

长链非编码 RNA lnc-CDH11-3 在胃癌组织中的表达及其干预效应分析

施莉, 韦炜, 向华, 范波, 施小英
(金华市人民医院, 浙江 金华 321000)

摘要: [目的] 分析胃癌标本中长链非编码 RNA lnc-CDH11-3 的表达与临床病理特征的相关性, 并在细胞水平上分析其对胃癌细胞的细胞活力、侵袭力及迁移能力的影响, 探讨其在胃癌发生、发展中可能的调控及意义。 [方法] 收集 46 例胃癌组织及其癌旁正常组织标本, 采用荧光实时定量 PCR 检测胃癌标本及癌旁正常胃黏膜组织中 lnc-CDH11-3 的表达量, 并进一步分析临床病理特征与其表达水平的关系; 利用慢病毒转染技术, 建立 lnc-CDH11-3 表达量不同的胃癌稳定转染细胞株, 运用 CCK-8、Transwell 跨膜实验检测细胞增殖活性、侵袭能力相关生物学功能; 利用核浆分离及 RT-PCR 方法探究 lnc-CDH11-3 在细胞中的表达定位。 [结果] lnc-CDH11-3 在癌组织的表达量高于所对应的癌旁正常胃黏膜组织 ($P < 0.05$)。lnc-CDH11-3 表达水平与肿瘤分化程度、区域淋巴结转移、TNM 分期相关; 而与年龄、性别、肿瘤大小、部位等其他因素无明显联系。稳定转染胃癌细胞株, 成功构建 lnc-CDH11-3 低表达细胞株, CCK-8 增殖实验结果显示下调 lnc-CDH11-3 可显著降低胃癌细胞株的增殖能力; Transwell 跨膜实验显示沉默 lnc-CDH11-3 可显著降低胃癌细胞株的侵袭能力。用 RT-PCR 技术检测发现 lnc-CDH11-3 主要表达于细胞核中, 仅少许表达于胞浆中。 [结论] lnc-CDH11-3 可作为促癌基因影响胃癌细胞增殖、侵袭等生物学特性, 其表达量的变化与胃癌的发生发展密切相关。

关键词: 长链非编码 RNA; lnc-CDH11-3; 胃肿瘤; 增殖; 侵袭

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)08-0790-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.08.B008

Expression of RNA lnc-CDH11-3 in Gastric Cancer and Its Clinicopathological Significance

SHI Li, WEI Wei, XIANG Hua, FAN Bo, SHI Xiao-ying
(Jinhua People's Hospital, Jinhua 321000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression levels of lnc-CDH11-3 in gastric cancer (GC) and its relation to clinicopathological features of the tumor. [Methods] Forty-six specimens (cancer tissues and adjacent normal tissues) of GC were collected, the expression levels of lnc-CDH11-3 were detected by real-time RT-PCR, and its relationship with clinicopathological factors was analyzed. The gastric cancer BGC cells were transfected with lnc-CDH11-3 siRNA to silence the lnc-CDH11-3 expression. Cell proliferation and invasion were examined by CCK-8 assay and Transwell assay, respectively. Nucleocytoplasmic separation technology and RT-PCR were used to determine the intracellular localization of lnc-CDH11-3. [Results] The expression of lnc-CDH11-3 in GC tissue was upregulated in comparison with adjacent normal tissue ($P < 0.05$). The expression of lnc-CDH11-3 was correlated with tumor differentiation, lymph nodes metastasis and TNM staging, but not correlated with age, gender, tumor size and tumor site. The CCK-8 assay showed that down-regulation of lnc-CDH11-3 significantly reduced the proliferation of BGC cells; and Transwell assay showed that silencing of lnc-CDH11-3 significantly reduced the invasive ability of BGC cells. RT-PCR found that lnc-CDH11-3 was mainly expressed in the nucleus, with only a little in the cytoplasm of GC cells. [Conclusion] lnc-CDH11-3 can promote proliferation and invasion of gastric cancer cells, and its expression levels are closely related to the clinicopathological features of gastric cancer.

Subject words: lncRNA; lnc-CDH11-3; gastric cancer; proliferation; metastasis

据国际卫生组织 GLOBOCAN 数据统计, 胃癌

基金项目: 浙江省科技厅课题 (2014C33140); 浙江省金华市科技计划项目 (2013-3-060)

通讯作者: 施莉, 院长助理, 主任医师, 硕士; 金华市人民医院消化科, 浙江省金华市婺城区新华街 326 号 (321000); E-mail: shii990099@126.com

收稿日期: 2017-06-13; **修回日期:** 2017-09-30

是全球高发病率的五大恶性肿瘤之一, 主要集中在东亚、南美及欧洲东南部等处, 全世界每年有超过 951 600 的新发病例和 723 100 的死亡病例, 其中约 42.5% 病例发生在中国, 胃癌发病率和死亡率均居我国恶性肿瘤第 2 位, 是威胁公众生命健康的主要

疾病之一。为了进一步改善胃癌患者预后,需要寻找新的肿瘤标志物和生物治疗靶标,而这一过程有赖于分子水平上胃癌发病机制的研究。

非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 在肿瘤发生发展中的机制是近年来研究的热点,尤其是转录本长度超过 200nt 的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)。许多研究均证实,异常表达的 lncRNA 参与了多种肿瘤的发生发展进程^[1,2]。我们前期 lncRNA 表达谱芯片检测显示,与正常胃黏膜组织比较,lnc-CDH11-3 在胃癌组织中表达明显上调。本研究进一步通过 RT-qPCR 方法检测了胃癌标本中 lnc-CDH11-3 的表达,分析它们与临床病理特征的联系,并在细胞水平进行干预,分析细胞基本生物学特征的变化,探讨其在胃癌发生、发展中可能的调控作用及意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

DMEM 培养基,胎牛血清,Opti-mem 培养基,0.05% Trypsin,脂质体 (lipofetmaine2000) 和 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;ReverTra Ace 逆转录试剂盒、SYBR Mastermix 等购自 Toyobo 公司;BGC 胃癌细胞株购自中科院上海科学研究所细胞库;胞核和胞浆蛋白提取试剂盒购自美国 Thermo-Fisher 公司;Matrigel 购自 BD Bioscience 公司;Transwell 小室购自 Costar 公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁研究所;siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成,引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集

2014 年 6 月至 2016 年 4 月,于我院经外科手术处理的胃癌患者 46 例,术前未曾接受放疗和化疗等治疗,年龄 51~77 岁,中位年龄 64 岁,按照 WHO 胃癌的病理学分类进行组织病理类型分类。每例标本中肿瘤组织和距肿瘤 5cm 以上的癌旁正常胃黏膜组织被取做标本(通过组织病理切片检查确认),离体后 10min 内保存于液氮中以进行后续研究。

1.2.2 RNA 提取

取于液氮中存放的组织标本,在液氮中经研磨处理碾碎至粉状,按照 Trizol 试剂说明书所示方法获取总 RNA。为去除可能污染的 DNA,抽提的 RNA 经 DNase I 处理后,酚-氯仿抽提后,纯化的 RNA 以 DEPC 水溶解。通过 Agilent 2100 bioanalyzer 检测 RNA 的浓度及其完整性。

1.2.3 lnc-CDH11-3 表达检测

按照 ReverTra Ace 逆转录试剂盒说明书进行操作,取 4μg 总 RNA,在随机引物(hexamer)诱导下进行逆转录。反应条件:42℃ 60min,75℃ 15min,反应结束后将产物置于-20℃冰箱中储存。定量 PCR 的检测:反应体系为 20μl。相关分析引物序列如 Table 1 所示。定量荧光 PCR 反应体系中含有:1μl RT 产物,1×SYBR Green I Mastermix,0.5μM 特异前向引物,0.5μM 特异反向引物。反应条件为:95℃ 2min 后,95℃ 15s,60℃ 1min,40 个循环。Real-time 定量 PCR 使用 ABI step-ONE 仪器进行。所有样品经 3 复孔同样条件下处理。根据待测标本的 Ct 值,将 GAPDH 作为内参,采用相对定量 PCR 法,以 $N=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示标本中 lnc-CDH11-3 相对表达量,其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{lnc-CDH11-3} - Ct_{GAPDH})_{肿瘤} - (Ct_{lnc-CDH11-3} - Ct_{GAPDH})_{正常}$ 。

Table 1 Sequences of primers related to lnc-CDH11-3 detection

Gene	Primers	Primer sequence	PCR product length(bp)
lnc-CDH11-3	Forward primers	5'- CGTTCAGCAAATCCACACCA -3'	165
	Reverse primers	5'- GGGTAGACAACACACCTGGA -3'	
GAPDH	Forward primers	5'- CAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAA -3'	101
	Reverse primers	5'- GGCTGGAATCATATTGGAACATGT -3'	

1.2.4 lnc-CDH11-3 干预对细胞增殖活性的检测

BGC 胃癌细胞用含 10%胎牛血清的 RPM1640 培养基,置于 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱内培养,每 2~3d 视其生长状况传代一次。取生长状态较好的肿瘤细胞以 1×10⁵ 细胞/100μl 接种 96 孔板,lnc-CDH11-3 siRNA 转染细胞,设以 20nM、40nM、80nM 三个不同浓度梯度的 siRNA 干预组、无关序列的对照组及不含 siRNA 的空白组。按照 lipofetmaine2000 说明书对细胞进行转染。处理 48h 后,加入 CCK8 溶液(10μl/孔),继续培养 4h。通过酶标仪测量该细胞样品在 450nm 处的吸光度。

1.2.5 Transwell 实验研究细胞的侵袭能力

遵循 Costar24-Well TranswellTM 的说明书进行

操作。Matrigel 储存于-20℃冰箱中,使用前需放置于4℃冰箱处理预冷,过夜后为液态。用无血清培养液把 Matrigel 按 1:1 稀释(于冰上操作),混匀后将预冷的稀释后 Matrigel 胶加入 Transwell 小室,每孔 15μl。于 37℃条件下恒温包被 1h,再用无血清培养液洗涤 3 次。消化 SiHa 细胞并用无血清培养液洗涤 2 次,用细胞计数板计数。向上室(insert)内加入细胞悬液(10 万个细胞)并加入无血清 DMEM 培养基稀释到 400ul,每组设置 3 个复孔。向下室加入 600μl 含 15% FBS 的 DMEM 完全培养基。于 37℃、5% CO₂ 培养 24h。除去上室内的液体,用棉棒擦拭除去上室底部表面贴覆的细胞,将 Transwell 小室浸入固定液(50%甲醇溶液)固定 15min,接下来用 PBS 溶液洗 3 遍。最后用结晶紫溶液染色 30min。风干后,利用荧光显微镜采集图像,每孔随机选 6 个视野计数并计算其平均数。

1.3 统计学处理

通过 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理。胃癌组织中 lnc-CDH11-3 表达水平以中位数以及四分位数间距表示。实验组与对照组两组间差异分析采用 Mann-Whitney *U* 检验,若为三组及以上,则利用 Kruskal-Wallis *H* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织及正常胃黏膜组织中 lnc-CDH11-3 的表达

以 GAPDH 为内参,lnc-CDH11-3 在胃癌中的相对表达量中位数为 8.162,显著高于正常胃黏膜组织中的表达量,差异有统计学意义(*P*<0.001)。见 Figure 1。

2.2 lnc-CDH11-3 表达与胃癌临床病理特征的相关性

胃癌组织中 lnc-CDH11-3 表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移及 TMN 分期有显著相关性(*P*<0.05),中高分化、有淋巴结转移、TNM 分期 III/IV 期组患者表达水平明显升高;与其他临床病理因素如年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位等未见明显相关性 (*P*>0.05)。见 Table 2。

2.3 沉默 lnc-CDH11-3 对胃癌细胞恶性生物学行为的影响

为分析 lnc-CDH11-3 效应,本研究进一步利用 siRNA 沉默 BGC 胃细胞株中 lnc-CDH11-3 表达。如

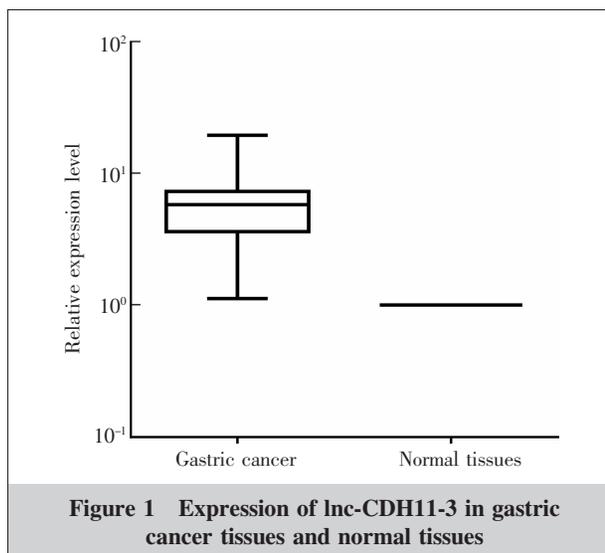


Figure 1 Expression of lnc-CDH11-3 in gastric cancer tissues and normal tissues

Table 2 Correlation analysis between lnc-CDH11-3 expression and clinicopathological factors of gastric cancer

Clinicopathological factors	n	lnc-CDH11-3 expression *	<i>P</i>
Age(years)			
<60	12	5.275(2.368~7.455)	0.715
≥60	34	6.085(4.223~7.613)	
Gender			
Male	41	5.126(2.932~7.432)	0.769
Female	5	6.241(3.937~7.431)	
Tumor size(cm)			
<5	22	6.153(5.030~9.525)	0.686
≥5	24	5.461(3.213~7.673)	
Tumor position			
Fundus of stomach	8	5.926(2.244~5.386)	0.621
Body of stomach	12	6.232(4.330~8.216)	
Antrum of stomach	26	6.921(5.522~9.576)	
Differentiation			
Moderately and highly differentiated	34	4.332(2.633~6.438)	0.028
Poor differentiated	12	6.433(4.89~8.828)	
Invasion depth			
T _{1/2}	11	5.678(4.343~7.53)	0.587
T _{3/4}	35	6.36(2.933~8.658)	
Lymph node metastasis			
Positive	34	6.742(5.420~9.661)	0.036
Negative	12	4.352(2.679~6.234)	
TNM staging			
I	9	4.871(2.223~5.155)	0.025
II	11	5.050(4.256~8.142)	
III/IV	26	6.923(5.558~9.250)	

*The expression of lnc-CDH11-3 was described by median and interquartile

Figure 2A 所示,分别用 20、40、80nmol/L siRNA 干预后,均可明显降低细胞内 lnc-CDH11-3 表达,40nmol/L 与 80nmol/L siRNA 的干扰效果差异无统计学意义,为此选择 40nmol/L 进行后续干预实验。如 Figure 2B 所示,40nmol/L siRNA 干预后,用 CCK8 试剂盒检测细胞的增殖情况,可见其增殖能力明显下降。Millicell 小室侵袭实验检测迁移侵袭能力发现,沉默 lnc-CDH11-3 可显著降低其侵袭能

力(Figure 3)。

2.4 lnc-CDH11-3 在胃癌细胞的定位表达分析

利用胞浆胞核分离提取试剂盒,分别提取 BGC 细胞的胞浆及胞核 RNA,利用 RT-PCR 方法检测 lnc-CDH11-3 的表达水平,结果发现,lnc-CDH11-3 主要表达于细胞核中,仅有少许表达于细胞浆中,在胞核和胞浆中的表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见 Figure 4。

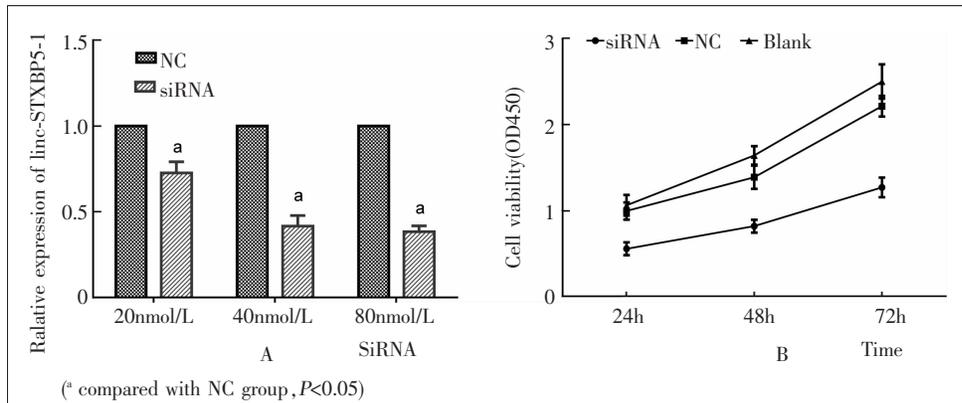


Figure 2 Effect of silencing lnc-CDH11-3 on the proliferation of BGC cells

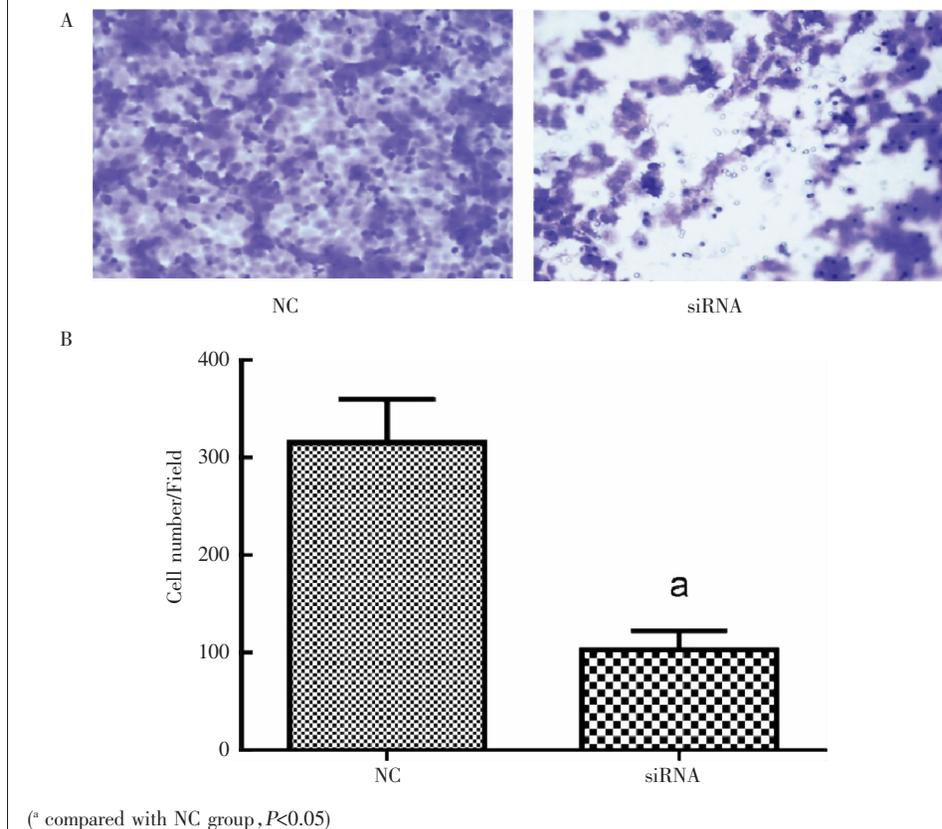


Figure 3 Effect of silencing lnc-CDH11-3 on invasion ability of BGC cells

3 讨论

RNA 组学的研究逐渐成为后基因组时代的热点之一:基因组超过 98% 的转录产物为不编码蛋白的非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)。其中长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类自身不编码蛋白的 RNA,通常转录本长度超过 200nt。lncRNA 可通过在表观遗传、转录及转录后等各个层面调控基因表达参与多种疾病的发生发展^[3]。越来越多的研究表明,lncRNA 在多种肿瘤的发生发展中扮演了重要角色,并逐渐成为肿瘤研究的热点方向之一。

关于 lncRNA 与胃癌的研究是目前研究的热点。lncRNA 不但是胃癌新的诊断生物标志,而且参与胃癌的发生发展^[4,5]。已报道 OR3A4^[6]、MALAT1^[7]、NEAT1^[8]、lncRNA00152^[9]、SNHG15^[10]等 lncRNA 通过多种机制参与胃癌发

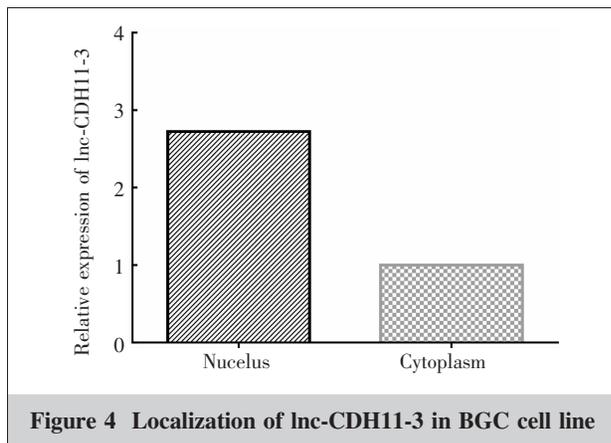


Figure 4 Localization of lnc-CDH11-3 in BGC cell line

生发展。SNHG15 可通过调节 MMP2/MMP9 表达,促进胃癌细胞的增殖和转移。BC032469 可通过上调 hTERT 表达后进而调节 miR-1207-5p 从而促进胃癌细胞增殖^[11]。HOXA-AS2 可通过表观遗传下调 P21/PLK3/DDIT3 轴的效应促进胃癌细胞增殖^[12]。

lnc-CDH11-3 是一条定位于人染色体 16q21 的一个 lncRNA (long intergenic non-coding RNA)。lnc-CDH11-3 存在 8 种转录本, 长度 263 bp~1760 bp。我们前期 lncRNA 表达谱芯片检测显示, 与正常胃黏膜组织比较, lnc-CDH11-3 在胃癌组织中的表达显著增加。本研究通过定量 PCR 技术进一步证实了芯片筛选的结果。与胃癌临床病理特征的相关分析显示, lnc-CDH11-3 的表达量在低分化组明显高于中高分化组 ($P=0.028$), 在胃癌伴淋巴结转移的患者的胃癌组织中显著高于无淋巴结转移患者的胃癌组织 ($P=0.036$), 临床分期 III~IV 期的胃癌组织亦明显高于 I、II 期 ($P=0.025$)。沉默 BGC 胃癌细胞 lnc-CDH11-3 表达后, 可显著降低其增殖及侵袭能力。这些结果提示 lnc-CDH11-3 作为促癌基因发挥效应, 可促进胃癌细胞的活力、侵袭力和迁移能力, 可作为胃癌预后不良的一项新的生物标志物, 也可作为潜在的治疗靶点。

关于 lnc-CDH11-3 调控机制迄今尚无相关研究报道。本研究通过检测细胞核、细胞浆中的表达情况, 发现 lnc-CDH11-3 主要分布于细胞核内。研究显示, 约 50% lncRNA 可通过招募多种染色质修饰复合物, 如 PCR2 蛋白复合物 (polycomb repressive complex 2), 在表观遗传学水平上发挥调控作用^[13]。是否 lnc-CDH11-3 通过招募染色质修饰复合物影响其邻近区域抑癌基因的启动子区的表观遗传学调控

有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Tsai MC, Spitale RC, Chang HY. Long intergenic noncoding RNAs: new links in cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(1):3-7.
- [2] Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, et al. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? [J]. *Oncogene*, 2012, 31(43):4577-4587.
- [3] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease [J]. *Cell*, 2013, 152(6):1298-1307.
- [4] Gu Y, Chen T, Li G, et al. LncRNAs: emerging biomarkers in gastric cancer [J]. *Future Oncol*, 2015, 11(17):2427-2441.
- [5] Yang ZG, Gao L, Guo XB, et al. Roles of long non-coding RNAs in gastric cancer metastasis [J]. *World J Surg Oncol*, 2015, 21(17):5220-5230.
- [6] Guo X, Yang Z, Zhi Q, et al. Long noncoding RNA OR3A4 promotes metastasis and tumorigenicity in gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21):30276-30294.
- [7] Qi Y, Ooi HS, Wu J, et al. MALAT1 long ncRNA promotes gastric cancer metastasis by suppressing PCDH10 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11):12693-12703.
- [8] Ma Y, Liu L, Yan F, et al. Enhanced expression of long non-coding RNA NEAT1 is associated with the progression of gastric adenocarcinomas [J]. *World J Surg Oncol*, 2016, 14(1):41.
- [9] Chen WM, Huang MD, Sun DP, et al. Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes tumor cell cycle progression by binding to EZH2 and repressing p15 and p21 in gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9):9773-9787.
- [10] Chen SX, Yin JF, Lin BC, et al. Upregulated expression of long noncoding RNA SNHG15 promotes cell proliferation and invasion through regulates MMP2/MMP9 in patients with GC [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(5):6801-6812.
- [11] Lu 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.
- [12] Xie M, Sun M, Zhu YN, et al. Long noncoding RNA HOXA-AS2 promotes gastric cancer proliferation by epigenetically silencing P21/PLK3/DDIT3 expression [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32):33587-33601.
- [13] Khalil AM, Guttman M, Huarte M, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(28):11667-11672.