

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.007

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.007>

长链非编码 RNA-HULC 调控肺腺癌细胞的增殖和侵袭

王鹏, 李青

(徐州市中心医院检验科, 江苏 徐州 221009)

[摘要] 目的: 探讨长链非编码RNA-HULC(long non-coding RNA-HULC, lncRNA-HULC)对肺腺癌细胞增殖和侵袭过程的调控作用。方法: 收集57例肺癌患者的癌组织及与其配对的癌旁组织, 通过实时定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)法检测组织及细胞中lncRNA-HULC的表达水平; 采用RNA干扰技术(siRNA)下调lncRNA-HULC的表达, 同时以qRT-PCR法检测其干扰效率。CCK-8法和Transwell法检测下调lncRNA-HULC对肺腺癌细胞增殖和侵袭过程的影响。结果: 与癌旁组织相比, lncRNA-HULC在癌组织中的表达显著升高; 与正常肺上皮细胞相比, lncRNA-HULC在肺癌细胞中的表达也显著升高。下调lncRNA-HULC的表达后, 肺腺癌细胞的增殖和侵袭能力均降低。结论: 下调lncRNA-HULC可抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭过程。

[关键词] 肺癌; 长链非编码RNA-HULC; 细胞增殖; 细胞侵袭

Down-regulation of long non-coding RNA-HULC suppresses cell proliferation and invasion in lung adenocarcinoma

WANG Peng, LI Qing

(Department of Clinical Laboratory, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou Jiangsu 221009, China)

Abstract **Objective:** To investigate the potential molecular mechanism of long non-coding RNA-HULC (lncRNA-HULC) in the proliferation and invasion of lung adenocarcinoma cell lines. **Methods:** Quantitative RT-PCR was used to detect the expression of lncRNA-HULC in lung cancer tissues and cell lines. Small interfering RNA (siRNA) was used to down-regulate lncRNA-HULC expression. CCK-8 assay and Transwell assay were performed to explore cell proliferation and invasion. **Results:** Compared with adjacent tissues, the expression of lncRNA-HULC was increased in lung cancer tissues. Compared with normal lung epithelial cell, lncRNA-HULC was also increased in lung cancer cell lines. Silence of lncRNA-HULC inhibited cell lines proliferative and invasive ability. **Conclusion:** Down-regulation of lncRNA-HULC can cell proliferation and invasion in suppress lung adenocarcinoma.

Keywords lung cancer; long non-coding RNA-HULC; cell proliferation; cell invasion

收稿日期 (Date of reception): 2018-03-25

通信作者 (Corresponding author): 李青, Email: phoenix010149@163.com

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一。尽管传统的治疗方法如手术切除、放疗、靶向治疗的技术不断提升,但其5年生存率不足15%^[1]。因此,深入研究肺癌细胞增殖和转移过程,寻找新的分子靶点,提高临床治疗效果是当前肺癌研究领域的热点。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一种长度大于200 nt的非编码RNA,参与各种疾病的发生发展过程^[2]。近年来,研究^[3-4]发现:lncRNA在多种恶性肿瘤中异常表达,并与肿瘤细胞增殖、侵袭转移等生物学过程密切相关,如lncRNA-NKILA通过抑制上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transitions, EMT)过程调控舌鳞状细胞癌^[3]; lncRNA-TP73-AS1参与肝癌细胞增殖的调控过程^[4]。然而,目前关于lncRNA-HULC在肺癌中的表达水平及功能作用尚不明确。本文旨在研究lncRNA-HULC在肺癌组织及细胞中的表达情况,初步探索其对肺腺癌细胞增殖和侵袭过程的影响,为临床诊治提供有力的理论基础。

1 材料与方法

1.1 样本收集

收集2014年2月至2016年11月徐州市中心医院肺癌患者手术切除标本57例癌组织及其相匹配的癌旁组织,离体后迅速放入液氮中,并置于-80℃超低温冰箱中保存。本研究经徐州市中心医院伦理委员会审核批准,患者均签署知情同意书。

1.2 材料与试剂

肺癌细胞(H358, SPCA1, A549, H1299)和人肺正常上皮细胞(BEAS-2B)均购自上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。RPMI-1640培养基、胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司。RNA抽提试剂TRIzol和反转录试剂盒购自日本Takara公司。lncRNA-HULC干扰RNA(siRNA lncRNA-HULC)和阴性对照si-Negative Control(si-NC)购自上海吉玛制药技术有限公司。细胞转染试剂lipofectamine 2000和细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自美国Invitrogen公司。Matrigel基质胶和Transwell小室购自美国BD公司。二甲基亚砜、结晶紫染液和PBS购自美国Hyclone公司。

1.3 方法

1.3.1 实时定量PCR

所有癌组织/癌旁组织,细胞总RNA均采用TRIzol法提取, Taqman探针法检测组织及细胞中lncRNA-HULC及内参磷酸甘油醛脱氢酶

(phosphoglyceraldehyde dehydrogenase, GAPDH)的表达量。lncRNA-HULC上游引物为: 5'-TCATGATGGAATTGGAGCCTT-3'; 下游引物为: 5'-CTCTTCCTGGCTTGCAGATTG-3'; GAPDH的上游引物为: 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'; 下游引物为: 5'-TTCTAGACGGCAGGTCAGGT-3'。

1.3.2 细胞转染试验

A549和H1299细胞用含10%FBS的RPMI-1640培养基培养,置于5%CO₂ 37℃恒温培养箱中。当细胞处于对数生长期时,将细胞接种于6孔板中,密度约为40%时,每孔加入5 μL lipofectamine 2000和200 pmol siRNA lncRNA-HULC混合液。siRNA lncRNA-HULC序列正义链为5'-CCGGAUAUUC-UUUGUUUAUU-3'; 反义链为5'-UAAACAAAGA-AUAUUCGGUU-3'。同时, si-NC为对照组,加入等量Lipofectamine 2000和si-NC。si-NC序列正义链为5'-CCUUAUAUGUUCUGGAAUUUU-3'; 反义链为5'-UAAAACGAAUGGAAUUCACUU-3'。

1.3.3 细胞增殖 CCK-8 试验

将转染后的细胞接种于96孔板,每孔加入100 μL无10%FBS培养基,保证每孔细胞数量约为2 000个。培养24, 48和72 h后,每孔加入10 μL CCK-8试剂,在培养箱内孵育2 h后测450 nm光密度(OD)值,避光,每组重复3次。

1.3.4 细胞侵袭和 Transwell 实验

按1:5比例将Matrigel胶与无10%FBS RPMI-1640培养基进行稀释,取50 μL稀释胶均匀铺于Transwell小室内凝固备用。将处于对数生长期的细胞消化,并用无10%FBS RPMI-1640培养基重悬后加入Transwell小室内,每个小室内的细胞数量约为2×10⁴个。小室下层加入700 μL含10%FBS的培养基,在细胞培养箱中培养24 h,弃去培养基,用PBS清洗3次,用无水甲醇固定20 min,用结晶紫染色剂染色30 min,置于显微镜下随机选取5个视野拍照计数。

1.4 统计学处理

采用STAT 11统计软件进行数据分析, lncRNA-HULC在癌和癌旁组织的表达值以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差法分析细胞中的相对表达, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA-HULC 在肺癌组织和细胞中表达显著升高

实时定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测结果发现:与癌旁组织相比, lncRNA-

HULC在肺癌组织中的表达显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.001$, 图1A)。结合患者临床信息, 发现lncRNA-HULC的表达与患者的性别、年龄和组织类型均无关, 而与肿瘤大小、转移和分期密切相关(表1)。同时, 本研究通过qRT-PCR法检测lncRNA-HULC在肺癌细胞中的表达, 结果显示: lncRNA-HULC在肺癌细胞(H358, SPCA1, A549, H1299)中的表达显著高于人正常肺上皮细胞(BEAS-2B), 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图1B)。以上结果提示lncRNA-HULC在肺癌的发展过程中起重要作用。

2.2 siRNA 可抑制肺腺癌细胞中 lncRNA-HULC 的表达水平

qRT-PCR实验发现: 与对照组si-NC相比, 在转染siRNA lncRNA-HULC的A549和H1299细胞中lncRNA-HULC的表达水平显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2)。提示siRNA lncRNA-HULC可抑制肺腺癌细胞中lncRNA-HULC的表达水平。

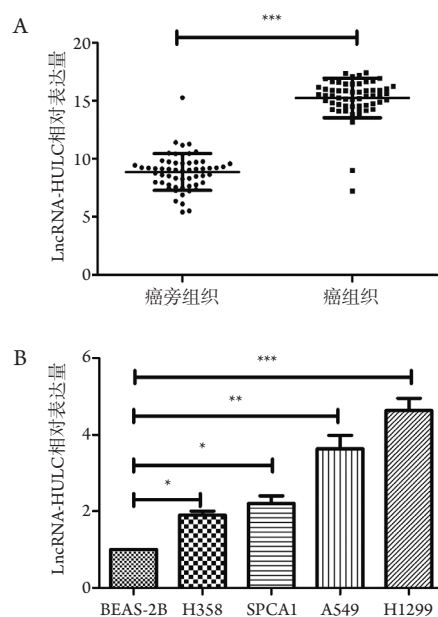


图1 lncRNA-HULC在肺癌组织和细胞中表达显著升高

Figure 1 lncRNA-HULC levels were obviously up-regulated both in lung cancer tissues and cell lines

(A) lncRNA-HULC在肺癌组织和癌旁组织中的相对表达量; (B) lncRNA-HULC在各种肺癌细胞和BEAS-2B中的相对表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

(A) lncRNA-HULC levels were detected between lung cancer tissues and the adjacent tissues; (B) lncRNA-HULC levels were detected between lung cancer cell lines and lung normal cell BEAS-2B. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

表1 lncRNA-HULC在临床样本中的表达情况

Table 1 Expression of lncRNA-HULC in clinical samples

临床特征	n	LncRNA-HULC		P
		高表达	低表达	
总计	57	29	28	
性别				0.337
男	24	14	10	
女	33	15	18	
年龄/岁				0.597
<60	32	17	15	
≥60	25	12	13	
组织类型				0.839
鳞癌	17	9	8	
腺癌	40	20	20	
肿瘤大小				0.024
T1/T2	30	11	19	
T3/T4	27	18	9	
转移情况				0.005
无转移	28	9	19	
有转移	29	20	9	
分期				0.001
I~II	26	7	19	
III~IV	31	22	9	

*以中位数为临界值。

*The median is the critical value.

2.3 下调 lncRNA-HULC 表达可抑制肺腺癌细胞的增殖能力

CCK-8增殖试验结果显示: 转染24 h后, A549和H1299细胞的增殖能力无明显差异; 而在转染48, 72 h后, A549和H1299细胞的增殖能力存在显著差异($P < 0.05$), 下调lncRNA-HULC表达后A549和H1299细胞的增殖能力明显下降(图3)。

2.4 下调 lncRNA-HULC 表达可抑制肺腺癌细胞的侵袭能力

Transwell侵袭试验结果显示: 转染siRNA lncRNA-HULC的肺腺癌细胞侵袭数比转染si-NC对照组明显减少, 提示下调lncRNA-HULC表达可抑制肺腺癌细胞侵袭能力, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图4)。

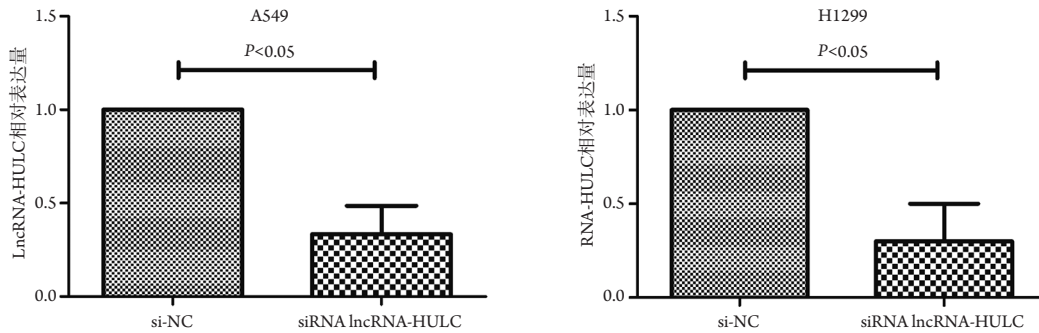


图2 转染 siRNA lncRNA-HULC 可降低肺腺癌细胞中 lncRNA-HULC 的表达

Figure 2 lncRNA-HULC levels were down-regulated in A549 and H1299 cell lines through transfecting with siRNA

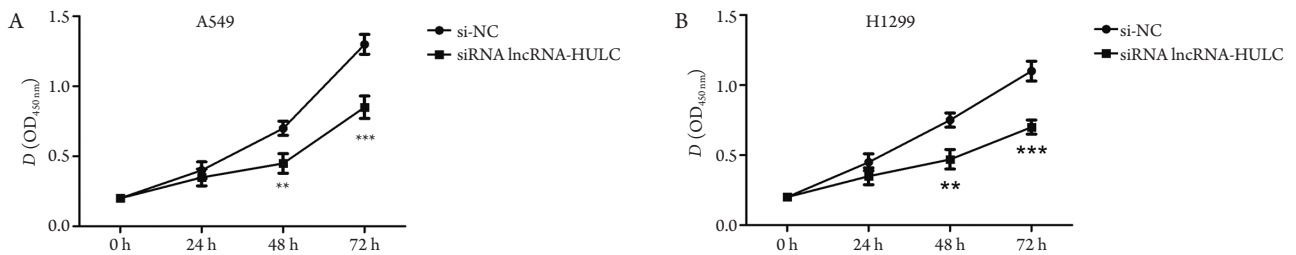


图3 下调lncRNA-HULC表达可抑制肺腺癌细胞的增殖能力

Figure 3 Down-regulation of lncRNA-HULC can inhibit cell proliferation

通过CCK8细胞增殖试验检测A549(A)和H1299(B)下调lncRNA-HULC后的OD_{450 nm}值。 **P<0.01, ***P<0.001。

OD_{450 nm} values were detected by CCK8 method in A549 (A) and H1299 (B) cells. **P<0.01, ***P<0.001.

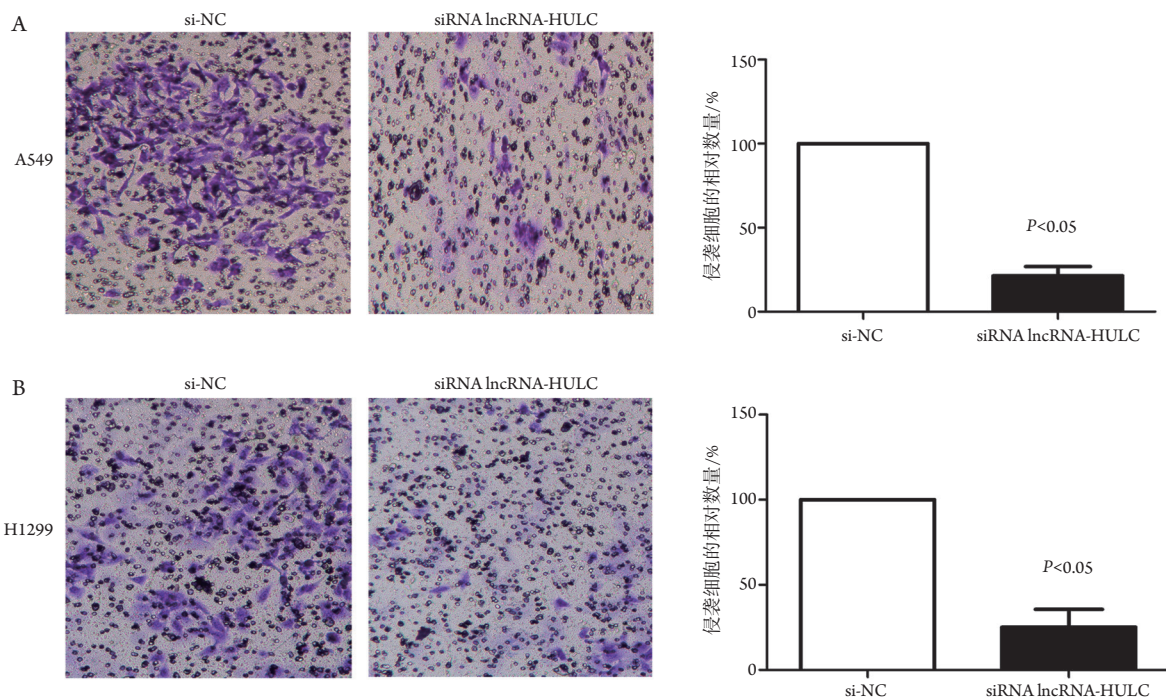


图4 下调lncRNA-HULC表达可抑制肺腺癌细胞的侵袭能力

Figure 4 Down-regulation of lncRNA-HULC can repress cell invasive ability

通过细胞侵袭试验检测A549(A)和H1299(B)下调lncRNA-HULC后的侵袭能力。

Cell invasive ability was detected by Transwell invasion assay in A549 (A) and H1299 (B) cells.

3 讨论

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,在我国发病率极高,严重危害人们的生命健康。因此,从分子水平的角度深入探索肺癌的发生发展,积极寻找早期诊断标志物、预后评估指标及放化疗靶点,提高肺癌患者的临床诊治和预后水平尤为重要。

近年来,诸多报道^[5-8]均发现异常表达的 lncRNAs 对肺癌的发展起重要的调控作用。lncRNA-SNHG1 可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肺癌的发展过程^[5]。lncRNA-LET 在肺癌中低表达,可抑制肿瘤细胞的生长^[6]。lncRNA-MEG3 可通过视网膜母细胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, Rb) 通路抑制肺癌细胞的增殖能力^[7]。lncRNA-HIT 通过与锌指 E 盒同源结合蛋白-1 (zinc finger E-box-binding homeobox 1, ZEB1) 的相互作用来促进肺癌细胞的侵袭转移过程^[8]。

有关 lncRNA-HULC 在各种疾病中扮演的角色也相继被发现,如 lncRNA-HULC 可作为胰腺癌患者预后不良的分子标志物^[9];其不仅可作为骨肉瘤的预后指标,还可促进细胞侵袭转移^[10]。在肝癌中, lncRNA-HULC 通过 miR-200a/ZEB1 信号通路诱导 EMT,从而促进肝癌细胞的侵袭转移^[11]。下调 lncRNA-HULC 增强化疗诱导的胃癌细胞凋亡过程^[12]。本研究探讨了 lncRNA-HULC 在肺腺癌细胞增殖和侵袭过程中的作用,结果显示: lncRNA-HULC 在肺癌组织中的表达显著高于癌旁组织,且与肿瘤大小、转移和分期有关,表明 lncRNA-HULC 作为一个促癌基因,与肺癌的发展过程密切相关。其次,体外细胞实验结果显示: lncRNA-HULC 在肺癌细胞中的表达也显著高于肺正常上皮细胞,转染特异性的 siRNA lncRNA-HULC 可降低 lncRNA-HULC 在肺腺癌细胞中的表达。进一步的 CCK-8 和 Transwell 试验也证实下调 lncRNA-HULC 可抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭能力。

综上所述, lncRNA-HULC 在肺癌组织和细胞中高表达,下调 lncRNA-HULC 可抑制肺腺癌细胞的增殖和侵袭能力,不仅为肺癌的临床诊治提供了有力的理论基础,还为未来的肿瘤靶向治疗提供了潜在的分子靶点。本研究初步论证了 lncRNA-HULC 在肺癌发生发展过程中的作用,然而其更深入的功能及潜在的分子机制仍不明确,需进一步探索。

参考文献

1. Strano S, Lupo A, Lococo F, et al. Prognostic significance of vascular and lymphatic emboli in resected pulmonary adenocarcinoma[J]. *Ann Thorac Surg*, 2013, 95(4): 1204-1210.
2. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long non-coding RNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641.
3. Huang W, Cui X, Chen J, et al. Long non-coding RNA NKILA inhibits migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma cells via suppressing epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(38): 62520-62532.
4. Li S, Huang Y, Huang Y, et al. The long non-coding RNA TP73-AS1 modulates HCC cell proliferation through miR-200a-dependent HMGB1/RAGE regulation[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 51.
5. Cui Y, Zhang F, Zhu C, et al. Upregulated lncRNA SNHG1 contributes to progression of non-small cell lung cancer through inhibition of miR-101-3p and activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11): 17785-17794.
6. Liu B, Pan CF, He ZC, et al. Long non-coding RNA-LET suppresses tumor growth and EMT in lung adenocarcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2016; 2016: 4693471.
7. Kruer TL, Dougherty SM, Reynolds L, et al. Expression of the lncRNA maternally expressed gene 3 (MEG3) contributes to the control of lung cancer cell proliferation by the Rb pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166363.
8. Jia X, Wang Z, Qiu L, et al. Upregulation of lncRNA-HIT promotes migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by association with ZEB1[J]. *Cancer Med*, 2016, 5(12): 3555-3563.
9. Peng W, Gao W, Feng J. Long non-coding RNA HULC is a novel biomarker of poor prognosis in patients with pancreatic cancer[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(12): 346.
10. Sun XH, Yang LB, Geng XL, et al. Increased expression of lncRNA HULC indicates a poor prognosis and promotes cell metastasis in osteosarcoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2994-3000.
11. Li SP, Xu HX, Yu Y, et al. lncRNA HULC enhances epithelial-mesenchymal transition to promote tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma via the miR-200a-3p/ZEB1 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 42431-42446.
12. Zhang Y, Song X, Wang X, et al. Silencing of lncRNA HULC enhances chemotherapy induced apoptosis in human gastric cancer[J]. *J Med Biochem*, 2016, 35(2): 137-143.

本文引用: 王鹏, 李青. 长链非编码 RNA-HULC 调控肺腺癌细胞的增殖和侵袭[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(6): 1179-1183. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.007

Cite this article as: WANG Peng, LI Qing. Down-regulation of long non-coding RNA-HULC suppresses cell proliferation and invasion in lung adenocarcinoma[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(6): 1179-1183. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.007