

长链非编码 RNA BANCR 对非小细胞肺癌增殖和侵袭的影响

陈志强¹, 尹凌帝¹, 孙倩¹, 刘博巽¹, 秦宇², 孙明³, 德伟³, 刘志军^{3*}

(¹南京医科大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029; ²正大天晴药业南京研究所生物药室, 江苏 南京 210042; ³南京医科大学生物化学与分子生物学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨长链非编码 RNA BANCR 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织及细胞系中的表达水平,以及 BANCR 对 NSCLC 细胞增殖和侵袭的影响。方法:用定量 PCR 技术检测 NSCLC 组织及细胞系中 BANCR 的表达水平;通过转染 pcDNA-BANCR 上调 BANCR 的表达水平,并通过 qPCR 检测转染效率。用 Transwell 实验检测上调 BANCR 的水平对 SPC-A1 细胞和 A549 细胞增殖和侵袭能力的影响,Western blot 检测这 2 种细胞中上调 BANCR 的水平对上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志物上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)表达水平的影响。结果:相比正常肺组织及细胞,在 NSCLC 组织和细胞中 BANCR 的表达出现显著下调。MTT 实验显示,上调 BANCR 的表达能降低 SPC-A1 细胞和 A549 细胞的增殖和侵袭能力。BANCR 过表达能通过上调 E-cadherin 表达并下调 Vimentin 表达,影响 EMT。结论: BANCR 可通过影响 EMT,抑制 NSCLC 细胞的增殖和侵袭。

[关键词] 非小细胞肺癌;长链非编码 RNA;BANCR;细胞增殖;侵袭;上皮-间质转化

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)05-650-06

doi:10.7655/NYDXBNS20150510

Down-regulated long noncoding RNA BANCR promotes cell proliferation and invasion in non-small cell lung cancer

Chen Zhiqiang¹, Yin Lingdi¹, Sun Qian¹, Liu Boxun¹, Qin Yu², Sun Ming³, De Wei³, Liu Zhijun^{3*}

(¹First School of Clinical Medicine, NJMU, Nanjing 210029; ²Nanjing Research and Development Center of CTTQ Pharmaceutical Research Institute, Nanjing 210042; ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression level of long noncoding RNA BANCR in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and cell lines, and to study the effect of BANCR on NSCLC cell proliferation and invasion. **Methods:** Quantitative PCR was performed to detect the relative expression of BANCR in NSCLC cell lines and tissues. pcDNA-BANCR was transfected into SPC-A1 cells and A549 cells to up-regulate BANCR expression. Transwell assays were performed to detect the effect of BANCR on NSCLC proliferation and invasion. Western blotting was used to detect the expression level of E-cadherin and Vimentin, markers of epithelial-mesenchymal transition. **Results:** This study showed that BANCR was lowly expressed both in NSCLC samples and cell lines compared with their corresponding normal tissues and cell lines. MTT assays indicated that up-regulated BANCR inhibited the proliferation and invasion of SPC-A1 and A549 cells. BANCR overexpression elevated the expression of E-cadherin and suppressed the level of Vimentin, thus influencing epithelial-mesenchymal transition. **Conclusion:** BANCR promotes NSCLC cell proliferation and invasion by affecting epithelial-mesenchymal transition.

[Key words] non-small cell lung cancer; long noncoding RNA; BANCR; cell proliferation; invasion; epithelial-mesenchymal transition

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05): 650-655]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81070620)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: liuzhijun100200@126.com

肺癌是我国高发的恶性肿瘤,5年生存率仅为13%,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占到所有肺癌类型的80%^[1-2]。NSCLC主要致死原因之一是肿瘤转移,而癌细胞侵袭是其关键

步骤,与上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)密切相关。EMT能提高肿瘤细胞对外界环境的适应能力,并破坏细胞连接及细胞骨架结构,导致肿瘤的扩散^[3-4]。EMT与上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)及波形蛋白(Vimentin)等多个指标相关^[5-6]。长链非编码 RNA(long noncoding RNA,lncRNA)作用于 EMT 相关的信号分子,从而调节上皮细胞的表型转变。LncRNA 在肿瘤发展中所起的作用正日益受到学界重视^[7-9]。BRAF 激活的非编码 RNA(BRAF activated non-coding RNA,BANCR)是一长度为 693 bp 的 lncRNA,参与黑色素瘤的侵袭过程^[10-12]。然而,BANCR 在 NSCLC 中所起的生物学作用目前仍知之甚少。本研究旨在阐明 lncRNA BANCR 在 NSCLC 中的表达情况,探索 BANCR 对 NSCLC 细胞增殖和侵袭的影响,希望为 NSCLC 诊断、早期干预治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

32 对 NSCLC 和癌周正常肺组织样本来自于南京医科大学第一附属医院 2008~2010 年被诊断为 NSCLC 并接受手术的患者,这些患者经过病理科严格鉴定(分期 II、III、IV,依据美国癌症联合会癌症分期指南第 7 版)。在手术前所有患者均未接受局部或全身治疗。所有样本取下后立即液氮冷冻,在取用前储存在-80℃冰箱。本研究经南京医科大学伦理委员会批准,并取得了患者的知情同意。

2 株 NSCLC 腺癌细胞系(SPC-A1 和 A549)与 1 株人正常支气管上皮细胞系(16HBE)(中国科学院生物化学与细胞生物学研究所)。SPC-A1 细胞用含 10%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基,置于 37℃、5%CO₂ 的恒温培养箱中培养;A549 和 16HBE 细胞在 RPMI1640 培养基中进行常规培养。

1.2 方法

1.2.1 RNA 抽提和定量聚合酶链反应(quantitative PCR,qPCR)分析

使用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,美国)提取总 RNA。使用 PrimeScript RT 试剂盒(TaKaRa 公司,大连)在标准条件下的随机引物,将总 RNA(500 ng)反转录为 10 μL 的最终体积。BANCR 表达水平的检测按照 STBR Premix Ex Taq(TaKaRa 公司,大连)的使用说明进行。结果用 3-磷酸甘油

醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)的表达量标化。BANCR 的上游引物:5'-ACAGGACTCCATGGCAAACG-3',下游引物:5'-ATGAAGAAAGCCTGGTGCAGT-3';GAPDH 上游引物:5'-GGGAGCCAAAAGGGTCAT-3',下游引物:5'-GAGTCCTTCCACGATACCAA-3';E-cadherin 上游引物:5'-TCCCATCAGCTGCCCAGAAA-3',下游引物:5'-TGACTCCTGTGTTCTGTGA-3';si-BANCR 引物:5'-GGAAAUAGACUGCAGCACCAATT-3'。qPCR 和数据收集基于 ABI 7500 平台。qPCR 结果的分析及表达与循环阈值(C_T值)进行比较,并转化为倍数改变。

1.2.2 质粒构建

BANCR 序列被合成并亚克隆至 pcDNA3.1 载体(Invitrogen 公司,上海)。BANCR 的过表达通过转染 pcDNA-BANCR 实现,对照是空 pcDNA3.1 载体。利用 qPCR 检测 BANCR 的 mRNA 表达水平。

1.2.3 细胞转染

用于转染的质粒载体(pcDNA3.1-BANCR 和 pcDNA3.1)经 DNA Midiprep(Qiagen 公司,德国)提取,并转染至 SPC-A1 或 A549 细胞。si-BANCR 转染至 SPC-A1 或 A549 细胞。A549 和 SPC-A1 细胞在 6 孔平板上培养至融合状态,并按照使用说明书通过 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,上海)进行转染。48 h 后收集细胞用于 qPCT 或 Western blot 分析。

1.2.4 细胞增殖试验

本研究使用 MTT 试剂盒(Roche Applied Science 公司,瑞士)进行细胞增殖试验。用 si-BANCR 转染的 A549 细胞(每孔 3 000 个细胞)以及用 pcDNA-BANCR 转染的 A549 或 SPC-A1 细胞在 96 孔平板上培养。按照使用说明书每隔 24 h 检测细胞生存状况。所有实验重复 4 次。在克隆形成实验中,pcDNA-BANCR 转染的 SPC-A1 或 A549 细胞(500 个/孔)在含有 10%FBS 的 6 孔平板上培养。计数可见的集落。每个处理组做 3 个复孔。

1.2.5 Transwell 侵袭实验

转染 48 h 后,将无血清培养液中的 5×10⁴ 个细胞置于 Transwell(孔径 8 μm,Millipore 公司,美国)的上层小室用于迁移分析。取 1×10⁵ 个细胞,并滴加无血清培养液重悬细胞,放入铺 Matrigel 胶(Sigma-Aldrich 公司,美国)的 Transwell 上层小室中。下层小室加入 10%FBS 的培养液。经 24 h 孵化后,用棉签擦除小室内细胞。固定染色后,显微镜下

取随机视野进行拍照计数。实验独立重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测

对过表达 BANCR 的 A549 细胞行 Western blot,以检测 E-cadherin 和 Vimentin 的表达。使用哺乳动物蛋白提取试剂 RIPA,并补充部分蛋白酶抑制剂混合物和苯甲基磺酰氟化物来溶解细胞。用 Bio-Rad 蛋白分析盒确定蛋白浓度。取 50 μg 蛋白提取物进行 10%的 SDS-PAGE 实验,将蛋白质转到硝酸纤维素膜(Sigma 公司,美国),并用 1:1 000 稀释的 E-cadherin 抗体(BD 公司,美国)、Vimentin 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国)孵育。通过凝胶图像处理系统 (Quantity One 软件,Bio-Rad 公司,美国)对放射自显影图片进行量化,以 GAPDH 作为对照。实验独立重复进行 3 次。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 16.0 软件包(IBM 公司,美国)进行数据分析,包括 Student's *t* 检验(双侧)、单因素方差分析和 Mann-Whitney U 检验。两两比较使用 Student's *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 组织中 BANCR 的 mRNA 表达水平

将 32 位患者的 NSCLC 样本与癌旁的正常组织进行配对,使用 qPCR 分别检测 BANCR mRNA 的表达水平。结果显示 78.13%(25/32) 的癌组织中,BANCR 的 mRNA 表达水平与正常组织相比存在显著降低($P < 0.01$,图 1)。

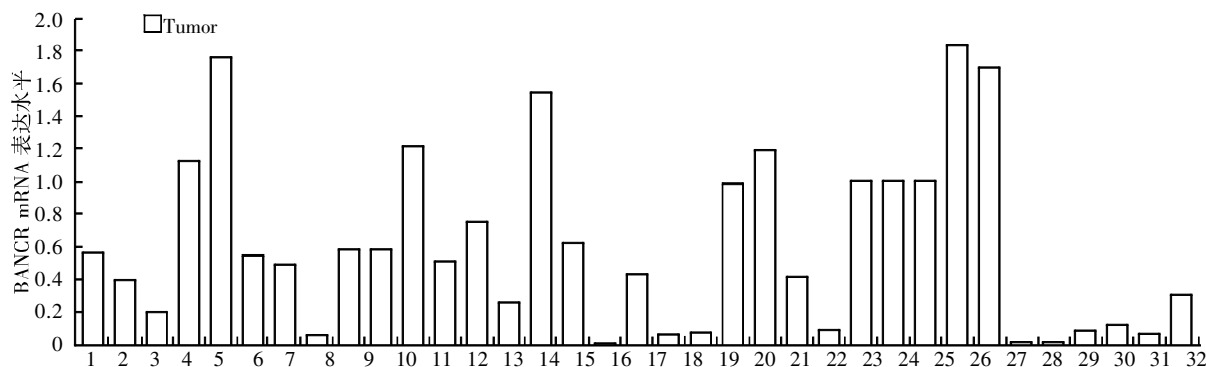


图 1 NSCLC 组织中 BANCR 的表达水平

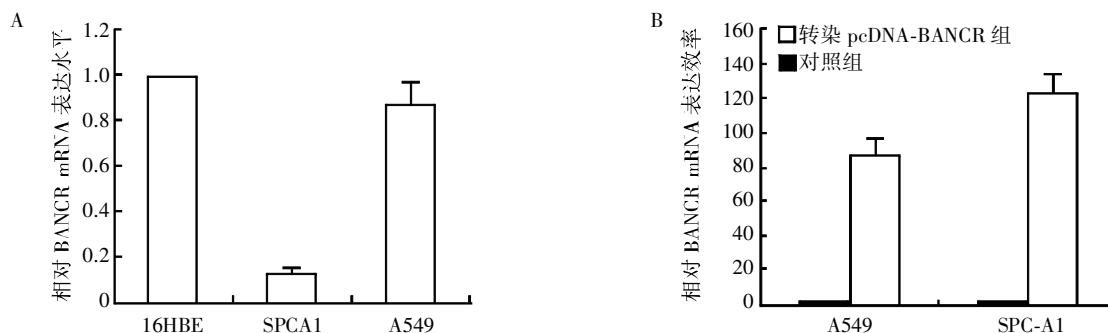
Figure 1 Expression level of BANCR in NSCLC tissue

与正常支气管上皮细胞系(16HBE)相比,2 株 NSCLC 腺癌细胞系(SPC-A1 和 A549)BANCR mRNA 表达水平均有下降(图 2A)。将质粒载体(pcDNA3.1-BANCR 和 pcDNA3.1)转染至 SPC-A1 或 A549 细胞,对 BANCR mRNA 表达进行分析。A549 细胞系中 BANCR 的过表达效率为 87 倍,SPC-A1 细胞系中 BANCR 的过表达效率是 124 倍(图 2B)。

2.2 过表达 BANCR 对 NSCLC 细胞增殖的影响

为研究 BANCR 对 NSCLC 细胞增殖所起的生物学作用,本实验研究了 BANCR 表达上调对 SPC-A1 或 A549 细胞增殖的影响。MTT 实验显示与对照组相比,转染 pcDNA-BANCR 的 SPC-A1 和 A549 细胞的增殖过程被抑制(图 3A、B)。

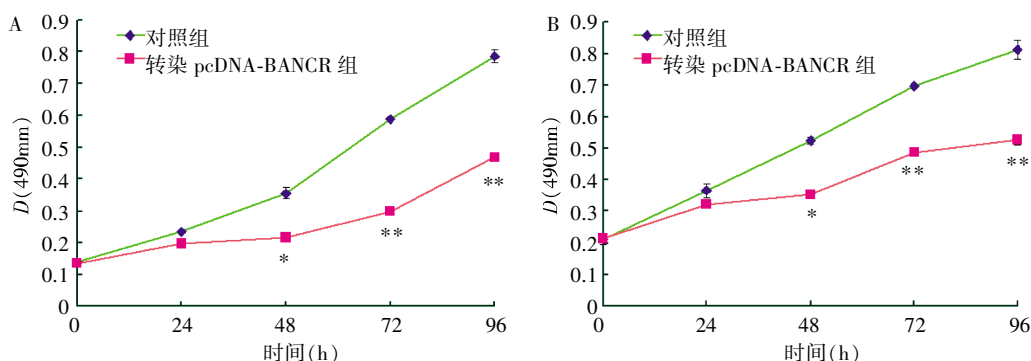
2.3 过表达 BANCR 对 NSCLC 细胞侵袭的影响



A: BANCR mRNA 表达水平;B: BANCR 过表达效率。

图 2 NSCLC 细胞系中 BANCR 的表达水平

Figure 2 Expression level of BANCR in NSCLC tissue and cell lines



A: MTT 实验显示与转染了空载体的对照组细胞相比,转染 pcDNA-BANCR 的 SPC-A1 细胞生长情况明显受抑, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$); B: MTT 实验显示与转染了空载体的对照组细胞相比,转染 pcDNA-BANCR 的 A549 细胞生长情况明显受抑, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 3 上调 BANCR 的表达对 SPC-A1 和 A549 细胞增殖的影响

Figure 3 The effect of up-regulated BANCR on proliferation of SPC-A1 cells and A549 cells

Transwell 实验结果显示,与其对应的对照组相比,转染 pcDNA-BANCR 的细胞迁移能力受到明显抑制(图 4)。两株 NSCLC 细胞系的迁移及侵袭细胞计数结果见图 5。

2.4 BANCR 表达对 NSCLC 细胞 EMT 的影响

对过表达 BANCR 的 A549 细胞行 Western blot 实验,以检测 EMT 启动标志物 E-cadherin 和 Vimentin 的表达。结果显示,BANCR 过表达 A549 细胞与阴性对照组细胞相比,E-cadherin 的表达水平明显增高,Vimentin 的表达水平显著降低(图 6)。

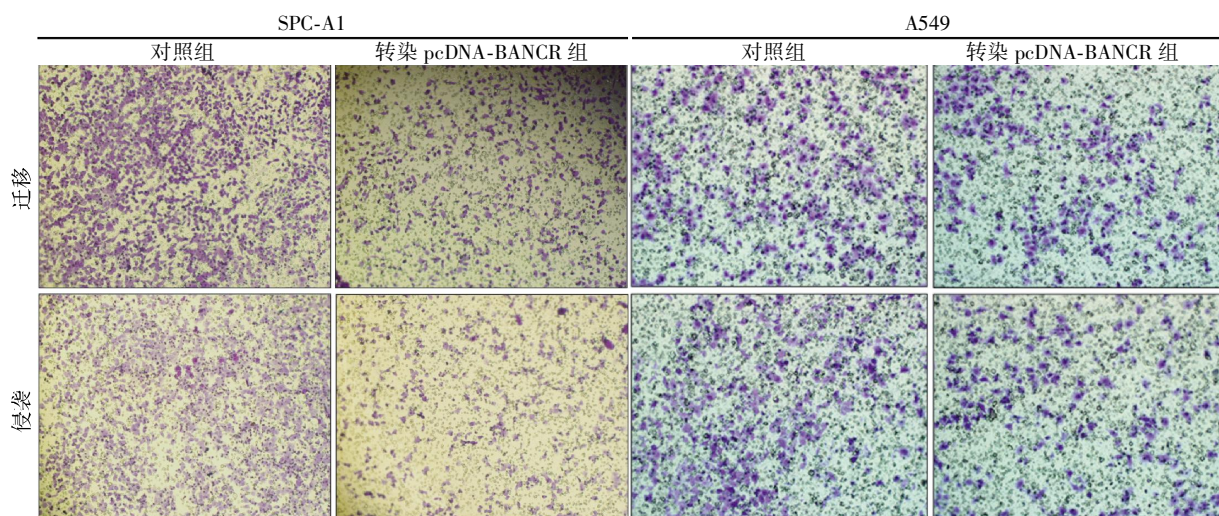
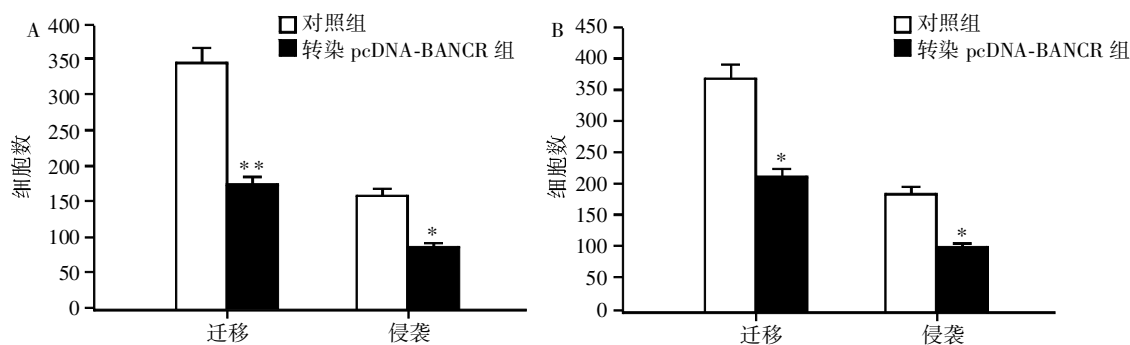


图 4 BANCR 对 SPC-A1 和 A549 细胞迁移和侵袭的影响

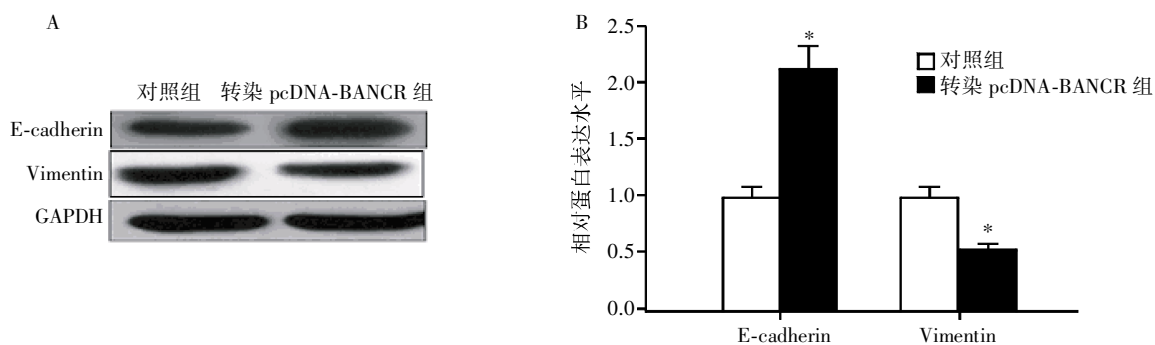
Figure 4 The effects of BANCR on invasion of SPC-A1 cells and A549 cells



A: SPC-A1 细胞,与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$); B: A549 细胞,与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 5 NSCLC 细胞系的迁移及侵袭细胞计数

Figure 5 Number of migration and invasion cells of NSCLC cell lines



A: Western blot 结果; B: 重复检测样本的量化数据和统计学处理结果, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图6 BANCER对A549细胞E-cadherin、Vimentin表达水平的影响

Figure 6 The effects of BANCER on E-cadherin and Vimentin expression level of A549

3 讨论

NSCLC是一种多因素共同参与的恶性肿瘤,其发病过程涉及基因及表观遗传学的改变。既往对NSCLC的研究主要集中在基因层面,如单核苷酸多态性、基因突变、DNA甲基化改变等。近年的一些研究提示,多种lncRNA在NSCLC发生发展中具有重要作用。Schmidt等^[13]证实lncRNA MALAT1可以作为NSCLC转移的预测标志物。作为第一个被发现的癌症相关lncRNA,H19能促进肺癌细胞增殖,实验性下调H19基因表达可降低肺癌细胞的集落形成能力和独立贴壁能力^[14]。Yang等^[15]发现lncRNA LET在肺鳞癌中的表达显著低于正常肺组织,低表达水平的LET通过稳定核因子90蛋白而参与缺氧介导的肿瘤转移。Liu等^[16]提示lncRNA HOTAIR能够促进NSCLC转移,是预后不良的生物学指标。此外,在NSCLC发生发展中起作用的lncRNA还包括:lncRNA p21(可促进肺癌细胞凋亡)、lncRNA UCA1(诱导肺癌发生药物抵抗)、lncRNA CCAT2(促进肺癌细胞的侵袭)和lncRNA BC200(促进肺癌的发展)等^[17-20]。

本研究通过检测lncRNA BANCER在NSCLC组织和细胞系中的表达水平,以及过表达BANCER对NSCLC细胞增殖和侵袭能力的影响,以证实BANCER与NSCLC发生发展的关系。实验结果提示NSCLC组织中BANCER mRNA的表达水平低于癌旁组织,而过表达BANCER能够抑制NSCLC细胞的增殖过程。Transwell实验进一步提示,过表达BANCER不仅能够抑制NSCLC细胞增殖,还能抑制肿瘤细胞的侵袭过程。

EMT是恶性肿瘤细胞获得侵袭能力的重要生物学过程,在NSCLC、乳腺癌、前列腺癌和肾癌等多

种肿瘤的发展中具有至关重要的作用,而E-cadherin表达下降、Vimentin和N-cadherin表达升高是EMT表达间质表型的主要特征^[21-23]。目前,BANCER在NSCLC增殖和侵袭的分子机制仍不清楚。本研究通过实验证实BANCER能够上调E-cadherin表达并下调Vimentin的表达,影响EMT。

综上所述,本研究证实lncRNA BANCER在NSCLC组织及细胞系中出现了明显的表达下调,过表达BANCER能显著抑制NSCLC细胞的增殖和侵袭能力,而BANCER的调节作用则有可能是通过EMT实现的,提示BANCER在NSCLC的形成和进展中起到了负性调控作用。大量研究证实lncRNA往往与肿瘤发生过程中的表观遗传学改变相关联,因此目前亟需解决的问题之一便是BANCER能否通过某些表观遗传学机制参与NSCLC的增殖和侵袭过程。当前的研究热点主要是围绕BANCER可能的其他表达调控机制,即BANCER还能通过哪些其他作用途径调节肿瘤细胞的增殖和侵袭;其次,BANCER具体是通过哪一层面影响了EMT;另外,在肿瘤的发生发展过程中,BANCER受到哪些信号分子的调控也是未来的研究方向之一。这能够为将来临床上NSCLC的早期诊断和后期治疗提供一个有效的分子标志物和药物治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29
- [2] De Angelis R, Sant M, Coleman MP, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO-CARE-5-a population-based study[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(1): 23-34
- [3] Aclouque H, Adams MS, Fishwick K, et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell

- state in development and disease[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1438
- [4] Gao D, Vahdat LT, Wong S, et al. Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(19): 4883–4889
- [5] Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma [J]. *Nature*, 1998, 392(6672): 190–193
- [6] Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease [J]. *J Cell Biol*, 2006, 172(7): 973–981
- [7] Loewer S, Cabili MN, Guttman M, et al. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(12): 1113–1117
- [8] 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 USA*, 2009, 106(28): 11667–11672
- [9] 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
- [10] Flockhart RJ, Webster DE, Qu K, et al. BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCER to regulate melanoma cell migration [J]. *Genome Res*, 2012, 22(6): 1006–1014
- [11] Rupertus K, Sinistra J, Scheuer C, et al. Interaction of the chemokines I-TAC (CXCL11) and SDF-1 (CXCL12) in the regulation of tumor angiogenesis of colorectal cancer [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2014, 31(4): 447–459
- [12] Xia T, O'Hara A, Araujo I, et al. EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3 [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1436–1442
- [13] Schmidt LH, Spieker T, Koschmieder S, et al. The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth [J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(12): 1984–1992
- [14] Barsyte-Lovejoy D, Lau SK, Boutros PC, et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(10): 5330–5337
- [15] Yang F, Huo X, Yuan S, et al. Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(6): 1083–1096
- [16] Liu X, Liu Z, Sun M, et al. The long non-coding RNA HOTAIR indicates a poor prognosis and promotes metastasis in non-small cell lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(1): 464
- [17] Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic non-coding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response [J]. *Cell*, 2010, 142(3): 409–419
- [18] Wang F, Li X, Xie X, et al. UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(13): 1919–1927
- [19] Qiu M, Xu Y, Yang X, et al. CCAT2 is a lung adenocarcinoma-specific long non-coding RNA and promotes invasion of non-small cell lung cancer [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(6): 1–6
- [20] Chen W, Böcker W, Brosius J, et al. Expression of neural BC200 RNA in human tumours [J]. *J Pathol*, 1997, 183(3): 345–351
- [21] Bai F, Chan HL, Scott A, et al. BRCA1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell dedifferentiation during mammary and tumor development [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(21): 6161–6172
- [22] Pu H, Horbinski C, Hensley PJ, et al. PARP-1 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate tumorigenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(11): 2592–2601
- [23] He H, Magi-Galluzzi C. Epithelial-to-mesenchymal transition in renal neoplasms [J]. *Adv Anat Pathol*, 2014, 21(3): 174–180

[收稿日期] 2014–08–27