

长链非编码 RNA RP11-214F16.8 促进乳腺癌细胞增殖

陈向宙, 叶嘉慧, 黎谢梦丹, 贾小婷*, 贺智敏

(广州医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 广州恶性肿瘤治疗转化医学重点实验室, 广州 510095)

摘要 长链非编码 RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs) 在乳腺癌发生发展中的作用备受瞩目。本研究通过大数据分析发现, lncRNA RP11-214F16.8 在乳腺癌组织中的表达量显著高于正常组织, 且其表达量与乳腺癌患者预后负相关。因此, 本文采用 qRT-PCR 技术, 在收集的临床样本中验证 RP11-214F16.8 的表达, 证实其在乳腺癌组织中相对表达量为 5.65 ± 0.72 , 其在癌旁组织中表达量为 2.63 ± 0.35 , 且 RP11-214F16.8 的表达量与乳腺癌瘤体大小和临床 TNM 分期相关。此外发现, RP11-214F16.8 在乳腺癌细胞中的表达量高于正常乳腺上皮细胞。在乳腺癌 MCF-7 细胞中, 过表达 RP11-214F16.8 后, MCF-7 细胞的增殖能力显著增强。而在 MDA-MB-231 细胞中, 敲低 RP11-214F16.8 的表达, 获得相反的结果。进一步研究发现, RP11-214F16.8 可上调细胞周期蛋白 D3、CDK4 的表达, 而下调 p18 蛋白表达量, 进而加速细胞增殖。总之, RP11-214F16.8 在乳腺癌中高表达, 且促进乳腺癌细胞增殖, 进而推动乳腺癌进程。这一研究发现, 将为乳腺癌发生发展的网络机制研究提供新的理论依据。

关键词 长链非编码 RNA; RP11-214F16.8; 增殖; 乳腺癌

中图分类号 R737.9

Long Non-coding RNA RP11-214F16.8 Enhances Proliferation of Breast Cancer Cells

CHEN Xiang-Zhou, YE Jia-Hui, LI-XIE Meng-Dan, JIA Xiao-Ting*, HE Zhi-Min

(Cancer Research Institute, Affiliated Cancer Hospital & Institute of Guangzhou Medical University, Affiliated Cancer Hospital & Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou Key Laboratory of Translational Medicine on Cancer Treatment, Guangzhou 510095, China)

Abstract Long non-coding RNAs (lncRNAs) were highlighted in the progression of breast cancer. In this study, it was found that RP11-214F16.8 was significantly enhanced in breast cancer tissues in data set analysis by GEPIA software, comparing with that in normal. Moreover, RP11-214F16.8 was negatively correlated with the prognosis of breast cancer patients. Furthermore, qRT-PCR assay was performed to determine the expression levels of RP11-214F16.8 in breast cancer and normal tissues collected at our hospital. The results showed that RP11-214F16.8 was highly expressed in breast cancer tissues (5.65 ± 0.72) than that in normal tissues (2.63 ± 0.35). RP11-214F16.8 expression was positively correlated with tumor size and TNM stage of breast cancer. Similarly, it was demonstrated that RP11-214F16.8 was evidently accelerated in breast cancer cells, comparing with that in mammary MCF-10A epithelial cells. Restoring RP11-214F16.8 enhanced proliferation of MCF-7 cells, while silencing RP11-214F16.8 reduced MDA-MB-231 cells proliferation. RP11-214F16.8 could upregulate cyclin D3 and CDK4 protein expression while downregulated p18 protein expression. To sum up, RP11-214F16.8

收稿日期: 2018-03-12; 修回日期: 2018-05-10; 接受日期: 2018-05-31

国家自然科学基金 (No. 81602016); 广东省医学科学技术研究基金 (No. A2017362) 和广州市医药卫生科技项目 (No. 20171A011321) 资助

* 通讯作者 Tel: 020-66673666-2016; E-mail: jxt1231994@163.com

Received: March 12, 2018; Revised: May 10, 2018; Accepted: May 31, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81602016); Medical Science and Technology Research Foundation of Guangdong Province (No. A2017362) and Guangzhou Medicine and Health Care Technology Project (No. 20171A011321)

* Corresponding author Tel: 020-66673666-2016; E-mail: jxt1231994@163.com

was highly expressed in breast cancer and enhanced proliferation of breast cancer cells. This investigation can provide new insight into the molecular mechanisms of breast cancer progression.

Key words long non-coding RNAs(lncRNAs); RP11-214F16.8; proliferation; breast cancer cells

人类基因组中,几乎 98% 的 RNAs 都是长链非编码 RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs),它们在肿瘤尤其是乳腺癌发生发展中发挥重要的作用^[1]。LncRNAs 是一类长度大于 200 nt 且没有蛋白质编码功能的 RNAs^[2]。这些 lncRNAs 经由 RNA 聚合酶 II 转录后,在 5' 端被加帽或在 3' 端加 A 尾。剪接之后的成熟 lncRNAs,一部分留在核内,一部分被输送到细胞质^[3]。核内的 lncRNAs 参与染色体重塑和修饰,转录调控或者 RNA 加工;胞质中的 lncRNAs 通常与成熟 mRNA 或者蛋白质结合以发挥其功能^[4,5]。

RP11-214F16.8,位于 13 号染色体,Ensemble ID 是 ENSG00000280710.2,转录本全长是 565 bp。本研究通过在线软件 GEPIA 统计了 1 085 例乳腺癌组织和 291 例正常组织中 RP11-214F16.8 的表达量。结果发现,RP11-214F16.8 在乳腺癌组织中显著高表达。提示其可能与乳腺癌发生发展相关。我们拟在此基础上,采用 qRT-PCR 方法检测 43 例乳腺癌组织和 26 例癌旁组织中 RP11-214F16.8 的表达量,分析其表达量与乳腺癌临床特征及预后的相关性。此外,通过干预 RP11-214F16.8 的表达,初步探究其对乳腺癌细胞增殖能力的影响和相关的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及标本收集

人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 及乳腺癌细胞 MCF-7、T47D、BT549、MDA-MB-231 和 SKBR3 本实验室保存。将乳腺癌细胞接种于含 10% 胎牛血清 (Gibco 公司) 的 1640 (Gibco 公司) 培养液中,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。MCF-10A 细胞培养基配置:DMEM/F12 (1:1) 培养基,马血清 (5%),依次加入胰岛素 (10 μg/mL)、表皮生长因子 (20 ng/mL)、霍乱毒素 (100 ng/mL) 和氢化可的松 (0.5 μg/mL),培养条件与 MCF-7 细胞一致。

本实验所需标本均来自本院组织标本库。其中,乳腺癌组织 43 例,癌旁组织 26 例。

1.2 RNA 提取及逆转录

使用 Trizol 室温裂解细胞 5 min,加入氯仿萃

取,静置 10 min,12 000 g 离心 10 min。吸取水相加入异丙醇,室温静置 10 min,12 000 g 离心 10 min。弃废液,沉淀用 70% 乙醇洗涤 1 次,12 000 g 离心 5 min。弃废液,风干,加入 30 μL 无核酶水,−80℃ 保存备用。

按照 Fermentas 逆转录试剂盒说明书,配置逆转录体系:RNA 2 μg,随机引物 1 μL,水补足 12 μL。65℃ 5 min,立即冰置 2 min。加入 4 μL 反应液,1 μL RNA 酶抑制剂,2 μL dNTP,1 μL 逆转录酶。42℃ 1 h,70℃ 5 min。−20℃ 保存该 cDNA。

1.3 qRT-PCR 检测

qRT-PCR 检测试剂盒购自 Fermentas 公司,按照说明书配置反应体系。在 Bio-Rad 荧光定量仪上运行该程序:50℃ 2 min,95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 30 s (40 个循环)。根据 2-ΔΔ_{ct} 值计算相对表达量。其中,内参 GAPDH 引物如下,Forward: 5'-ATTCCATGGCACCGTCAAGGCTGA-3', Reverse: 5'-TTCTCCATGCTGGTGAAGACGCCA-3'。RP11-214F16.8 引物如下,Forward: 5'-GTAACCAAGGAACCCCGAATG-3', Reverse: 5'-TTCCCACTGATGATGTGAGACG-3'。

1.4 Western 印迹分析

用 RIPA 裂解液处理细胞并超声破碎,14 000 g 离心 10 min。收集上清,用 BCA 法测蛋白质浓度。SDS-PAGE 后,将蛋白质条带转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,ECL 化学发光法检测蛋白质表达量。

1.5 BrdU 细胞增殖活力检测

将目标细胞以 10 000 个细胞/孔密度接种到 96 孔板,每个实验组做 3 个副孔。待贴壁后,饥饿培养 24 h。加入 BrdU 检测液,在 37℃ 培养箱中孵育 20 h。加入固定/变形液,孵育 30 min。弃废液,加入检测抗体,室温孵育 1 h。弃废液,洗涤液洗涤 3 次。加入辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育 30 min。最后,加入底物,室温孵育 30 min。加入终止液,多功能酶标仪 450 nm 处检测各孔的吸光值,计算各孔的细胞活力。

1.6 质粒构建

自广州富能购买靶向 RP11-1055B8.4 的 siRNAs 和针对 RP11-1055B8.4 的过表达载体。

1.7 统计学方法

所有的实验重复 3 次,以确保结果的可靠性。所有的数据都用平均值 ± 标准差 ($M \pm SD$) 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验或者方差分析, $P < 0.05$ 表示有差异。

2 结果

2.1 RP11-214F16.8 在乳腺癌中高表达

通过在线软件 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 发现,RP11-214F16.8 在 1 085 例乳腺癌组织中的表达量显著高于其在 291 例癌旁组织中的表达量(Fig. 1A)。采用 qRT-PCR 技术,验证 RP11-214F16.8 在 43 例乳腺癌组织及 26 例癌旁组织中的表达量,获得与 Fig. 1A 一致的结果(Fig. 1B)。同样,在乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞中,检测 RP11-214F16.8 表达量,发现其在乳腺癌细胞中的表达量显著高于正常乳腺上皮细胞(Fig. 1C)。

2.2 RP11-214F16.8 与乳腺癌临床特征及预后相关

为探讨 RP11-214F16.8 临床意义,统计分析了 43 例乳腺癌患者中 RP11-214F16.8 的表达与乳腺癌临床特征的相关性。结果证实,RP11-214F16.8 的表达与乳腺癌患者年龄、淋巴结转移及远端转移无关,但是与瘤体大小和 TNM 分期密切相关(Table 1)。

Table 1 Correlation between the levels of RP11-214F16.8 and clinicopathological parameters in breast cancer tissues						
Factor	Cases	RP11-214F16.8 Expression				P value
		High	(≥2 fold)	Low		
All patients	43	No.	%	No.	%	
Age (years)						
≤45	23	13	56.52%	10	43.48%	0.783
>45	20	11	55%	9	45%	
Tumor Size(CM)						
≤ 2	13	4	30.77%	9	69.23%	0.004
> 2	30	23	76.67%	7	23.33%	
Node Status						
Yes	30	25	83.33%	5	16.67%	0.296
No	13	9	69.23%	4	30.77%	
TNM Stage						
I + II	11	5	45.45%	6	54.55%	0.042
III + IV	32	25	78.13%	7	21.87%	
Distant Metastasis						
Yes	15	10	66.67%	5	33.33%	0.561
No	28	21	75%	7	25%	

在 GEPIA 软件上统计 RP11-1055B8.4 与乳腺癌患者预后的相关性。发现 RP11-214F16.8 高表达的乳腺癌患者预后,明显较 RP11-214F16.8 低表达的

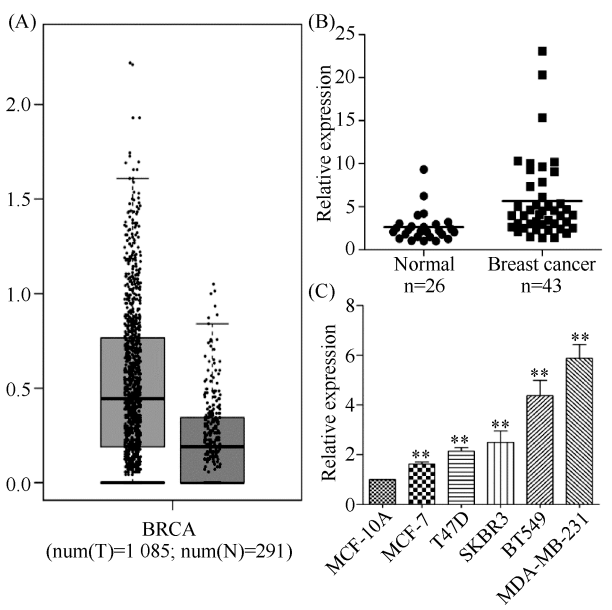


Fig. 1 RP11-214F16.8 was enhanced in breast cancer tissues (A) Bioinformatics analysis was performed to determine RP11-214F16.8 expression in breast cancer and normal tissues using online software GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>). (B) The expression levels of RP11-214F16.8 in 43 cases of breast cancer tissues and 26 cases of normal tissues were determined by qRT-PCR assay. (C) qRT-PCR assay was used to test RP11-214F16.8 expression in breast cancer cells and mammary epithelial cells. ** $P < 0.01$, vs MCF-10A

的乳腺癌患者预后差(Fig. 2)。
2.3 RP11-214F16.8 促进乳腺癌细胞增殖
根据 Fig. 1C 提示,在 MCF-7 细胞中过表达

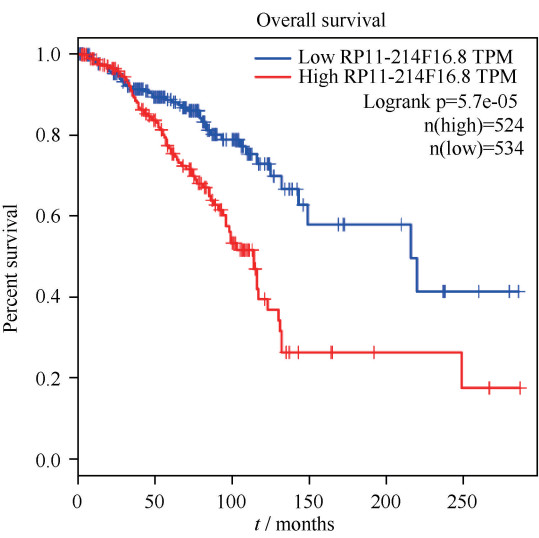


Fig. 2 RP11-214F16.8 was positively correlated with poor prognosis of breast cancer patients
GEPIA software was used to evaluate the correlation between the expression of RP11-214F16.8 and prognosis of breast cancer patients

RP11-214F16.8, 在 MDA-MB-231 细胞中利用 siRNA 敲低 RP11-214F16.8 表达。BrdU 检测结果证实,RP11-214F16.8 可显著增加 MCF-7 细胞的

增殖能力 (Fig. 3A), 而在 MDA-MB-231 细胞中降低 RP11-214F16.8 的表达后,该细胞增殖能力大幅度减弱 (Fig. 3B)。对上述两种干预 RP11-214F16.8 的细胞行 Western 印迹检测,发现 RP11-214F16.8 可上调细胞周期蛋白 D3、CDK4,而下调 p18 的蛋白质水平表达量 (Fig. 3C), 提示 RP11-214F16.8 通过调控细胞周期相关分子表达促进乳腺癌细胞增殖。

3 讨论

基因组测序和生物信息学研究揭示了真核生物基因组转录广谱的 RNAs, 包括编码蛋白质的 mRNAs、短的非编码转录物和 lncRNAs^[6,7]。在这些 RNA 中,发现非编码转录物在人类细胞中更丰富。虽然高达 70% 的人类基因组会被转录,然而只有 2% 基因组会被翻译成蛋白质^[8]。越来越多的证据表明,lncRNAs 不仅仅是基因组的噪音产物,而且具有其独特的细胞功能,尤其是其与肿瘤密切相关的功能^[9-12]。

LncRNA HOTAIR 在原发性乳腺癌中的表达量显著高于癌旁组织,且 HOTAIR 促进乳腺癌转移^[13,14]。机制研究表明,HOTAIR 通过修饰特定的

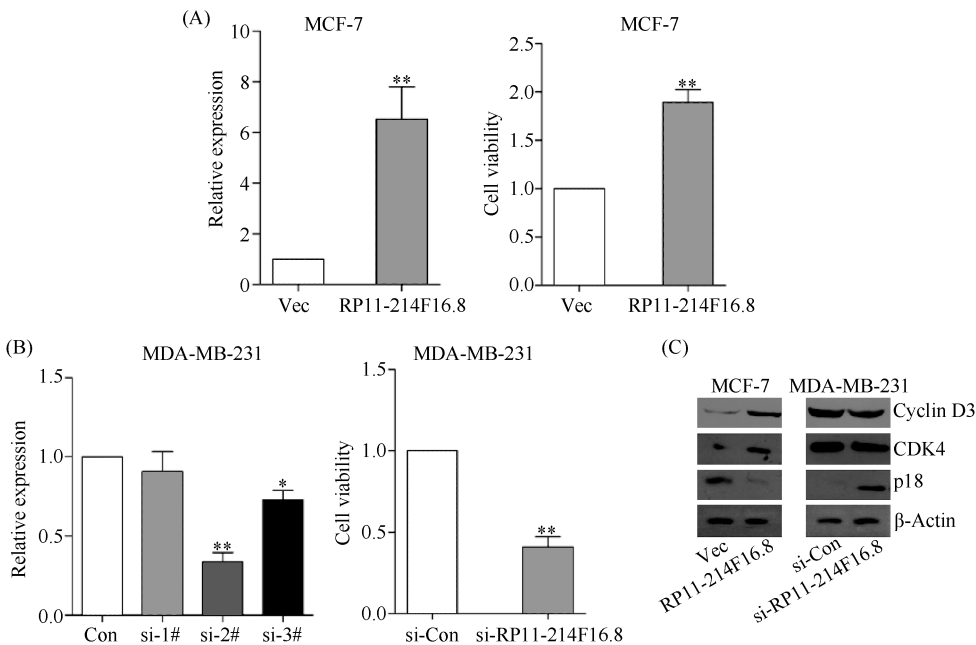


Fig. 3 RP11-214F16.8 evidently improved proliferation and colony formation of breast cancer cells (A) RP11-214F16.8 or vector plasmids were overexpressed in MCF-7 cells, the relative expression of RP11-214F16.8 was estimated by qRT-PCR assay. BrdU assay was carried out to measure cell proliferation ability. ** $P < 0.01$, vs Vec. (B) siRNAs targeting RP11-214F16.8 was transfected into MDA-MB-231 cells. qRT-PCR assay was used to determine RP11-214F16.8 expression, and si-2# was chosen for the following study for its best silencing effect on RP11-214F16.8; cell proliferation ability was assessed by BrdU. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs si-con. (C) Western blot assay was utilized to determine expression levels of cell cycle biomarkers in these cells

组蛋白密码影响多个下游基因^[15]。MALAT1 与 RNA 结合蛋白 HuR 形成抑制复合物,通过结合 CD133 基因启动子负向控制其表达。CD133 是肿瘤干细胞的标志物,促进各种肿瘤的上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 进程^[16,17]。SNHG16 在膀胱癌的组织 and 细胞系中都明显高表达,且其高表达与患者的总体生存率负相关。SNHG16 可表观沉默 p21 的表达,推动细胞周期前进,减少细胞凋亡。沉默 SNHG16 后,抑制细胞增殖^[18]。MYC 转录上调 lncRNA DANCER,而 DANCER 抑制 p21 的表达,并且通过 p21 沉默可部分挽救 DANCER 损失对细胞增殖的抑制作用^[19]。与配对的正常组织相比,TFPI2AS1 在非小细胞肺癌组织中显著高表达。敲低 TFPI2AS1 促进非小细胞肺癌增殖和迁移能力。机制研究发现,TFPI2AS1 可抑制细胞 G₁/S 期转换,降低细胞周期蛋白 D1 和细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK2 的表达^[20]。本研究发现,RP11-214F16.8 在乳腺癌组织和细胞中均显著高表达,且其表达量与乳腺癌瘤体、TNM 分期正相关。生物信息学统计分析后发现,其表达量与乳腺癌患者预后负相关。过表达 RP11-214F16.8 可促进乳腺癌细胞增殖,反之亦然。初步机制研究发现,RP11-214F16.8 可显著上调细胞周期相关蛋白 D3 和细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK4 的表达,同时下调细胞周期相关蛋白 p18 的表达,促进细胞增殖。但是,本课题对 RP11-214F16.8 如何调控上述周期相关蛋白质并不明了。在今后的研究中,我们将重点探讨上述调控机制,以期对乳腺癌发生发展网络提供更加丰富的理论依据。

参考文献 (References)

[1] Salamo O, Mortaz E, Mirsaedi M. Noncoding RNAs: new players in pulmonary medicine and sarcoidosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, **58**(2):147-156

[2] Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs[J]. Annu Rev Biochem, 2012, **81**: 145-166

[3] Sun M, Kraus WL. Minireview: Long noncoding RNAs: new

“links” between gene expression and cellular outcomes in endocrinology[J]. Mol Endocrinol, 2013, **27**(9): 1390-1402

[4] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease[J]. Cell, 2013, **152**(6): 1298-1307

[5] Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J]. Cancer Cell, 2016, **29**(4): 452-463

[6] Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription[J]. Science, 2007, **316**(5830): 1484-1488

[7] Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer[J]. Nat Med, 2015, **21**(11): 1253-1261

[8] Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome[J]. Science, 2005, **309**(5740): 1559-1563

[9] Liu Y, Sharma S, Watabe K. Roles of lncRNA in breast cancer[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2015, **7**: 94-108

[10] Vikram R, Ramachandran R, Abdul KS. Functional significance of long non-coding RNAs in breast cancer[J]. Breast Cancer, 2014, **21**(5): 515-521

[11] 赵明,杨芝芸,丁先锋.长链非编码 RNA 与性激素依赖性肿瘤[J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Zhao M, Yang ZY, Ding XF. Long non-coding RNAs in common sexual hormone-dependent tumors[J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2016, **32**(4): 380-387

[12] Alvarez-Dominguez JR, Lodish HF. Emerging mechanisms of long noncoding RNA function during normal and malignant hematopoiesis[J]. Blood, 2017, **130**(18): 1965-1975

[13] 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

[14] Sørensen KP, Thomassen M, Tan Q, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker of metastasis in estrogen receptor-positive primary breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, **142**(3): 529-536

[15] Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs[J]. Cell, 2007, **129**(7): 1311-1323

[16] Wang J, Ye C, Xiong H, et al. Dysregulation of long non-coding RNA in breast cancer: an overview of mechanism and clinical implication[J]. Oncotarget, 2017, **8**(3): 5508-5522

[17] Latorre E, Carelli S, Raimondi I, et al. The ribonucleic complex HuR-MALAT1 represses CD133 expression and suppresses epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. Cancer Res, 2016, **76**(9): 2626-2636

[18] Cao X, Xu J, Yue D. LncRNA-SNHG16 predicts poor prognosis and promotes tumor proliferation through epigenetically silencing p21 in bladder cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2018, **25**(1-2): 10-17

[19] Lu Y, Hu Z, Mangala LS, et al. MYC targeted long non-coding RNA DANCER promotes cancer in part by reducing p21 levels[J]. Cancer Res, 2018, **78**(1): 64-74

[20] Gao S, Lin Z, Li C, et al. TFPI2AS1, a novel lncRNA that inhibits cell proliferation and migration in lung cancer[J]. Cell Cycle, 2017, **16**(23): 2249-2258