et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(3): 1180-1189.
- [14] Xu WW, Jin J, Wu XY, et al. MALAT1-related signaling pathways in colorectal cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 126. doi: 10.1186/s12935-022-02540-y
- [15] O'Donohue MF, Da Costa L, Lezzerini M, et al. HEATR3 variants impair nuclear import of uL18 (RPL5) and drive Diamond-Blackfan Anemia [J]. *Blood*, 2022, 139(21): 3111-3126.
- [16] Xiao S, Yu T, Yang F, et al. LMAN2 interacts with HEATR3 to expedite HER2-positive breast cancer advancement and inflammation and Akt/ERK/NF- κ B signaling[J]. *Biochem Cell Biol*, 2025, 103: 1-11. doi: 10.1139/bcb-2024-0166
- [17] Hu C. lncRNA DSCAM-AS1: a pivotal therapeutic target in cancer[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2023, 23(5): 530-536.
- [18] Miao H, Wang L, Zhan H, et al. A long noncoding RNA distributed in both nucleus and cytoplasm operates in the PYCARD-regulated apoptosis by coordinating the epigenetic and translational regulation[J]. *PLoS Genet*, 2019, 15(5): e1008144. doi: 10.1371/journal.pgen.1008144
- [19] Buranjang G, Abuduwanke A, Li XW, et al. lncRNA HOTAIR enhances RCC2 to accelerate cervical cancer progression by sponging miR-331-3p [J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(6): 1650-1660.
- [20] Pelagiadis I, Kyriakidis I, Katzilakis N, et al. The diverse genomic landscape of diamond-blackfan Anemia: two novel variants and a mini-review[J]. *Children (Basel)*, 2023, 10(11): 1812. doi:10.3390/children10111812
- [21] Zhang W, Hui KY, Gusev A, et al. Extended haplotype association study in Crohn's disease identifies a novel, Ashkenazi Jewish-specific missense mutation in the NF- κ B pathway gene, HEATR3 [J]. *Genes Immun*, 2013, 14(5): 310-316.
- [22] Dou X, Ma XY, Meng WT, et al. HEATR3 involved in the cell proliferation, metastasis and cell cycle development of bladder cancer acts as a tumor suppressor [J]. *Mol Genet Genom*, 2023, 298(6): 1353-1364.
- [23] Hashemi M, Moosavi MS, Abed HM, et al. Long non-coding RNA (lncRNA) H19 in human cancer: From proliferation and metastasis to therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 184: 106418. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106418
- [24] Raju GSR, Pavitra E, Bandaru SS, et al. HOTAIR: a potential metastatic, drug-resistant and prognostic regulator of breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 65. doi:10.1186/s12943-023-01765-3
- [25] Xu W, Ding M, Wang B, et al. Molecular mechanism of the canonical oncogenic lncRNA MALAT1 in gastric cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(42): 8800-8809.
- [26] 甄全胜, 王立娟, 刘冬梅. 声门上型喉癌患者血清 lncRNA MALAT1、miR-204-5p 表达与预后的关系 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2024, 31(11): 698-702. ZHEN Quansheng, WANG Lijuan, LIU Dongmei. Relationship between serum lncRNA MALAT1 and miR-204-5p expression and prognosis in patients with supraglottic carcinoma [J]. *Chinese Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 2024, 31(11): 698-702.
- [27] 徐伟强, 章平. lncRNA MALAT1 在胃癌组织中的表达及其与临床病理特征和预后关系的研究 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2024, 58(4): 401-405. XU Weiqiang, ZHANG Ping. Expression of lncRNA MALAT1 in gastric cancer and its relationship with clinicopathological features and prognosis [J]. *Journal of Harbin Medical University*, 2024, 58(4): 401-405.
- [28] 梁亚海, 李金媚, 彭晓霞, 等. 血清 lncRNA MALAT1 和 microRNA-124 水平检测对非小细胞肺癌患者预后的评估价值 [J]. *现代肿瘤医学*, 2024, 32(7): 1254-1259.