

长链非编码 RNA MALAT1 在肿瘤细胞中调控 IRF3 的表达

张道奇¹, 曹倩¹, 唐羽², 王会丹¹, 李胜¹, 周国平^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院儿科, ²胸外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:验证长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)肺腺癌转移相关转录本 1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)与干扰素调节因子 3(interferon regulation factor 3, IRF3)的靶向调控关系。方法:将人 IRF3 启动子荧光素酶报告基因重组质粒 pGL3-56 与敲降 MALAT1 的 siRNA(siMALAT1-1、siMALAT1-2)或阴性对照物(siNC)瞬时共转染 A549 细胞,检测相对荧光素酶活性。同样使用 siNC 或 siMALAT1-1、siMALAT1-2 瞬时共转染 A549 细胞,反转录-实时荧光定量 PCR 检测 IRF3 mRNA 表达水平,Western blot 检测 IRF3 蛋白表达水平。结果:与 siNC 组比较,siMALAT1-1 组和 siMALAT1-2 组荧光素酶活性均有下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 siNC 组比较,siMALAT1-1 组和 siMALAT1-2 组 MALAT1 mRNA 和 IRF3 mRNA 相对表达量均有下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 siNC 组比较,siMALAT1-1 组和 siMALAT1-2 组的 IRF3 蛋白表达水平均有下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:IRF3 是 MALAT1 的靶基因, MALAT1 通过调控 IRF3 启动子区来影响 IRF3 的转录与表达。

[关键词] 长链非编码 RNA; MALAT1; IRF3; 启动子; 转录因子

[中图分类号] R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)04-435-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20180403

Long non-coding RNA MALAT1 regulated IRF3 expression by cancer cell

Zhang Daoqi¹, Cao Qian¹, Tang Yu², Wang Huidan¹, Li Sheng¹, Zhou Guoping^{1*}

¹Department of Pediatrics, ²Department of Chest Surgery, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To validate whether interferon regulation factor 3 (IRF3) is regulated by long non-coding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1). **Methods:** Luciferase report plasmid pGL3-56 inserted with IRF3 promoter and MALAT1 knockdown siRNAs (negative control, siMALAT1-1 and siMALAT1-2) were co-transfected to A549 cells, then relative luciferase activities were determined. MALAT1 knockdown siRNAs were transfected to A549 cells, then IRF3 mRNA and protein levels were detected by qPCR and Western blotting respectively. **Results:** Relative luciferase activities of the siMALAT1-1 and the siMALAT1-2 groups were lower than that of the siNC group respectively, which were statistically significant ($P < 0.05$). Relative MALAT1 RNA levels of the siMALAT1-1 and the siMALAT1-2 groups were lower than that of the siNC group respectively, which were statistically significant ($P < 0.05$); Relative IRF3 mRNA levels of the siMALAT1-1 and the siMALAT1-2 groups were lower than that of the siNC group respectively, which were statistically significant ($P < 0.05$). Relative IRF3 protein levels of the siMALAT1-1 and the siMALAT1-2 groups were lower than that of the siNC group respectively, which were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** IRF3 is a target of MALAT1 and MALAT1 regulates the expression of IRF3 by targeting IRF3 promoter.

[Key words] long non-coding RNA; MALAT1; IRF3; promoter; transcription factor

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(04):435-438]

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)

是一类长度超过 200 个核苷酸、无编码能力的 RNA^[1]。目前研究表明, lncRNA 可以通过以下方式调控相关基因表达:①招募转录因子来对 DNA 进行修饰;②形成异构核糖核蛋白复合物(hnRNP);③诱导相关蛋白、微小 RNA(microRNA);④直接与

[基金项目] 国家自然科学基金(30872804, 81300023); 江苏高校优势学科建设工程资助

*通信作者(Corresponding author), E-mail: gpzhou2005@163.com

RNAs以及DNAs结合等多种方式发挥作用^[2]。已有报道显示肺腺癌转移相关转录本1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)与肺癌的发生发展关系密切^[3-5],MALAT1在肺癌组织中高表达,主要通过影响肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移、凋亡或者转移扩散来干预肺癌的预后^[6-7]。

干扰素调节因子3(interferon regulation factor 3, IRF3)在干扰素(interferon, IFN)系统和细胞周期中起重要作用,在病毒感染过程中,IRF3通过其羧基末端的磷酸化而被激活,并转移到细胞核中对其目标基因发生转录调控,从而在增强人体免疫功能,特别是在病毒感染中起关键作用^[8]。近年来越来越多的文献报道IRF3与肺癌的发生关系密切,但IRF3在肺癌的发生过程中具体的调控机制不清楚^[9]。本研究应用分子生物学技术验证 lncRNA MALAT1对IRF3的靶向调控作用,阐明IRF3在肺癌发生发展中的作用机制,为临床免疫靶向治疗肺癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌 A549 细胞、pGL3-56 载体为本课题组所保存。DMEM 高糖培养基(HyClone 公司,美国);青霉素-链霉素溶液、胰酶消化液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天公司);胎牛血清(FBS,杭州四季青公司);脂质体转染试剂 lipo3000、TRIzol 总 RNA 提取试剂(Invitrogen 公司,美国);双荧光素酶报告基因试剂盒(Promega 公司,美国);实时荧光定量 PCR 试剂盒、逆转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本);全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物公司);蛋白 Maker(Thermo 公司,美国);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Millipore 公司,美国);兔抗人 IRF-3 单克隆抗体(Abcam 公司,英国);兔抗人 GAPDH 单克隆抗体、生物素标记的羊抗兔 IgG(Jacon ImmunoResearch 公司,美国)。实验过程中的人 IRF-3、GAPDH、MALAT1 的上下游引物序列(上海英骏公司),MALAT1:上游 5'-GAATTGCGTCATT-TAAAGCCTAG-3',下游 5'-GTTTCATCCTACCACTCCCAATT-3';GAPDH:上游 5'-ATGACATCAAGAAGGTGGTG-3',下游 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTG-3';IRF-3:上游 5'-GGACCCTCAGACCCACATA-3',下游 5'-CCATGTTACCCAGTAACTCATC-CAG-3'。实验过程中小干扰 RNA siRNA 序列如下:siMALAT1-1:5'-GAAUCCGGUGAUGCCGAGUTT-

3',siMALAT1-2:5'-GGCAAUAGAGGCCUCUAATT-3';阴性对照(siRNA negative control, siNC)由上海吉玛公司提供^[10]。

1.2 方法

1.2.1 荧光素酶报告基因系统检测 IRF-3 的核心启动子活性

依据本实验室前期研究结果,MALAT1 与 IRF-3 的结合位点在 IRF3 的核心区域,pGL3-56 即 IRF-3 核心启动子的 DNA 片段,该片段位于 IRF-3 的 5'侧翼区-149~-93 bp^[11]。

在 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基中培养 A549 细胞,培养箱温度 37 ℃、5%CO₂ 饱和湿度。按照密度 1.5×10^4 个/孔接种于 96 孔板,分为 siNC 组、siMALAT1-1 组、siMALAT1-2 组,其中目的质粒 pGL3-56 100 ng、内标质粒 pRL-TK 4 ng 分别与 siNC、siMALAT1-1 或 siMALAT1-2 各 75 nmol/L 共转染,瞬时转染使用转染试剂为 lipo3000,每组 3 个复孔。

转染后 24 h 收集细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,每孔加入 50 μ L PLB 细胞裂解液,室温摇床上振荡 30 min,根据双荧光素酶报告基因试剂盒说明书进行活性检测。计算出报告质粒与内参的荧光素酶活性比值。实验重复 3 次。

1.2.2 反转录-实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 IRF-3 mRNA 表达水平

A549 按照密度 2.0×10^5 个/孔接种于 12 孔板,将细胞分为 3 组,分别转染 siNC、siMALAT1-1、siMALAT1-2,其中 siNC、siMALAT1-1、siMALAT1-2 的终浓度为 75 nmol/L。转染后 24 h 用 TRIzol 提取总 RNA,反转录成 cDNA,进行 qPCR 检测。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 IRF-3 的相对表达量。实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 检测 IRF-3 蛋白表达水平

A549 按 2.0×10^5 个/孔接种于 6 孔板,将细胞分为 3 组,分别转染 siNC、siMALAT1-1、siMALAT1-2,其中 siNC、siMALAT1-1、siMALAT1-2 的终浓度为 75 nmol/L。转染后 48 h 收集细胞,使用全蛋白提取试剂盒提取总蛋白,用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液,100 ℃煮沸 5 min。取 40 μ g 总蛋白进行凝胶电泳分离,后湿转将蛋白转至 PVDF 膜上;脱脂奶粉室温封闭 1 h;一抗(1:1 000)4 ℃摇床孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;二抗室温摇床孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;曝光成像,以 IRF-3 灰度值与内参照 GAPDH 灰度值的比值作为 IRF-3 蛋白相对表达量。使用 ImageJ 软件进行蛋白灰度值统计。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

应用SPSS20.0软件进行统计学分析,定量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。3组及以上用单因素方差分析,两两比较用Bonferroni检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在A549细胞中敲低MALAT1后IRF-3的核心启动子活性下降

MALAT1的敲低使用小干扰RNA的方法。siNC组、siMALAT1-1组和siMALAT1-2组的相对荧光素酶活性的差异有统计学意义($F=24.26, P < 0.01$),其中siMALAT1-1组和siMALAT1-2组荧光素酶活性均比siNC组下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图1)。

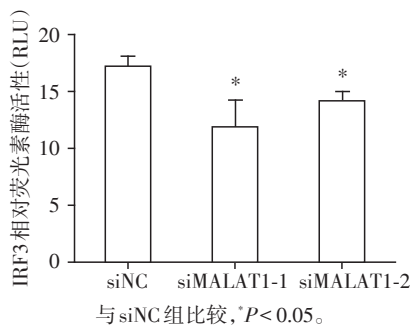


图1 MALAT1下调后IRF3核心启动子在A549细胞相对荧光素酶活性大小

Figure 1 Relative luciferase activity of IRF3 promoter by knockdown of the MALAT1 in A549 cells

2.2 在A549细胞中敲低MALAT1后IRF3的mRNA表达水平下降

通过qPCR手段检测mRNA表达水平,siNC组、siMALAT1-1组和siMALAT1-2组的MALAT1 mRNA、IRF3 mRNA相对表达量均有统计学差异(MALAT1 mRNA: $F=87.72, P < 0.01$; IRF3 mRNA: $F=170.10, P < 0.01$),其中siMALAT1-1组和siMALAT1-2组均相对于siNC组下降,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2)。

2.3 在A549细胞中敲低MALAT1后IRF3的蛋白表达水平下降

通过Western blot检测IRF3蛋白表达水平,siNC组、siMALAT1-1组和siMALAT1-2组的IRF3蛋白表达水平差异有统计学意义($F=18.95, P < 0.01$),其中siMALAT1-1组和siMALAT1-2组的IRF3蛋白水平相对于siNC均有下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图3)。

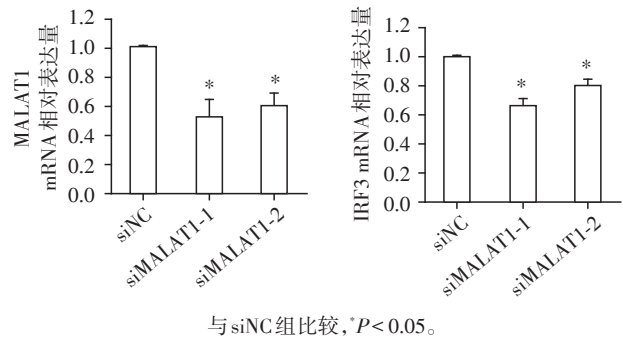


图2 MALAT1下调后A549中MALAT1以及IRF3 mRNA相对表达量

Figure 2 Relative expression of MALAT1 and IRF3 mRNA by knockdown of the MALAT1 in A549 cells

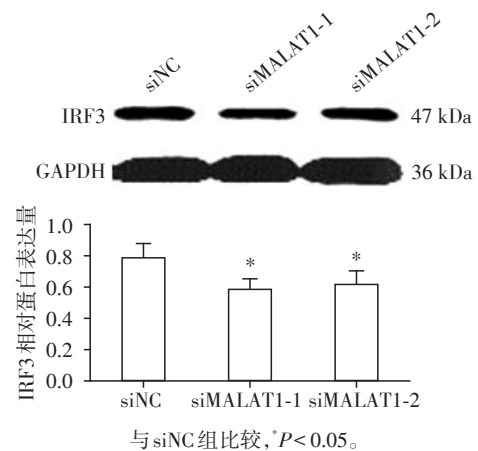


图3 MALAT1下调后A549中IRF3相对蛋白表达水平

Figure 3 Relative expression of IRF3 protein by knockdown of the MALAT1 in A549 cells

3 讨论

随着免疫治疗在肿瘤方面越来越广泛的应用,肿瘤与免疫之间的关系也越来越紧密。IRF3在肺癌患者中高表达^[12],同时lncRNA MALAT1在肺癌中也有高表达^[4,13],可能MALAT1通过作用于IRF3等相关基因来影响肺癌患者预后。在此次实验中敲低MALAT1,检测IRF3的mRNA水平和蛋白水平,发现MALAT1与IRF3正相关;pGL3-56是在本实验室先前已验证出IRF3启动子活性较高的质粒,位于-149~-93 bp区域^[11],此次实验共转该质粒,检测发现较对照组活性有所下降,MALAT1可能通过调控IRF3启动子区发挥作用。

lncRNA的作用方式多样,主要分为邻近作用和远距离调控,邻近发挥监督作用,远距离通过招募相关蛋白或者直接结合的方式,调控相关基因的转录^[14]。MALAT1位于11号染色体上,IRF3位于19号

染色体上,排除邻近作用,在该实验中分析,不仅证明两者具有正相关,而且证明作用方式主要为调控 IRF3 的活性较高启动子区(称核心启动子区),通过相关生物信息学预测软件,预测到 HSF、E2F1、c-Myb 等转录因子可结合核心启动子区发挥作用,某些 LncRna 可以通过招募相关转录因子发挥调控作用^[15]。

我们可接着研究 MALAT1 如何通过 HSF、E2F1、c-Myb 等转录因子发挥调控 IRF3 作用的,通过敲低、RNA 结合蛋白免疫沉淀(RIP)等技术去验证 MALAT1 调控 IRF3 的具体机制。癌症的难治愈性,在于癌症可隐藏逃避免疫系统攻击,了解 MALAT1 具体调控免疫系统的方式,有助于帮助免疫系统在肿瘤刚开始出现时能够检测和攻击它们,为新的免疫治疗提供思路^[16]。

[参考文献]

- [1] Bassett AR, Akhtar A, Barlow DP, et al. Considerations when investigating lncRNA function *in vivo* [J]. *Elife*, 2014, 3(8): e03058
- [2] Chen LL. Linking long noncoding RNA localization and function [J]. *Trends Biochemical Sciences*, 2016, 41(9): 761-772
- [3] Gutschner T, Hämmerle M, Eissmann M, et al. The non-coding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(3): 1180-1189
- [4] Yoshimoto R, Mayeda A, Yoshida M, et al. MALAT1 long non-coding RNA in cancer [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2016, 1859(1): 192-199
- [5] Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11): 1253-1261
- [6] Gutschner T, Hämmerle M, Diederichs S. MALAT1-a paradigm for long noncoding RNA function in cancer [J]. *J Mol Med*, 2013, 91(7): 791-801
- [7] Liu M, Sun W, Liu Y, et al. The role of lncRNA MALAT1 in bone metastasis in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(3): 1679-1685
- [8] Sharma S, Tenover BR, Grandvaux N, et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway [J]. *Science*, 2003, 300(5622): 1148-1151
- [9] Tokunaga T, Naruke Y, Shigematsu S, et al. Aberrant expression of interferon regulatory factor 3 in human lung cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397(2): 202-207
- [10] Li B, Chen P, Qu J, et al. Activation of LTBP3 gene by a long noncoding RNA (lncRNA) MALAT1 transcript in mesenchymal stem cells from multiple myeloma [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(42): 29365-29375
- [11] Xu HG, Ren W, Lu C, et al. Characterization of the human IRF-3 promoter and its regulation by the transcription factor E2F1 [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(7): 3073-3080
- [12] Wang LL, Chen ZS, Zhou WD, et al. Down-regulated GATA-1 up-regulates interferon regulatory factor 3 in lung adenocarcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2551
- [13] Shi X, Sun M, Liu H, et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases [J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2): 159-166
- [14] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3): 155-159
- [15] Feng T, Fang S, Wu Q, et al. miR-124 downregulation leads to breast cancer progression via lncRNA-MALAT1 regulation and CDK4/E2F1 signal activation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16205-16216
- [16] Nirschl CJ, Suárez-Farinas M, Izar B, et al. IFN gamma-dependent tissue-immune homeostasis is co-opted in the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2017, 170(1): 127-141

[收稿日期] 2017-08-03