

长非编码 RNA BANCR 逆转非小细胞肺癌细胞株顺铂耐药的研究

姜黎黎^{1,2}, 魏晨晨¹, 陈沁楠¹, 陈臻瑶¹, 陈昕¹, 王朝霞^{1*}

(¹南京医科大学第二附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210011; ²海门市人民医院肿瘤科, 江苏 海门 226100)

[摘要] **目的:**研究长非编码 RNA BANCR 对人非小细胞肺癌耐顺铂细胞株 A549/DDP 耐药性的影响及其可能的作用机制。**方法:**应用实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)检测耐顺铂细胞株 A549/DDP 及其亲本细胞株 A549 中 BANCR 的表达差异,发现 BANCR 在 A549/DDP 细胞中显著低表达。在 A549/DDP 细胞中过表达 BANCR,分别应用 MTT 法、克隆形成实验、流式细胞术检测过表达后 A549/DDP 细胞对顺铂药物敏感性,细胞增殖能力,联合顺铂处理后细胞凋亡变化;Western blot 检测过表达 BANCR 后 A549/DDP 细胞 p53 的表达变化。**结果:**BANCR 在 A549/DDP 细胞中的表达量显著低于 A549 细胞 ($P < 0.05$),在 A549/DDP 细胞中过表达 BANCR 可产生以下效应:相较于对照组,顺铂对 A549/DDP/BANCR 细胞的半数抑制浓度(half inhibition concentration, IC_{50})减低($P < 0.05$),A549/DDP/BANCR 细胞的增殖能力减弱,A549/DDP/BANCR 经过顺铂处理后细胞凋亡增多($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,与空白对照组比较,过表达 BANCR 的 A549/DDP 细胞 p53 表达水平明显升高。**结论:**BANCR 可能通过诱导细胞凋亡,抑制细胞增殖,上调 p53 蛋白表达而逆转 A549/DDP 细胞对 DDP 的耐药性。

[关键词] 非小细胞肺癌;BANCR;顺铂耐药性

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)02-189-05

doi:10.7655/NYDXBNS20170211

BRAF activated non-coding RNA (BANCR)reverse human non-small cell lung cancer A549/DDP cell line to cisplatin resistance

Jiang Lili^{1,2}, Wei Chenchen¹, Chen Qinnan¹, Chen Zhenyao¹, Chen Xin¹, Wang Zhaoxia^{1*}

(¹Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; ²Department of Oncology, Haimen People's Hospital, Haimen 226100, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of BANCR in reversing cisplatin(DDP) resistance of human non-small cell lung cancer (NSCLC)A549/DDP cell line and its related mechanisms. **Methods:** The real-time fluorescent quantitative PCR(qRT-PCR) was used to detect BANCR expression differences in DDP-resistant A549/DDP cells and its parent cell line A549. Overexpress BANCR in A549/DDP cells and use MTT assay, colony formation assay and flow-cytometric analysis to detect A549/DDP cells to DDP drug sensitivity, cell proliferation ability and apoptosis on treatment with DDP. The protein expression of p53 in A549/DDP cells were detected by western blotting. **Results:** The BANCR expression level in A549/DDP cell line was significantly lower than that in A549 cell line ($P < 0.05$). Ectopic BANCR expression in A549/DDP cells could produce the following effects: compared to the control group, the half inhibition concentration (IC_{50}) of DDP in A549/DDP/BANCR cells lower ($P < 0.05$), proliferation of A549/DDP/BANCR cells diminished ($P < 0.05$), apoptosis on treatment with DDP increased ($P < 0.05$). Furthermore, the protein expressions p53 was upregulated in BANCR transfected group than those in empty vector. **Conclusion:** BANCR reverses the resistance of A549/DDP cells to DDP through induction of apoptosis, diminished cell proliferation, up-regulating the expressions of p53 protein.

[Key words] NSCLC; BANCR; DDP-resistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(02): 189-193]

[基金项目] 国家自然科学基金(81272601, 81472198); 江苏省科技厅临床医学科技专项(BL2014096); 江苏省医学重点人才基金(RC2011080)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhaoxiawang88@hotmail.com

肺癌是世界范围内最常见恶性肿瘤之一,非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌总数的 80%以上^[1],超过 65%的患者为中晚期^[2]。含铂类方案为 NSCLC 化疗重要的方案之一,而顺铂耐药长期困扰临床治疗,成为治疗人非小细胞肺癌最大的障碍之一。近年来,长非编码 RNA 的发现为肿瘤治疗靶点的研究带来了新的希望。长非编码 RNA BANCR(BRAF activated non-coding RNA)位于 9 号染色体上,是包含有 693 个碱基的转录本,由 Flockhart 等^[3]在黑色素瘤中首次发现,其过表达与黑色素瘤的迁移能力密切相关。本课题组通过荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)发现了 BANCR 在顺铂(cisplatin,DDP)耐药的人非小细胞肺癌细胞株 A549/DDP 较其亲本细胞 A549 显著降低。鉴于 BANCR 在肺癌耐药中的作用尚不清楚,本研究在顺铂耐药的人非小细胞肺癌细胞株 A549/DDP 中过表达 BANCR,观察 BANCR 表达的改变及其在 DDP 耐药中的作用,并初步探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

DDP 耐药的人非小细胞肺癌 A549/DDP 细胞株和其亲本细胞株 A549(中科院肿瘤研究所)。小牛血清和 RPMI1640 培养液(Gibco 公司,美国);顺铂(纯度: $P_1 \geq 65.0\%$,山东齐鲁制药有限公司);TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,美国);反转录和实时荧光定量 PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐、二甲基亚砜(DMSO)、结晶紫(台盼兰)染液、PBS(Hycon 公司,美国)。pcDNA-BANCR、pcDNA-NC 质粒由 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点将 BANCR、NC 的 cDNA 导入(由美国 Invitrogen 公司合成)。兔抗人 p53 抗体、鼠抗人 GAPDH 抗体(Santa Cruz 公司,美国)。辣根过氧化物酶偶联的抗兔(武汉博士德公司)。Fugene 转染试剂(罗氏公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和细胞转染

细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液、置于 37℃ 5%CO₂ 及相对湿度条件下的培养箱中培养,其中 A549/DDP 细胞培养液中含终浓度为 2 μg/mL 的 DDP。取对数生长期细胞进行细胞转染,按 Fugene 转染试剂说明书的方法将对照空质粒和 pcDNA BANCR 分别转染到 A549/DDP 细胞中。细胞转染 48 h 后,进行相关试验检测。

1.2.2 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,采用 Smart-Spec™ plus 分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,采用 TaKaRa 反转录试剂盒合成 cDNA,PCR 扩增采用 SYBR Green 荧光染料法,PCR 反应条件为:95℃ 30 s 预变性;95℃ 5 s 变性;60℃ 30 s 结合;72℃ 1 min 延伸,共 40 个循环,内参照为 GAPDH。实验中使用的引物在表 1 中列出。相关引物数据采用 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量分析。

表 1 qRT-PCR 检测 BANCR 的引物序列
Table 1 BANCR primers for qRT-PCR detection

Gene	Primer	Sequences(5'→3')
BANCR	PCR 引物	上游 ACAGGACTCCATGGCAAACG
		下游 ATGAAGAAAGCCTGGTGCAGT
GAPDH	PCR 引物	上游 GGGAGCCAAAAGGGTCAT
		下游 GAGTCCTTCCACGATACCAA

1.2.3 MTT 法检测过表达 BANCR 后 A549/DDP 细胞对 DDP 的敏感性

细胞转染 48 h 后,以 0.25%胰蛋白酶消化细胞,用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液制备成单细胞悬液,细胞接种于 96 孔培养板中,6×10³ 个细胞/孔。细胞贴壁后,加入终浓度为 4 μg/mL 的 DDP,100 μL/孔。待细胞贴壁后,每隔 24 h 加新鲜配制的 MTT 溶液(5 μg/μL)20 μL/孔,继续培养 4 h 后,终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,加入 DMSO150 μL/孔,振荡 10 min,在酶联免疫检测仪上测定 490 nm 波长处各孔的吸光度(OD)值,取 6 个重复孔的平均吸光度值。根据数据绘制细胞生长抑制率曲线,并计算 DDP 对细胞的半数抑制浓度(half inhibition concentration,IC₅₀)。

1.2.4 克隆形成实验检测过表达 BANCR 后 A549/DDP 细胞增殖能力

细胞转染 48h 后,以 0.25%胰蛋白酶消化细胞,用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液制备成单细胞悬液,细胞接种于 6 孔板,1 000 个细胞/孔,分布均匀,继续培养 10 d,出现肉眼可见的克隆后终止培养,用 4%多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染液染色 5 min,洗净晾干,拍照记录。

1.2.5 流式细胞术检测过表达 BANCR 后 A549/DDP 细胞联合 DDP 处理的凋亡率

将对数生长期的人非小细胞肺癌 A549/DDP 细胞调整浓度至 3×10⁵/mL,以 2 mL/孔接种于 6 孔板,转染 24 h 后按实验分组设计加入终浓度为 15 μg/mL DDP,置于 37℃,5% CO₂ 及饱和湿度条件下

的培养箱中继续培养 48 h 后,分别收集各处理组 A549/DDP 细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次收集细胞,按操作说明采用 AV/PI 双染,避光放置 10 min,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.6 流式细胞术检测过表达 BANCR 后对 A549/DDP 细胞周期的影响

长期的人非小细胞肺癌 A549/DDP 细胞,调整浓度至 $3 \times 10^5/\text{mL}$,以 2 mL/孔接种于 6 孔板,按上述转染后收集细胞,用 PBS(0.01 mmol/L, pH7.2)洗 2 次,每次 800 g 离心 5 min。用 75%乙醇在 4℃固定 1 h, PBS 洗 1 次,重悬后加入 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 碘化丙啶(PI)试剂和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA 酶抑制剂异硫氰酸胍,室温避光孵育 30 min,流式细胞仪检测各组细胞细胞周期。

1.2.7 Western blot 检测过表达 BANCR 后 A549/DDP 细胞中 p53 蛋白表达的变化

收集转染后 48 h 的细胞,加入细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白,Bradford 法蛋白定量,进行 SDS-PAGE 电泳,将电泳分离的蛋白电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭,加入 1:1 000 兔抗人 p53 抗体,4℃过夜, TBST 洗 3 次,每次 5 min。加入辣根过氧化物酶偶联的抗兔(1:10 000 稀释),37℃,孵育 2 h, TBST 缓冲液充分洗膜 3 次,每次 10 min,发光压片显色,以 GAPDH 作为内参,分析结果。

1.3 统计学方法

所有实验重复 3 次,运用 SPSS15.0 统计软件分析。数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两样本均数间比较采用 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BANCR 在细胞中的表达变化

通过 qRT-PCR 检测 A549/DDP 细胞和 A549 细胞中 BANCR 的表达量,以 GAPDH 为内参,结果显示 A549/DDP 细胞中 BANCR 的相对表达量显著低于 A549 细胞($P < 0.05$,图 1A)。

为验证 pCDNA-BANCR 是否成功导入 A549/DDP 细胞中,在转染 48 h 后,用 qRT-PCR 检测 BANCR 的表达水平,结果发现转染了 pCDNA-BANCR 组中 BANCR 的表达量较对照组相比升高 99 倍($P < 0.05$,图 1B),该结果表明瞬时转染成功。接下来的实验可以采用 pCDNA-BANCR 转染 48 h 的细胞进行分析。

2.2 BANCR 对 A549/DDP 细胞 DDP 耐药的影响

通过 MTT 方法首先检测 A549 细胞和 A549/

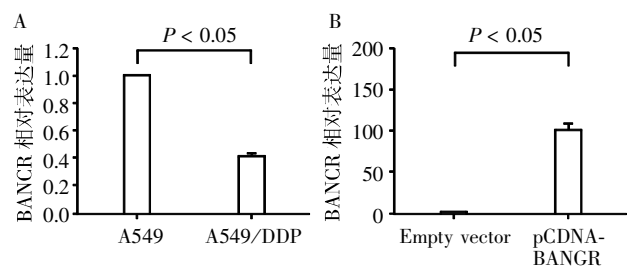


图 1 qRT-PCR 检测 BANCR 在 A549 和 A549/DDP 细胞中的表达

Figure 1 BANCR expression in A549 and A549/DDP cells detected by qRT-PCR

DDP 细胞对顺铂(DDP)药物敏感型变化并计算 IC_{50} 值,发现 DDP 对 A549 细胞的 IC_{50} 值明显低于 A549/DDP 细胞($P < 0.05$,图 2A)。通过 MTT 方法检测空白对照组和 pCDNA-BANCR 组对顺铂药物敏感性变化,发现 DDP 对转染 BANCR 质粒细胞的 IC_{50} 值明显低于转染空质粒的细胞($P < 0.05$,图 2B)。

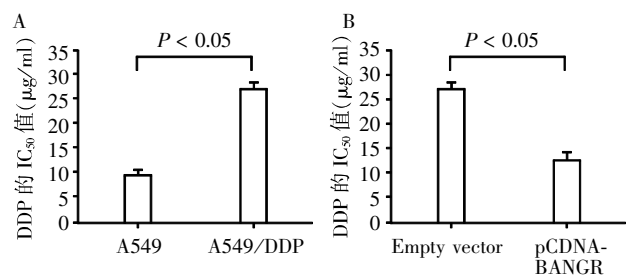


图 2 MTT 方法检测顺铂敏感性变化

Figure 2 MTT assay of the IC_{50} values of cells to cisplatin

2.3 BANCR 对 A549/DDP 细胞增殖的影响

通过克隆形成实验检测 BANCR 是否影响 A549/DDP 细胞增殖能力。实验表明,转染 pCDNA-BANCR 的 A549/DDP 细胞克隆较对照组的细胞克隆数目明显减少(图 3A)。细胞周期分析表明 BANCR 主要将细胞周期主要阻滞在有丝分裂间期 G0~G1 期(图 3B),减少细胞进一步增殖分裂。因此, BANCR 能抑制 A549/DDP 细胞的增殖速度,也能抑制其克隆形成能力。

2.4 BANCR 对 A549/DDP 细胞凋亡的影响

流式细胞术分析显示,给予 DDP 处理后,转染 pCDNA-BANCR A549/DDP 细胞早期凋亡率(LR quadrant, LR)为 $(7.16 \pm 0.68)\%$,晚期凋亡率(UR quadrant, UR)为 $(4.96 \pm 0.24)\%$;转染空质粒的 A549/DDP 细胞早期凋亡率为 $(2.07 \pm 0.13)\%$,晚期凋亡率为 $(0.88 \pm 0.14)\%$,差异均具统计学差异($P < 0.05$,图 4)。结果表明 BANCR 可通过诱导凋亡增强

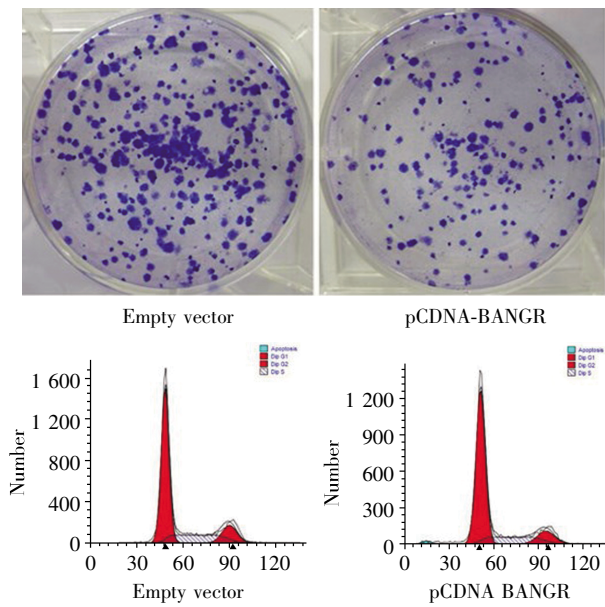


图 3 BANCR 对 A549/DDP 细胞增殖的影响

Figure 3 The effect of BANCR on proliferation of A549/DDP cells

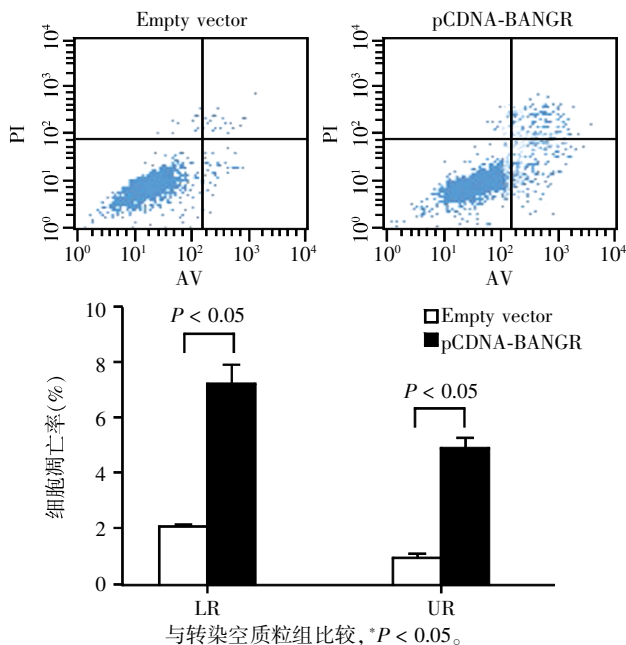


图 4 流式细胞术检测 BANCR 对给予顺铂处理的 A549/DDP 细胞凋亡的影响

Figure 4 The effect of BANCR on apoptosis of A549/DDP cells detected by flow-cytometric

A549/DDP 细胞对 DDP 的敏感性。

2.5 BANCR 对 A549/DDP 细胞 p53 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,相较于转染空质粒的细胞,转染 pCDNA-BANCR 质粒的 A549/DDP 细胞中 p53 蛋白上调表达(图 5)。

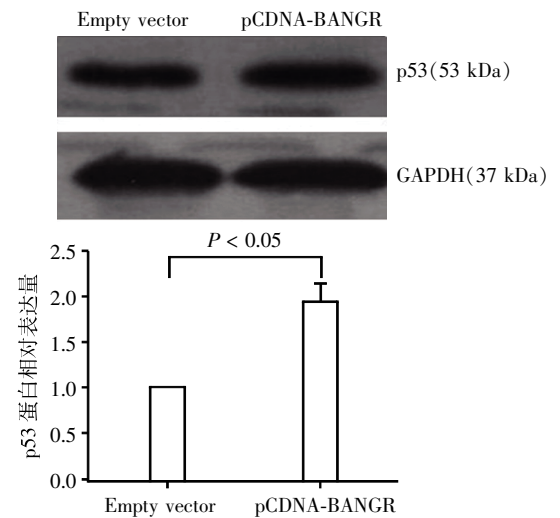


图 5 Western blot 测转染后 A549/DDP 细胞 p53 蛋白的表达

Figure 5 Expressions of p53 proteins in transfection A549/DDP cells by Western blotting

3 讨论

长非编码 RNA(lncRNA)作为非编码 RNA 家族的新成员,它是序列长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA 分子,已被证实在多个肿瘤的发生发展过程中发挥着类似癌基因或者抑癌基因的作用,它与肿瘤的分化、增殖、转移、耐药等过程密切相关。最近研究发现,长非编码 RNA BANCR 参与肿瘤发生发展的调控,在多种肿瘤中显著低表达,作为肿瘤抑制因子参与肿瘤各种生物功能调控,也有报道表明 BANCR 在少数癌组织中发挥癌基因的作用。本课题组前期证实了下调 BANCR 后人非小细胞肺癌预后变差,同时通过影响上皮间质转化促进了癌细胞的转移^[4];Zhang 等^[5]研究表明 BANCR 通过调节 NF- κ B1 促进胃癌细胞增殖;Wang 等^[6]发现了 BANCR 在乳头状甲状腺癌中促进细胞增殖和自噬作用;Shi 等^[7]发现了下调 BANCR 可通过促进结直肠癌细胞增殖;Jiang 等^[8]发现 BANCR 通过 MAPK 信号通路促进肺癌细胞增殖和迁移;Chen 等^[9]研究表明上调 BANCR 与肺癌放疗密切相关。Chen 等^[10]发现 BANCR 可通过影响 EMT,抑制 NSCLC 细胞的增殖和侵袭。本课题组新近研究中发现长非编码 RNA 与顺铂耐药密切相关,长非编码 RNA HOTAIR 通过下调 p21 表达促进人肺腺癌顺铂耐药性^[11],长非编码 RNA MEG3 通过上调 p53 蛋白促进人肺腺癌顺铂耐药性^[12]。其他课题组还发现长非编码 RNA UCA1 通过调节 Wnt 信号通路促进膀胱癌顺铂耐药性^[13]。本研究通过 qRT-PCR 分析发现,对 DDP 耐药

的 A549/DDP 细胞株中 BANCR 的表达比其亲本细胞株的 A549 细胞株显著降低。为进一步观察 BANCR 在 NSCLC 细胞对顺铂耐药中的作用,本研究将 pcDNA-BANCR 转染至 A549/DDP 细胞,观察过表达 BANCR 后对顺铂的药物敏感性的变化,发现顺铂对转染 pcDNA-BANCR 后 A549/DDP 细胞的 IC₅₀ 值较转染前显著降低。BANCR 能够增加 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性,抑制 A549/DDP 细胞对顺铂的耐药性。同时,显著抑制非小细胞肺癌 A549/DDP 细胞增殖及克隆形成,促进细胞凋亡。进一步研究发现,BANCR 可以上调 p53 蛋白表达,提示 BANCR 对非小细胞肺癌 A549/DDP 细胞的促凋亡作用,可能是通过提高 p53 表达起作用的。p53 是一种抑癌基因,在很多生理过程发挥着重要的作用,包括 DNA 的修复和细胞的凋亡^[14]。它还可以被顺铂诱导促进细胞周期阻滞^[15],同时再激活 p53 是治疗癌症的可行方案之一^[16]。本研究中发现转染了 pcDNA-BANCR 的 A549/DDP 细胞中 p53 表达升高,而细胞增殖能力下降,凋亡显著增加,细胞对顺铂耐药性下降。所以推测长非编码 RNA BANCR 逆转 A549/DDP 细胞耐药性通过增加 p53 表达实现。

以上研究表明,长非编码 RNA BANCR 可以增加 A549/DDP 细胞对 DDP 的敏感性,逆转耐药性,其功能可能是通过抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,上调 p53 蛋白的表达来实现。这一研究为长非编码 RNA BANCR 和顺铂治疗肺癌提供了实验依据,并为肺癌基因治疗提供了新的靶标。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90

[2] Sculier JP. Nonsmall cell lung cancer[J]. *Eur Respir Rev*, 2013, 22(127): 33-36

[3] Flockhart RJ, Webster DE, Qu K, et al. BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCR to regulate melanoma cell migration[J]. *Genome Res*, 2012, 22(6): 1006-1014

[4] Sun M, Liu XH, Wang KM, et al. Downregulation of BRAF activated non-coding RNA is associated with poor prognosis for non-small cell lung cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 68

[5] Zhang ZX, Liu ZQ, Jiang B, et al. BRAF activated non-coding RNA (BANCR) promoting gastric cancer cells proliferation via regulation of NF-kappaB1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(2): 225-231

[6] Wang Y, Guo Q, Zhao Y, et al. BRAF-activated long non-coding RNA contributes to cell proliferation and activates autophagy in papillary thyroid carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(5): 1947-1952

[7] Shi Y, Liu Y, Wang J, et al. Downregulated long noncoding RNA BANCR promotes the proliferation of colorectal cancer cells via downregulation of p21 expression [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122679

[8] Jiang W, Zhang D, Xu B, et al. Long non-coding RNA BANCR promotes proliferation and migration of lung carcinoma via MAPK pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 69: 90-95

[9] Chen JX, Chen M, Zheng YD, et al. Up-regulation of BRAF activated non-coding RNA is associated with radiation therapy for lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 71: 79-83

[10] 陈志强,尹凌帝,孙倩,等.长非编码 RNA BANCR 对非小细胞肺癌增殖和侵袭的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(5): 650-655

[11] Liu Z, Sun M, Lu K, et al. The long noncoding RNA HOTAIR contributes to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma cells via downregulation of p21 (WAF1/CIP1) expression [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77293

[12] Liu J, Wan L, Lu K, et al. The long noncoding RNA MEG3 contributes to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0114586

[13] Fan Y, Shen B, Tan M, et al. Long non-coding RNA UCA1 increases chemoresistance of bladder cancer cells by regulating Wnt signaling [J]. *FEBS J*, 2014, 281(7): 1750-1758

[14] Riley T, Sontag E, Chen P, et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(5): 402-412

[15] Wang S, Li W, Xue Z, et al. Molecular imaging of p53 signal pathway in lung cancer cell cycle arrest induced by cisplatin [J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(11): 900-907

[16] Wade M, Li YC, Wahl GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2): 83-96