

# LncRNA AC006449.2 抑制卵巢癌细胞增殖

张晓君\*

(广州市红十字会医院检验科, 广州 510220)

**摘要** 长链非编码 RNAs(long non-coding RNAs, lncRNAs)是一类无蛋白质编码功能的 RNAs。多项研究表明,lncRNAs 在肿瘤的发生发展中发挥重要的作用。GEPIA 数据库结合 qRT-PCR 结果提示,lncRNA AC006449.2 在卵巢癌组织中的表达量显著低于正常组织,且其在卵巢癌细胞中的水平也低于正常卵巢上皮细胞。进一步分析发现,lncRNA AC006449.2 的表达量与卵巢癌患者较差的预后负相关,与瘤体大小和远端转移密切相关,而与卵巢癌患者年龄、淋巴结转移及 TNM 分期无关。细胞功能研究发现,上调 AC006449.2,卵巢癌细胞的增殖和平板克隆能力降低;而下调 AC006449.2 之后,该细胞的增殖和平板克隆能力显著增加。深入的机制研究发现,AC006449.2 可上调细胞周期相关蛋白 p21 和 p27 的表达量,上调促凋亡蛋白 Bax 的表达,而下调抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达量,最终抑制卵巢癌细胞的增殖。上述研究结果推测,lncRNA AC006449.2 在卵巢癌细胞中可能发挥抑癌因子的作用。

**关键词** 长链非编码 RNA; AC006449.2; 卵巢癌; 细胞增殖; 平板克隆

**中图分类号** R737.31

# LncRNA AC006449.2 Suppresses Proliferation of Ovarian Cancer Cells

ZHANG Xiao-Jun\*

(Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou 510220, China)

**Abstract** LncRNAs, a class of RNAs without protein coding ability, play important roles in tumor progression. GEPIA combining with qRT-PCR assays indicated that lncRNA AC006449.2 was downregulated in ovarian cancer tissues, comparing with that in normal tissues. Meanwhile, expression of lncRNA AC006449.2 was much lower in ovarian cancer cells as compared with normal ovarian epithelial cells. Further study demonstrated that lncRNA AC006449.2 was negatively correlated with poor outcomes of ovarian cancer patients. The relationship between AC006449.2 and clinicopathological parameters was also investigated. It is showed that AC006449.2 was related to tumor size and distant metastasis, but not age, node metastasis of TNM stage. Functionally, restored AC006449.2 obviously reduced proliferation and colony forming ability of ovarian cancer cells, whereas Knock-down of AC006449.2 yielded opposite results. Furthermore, we found that AC006449.2 obviously enhanced expression of p21, p27, and Bax but reduced expression of Bcl2 bat mRNA and protein levels. In conclusion, lncRNA AC006449.2 acted as a suppressor in ovarian cancer.

**Key words** long non-coding RNAs ( lncRNA ); AC006449.2; ovarian cancer; proliferation; colony forming

卵巢癌是常见的恶性肿瘤,其死亡率居女性肿瘤第 5 位。2017 年,美国新增卵巢癌 22 440 例,新增死亡病例 14 080 例<sup>[1]</sup>。2015 年,中国新增卵巢癌患者 52 100 例,2 2500 例卵巢癌患者死亡<sup>[2]</sup>。卵巢癌治疗主要是手术,辅以化疗。卵巢癌患者治疗效果不佳,尤其是卵巢上皮癌患者,其 5 年生存率仅为 30%左右<sup>[3]</sup>。卵巢癌发生发展的机制不详,是其发

收稿日期: 2018-11-08; 修回日期: 2018-12-14; 接受日期: 2019-01-23

\* 通讯作者 Tel: 18928806000; E-mail: x20xj16@126.com

Received: November 8, 2018; Revised: December 14, 2018; Accepted: January 23, 2019

\* Corresponding author Tel: 18928806000; E-mail: x20xj16 @ 126.com

生率和死亡率居高不下的主要原因。因此,探索卵巢癌增殖的分子机制,丰富卵巢癌发生发展的调控网络,寻找潜在的治疗靶点是卵巢癌治疗的当务之急。

长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) 是一类长度大于 200 nt 且无蛋白质编码功能的 RNA<sup>[4]</sup>。深入研究发现, lncRNAs 在发育、转移、凋亡、干细胞特性、增殖、DNA 损伤、分化和肿瘤中都发挥着非常重要的功能<sup>[5-7]</sup>。我们在前期研究中发现, lncRNA AC006449.2 在卵巢癌组织中的表达量显著低于其在正常组织中的表达量, 且 AC006449.2 的表达量与卵巢癌患者较差的预后负相关。AC006449.2 位于 17 号染色体, 其转录本由 2 个外显子组成, 全长 486 bp, 转录本 ID 为 ENST00000618407.1。本研究拟在上述文献基础上, 探讨 lncRNA AC006449.2 在卵巢癌中作用及其分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及其培养

人正常卵巢上皮细胞 HOSEpiC 及卵巢癌细胞 A2780、SKOV3、CoC1 和 HO-8910 均由本院实验室保存。将上述细胞接种于含 10% 胎牛血清 (Gibco 公司) 的 1640 培养基 (Gibco 公司) 中, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

### 1.2 临床样本

在患者知情同意的情况下, 收集自 2013 年 7 月至 2018 年 4 月来本院就诊的卵巢癌患者手术标本及正常卵巢组织标本。其中, 卵巢癌组织 49 例, 正常卵巢组织 34 例。将手术标本放在 -80℃ 冰箱中备用。查阅病历和随访资料, 统计分析 AC006449.2 表达量与卵巢癌临床特征及患者预后的相关性。

### 1.3 稳定细胞株的培养

AC006449.2 过表达质粒 LV-AC006449.2 和对照质粒、干扰的慢病毒质粒 LV-sh-AC006449.2 和对照质粒均购自广州复能生物有限公司。在 HEK-293T 细胞中, 根据慢病毒包装说明书, 包装各病毒。将 500 μL 未浓缩的病毒液直接感染靶细胞 24 h, 更换含有 1 μg/mL 嘌呤霉素的完全培养基筛选目标克隆。挑取单克隆细胞群落, 实时荧光定量 PCR 技术检测 AC006449.2 在各细胞中的表达量, 以确定 AC006449.2 稳定细胞株和干扰细胞株是否成功建立。将成功建立的过表达稳定株命名为 A2780/AC006449.2, 对照组命名为 A2780/Vec; 将成功建

立的干扰细胞株命名为 SKOV3/sh-AC006449.2, 对照组命名为 SKOV3/sh-con。

### 1.4 实时荧光定量 PCR

将目标细胞收集到离心管中, 加入 TRIzol 提取细胞总 RNAs, 将其逆转录成 cDNA。天根生物有限公司 lncRNA qPCR Detection Kit 用于 qRT-PCR。配置反应体系: lncR lncRNA premix 10 μL, Forward primer 0.5 μL, Reverse primer 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补至 20 μL。在 BioRad 荧光定量仪上运行该程序: 95℃ 3 min, 95℃ 5 s, 60℃ 15 s (40 个循环)。根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值计算相对表达量。GAPDH 上游引物: 5'-ATTCCATGGCACCCTCAAGGCTGA-3', GAPDH 下游引物: 5'-TTCTCCATGGTGGTGAAGACGCCA-3'。AC006449.2 上游引物: 5'-CAAGTCCGCTCCTCCCATTA-3', 下游引物 5'-TG TAGATGTAGCCTCTTCGTCCC-3'。

### 1.5 Western 印迹检测

碧云天 RIPA 温和裂解液处理目标细胞, 提取细胞总蛋白质。BCA 法检测蛋白质浓度。将蛋白质进行 SDS-PAGE, 并以 200 mA, 60 min 的条件将 PAGE 胶上的蛋白质条带湿转入 PVDF 膜上。室温 5% 脱脂牛奶孵育 2 h, 将 p21、p27、Bax、Bcl2 和 β-肌动蛋白抗体 (所有抗体均购自 cell signaling technology) 分别与 PVDF 膜孵育过夜, 辣根过氧化物酶偶联的二抗室温孵育 1 h。ECL 化学发光检测各蛋白质的表达量。

### 1.6 MTS 细胞增殖检测

MTS 试剂购自 Promega 公司。将目标细胞以 1 000 个细胞/孔的密度接种 96 孔板, 设置 10 个副孔。每孔培养基 200 μL, 每天更换新鲜培养基 1 次。在 0、1、2、3、4 和 5 d 加入 20 μL MTS, 室温培养 3 h, 460 nm 测量各孔的绝对吸光值。

### 1.7 平板克隆形成实验

将目标细胞计数, 同种细胞接种 3 个孔 (6 孔板), 细胞数目分别为 250 个、500 个和 1 000 个。每隔 3 d 更换完全培养液 1 次, 大约 2 周之后, 弃去细胞培养液, 预冷 PBS 洗涤细胞 1 次, 加入预冷甲醇 500 μL, 室温固定 20 min。弃去甲醇, 1% 结晶紫染色 10 min。流动水洗涤平板, 拍照。

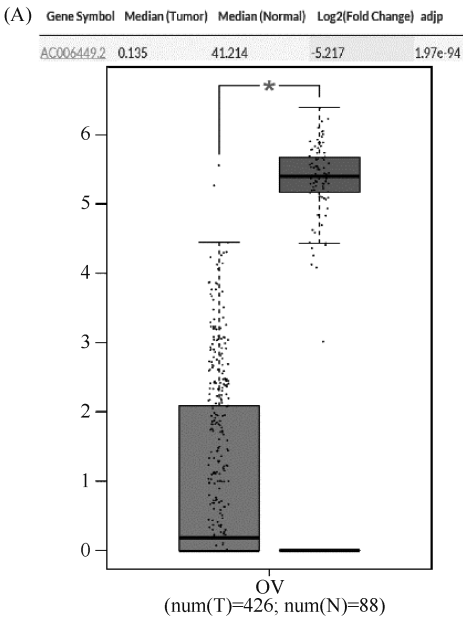
### 1.8 统计学方法

所有的实验均重复 3 次以上, 以确保结果可靠。数据采用  $M \pm SD$  表示。SPSS 19.01 软件包用于进行统计分析, 两组间差异采用独立样本 *t* 检验或者方差分析,  $P < 0.05$  表示统计学有差异。

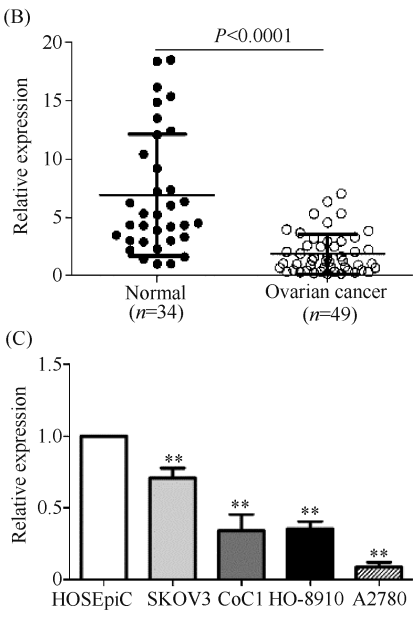
2 结果

2.1 AC006449.2 在卵巢癌中低表达

通过在线数据库 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 分析卵巢癌及癌旁组织中差异表达的 lncRNAs。结果发现,AC006449.2 在 426 例卵巢癌组织中表达中位数是 0.135,在 88 例癌旁组织中表达中位数是 41.214,提示 AC006449.2 在卵巢癌组织中显著低表达 ( $P=1.97\text{e-}94$ ) (Fig.1A)。为验证



这一结果,在 49 例卵巢癌组织和 34 例癌旁组织中检测 AC006449.2 的表达量。如 Fig.1B 所示,AC006449.2 在卵巢癌组织中的表达量显著低于其在癌旁组织中的表达量 ( $P<0.0001$ )。经实时荧光定量 PCR 结果提示,AC006449.2 在卵巢癌细胞中的表达量显著低于正常卵巢上皮细胞。具体来说,AC006449.2 在 A2780 卵巢癌细胞中的表达量最低,在 SKOV3 卵巢癌细胞中的表达量最高 (Fig.1C)。



**Fig.1 AC006449.2 expression was decreased in ovarian cancer** (A) AC006449.2 expression pattern was predicted by GEPIA databank. *vs* Normal,  $P<0.001$ . (B) Total RNAs were obtained from normal ( $n=34$ ) and ovarian cancer tissues ( $n=49$ ). AC006449.2 expression levels in these tissues were determined by qRT-PCR assay in three independent experiments. (C) qRT-PCR assay was carried out to investigate AC006449.2 expression pattern in normal ovarian epithelial cells and ovarian cancer cells. *vs* HOSEpiC, \*\*  $P<0.01$ . Data were presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments

2.2 AC006449.2 与卵巢癌临床特征及预后相关

为了探讨 AC006449.2 在卵巢癌组织中的临床表达意义,采用方差分析的方法统计了 49 例卵巢癌患者中 AC006449.2 的表达与其临床特征的相关性。如 Table 1 所示,AC006449.2 在 17 例卵巢癌患者中高表达,在 32 例卵巢癌患者中低表达;且其表达量与卵巢癌患者年龄、淋巴结转移及 TNM 分期无关,但是与瘤体大小和远端转移密切相关。在 GEPIA 软件上统计了 AC006449.2 与卵巢癌患者预后的相关性。结果发现,AC006449.2 高表达的卵巢癌患者预后明显较 AC006449.2 低表达的卵巢癌患者预后好 (Fig.2)。

2.3 AC006449.2 抑制卵巢癌细胞增殖和克隆形成能力

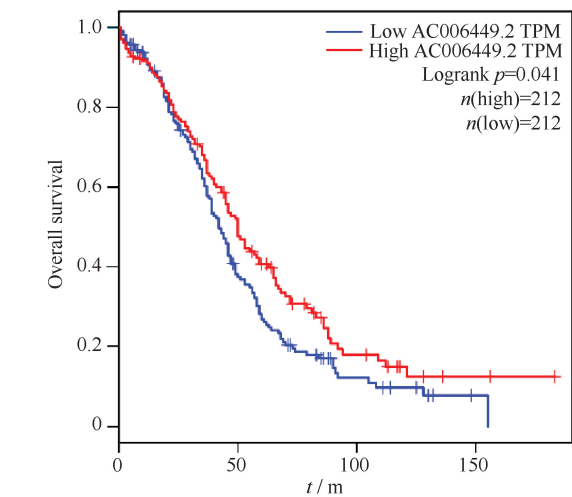
为探讨 AC006449.2 在卵巢癌中的功能,在细

胞水平干预了 AC006449.2 的表达,观察细胞增殖和克隆形成能力。如 Fig.3A 所示,将 AC006449.2 过表达质粒 LV-AC006449.2 转染 293T 细胞,包装慢病毒,用此慢病毒液感染 A2780 细胞。qRT-PCR 结果发现,与对照组比较,过表达 AC006449.2 组 AC006449.2 的表达量高 9.12 倍 (Fig.3A)。将干扰的慢病毒质粒 LV-sh-AC006449.2 转染 293T 细胞,包装慢病毒,用此慢病毒液感染 SKOV3 细胞, qRT-PCR 结果提示,sh-1#对 AC006449.2 的沉默效果最为明显,用于后续研究 (Fig.3A)。过表达 AC006449.2 后,A2780 细胞的增殖能力和平板克隆能力显著低于对照组 (Fig.3B, Fig.3C)。而在敲低 AC006449.2 后,卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖能力和平板克隆形成能力显著增强 (Fig.3B, Fig.3C)。

**Table 1** The correlation between AC006449. 2 and clinicopathological parameters

Factor	Cases	AC006449. 2 expression				P value
		High( $\geq 2$ fold * )		Low		
		No.	%	No.	%	
All patients	49	17		32		
Age ( years )						0. 739
≤45	13	5	38. 46	8	61. 54	
>45	36	12	33. 33	24	66. 67	
Tumor size ( CM )						0. 007
≤2	30	6	20. 00	24	80. 00	
>2	19	11	57. 89	8	42. 11	
Node status						0. 879
Negative	31	11	35. 48	20	64. 52	
Positive	18	6	33. 33	12	66. 67	
TNM stage						0. 062
I-II	29	7	24. 14	22	75. 86	
III- IV	20	10	50. 00	10	50. 00	
Distant metastasis						0. 013
Negative	34	8	23. 53	26	76. 47	
Positive	15	9	60. 00	6	40. 00	

\* The patients were divided into two groups by fold change of 2 (breast cancer tissue expression/ normal tissue expression) as a cut off. The expression of AC006449. 2 in each sample was subsequently classified as either high level ( $\geq 2$  fold) or low level ( $< 2$  fold)



**Fig.2 AC006449. 2 negatively correlated with outcomes of ovarian cancer patients** The correlation between expression of AC006449. 2 and prognosis of ovarian cancer patients was estimated via GEPIA software

2.4 AC006449. 2 影响卵巢癌细胞细胞周期蛋白质和凋亡相关蛋白质的表达

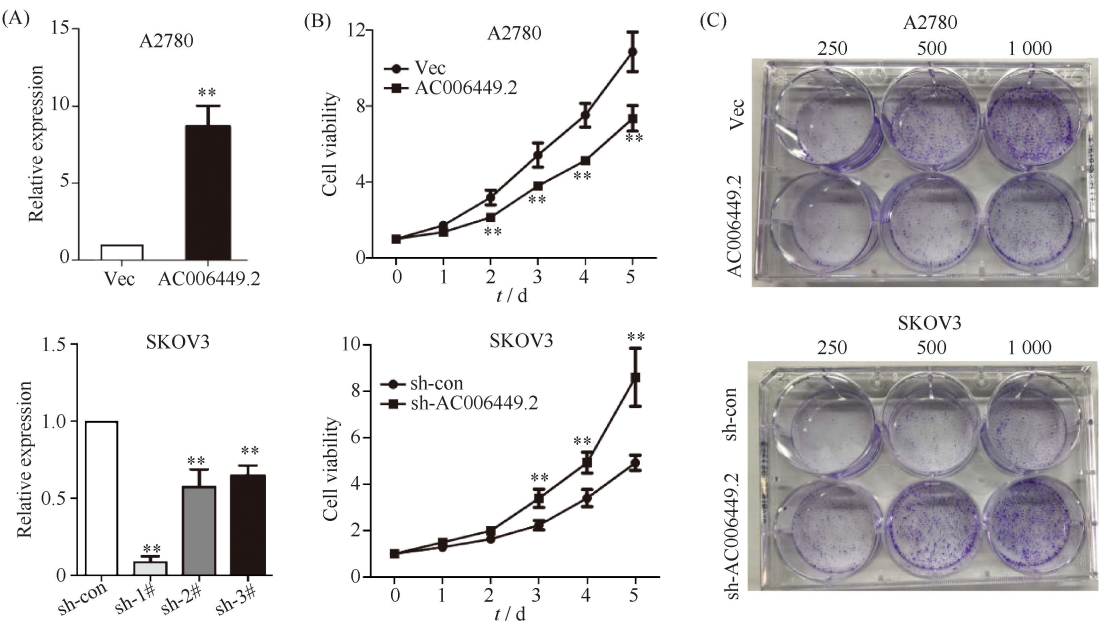
目前,本文已明确 AC006449. 2 可抑制卵巢癌细胞增殖。为了探讨其作用的分子机制,采用 qRT-PCR 和 Western 印迹技术,检测细胞周期相关蛋白质和凋亡相关蛋白质的表达量。结果发现,在 A2780 细胞株中,过表达 AC006449. 2 可明显增加 p21、p27 和 Bax 基因的表达量,同时下调 Bcl2 的表

达量 (Fig.4A)。与此相一致的是,在 SKOV3 细胞中敲低 AC006449. 2 可显著降低 p21、p27 和 Bax 基因的表达,而增加 Bcl2 的表达量 (Fig. 4B)。但是,AC006449. 2 如何调控这些基因的表达还有待进一步的研究。

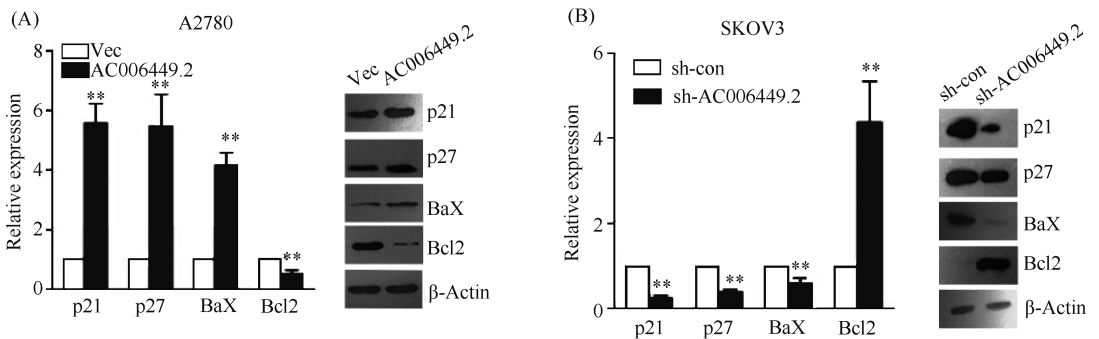
3 讨论

新近的研究发现,在卵巢癌中,异常表达的 lncRNAs 大多参与了卵巢癌的起始、发展、恶化和化疗耐受等病理过程,发挥原癌基因或者抑癌因子的功能<sup>[8]</sup>。在卵巢癌中,上调的转移相关肺腺癌转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 可以在体内外促进卵巢癌细胞的增殖、侵袭、迁移和远端转移。下调 MALAT1,体外可促使卵巢癌细胞发生 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞阻滞,诱导该细胞凋亡,体内可抑制瘤体生长<sup>[9-11]</sup>。LncRNA ABHD11-AS1 在上皮卵巢癌组织中的表达量,显著高于其在正常卵巢组织的表达量。过表达该 lncRNA,可促进卵巢癌细胞的增殖、侵袭和迁移。沉默该 lncRNA,可获得相反的结果。深入机制研究发现,ABHD11-AS1 可与 RhoC 直接结合,上调 RhoC、p70s6k1、MMP2 和 BCL-xL。沉默 RhoC 可逆转 ABHD11-AS1 对卵巢癌细胞的推动作用<sup>[12]</sup>。HOXA11-AS 在卵巢癌组织中的表达量显著低于其在正常卵巢组织的表达。细胞功能研究发现,





**Fig.3 AC006449.2 evidently suppressed proliferation and colony forming ability of ovarian cancer cells** (A) qRT-PCR assays was performed to measure AC006449.2 expression after overexpression or knock-down experiments in A2780 and SKOV3 cells, respectively. *vs* Vec, \*\*  $P < 0.01$ . *vs* sh-con, \*\*  $P < 0.01$ . Vec stands for ‘vector’. Sh-con stands for ‘control group’. Cell viability (B) and colony forming ability (C) were analyzed. *vs* Vec, \*\*  $P < 0.01$ . *vs* sh-con, \*\*  $P < 0.01$ . Data were presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments



**Fig.4 The mechanism of AC006449.2 function in ovaerian cancer cells** (A) Restored overexpression of AC006449.2 in A2780 cells. (B) Knock-down of AC006449.2 expression in SKOV3 cells. qRT-PCR and Western blotting assays were performed to measure expression levels of cell cycle and apoptosis related genes. These experiments were carried out for three times. *vs* Vec, \*\*  $P < 0.01$ . *vs* sh-con, \*\*  $P < 0.01$

HOXA11-AS 可降低上皮卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力<sup>[13]</sup>。与此相类似的是,通过 GEPIA 数据库发现,AC006449.2 在卵巢癌组织中表达量显著低于正常组织,而在收集的临床标本中也验证了这一结果。细胞水平研究发现,过表达 AC006449.2 可抑制卵巢癌细胞增殖和平板克隆形成能力,敲低 AC006449.2 后得到相反的结果。结果提示,AC006449.2 在卵巢癌中可能发挥了抑癌因子的部分作用。

随着研究的深入,发现 lncRNAs 的表达与肿瘤

临床病理特征和患者预后密切相关<sup>[14-16]</sup>。有研究证实,lncRNA FAL1 的基因组拷贝数和表达与卵巢癌患者预后相关。机制方面研究证实,FAL1 可与 BMI 相互作用,抑制 p21 表达<sup>[17]</sup>。Taurine 上调基因 1 (taurine up-regulated gene 1, TUG1) 在卵巢癌中的表达与瘤体分级和 FIGO 分期密切相关<sup>[18]</sup>。NEAT1 与 FIGO 分期、肿瘤分级和远端转移正相关。Kaplan-Meier 分析证实,上调的 NEAT1 与卵巢癌患者较差的预后正相关<sup>[19]</sup>。高表达的 CCAT2 与卵巢癌患者较差的预后、FIGO 分期、瘤体分级和远端转

移密切相关<sup>[20]</sup>。我们在研究中也发现, AC006449.2 与卵巢癌患者年龄、淋巴结转移及 TNM 分期无关,但是与瘤体大小和远端转移密切相关。GEPIA 数据库信息提示, AC006449.2 与卵巢癌患者较差的预后负相关。机制研究发现, AC006449.2 可上调 p21、p27 与 BaX 的表达,同时下调抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达量。后续的研究需要建立裸鼠模型,体内实验明确 AC006449.2 的作用及其相关的分子机制。

## 参考文献 (References)

- [1] Siegel, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, **67**(1):7-30
- [2] Chen, Zheng R, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, **66**(2): 115-132
- [3] Swisher, Taniguchi T, Karlan BY. Molecular scores to predict ovarian cancer outcomes; a worthy goal, but not ready for prime time[J]. J Natl Cancer Inst, 2012, **104**(9): 642-645
- [4] Saxena, Carninci P. Long non-coding RNA modifies chromatin: epigenetic silencing by long non-coding RNAs[J]. Bioessays, 2011, **33**(11):830-839
- [5] Worku, Bhattacharai D, Ayers D, *et al.* Long non-coding RNAs: the new horizon of gene regulation in ovarian cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, **44**(3): 948-966
- [6] Pan, Li C, Chen J, *et al.* The emerging roles of long noncoding RNA ROR (lincRNA-ROR) and its possible mechanisms in human cancers [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, **40**(1-2): 219-229
- [7] Wang, Wang H, Song T, *et al.* HOTAIR is a potential target for the treatment of cisplatin resistant ovarian cancer[J]. Mol Med Rep, 2015, **12**(2): 2211-2216
- [8] Nikpayam, Tasharrofi B, Sarrafzadeh S, *et al.* The Role of Long Non-Coding RNAs in Ovarian Cancer[J]. Iran Biomed J, 2017, **21**(1): 3-15
- [9] Liu, Jiang X, Li W, *et al.* Inhibition of the long non-coding RNA MALAT1 suppresses tumorigenicity and induces apoptosis in the human ovarian cancer SKOV3 cell line[J]. Oncol Lett, 2016, **11**(6): 3686-3692
- [10] Zou, Liu R, Wu X. Long non-coding RNA MALAT1 is up-regulated in ovarian cancer tissue and promotes SK-OV-3 cell proliferation and invasion [J]. Neoplasma, 2016, **63**(6): 865-872
- [11] Zhou, Xu X, Lv H, *et al.* The long noncoding RNA MALAT-1 is highly expressed in ovarian cancer and induces cell growth and migration[J]. PLoS One, 2016, **11**(5): e0155250
- [12] Wu, Chen X, Sun KX, *et al.* Role of the lncRNA ABHD11-AS1 in the tumorigenesis and progression of epithelial ovarian cancer through targeted regulation of RhoC[J]. Mol Cancer, 2017, **16**(1): 138
- [13] Richards, Permuth-Wey J, Li Y, *et al.* A functional variant in HOXA11-AS, a novel long non-coding RNA, inhibits the oncogenic phenotype of epithelial ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2015, **6**(33): 34745-34757
- [14] Teschendorff, Lee SH, Jones A, *et al.* HOTAIR and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian cancer[J]. Genome Med, 2015, **7**: 108
- [15] Li, Yu H, Xi M, *et al.* Long noncoding RNA C17orf91 is a potential prognostic marker and functions as an oncogene in ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2016, **9**(1): 49
- [16] Li, Huang H, Li Y, *et al.* Decreased expression of long non-coding RNA GAS5 promotes cell proliferation, migration and invasion, and indicates a poor prognosis in ovarian cancer[J]. Oncol Rep, 2016, **36**(6): 3241-3250
- [17] Hu, Feng Y, Zhang D. A functional genomic approach identifies FAL1 as an oncogenic long noncoding RNA that associates with BMI1 and represses p21 expression in cancer[J]. Cancer Cell, 2014, **26**(3): 344-357
- [18] Kuang, Zhang X, Hua S, *et al.* Long non-coding RNA TUG1 regulates ovarian cancer proliferation and metastasis via affecting epithelial-mesenchymal transition[J]. Exp Mol Pathol, 2016, **101**(2): 267-273
- [19] Chen, Zhang Z, Xie BB, *et al.* Clinical significance of up-regulated lncRNA NEAT1 in prognosis of ovarian cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, **20**(16): 3373-3377
- [20] Huang, Qing C, Huang Z, *et al.* The long non-coding RNA CCAT2 is up-regulated in ovarian cancer and associated with poor prognosis[J]. Diagn Pathol, 2016, **11**(1): 49