

下调 *lincRNA HOTAIR* 对胃癌细胞迁移及增殖抑制作用的研究

陈登宇* 徐志本 郑庆委

(蚌埠医学院病原生物学教研室, 安徽省感染与免疫重点实验室, 蚌埠 233030)

摘要 通过下调人胃癌细胞BGC823中 *lincRNA HOTAIR* 基因的表达, 该文探讨了 *lincRNA HOTAIR* 低表达对胃癌细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响。该文构建针对人 *lincRNA HOTAIR* 基因的干扰质粒shHOTAIR, 稳定转染入胃癌细胞BGC823, 筛选稳转株, qPCR检测 *lincRNA HOTAIR* 在胃癌细胞中表达水平。采用划痕试验、侵袭试验、MTT法分别检测转染胃癌细胞迁移、侵袭及增殖能力。结果表明, 稳定转染干扰质粒shHOTAIR后下调 *lincRNA HOTAIR* 表达的胃癌细胞株细胞迁移、侵袭及增殖能力较阴性对照组明显减弱。下调胃癌细胞中 *lincRNA HOTAIR* 的表达, 可降低胃癌细胞的迁移力、侵袭性、抑制其增殖能力, 提示 *lincRNA HOTAIR* 可作为分子靶点用于胃癌的分子靶向治疗。

关键词 胃癌; *lincRNA HOTAIR*; RNA干扰; 靶向治疗

Study of Downregulated *LincRNA HOTAIR* on Migration and Proliferation Inhibition of Gastric Cancer Cells

Chen Dengyu*, Xu Zhiben, Zheng Qingwei

(Department of Pathogenic Biology, Bengbu Medical College, Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

Abstract This work was aim to study the effect of downregulating *lincRNA HOTAIR* expression on the migration and proliferation of BGC823 gastric cancer cells. The short hairpin RNA shHOTAIR was transfected into BGC823 gastric cancer cells, and the stably transfected cells were isolated by G418 selection. The *lincRNA HOTAIR* gene expression was detected by qPCR. The abilities of migration, invasion and proliferation of shHOTAIR transfected gastric cancer cells were investigated in the ways of wound healing and transwell invasion and MTT assays. The results showed that the abilities of migration, invasion and proliferation of the gastric cancer cells of low *lincRNA HOTAIR* expression were significantly decreased compared with the control group. Targeting *lincRNA HOTAIR* expression in gastric cancer cells with RNA interference could significantly reduce and inhibit the migration and proliferation abilities of gastric cancer cells. These data suggested that *lincRNA HOTAIR* could be one potential therapeutic target for human gastric cancer treatment.

Keywords gastric cancer; *lincRNA HOTAIR*; RNA interference; targeted therapy

由于聚餐饮食习惯和不良卫生环境因素, 我国的幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)交叉感染较为

普遍。Hp感染可引起慢性活动性胃炎、胃及十二指肠慢性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤和胃癌^[1-2]。

收稿日期: 2015-03-03 接受日期: 2015-07-08

蚌埠医学院科技发展基金重点项目(批准号: Bykfl3A08)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0552-3175275, E-mail: chengong131@sina.com

Received: March 3, 2015 Accepted: July 8, 2015

This work was supported by the Key Fund Project of Science and Technology Development of Bengbu Medical College (Grant No.Bykfl3A08)

*Corresponding author. Tel: +86-552-3175275, E-mail: chengong131@sina.com

网络出版时间: 2015-07-29 10:59:19 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150729.1059.002.html>

而胃癌是我国常见的消化道恶性肿瘤, 发病率有逐年增高的趋势, 已位于我国人群高发恶性肿瘤前三位, 治疗失败的原因多为肿瘤的复发、侵袭和转移^[1]。

长非编码RNA(large intergenic non-coding RNA, lincRNA)调节细胞染色体基因DNA的转录表达, lincRNA中有一种为HOX转录反义RNA(HOX antisense intergenic RNA, HOTAIR)高表达与肿瘤侵袭转移有关^[2], 对肿瘤细胞迁移侵袭转移相关的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进程相关基因同源异型基因(homeotic genes, HOX)等转录调控发挥重要作用。LincRNA HOTAIR调控HOX对细胞增殖与定向分化作用, HOTAIR的5'端可招募结合多梳蛋白抑制复合物2(polycomb repressive complex 2, PRC2), 借助PRC2上甲基化酶使另一基因座HOXD上长约40 Kb的序列转录沉默, 从而使细胞内转录倾向于成纤维细胞样表型^[3-4]。

本课题拟探讨lincRNA HOTAIR在胃癌细胞侵袭转移中对癌细胞上皮-间质转化进程的调控作用, 研究下调lincRNA HOTAIR对胃癌细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响, 以期阐明肿瘤新靶点, 有利于临床抗肿瘤药物开发并用于胃癌侵袭转移的分子靶向治疗。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人胃癌细胞株BGC823购自中国科学院上海细胞库; Trizol试剂购自Invitrogen公司; RT-PCR及qPCR试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 限制性核酸内切酶Hind III、Bgl II及T4 DNA连接酶购自大连宝生生物公司; 质粒小提及割胶纯化试剂盒购自Axygen公司; 脂质体2000购自Invitrogen公司; G418购自Sigma公司; matrigel基质胶购自BD公司; Transwell小室购自Corning公司; MTT检测试剂盒购自南京凯基生物科技公司。

1.2 RT-PCR及qPCR检测

胃癌细胞BGC823抽提总RNA, 随机引物逆转录RNA, RT-PCR及qPCR扩增lincRNA HOTAIR等基因, 以U6作为内参。lincRNA HOTAIR引物, 上游5'-GGT AGA AAA AGC AAC CAC GAA GC-3', 下游5'-TTG GGG AAG CAT TTT CTG AC-3', 产物744 bp; U6引物, 上游5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 下游5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3', 产物94 bp。ABI StepOnePlus荧光定量PCR仪检测。E-钙黏附

蛋白(E-cadherin)引物, 上游: 5'-TAC ACT GCC CAG GAG CCA GA-3', 下游: 5'-TGG CAC CAG TGT CCG GAT TA-3', 产物103 bp; 内参 β -actin引物, 上游: 5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3', 下游: 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3', 产物234 bp。

1.3 干扰质粒构建及转染

根据国外文献^[4]查找靶向lincRNA HOTAIR基因(Gene ID: 100124700)的有效siRNA序列, 根据干扰质粒pSUPER-EGFP1载体要求合成shRNA寡核苷酸模板, shRNA基因由上海Invitrogen公司合成, Bgl II和Hind III酶切残基连接入载体质粒。同时, 合成不靶向任何基因的阴性对照序列scramble-shRNA。HOTAIR-shRNA序列正义链: 5'-GAT CCC CGA AC GGG AGT ACA GAG AGA TTC AAG AGA TCT CTC TGT ACT CCC GTT CTT TTT GGA AA-3'; 反义链: 5'-AGC TTT TCC AAA AAG AAC GGG AGT ACA GGA GAT CTC TTG AAT CTC TCT GTA CTC CGT TCG GG-3'。Scramble-shRNA序列, 参考以往工作文献^[5]。构建质粒pSUPER-EGFP1-HOTAIR-shRNA(简称shHOTAIR), 双酶切及测序鉴定, 稳定转染肿瘤细胞后可产生HOTAIR-siRNA: 5'-GAA CGG GAG UAC AGA GAG A-3', 干扰HOTAIR基因的表达; 同法构建和转染pSUPER-EGFP1-scramble-shRNA(简称scramble)质粒, 稳定转染肿瘤细胞后可产生scramble-siRNA: 5'-UUC UUC CGA ACG UGU CAC GU-3', 不干扰任何基因的表达, 为阴性对照组使用。以脂质体2000将构建的干扰质粒分别转染入胃癌细胞后, 以干扰质粒GFP绿色荧光蛋白表达及G418抗性的特征及有限稀释法筛选出稳定转染胃癌细胞株, 挑选三个单克隆细胞组成混合细胞系, 扩大培养, 用于后续功能性实验检测。

1.4 划痕试验(Wound healing assay)

肿瘤细胞迁移力检测采用划痕试验的方法^[6], 将待观测shHOTAIR质粒稳定转染胃癌细胞及scramble阴性对照质粒稳定转染胃癌细胞分别种于6孔板中, 重复3孔, 待生长融合度达到95%左右后, 更换含5%小牛血清1640培养液进行划痕检测。分析计算愈合度(healing degree)=(1-某时点划痕宽度/原始划痕宽度) \times 100%, 判定细胞迁移能力。

1.5 Transwell小室基质胶侵袭试验(Transwell invasive assay)

肿瘤细胞侵袭力检测采用Transwell小室Matrigel

基质胶侵袭实验的方法, 测定转染胃癌细胞BGC823侵袭溶解穿越基质胶的能力。放Transwell小室于24孔板内, 将稀释好的基质胶置于Transwell上层, 凝固后每孔种植 2×10^4 细胞, 小室下层加含血清完全培养基, 孵育24 h后取出小室, 清洗、固定、染色, 晾干后倒置显微镜下200倍镜观察并计数分析。

1.6 MTT法测定细胞生长曲线

MTT法采集数据, 绘制实验组及对照组细胞的生长曲线。分别将各组转染细胞用含血清培养液配制成单细胞悬液, 计数后接种于96孔细胞培养板, 每孔 1×10^4 细胞, 同时设立空白组, 共培养7 d, 每2 d换液1次。第2, 3, 4, 5, 6 d, 分别每组细胞各取6孔, 加入MTT试剂进行检测, 酶联免疫检测仪上490 nm波长测定各孔吸光度(D)值, 以时间为横轴, D值为纵轴绘制生长曲线。

1.7 统计学方法

实验重复3次, 统计数据以平均数 \pm 标准差表示, 运用GraphPad.Prism.v5.0软件进行数据统计分析并作图, 配对t检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 构建shHOTAIR干扰质粒

针对*lincRNA HOTAIR*的siRNA干扰序列为: 5'-GAA CGG GAG TAC AGA GAG A-3'。基因测序验证

构建的shHOTAIR干扰质粒序列正确与否。插入的shRNA正向序列为: 5'-GAT CCC CGA ACG GGA GTA CAG AGA GAT TCA AGA GAT CTC TCT GTA CTC CCG TTC TTT TTG GAA A-3'。图1为shHOTAIR干扰质粒正向测序, 所插入位置可查见所要序列, 见图中下划线部分基因, 说明干扰质粒shHOTAIR构建正确。

阴性对照shRNA-scramble序列正义链为: 5'-GAT CCC CTT CTC CGA ACG TGT CAC GTT TCA AGA GAA CGT GAC ACG TTC GGA GAA TTT TTG GAA A-3'。构建的阴性对照干扰质粒正向测序如图2所示, 划线部分可查见所要序列, 说明阴性对照干扰质粒scramble构建成功。

2.2 定量PCR检测shHOTAIR转染细胞*lincRNA HOTAIR*表达量

提取稳定转染胃癌细胞株, RNA逆转录后, qPCR测定*lincRNA HOTAIR* RNA表达量。结果显示, shHOTAIR稳定转染的胃癌细胞较scramble转染胃癌细胞中*lincRNA HOTAIR*表达显著下降, 差异极显著($P < 0.01$)(图3)。该结果表明, shHOTAIR干扰有效, 获得的*lincRNA HOTAIR*下调胃癌细胞株可用于*lincRNA HOTAIR*下调后相关功能性实验。

2.3 下调*lincRNA HOTAIR*对胃癌细胞的迁移能力及基质胶侵袭能力影响

对划痕实验中24, 48 h时间点划痕愈合度进行

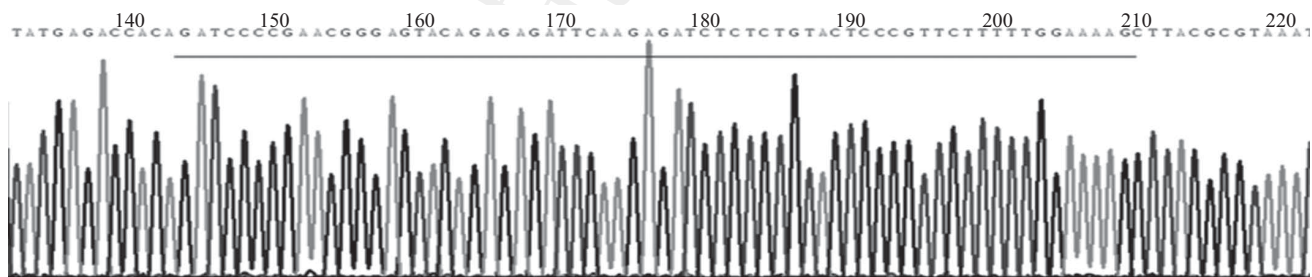


图1 pSUPER-EGFP1-shHOTAIR基因测序图

Fig.1 pSUPER-EGFP1-shHOTAIR gene sequencing map

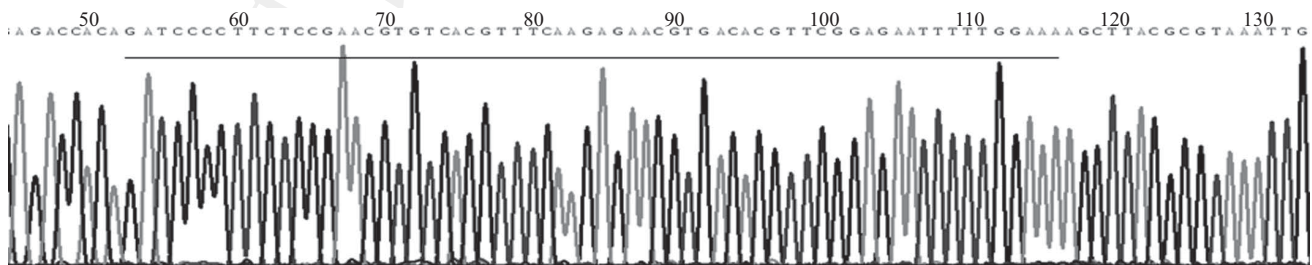


图2 pSUPER-EGFP1-scramble质粒正向测序图

Fig.2 pSUPER-EGFP1-scramble plasmid forward sequencing map

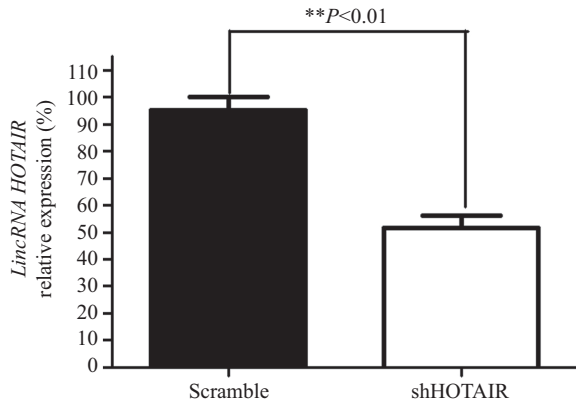


图3 定量PCR检测转染细胞*lincRNA HOTAIR*表达量
Fig.3 The expression of *lincRNA HOTAIR* in shHOTAIR cells detected by qPCR

比较, 结果显示, shHOTAIR稳转下调HOTAIR表达的胃癌细胞较转染阴性对照scramble质粒细胞愈合度下降, 差异有统计学意义(图4A和4图B)($P<0.05$)。Transwell小室基质胶侵袭实验结果为5个随机镜下视野计数出每孔侵袭细胞平均数进行比较, 统计结

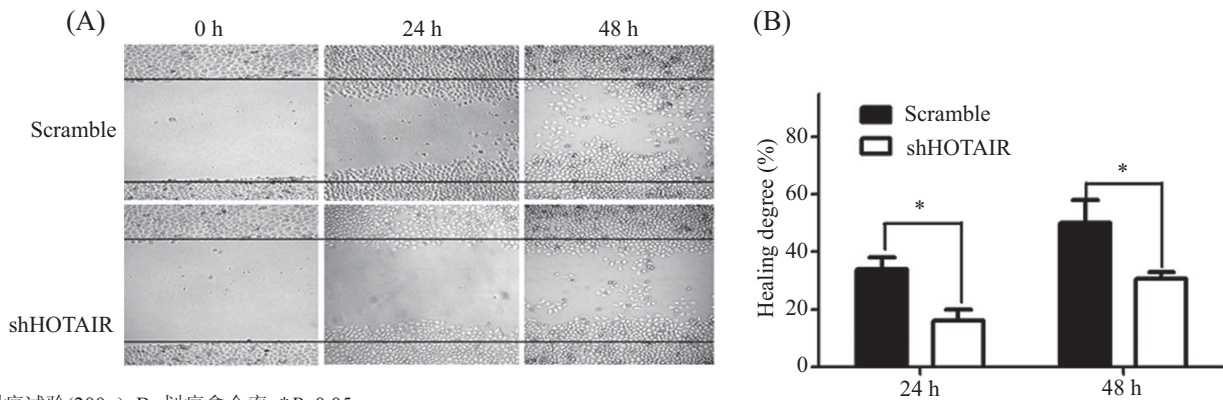
果显示, shHOTAIR组胃癌细胞较scramble组侵袭力明显下降, 差异极显著(图5A和图5B)($P<0.01$)。

2.4 下调*lincRNA HOTAIR*对胃癌细胞增殖能力的影响

MTT法细胞增殖实验结果显示(图6), 下调*lincRNA HOTAIR*后胃癌细胞增殖能力较阴性对照组明显下降, 差异有统计学意义, 显示*lincRNA HOTAIR*下调后减缓了胃癌细胞增殖能力。培养第3, 4 d, shHOTAIR组胃癌细胞较scramble组增殖能力下降, 差异有统计学意义($P<0.05$)。培养第5, 6 d, shHOTAIR组胃癌细胞较scramble组增殖能力明显下降, 差异极显著($P<0.01$)。

2.5 下调*lincRNA HOTAIR*对胃癌细胞的*E-cadherin*表达的影响

定量PCR法检测不同转染细胞*E-cadherin*表达情况, 结果显示(图7), 下调*lincRNA HOTAIR*后胃癌细胞*E-cadherin* mRNA表达水平较阴性对照组增加, 差异有统计学意义, 表明*lincRNA HOTAIR*下调后增

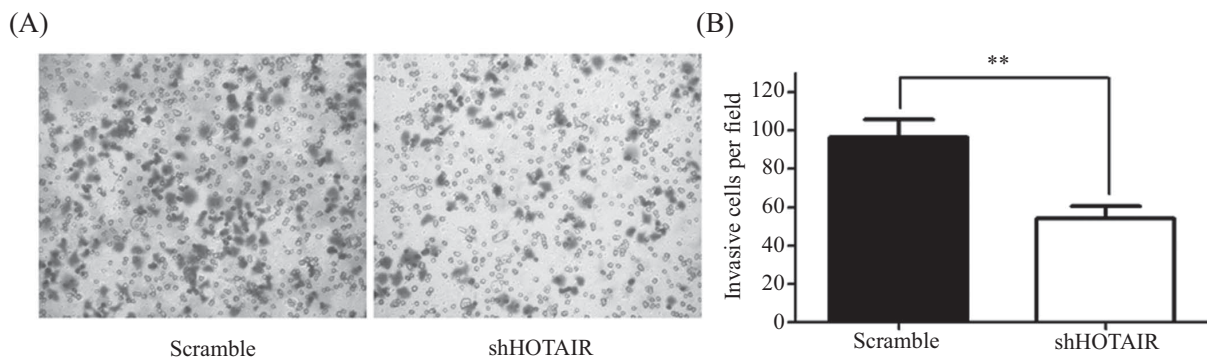


A: 划痕试验(200×); B: 划痕愈合率, * $P<0.05$ 。

A: wound healing assay (200×); B: the cell recovery rate of wound-healing assay, * $P<0.05$ 。

图4 迁移试验检测转染胃癌细胞迁移能力

Fig.4 The migration ability of shHOTAIR cells detected by wound healing assay

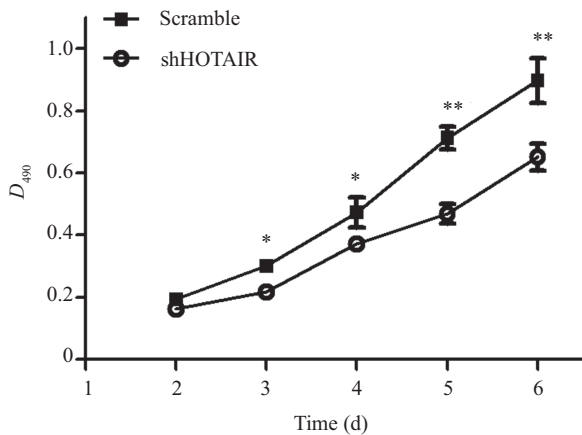


A: 穿过铺基质胶的Transwell小室的细胞(200×); B: 穿过Transwell小室的细胞数统计, ** $P<0.01$ 。

A: invasive cells of Transwell invasion assay (200×); B: the number of invasive cells, ** $P<0.01$ 。

图5 Transwell小室基质胶肿瘤细胞侵袭试验检测转染胃癌细胞侵袭能力

Fig.5 The invasion ability of shHOTAIR cells detected by Transwell invasive assay



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与scramble组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs scramble group.

图6 MTT法检测转染胃癌细胞增殖能力

Fig.6 The proliferation ability of shHOTAIR cells detected by MTT assay

加了胃癌细胞*E-cadherin*表达。

3 讨论

长非编码RNA(lincRNAs)可在表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等多种层面上调控基因的表达水平^[3-4], 其中*lincRNA HOTAIR*高表达与上皮来源性肿瘤(如乳腺癌、结肠癌)侵袭、转移等密切相关。*LincRNA HOTAIR*是HOX基因转录反义RNA(HOX transcript antisense RNA, *HOTAIR*), 长非编码RNA *HOTAIR*作为lincRNAs的成员之一, 由*HOXC*基因座转录, 是一个长度为2.2 Kb的基因, 不编码任何蛋白质, 产物为一段长的非编码RNA, *lincRNA HOTAIR*的高表达与肿瘤转移和预后有关。*lincRNA HOTAIR*可结合HOX基因使其表达发生基因沉默, 但*lincRNA HOTAIR*如何促进肿瘤转移的具体机制却仍有待阐明, 调控*lincRNA HOTAIR*的上游分子也有待探明。

幽门螺杆菌在抗生素等作用后的变异体缺壁菌即Hp-L型在胃癌形成和发展中也发挥一定促进作用^[6-7], 幽门螺杆菌可使胃癌细胞发生上皮-间质转化及干性增强的表现^[8], 临床治疗时需将Hp-L型完全清除才能使在胃炎、消化性溃疡及胃癌防治中取得良好的疗效。Hp-L型感染可促进胃癌的发生、发展、侵袭及转移。其中, 需要探明, 通过何种胞内分子发挥作用, 以利于治疗。*lincRNA HOTAIR*可能为其中的重要调控分子, 本研究发现, 下调*lincRNA HOTAIR*后, 胃癌细胞迁移、侵袭及增殖能力下降, 显

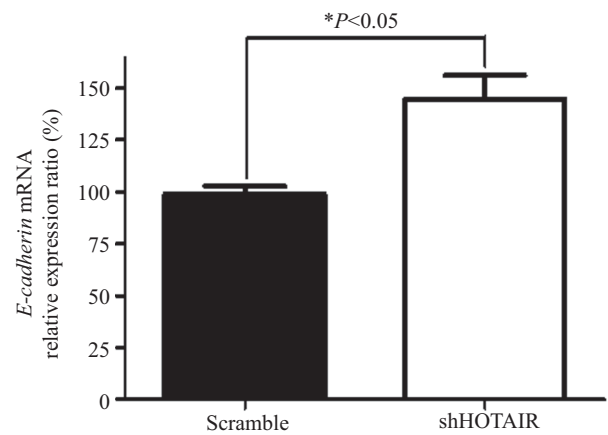


图7 定量PCR法检测转染胃癌细胞*E-cadherin*表达水平

Fig.7 The expression *E-cadherin* mRNA in shHOTAIR cells detected by qPCR

示*lincRNA HOTAIR*在胃癌细胞迁移、侵袭中发挥促进作用, 对胃癌细胞生长也起到促进作用。

探讨机制发现, *lincRNA HOTAIR*下调后增加了胃癌细胞*E-cadherin*表达。*E-cadherin*是细胞间黏附分子, 主要介导同种细胞间的黏附反应, 是维护上皮细胞形态和结构完整性和极性的重要分子, 当*E-cadherin*表达失调时可导致细胞间黏附能力下降及促进肿瘤的转移^[9]。在上皮细胞向间叶细胞转化的过程中, 主要特点是细胞黏附蛋白及细胞黏附蛋白调节蛋白表达异常, 使细胞失去正常接触, 造成细胞离散、迁移, 而细胞黏附能力下降是肿瘤发生侵袭和转移的前提。因而推测, 下调*lincRNA HOTAIR*通过增加*E-cadherin*表达导致细胞间黏附能力提高, 降低胃癌细胞的迁移、侵袭作用。此外, *E-cadherin*与胞膜及胞浆内β-连环蛋白(β-catenin)相关联, 而β-catenin参与Wnt信号传递调节细胞的生长增殖^[10], 可能为下调*lincRNA HOTAIR*降低胃癌细胞增殖能力的机制之一。

由此可见, 靶向下调*lincRNA HOTAIR*的表达, 可以降低胃癌的迁移、侵袭及增殖能力, *lincRNA HOTAIR*可以作为候选靶点用于胃癌的分子靶向治疗, 作为靶点用于抗癌药物的开发。

参考文献 (References)

- Kim SS, Ruiz VE, Carroll JD, Moss SF. *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Lett* 2011; 305(2): 228-38.
- Wen S, Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 2009; 282(1): 1-8.

- 3 Endo H, Shiroki T, Nakagawa T, Yokoyama M, Tamai K, Yamanami H, *et al.* Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer. *PLoS One* 2013; 8(10): e77070.
- 4 Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, *et al.* Long non-coding RNA *HOTAIR* reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464(7291): 1071-6.
- 5 陈登宇, 陈峻崧, 王 净, 曹文虎, 张洪义, 杨翠萍, 等. 靶向上皮性卵巢癌SKOV3细胞ZEB1-shRNA重组体构建及功能研究. *中国免疫学杂志*(Chen Dengyu, Chen Junsong, Wang Jing, Cao Wenhui, Zhang Hongyi, Yang Cuiping, *et al.* Construction of targeting ZEB1-shRNA recombinant and its functional research in epithelial ovarian cancer SKOV3 cells. *Chinese Journal of Immunology*) 2012; 28(7): 611-5.
- 6 黄谷良, 林特夫, 贾继辉, 叶和平. 幽门螺杆菌L型及其致病性. *蚌埠医学院学报*(Huang Gulin, Lin Tefu, Jia Jihui, Ye Heping. *Helicobacter pylori* L-form and its pathogenicity. *Journal of Bengbu Medical College*) 2003; 28(1): 9-12.
- 7 罗彦丽, 于东红, 周 蕾, 蔡兆根, 承泽农. 幽门螺杆菌L型感染与胃癌浸润和转移的关系. *癌变, 畸变, 突变*(Luo Yanli, Yu Donghong, Zhou Lei, Cai Zhaogen, Cheng Zenong. Relation between *Helicobacter pylori* L-form infection in gastric carcinoma and its invasion and metastasis. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*) 2009; 21(5): 384-7.
- 8 Bessède E, Staedel C, Acuña Amador LA, Nguyen PH, Chambonnier L, Hatakeyama M, *et al.* *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* 2014; 33(32): 4123-31.
- 9 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139(5): 871-90.
- 10 Su YJ, Chang YW, Lin WH, Liang CL, Lee JL. An aberrant nuclear localization of E-cadherin is a potent inhibitor of Wnt/ β -catenin-elicited promotion of the cancer stem cell phenotype. *Oncogenesis* 2015; 4: e157.