

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.09.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.09.002

长链非编码 RNA BC032469 通过调控 hTERT 影响肺癌细胞的增殖、迁移及侵袭

秦桂香¹, 潘林清²

(1. 南通市第一人民医院急诊科, 江苏 南通 226001; 2. 连云港市妇幼保健院生殖中心, 江苏 连云港 222000)

[摘要] 目的: 探讨长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)BC032469在肺癌细胞系中的表达及对细胞增殖、迁移和侵袭的影响。方法: 采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)测定肺癌细胞系(H1437, A549, H1299, H1975及H460)和人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, HBE)中lncRNA BC032469的表达; 设计沉默lncRNA BC032469的siRNA, 利用qRT-PCR检测lncRNA BC032469 siRNA在肺癌细胞中的沉默效率; CCK-8法检测细胞增殖能力的变化; 划痕和Transwell试验评估细胞的迁移和侵袭能力的变化; qRT-PCR及Western印迹法分别测定hTERT mRNA和蛋白水平表达的变化。结果: LncRNA BC032469在肺癌细胞系(H1437, A549, H1299, H1975及H460)中相对表达量高于HBE($P < 0.05$)。沉默lncRNA BC032469后, 可以抑制H460细胞的增殖、迁移和侵袭, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: LncRNA BC032469在肺癌细胞系中高表达, 沉默lncRNA BC032469抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 其机制可能与下调hTERT表达有关, 提示lncRNA BC032469可以作为临床肺癌治疗的潜在靶标。

[关键词] 肺癌; 非编码RNA BC032469; 增殖; 迁移; 侵袭

Downregulation of long non-coding RNA BC032469 suppresses lung cancer cell proliferation, migration and invasion by regulating hTERT

QIN Guixiang¹, PAN Linqing²

(1. Department of Emergency, Nantong First People's Hospital, Nantong Jiangsu 226001; 2. Reproductive Medical Center, Lianyungang Maternal and Child Health Care Hospital, Lianyungang Jiangsu 222000, China)

Abstract **Objective:** To explore the expression of long non-coding RNA (lncRNA BC032469) in lung cancer cell lines and its effect on proliferation, migration and invasion. **Methods:** We compared the expression of lncRNA BC032469 in lung cancer cell lines (H1437, A549, H1299, H1975 and H460) and human bronchial epithelial cells (HBE) by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). qRT-PCR was used to detect the silence efficiency of lncRNA BC032469 silence sequence. The proliferation, migration and invasion ability of cells were assessed by CCK-8 assay, Scratch assay and Transwell assay after the lncRNA BC032469 siRNA transfection. qRT-PCR and Western blot were

收稿日期 (Date of reception): 2018-05-26

通信作者 (Corresponding author): 潘林清, Email: js2018lyg@sina.com

used to detect the expression of hTERT. **Results:** qRT-PCR results showed that lncRNA BC032469 expression was higher in lung cancer cells ($P<0.05$). Knockdown of lncRNA BC032469 inhibited proliferation, migration and invasion of H460 cells ($P<0.05$). **Conclusion:** lncRNA BC032469 is highly expressed in lung cancer cells. Knockdown of lncRNA BC032469 inhibits lung cancer cells proliferation, migration and invasion and the mechanism may be related to the down-regulated of hTERT, which indicating that lncRNA BC032469 may be a candidate target of lung cancer gene therapy.

Keywords lung cancer; long non-coding RNA BC032469; proliferation; migration; invasion

世界范围内, 肺癌以92%的病死率高居肿瘤致死率之首, 同时也是男性发病率和病死率最高的肿瘤^[1]。虽然近年来肺癌的靶向治疗研究取得了一定的进展, 但其5年生存率仍然低于16%^[2-3], 主要由于大多数患者确诊时已处于晚期, 发生淋巴结转移患者的预后往往也较差^[4]。因此, 寻找合适的早期诊断靶点和预后标志, 对提高肺癌患者的生存率具有重要意义^[5]。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于200 nt的非编码RNA, 在转录沉默、转录激活、核内运输、染色体修饰等方面均具有重要的功能^[6]。近年来关于lncRNA在肿瘤中的研究引起了广泛的关注, 其主要功能不是编码蛋白质, 而是通过调控靶基因的表达或竞争性靶向miRNA调控肿瘤的生物学过程^[7-8]。最早在胃癌细胞中发现lncRNA BC032469异常高表达^[9], 并且与肿瘤大小、细胞分化和胃癌患者生存时间息息相关; 同时也在胃癌细胞的增殖、细胞周期的调控方面发挥重要的生物学功能^[10]。然而目前lncRNA BC032469在肺癌细胞系中的表达及其对增殖和迁移的影响未见报道。本研究旨在探讨lncRNA BC032469在肺癌细胞系中的表达及其对增殖和迁移的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

H1299, A549, H1975, H1437, H460等人肺癌细胞系和正常的人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, HBE)购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)细胞库和中国医学科学院上海细胞库, 按照细胞使用说明冷冻保存以及传代培养。在添加了10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养HEB。DMEM细胞培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司; 胰酶-EDTA购自美国Sigma公司; 转染脂质体Lipofectamine™

2000转染细胞购自美国Invitrogen公司。CCK-8试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司; 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。Transwell小室和Matrigel基质胶购自美国BD公司; hTERT抗体(1:1 000)、山羊抗兔IgG(H+L)和山羊抗鼠IgG(H+L)的二抗(1:5 000)购自美国Proteintech公司; GAPDH(1:1 000)购自美国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养和传代

采用Lipofectamine™ 2000转染试剂转染对应的siRNA, 详细的操作过程如下: 转染前将处于对数期生长的H460细胞接种到6孔板中; 当细胞融合度为80%~90%时, 对细胞进行siRNA转染; lncRNA BC032469 siRNA和Lipofectamine™ 2000分别用无血清培养基稀释, 然后混匀, 在室温下静置孵育5 min, 将转染混合试剂加入到培养板中进行转染, 培养6~8 h后吸出转染培养液, 加入新鲜的含血清的无双抗的DMEM培养基继续培养。

1.2.2 CCK-8法检测细胞的增殖能力

用对照和特异性的lncRNA BC032469分别转染对数期生长的H460细胞, 8 h后, 将100 μ L含细胞数为2 000个的培养基加入到96孔板中, 分别在24, 48, 72 h, 取10 μ L CCK-8试剂加入到每个孔中, 继续培养2 h, 用酶标仪检测450nm处的吸光度(D)值。

1.2.3 迁移和侵袭试验

划痕试验: 在6孔板的每个孔中加入约 5×10^5 个细胞, 37 $^{\circ}$ C培养过夜; 当细胞汇合度达到90%时, 用枪头比着直尺, 尽量垂直于背后的横线划痕, 用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)小心洗细胞3次直到无漂浮的细胞; 加入无血清培养基, 分别转染lncRNA BC032469 siRNA以及其对照物培养8 h后, 换正常培养基, 37 $^{\circ}$ C培养箱中继续培养, 按0, 48 h在显微镜下观察细胞的划痕空隙的修复情况, 拍照。

Transwell试验: 小室上层加入20 μ L浓度为1 mg/mL的基质胶后, 自然晾干; 下层加入600 μ L含20%血清的DMEM培养基, 小室上层加入100 μ L含 3×10^6 个细胞的无血清培养基; 小室于24孔板中培养48 h后, PBS清洗细胞, 用浓度为4%的多聚甲醛固定15 min, 用0.1%的结晶紫处理0.5 h后, 于倒置显微镜拍照, 计数。

1.2.4 RNA 提取、反转录及实时荧光定量 PCR

收集处理后相应时间点的细胞, 按照试剂盒说明书指导提取RNA; 使用TaKaRa反转录试剂盒对所提取的RNA进行反转录; 按照实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)试剂盒步骤进行PCR检测。LncRNA-BC032469正向引物序列为5'-ATGGAGTCTCGCTCTGTCTG-3', 反向引物序列为5'-CCCCTAGACCCAGGAAGT-3'; hTERT mRNA正向引物序列为5'-GTGCTGCAGCTCCCATTTCAT-3', 反向引物序列为5'-GCTTTCAGGATGGAGTAGCAGA-3'; GAPDH正向引物序列为5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3', 反向引物序列为3'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-5'。以GAPDH为内参。

1.2.5 Western 印迹法

LncRNA BC032469处理H460细胞48 h后, 收集细胞, 使用RIPA裂解液提取蛋白; 每个孔上样总蛋白的量为30 μ g, 200 V恒压电泳至样品指示剂至胶底部。200 mA恒流转膜120 min, 用5%的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)于室温下封闭2 h; 一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 混有Tween 20的三乙醇胺缓冲盐溶液(mixture of tris-buffered saline and Tween 20, TBST)洗膜3次, 每次10 min。用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的相应二抗于室温下孵育1 h; 用TBST洗膜3次, 每次10 min; ECL化学发光法对膜进行显影后曝光; 通过图像分析软件对照片进行分析, 测定灰度值, 以GAPDH为内参。

1.3 统计学处理

应用SPSS 19.0统计软件进行数据分析。采用Prism软件作图。两组独立数据用t检验进行比较, 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA BC032469 在肺癌细胞系中的表达升高以HBE为对照, 通过qRT-PCR方法检测

LncRNA BC032469在不同肺癌细胞系中的表达, 结果表明: LncRNA BC032469在肺癌细胞系中的表达水平显著高于肺正常细胞, 提示LncRNA BC032469在肺癌细胞中异常高表达($P < 0.05$, 图1)。

2.2 LncRNA BC032469 敲低对 H460 肺癌细胞增殖的影响

qRT-PCR结果表明: 与模拟组(Mock组)和对照组(Control组)相比, LncRNA BC032469 siRNA组LncRNA BC032469 siRNA的表达量显著降低(图2A)。CCK-8检测结果表明: 沉默LncRNA BC032469 72 h的表达可明显抑制H460肺癌细胞增殖($P < 0.05$, 图2B)。

2.3 沉默 LncRNA BC032469 对肺癌细胞 H460 迁移和侵袭能力方面的影响

转染后, 细胞划痕试验检测沉默LncRNA BC032469对细胞迁移能力的影响。检测结果表明: 48 h后LncRNA BC032469沉默组细胞迁移能力显著低于LncRNA BC032469对照组。Transwell小室侵袭检测结果表明: LncRNA BC032469敲低后, H460肺癌细胞侵袭的数量显著减少, 提示沉默LncRNA BC032469的表达可以显著抑制肺癌细胞迁移和侵袭能力(图3)。

2.4 LncRNA BC032469 调节 hTERT 的表达

qRT-PCR结果表明: 与对照相比, hTERT mRNA表达水平显著降低(图4A)。Western印迹检测结果表明: LncRNA BC032469沉默后, hTERT蛋白水平显著降低(图4B, 4C)。

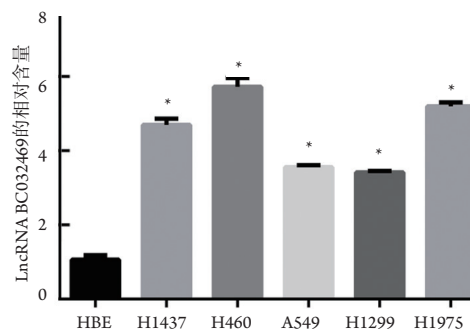


图1 LncRNA BC032469 在不同肺癌细胞系和 HBE 中的表达
Figure 1 Expression of LncRNA BC032469 in lung cancer cell line and normal human bronchial epithelial cell line

* $P < 0.05$.

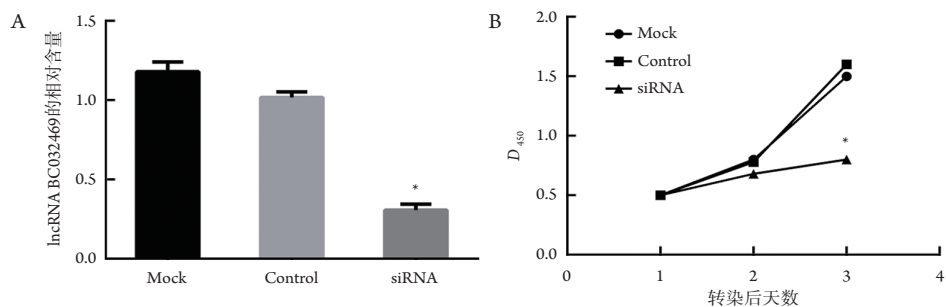


图 2 H460 细胞转染 lncRNA BC032469 siRNA 后 lncRNA BC032469 表达水平 (A) 和对细胞活性的影响 (B)

Figure 2 Expression of lncRNA BC032469 (A) and cell viability (B) both decreased after silencing lncRNA BC032469 in H460 cells *P<0.05.

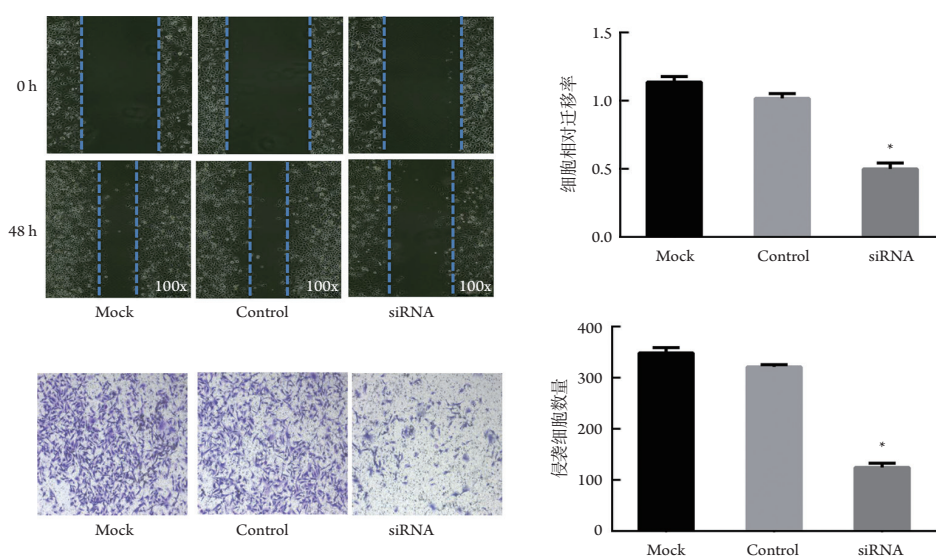


图3 沉默lncRNA BC032469对细胞迁移和侵袭的影响

Figure 3 Effect on cell migration and invasion after transfected with lncRNA BC032469 siRNA in H460 cells

*P<0.05.

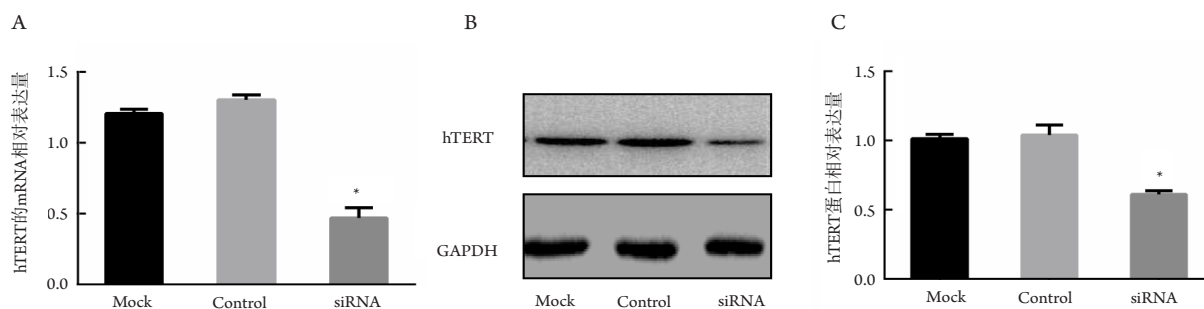


图4 沉默lncRNA BC032469对hTERT表达的影响(*P<0.05)

Figure 4 Effect of silencing lncRNA BC032469 on the expression of hTERT in H460 cells (*P<0.05)

(A)qRT-PCR 检测 Mock 组、Control 组和 lncRNA BC032469 敲低组 hTERT mRNA 的表达水平; (B)Western 印迹检测 Mock 组、Control 组和 lncRNA BC032469 敲低组 hTERT 蛋白的表达水平; (C)Mock 组、Control 组以及 lncRNA BC032469 敲低组 hTERT 蛋白相对表达量比较。

(A) Expression of hTERT mRNA level of the Mock, Control and lncRNA BC032469 siRNA groups by qRT-PCR; (B) Expression of hTERT protein level of the Mock, Control and lncRNA BC032469 siRNA groups by qRT-PCR; (C) Comparison of hTERT protein expression between the Mock, Control and lncRNA BC032469 siRNA groups.

3 讨论

随着分子生物学理论和研究技术水平的不断提高, 肺癌的治疗手段已发展为手术、放化疗、基因治疗等多种治疗手段相结合的综合性治疗^[8-9,11], 但效果并不理想。合适的lncRNA作为早期诊断或药物治疗靶点则成为肺癌治疗的新模式。lncRNA BC032469最早在胃癌中被报道^[6], 其通过吸附miRNA-1207-5p调节hTERT的表达, 进而影响肺癌细胞的增殖与凋亡^[7]。本研究发现: lncRNA BC032469在H1437, A549, H1299, H1975和H460高表达, 在HBE中低表达; 在肺癌细胞系中, lncRNA BC032469沉默表达, 肺癌细胞的增殖和迁移、侵袭能力减弱, 提示lncRNA BC032469具有类似于原癌基因的功能。miR-1207-5p异常高表达可以明显抑制肺癌、肝癌及乳腺癌细胞的增殖和迁移能力^[12-14]。研究^[15]发现: 在胃癌中, miR-1207-5p能够直接靶向影响hTERT抑制胃癌细胞迁移和侵袭能力。hTERT是一种核糖核蛋白复合物, 在多种肿瘤细胞中异常高表达, 包括肺癌、骨肉瘤和黑色素瘤^[16-18]。hTERT能与多种肿瘤相关因子结合, 进而调控肿瘤细胞的活力^[19-20]。本研究结果显示: 在肺癌细胞中, lncRNA BC032469沉默后, hTERT表达下调, 提示在肺癌中lncRNA BC032469可能类似于其在胃癌中的功能, 通过影响hTERT的表达而发挥作用, 但这其中是否涉及到miR-1207-5p和其它miRNA, 以及其具体的作用机制如何, 仍需进一步研究。

综上所述, 本研究结果为揭示lncRNA BC032469在肿瘤发生、发展进程中的机制研究提供线索, 为肺癌治疗提供了一个新的靶标。但本研究也存在一定的局限性, lncRNA BC032469在肺癌组织中的表达水平及与预后的关系尚不明确, 在动物水平中也值得进一步研究。

参考文献

1. Früh M, Peters S. Genomic features of response to combination immunotherapy in lung cancer[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(5): 791-793.
2. Grose D, Devereux G, Milroy R, et al. Comorbidity in lung cancer: important but neglected. a review of the current literature[J]. *Clin Lung Cancer*, 2011, 12(4): 207-211.
3. 肖垚. Ku80通过调控COX-2表达参与肺癌生长的作用机制和临床意义[D]. 大连: 大连医科大学, 2015.

XIAO Yao. The mechanism and clinical significance of Ku80 involved in lung cancer growth by regulating COX-2 expression[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2015.

4. Xuan Y, Wang J, Ban L, et al. hnRNPA2/B1 activates cyclooxygenase-2 and promotes tumor growth in human lung cancers[J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(4): 610-624.
5. 朱晓静, 程子杰, 冯梦文, 等. 长链非编码RNA uc.299在心脏发育中的作用[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(6): 1111-1116.
ZHU Xiaojing, CHENG Zijie, FENG Mengwen, et al. Effect of long non-coding RNA uc.299 on heart development[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(6): 1111-1116.
6. Zheng Y, Liu L, Shukla GC, et al. A comprehensive review of web-based non-coding RNA resources for cancer research[J]. *Cancer Lett*, 2017, 407: 1-8.
7. Dong J, Wang Q, Li L, Xiao Z, et al. Upregulation of long non-coding RNA small nucleolar rna host gene 12 contributes to cell growth and invasion in cervical cancer by acting as a sponge for miR-424-5p[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(5): 2086-2094.
8. Li T, Mo X, Fu L, et al. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8601-8612.
9. Lü MH, Tang B, Zeng S, et al. Long noncoding RNA BC032469, a novel competing endogenous RNA, upregulates hTERT expression by sponging miR-1207-5p and promotes proliferation in gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2016, 35(27): 3524-3534.
10. 王雅梅, 徐晓艳. 与肺癌相关的靶基因研究简介[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(4): 525-530.
WANG Yamei, XU Xiaoyan. Advances in molecular pathology of lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2016, 36(4): 525-530.
11. 叶东, 邢德刚, 曾志, 等. 沉默CIC-3氯通道基因对HeLa细胞周期分布的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(2): 257-262.
YE Dong, XING Degang, ZENG Zhi, et al. Effect of CIC-3 siRNA on cell cycle of HeLa cells[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2017, 33(2): 257-262.
12. Dang W, Qin Z, Fan S, et al. miR-1207-5p suppresses lung cancer growth and metastasis by targeting CSF1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 32421-32432.
13. Zhao G, Dong L, Shi H, et al. MicroRNA-1207-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell growth and invasion through the fatty acid synthase-mediated Akt/mTOR signalling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(3): 1709-1716.
14. Yan C, Chen Y, Kong W, et al. PVT1-derived miR-1207-5p promotes breast cancer cell growth by targeting STAT6[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(5): 868-876.
15. Chen L, Lü MH, Zhang D, et al. miR-1207-5p and miR-1266 suppress

- gastric cancer growth and invasion by targeting telomerase reverse transcriptase[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1034.
16. Chen W, Qin L, Wang S, et al. CPSF4 activates telomerase reverse transcriptase and predicts poor prognosis in human lung adenocarcinomas[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(3): 704-716.
17. Chen P, Gu WL, Gong MZ, et al. shRNA-mediated silencing of hTERT suppresses proliferation and promotes apoptosis in osteosarcoma cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2017, 24(8): 325-332.
18. Chai L, Kang XJ, Sun ZZ, et al. MiR-497-5p, miR-195-5p and miR-455-3p function as tumor suppressors by targeting hTERT in melanoma A375 cells[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 989-1003.
19. Zhang C, Song C, Liu T, et al. KMT2A promotes melanoma cell growth by targeting hTERT signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(7): e2940.
20. Feng X, Xu X, Xiao X, et al. NMI inhibits cancer stem cell traits by downregulating hTERT in breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2783.

本文引用: 秦桂香, 潘林清. 长链非编码RNA BC032469通过调控 hTERT影响肺癌细胞的增殖、迁移及侵袭[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(9): 1828-1833. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.09.002

Cite this article as: QIN Guixiang, PAN Linqing. Downregulation of long non-coding RNA BC032469 suppresses lung cancer cell proliferation, migration and invasion by regulating hTERT[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(9): 1828-1833. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.09.002