

长链非编码RNA BANCR在胃癌中表达及其对胃癌细胞迁移、侵袭的影响

崔鹤*,居晓斌,叶琴,潘猛,周惠英

南京医科大学第一附属医院司法鉴定所,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:检测长链非编码RNA BANCR在胃癌组织中的表达,并探讨其对胃癌细胞迁移、侵袭生物学行为的调控作用与相关机制。方法:采用荧光定量PCR(QPCR)和TCGA-STDA数据库分析胃癌组织和癌旁组织中BANCR的表达水平,采用小干扰RNA(siRNA)技术敲低胃癌细胞MKN28 BANCR的表达,采用Transwell、QPCR检测MKN28细胞的迁移、侵袭情况以及肿瘤细胞转移相关标志物的表达水平变化。结果:胃癌组织中BANCR的表达水平呈明显上调。敲低BANCR表达后,MKN28细胞的迁移、侵袭能力被抑制,转移相关分子CDH1的表达量显著增加,而Vimentin的表达量显著降低。此外,敲低BANCR下调ZEB1表达,同时干扰miR-203能部分恢复ZEB1的表达水平。结论: BANCR在胃癌组织中呈高表达,其可能通过调节miR-203-ZEB1-CDH1轴促进胃癌细胞迁移和侵袭。

[关键词] 胃癌;长链非编码RNA;BANCR;迁移;侵袭

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)12-1674-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20181202

The expression of long non-coding RNA BANCR and its effect on the migration and invasion of gastric cancer cells

Cui He*, Ju Xiaobin, Ye Qin, Pan Meng, Zhou Huiying

Department of Genetics Laboratory, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of lncRNA BANCR in gastric cancer (GC), and explore the potential biological function and underlying molecular mechanism on cell migration and invasion. **Methods:** The mRNA expression level of BANCR in GC tissues was detected by quantitative real-time PCR (QPCR). MKN28 cells was transfected with siRNA against BANCR. Transwell assays was used to detect the ability of cell migration and invasion and QPCR was used to detect the expression of metastasis-related markers. **Results:** The expression level of BANCR in GC tissues was significantly higher than that in adjacent tissues, which consistent with TCGA data. Down-regulation of BANCR repressed GC cell migration and invasion. Furthermore, the expression level of CDH1 was up-regulated, and the expression level of Vimentin and ZEB1 was down-regulated in BANCR knocking-down cells. Interesting, the expression level of ZEB1 was restored by decreasing miR-203 in BANCR knocking-down cells. **Conclusion:** BANCR was over-expressed in GC tissues and play an oncogenic role by regulating the miR-203-ZEB1-CDH1 axis in GC.

[Key words] gastric cancer; lncRNA; BANCR; migration; Invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(12): 1674-1678]

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,中国胃癌的发病率和死亡率均高于世界平均水平,严重影响国人的健康^[1]。目前针对胃癌的有效治疗非常有限,其预

后取决于多种因素,但总体治疗效果不佳。细胞转移是胃癌高死亡率的重要因素^[2]。因此,揭示胃癌侵袭转移的调控机制,寻找影响胃癌转移及预后的分子标志物,能够为胃癌的诊断和治疗提供新思路。

长链非编码RNAs (Long noncoding RNAs, lncRNAs)是一类不具有蛋白编码功能,长度超过200个

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81702789)

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

核苷酸的RNAs。大量研究表明,lncRNAs参与多种生物学过程,包括X染色体印迹、干细胞分化、免疫反应等,其异常表达是诱导肿瘤发生发展的重要分子机制之一^[3]。目前,已经发现多个重要的lncRNAs参与胃癌的发生发展。近年发现lncRNA BANCR与胃癌的发生发展密切相关,其通过调控核因子(nuclear factor,NF)- κ B1促进胃癌细胞的增殖^[3]。临床信息分析发现,BANCR与胃癌细胞的转移及不良预后具有显著性相关^[4],但具体生物学功能尚不清楚。因此,本研究检测BANCR在胃癌组织中的表达情况,探究其对胃癌细胞转移能力的影响及调控机制,为胃癌的早期诊断与靶向治疗提供新理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

胃癌组织和癌旁组织标本均为新鲜样本,选自2015年1月—2015年7月在南京医科大学附属江宁医院行根治性手术治疗的胃癌患者30例,术前未接受放化疗等治疗。胃癌细胞MKN28(中科院上海细胞库)。RNA提取试剂、逆转录试剂和荧光定量PCR试剂(Takara公司,中国);1640培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(HyClone公司,美国);Lipofectamine 2000转染试剂(Invitrogen公司,美国)。BANCR-siRNA干扰序列由上海吉玛生物公司设计合成(中国)。细胞迁移、侵袭小室、Matrigel(BD公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量PCR(quantitative real-time PCR,QPCR)检测

采用TRIzol试剂提取胃癌组织和细胞总RNA,逆转录成cDNA(complementary DNA)后,以cDNA为模板采用SYBR Green I试剂进行目的基因的扩增。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.2.2 细胞培养与转染

常规复苏MKN28细胞,用含有10%胎牛血清的1640培养基,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。取对数生长期细胞接种于6孔板,接种密度为 5×10^5 个/孔,24小时后按转染试剂说明转染BANCR-siRNAs和阴性对照siNC。BANCR-siRNA-1序列(5'-3'):GGA-GUGGCGACUAUAGCAATT;BANCR-siRNA-2序列(5'-3'):GCCUC UAUUGGAAUCAGCUTT。miR-203 inhibitor(5'-3'):CUAGUGGUCCUAAACAUUUCAC。

1.2.3 Transwell迁移实验

用无血清RPMI-1640培养基稀释细胞至 $2 \times$

10^5 个/mL,加入上层小室中500 μ L,下层孔中加入750 μ L含10%胎牛血清RPMI-1640培养基。置于细胞培养箱培养24 h后取出小室,结晶紫染色后在显微镜下随机选取5个视野拍照计数。

1.2.4 Transwell侵袭实验

拆开储藏于-20℃的Matrigel Invasion Chambers包装,取出小室,放入24孔板中,平衡至室温。用无血清RPMI-1640培养基稀释细胞至 2×10^5 个细胞/mL,加入上层小室中500 μ L,下层孔中加入750 μ L含10%胎牛血清RPMI-1640培养基。置于细胞培养箱培养24 h后取出小室,结晶紫染色后在显微镜下随机选取5个视野拍照计数。

1.3 统计学方法

采用SPSS18.0统计学软件进行分析。数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BANCR在胃癌组织和癌旁组织中的表达水平比较

通过QPCR实验在30例成对胃癌组织和癌旁组织中检测BANCR的表达水平。结果显示,相较于癌旁组织,BANCR在胃癌组织中的表达水平显著上调,差异具有统计学差异(图1A, $P < 0.001$)。进一步通过TCGA数据库获取BANCR在375例胃癌和32例癌旁组织中的表达数据分析发现,BANCR在胃癌组织中的平均表达水平显著高于癌旁组织的平均表达水平(图1B, $P < 0.05$)。

2.2 干扰BANCR表达抑制胃癌细胞的迁移和侵袭能力

在胃癌细胞MKN28中,转染2条不同的siRNAs干扰BANCR的表达。QPCR检测干扰效果显示,与阴性对照相比,siRNA-1组和siRNA-2组中的BANCR表达显著降低(图2A, $P < 0.01$)。细胞迁移实验结果显示:BANCR表达沉默后显著抑制MKN28的迁移能力。MKN28-siBANCR-1和MKN28-siBANCR-2细胞穿过transwell膜的平均数量分别是115.07个和113.63个,明显少于MKN28-siNC细胞的平均数目(图2B, $P < 0.01$)。细胞侵袭实验结果显示:BANCR表达沉默后显著抑制MKN28的侵袭能力。MKN28-siBANCR-1和MKN28-siBANCR-2细胞穿过Matrigel的平均数量分别是55.1个和47.2个,明显少于MKN28-siNC细胞的平均数目(图2B, $P < 0.01$)。

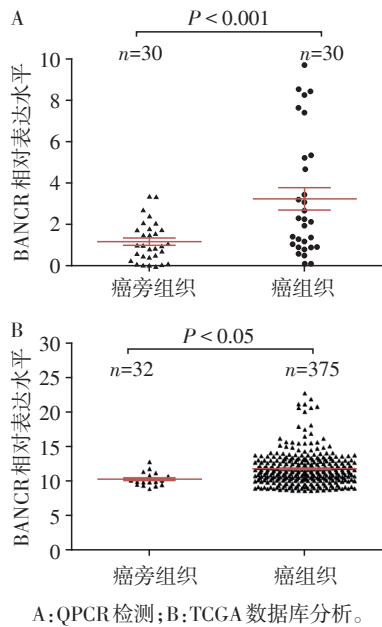


图1 检测BANCR在胃癌组织中的表达情况

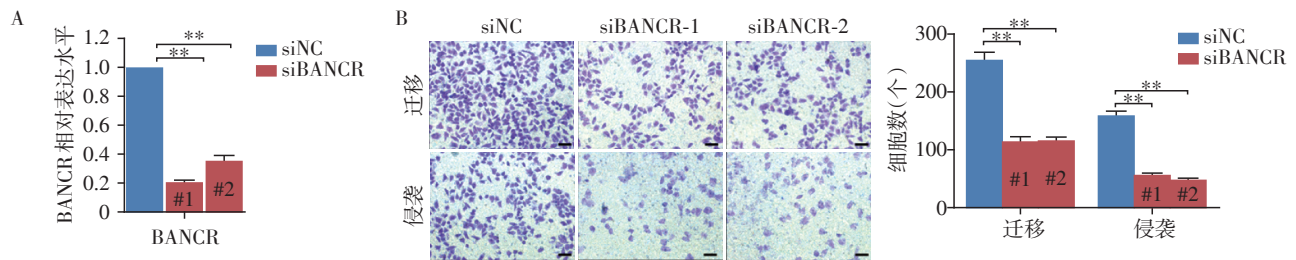
Figure 1 The expression of BANCR detected in GC tissues

2.3 干扰BANCR表达后影响肿瘤转移相关标志分子的表达

研究显示, BANCR参与促进甲状腺癌和肺癌细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[5-6]。在胃癌细胞中, QPCR和Western blot检测转移标志分子Cadherin 1(CDH1)和Vimentin(VIM)的表达水平。结果显示, 与阴性对照相比, CDH1在MKN28-siBANCR-1和MKN28-siBANCR-2细胞中的表达显著上调, 而VIM的表达显著下调(图3)。

2.4 BANCR吸附miR-203调控EMT相关转录因子ZEB1的表达

目前, 有关BANCR作为内源竞争RNA结合miRNA调控下游靶基因的报道相对较少。有报道显示, BANCR吸附miR-203发挥调控作用^[7]。通过TargetScan预测发现, miR-203与EMT相关转录调控因子ZEB1的3'UTR存在保守的8mer匹配位点(图4A)。QPCR检测发现, 敲低BANCR后显著降低



A: QPCR检测BANCR敲低后的表达水平, ** $P < 0.01$; B: BANCR表达敲低后MKN28细胞的迁移和侵袭能力检测, 比例尺100 μm , ** $P < 0.01$ 。

图2 分析BANCR对MKN28细胞迁移、侵袭能力的影响

Figure 2 The effects of BANCR on the migration and invasion of MKN28

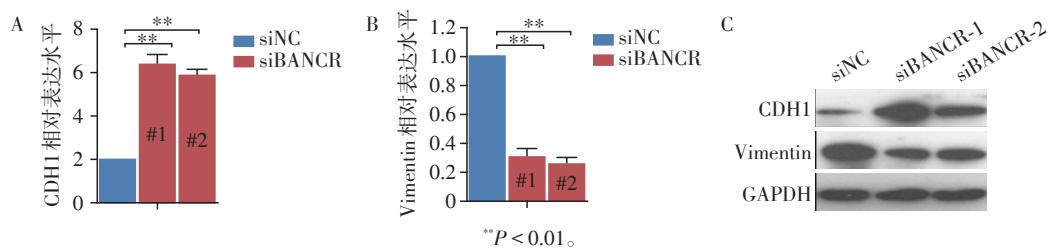


图3 敲低BANCR后检测CDH1和VIM转录水平及蛋白表达

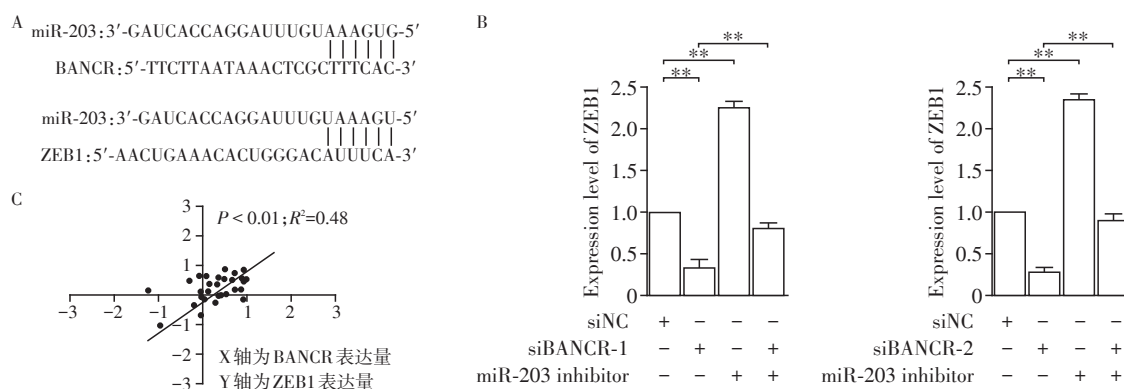
Figure 3 The expression of metastasis-related markers detected in BANCR downregulated cells

ZEB1的表达, 进一步在BANCR低表达细胞中干扰miR-203的表达后, ZEB1的表达部分恢复(图4B)。此外, 30例病例组织检测ZEB1的表达发现, BANCR和ZEB1的表达呈显著正相关(图4C)。

3 讨论

lncRNA是一类不编码蛋白质, 在细胞中起重

要调节作用的信息分子。目前, 已发现多个重要的lncRNA参与胃癌的恶性发展。例如, lncRNA HM-lincRNA717, 也称胃癌相关转录本2被证实在胃癌组织和细胞中低表达, 与胃癌细胞的神经侵袭和远端转移有密切关系^[8]。还有研究报道HOXA11-AS, ZFAS1等参与胃癌的发生发展^[9-10]。因此, 揭示lncRNA在肿瘤中的临床意义、生物学功能及潜在调控机制



A: BANCR、ZEB1与miR-203序列匹配示意图。B: 敲低BANCR、干扰miR-203或共抑制BANCR及miR-203表达后检测ZEB1表达, ** $P < 0.01$ 。C: 检测BANCR与ZEB1在组织病例中的相关性。

图4 BANCR吸附miR-203调控ZEB1表达

Figure 4 BANCR regulates ZEB1 by sponging miR-203

对早期诊断和治疗靶点的寻找提供参考。

BANCR是一条长693 bp的lncRNA,由Flockhart等^[11]研究者通过对BRAFV600E影响的转录本测序筛选而发现,BANCR可以促进黑色素瘤细胞的运动能力;Li等^[12]研究者发现,BANCR在黑色素瘤组织和细胞中高表达,体内、外实验显示,敲低BANCR的表达后能够抑制黑色素瘤细胞的生长。Wang等^[13]研究者发现,BANCR在乳头状甲状腺癌中能够调控癌干细胞分子标志物等。此外,在乳腺癌和肝癌也证实BANCR具有促进肿瘤发生发展的作用^[14]。以上研究提示BANCR具有癌基因特性。此外,有少数报道显示肺癌中BANCR发挥抑癌基因的作用,其高表达抑制肺癌细胞的生长和转移^[10]。由此提示,BANCR在肿瘤中的临床意义和生物学功能可能存在差异性。目前胃癌中BANCR的研究相对较少,其对胃癌细胞的影响有待探讨。本文发现BANCR在胃癌病例中存在高表达情况,提示其可能发挥促癌作用。Li等^[4]研究者发现,BANCR的高表达与胃癌患者肿瘤细胞转移存在显著性相关。确实,通过体外细胞学实验发现,BANCR显著增加胃癌细胞的迁移和侵袭能力。由此提示,BANCR可能通过影响胃癌细胞的运动能力参与胃癌的发展过程。

最新研究发现,多条BANCR介导的信号通路参与肿瘤的发生发展。BANCR通过调控细胞周期分子CyclinD1影响G0/G1期^[15];BANCR通过调控RAF/MEK/ERK信号通路调控肿瘤干细胞标志分子LGR5和EpCAM的表达^[16];此外,BANCR还能通过调控MAPK和PIK3信号通路影响乳头状甲状腺癌细胞的侵袭性^[17]。以上结果提示,BANCR在肿瘤细胞的分子调控网络中发挥重要作用。胃癌中有报

道显示,BANCR通过调控NF- κ B1的表达促进胃癌细胞的增殖^[3],但针对肿瘤细胞转移的机制尚无报道。本文中,下调BANCR表达后能够显著升高CDH1的表达,降低VIM的表达。CDH1和VIM是EMT的重要分子标志物。根据以往报道和生物信息学的预测分析发现,BANCR能够吸附miR-203并调控EMT相关转录调控因子ZEB1。进一步发现,BANCR与ZEB1存在表达上的相关性,提示其参与对胃癌细胞迁移、侵袭的调控。本研究初步结果提示,BANCR可能通过诱导EMT调控胃癌细胞的恶性转移。目前在结直肠癌中,BANCR与miR-203的表达呈显著性负相关^[11]。因此,后续需要进一步通过相关实验补充确认BANCR与miRNA-203以及miRNA-203与ZEB1在胃癌细胞中的靶向关系。此外,EMT相关基因CDH1受表观遗传修饰的调控,BANCR是否与表观调控相关酶分子存在相互作用介导胃癌细胞的迁移和侵袭有待证实。

综上所述,BANCR在胃癌组织中呈高表达状态,其可能通过调控胃癌细胞的迁移和侵袭能力影响胃癌的发生发展。BANCR能够吸附miR-203上调ZEB1的表达,进而调控转移相关标志分子CDH1和VIM的表达,提示其可能参与EMT过程。然而本研究尚有诸多不足,需要进一步增加临床样本分析和功能验证实验对BANCR的生物学作用和调控机制进行探究。深入展开对BANCR的研究有助于对胃癌的临床早期诊断和靶向药物的研发提供参考。

[参考文献]

[1] Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-ad-

- justed life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016: A systematic analysis for the global burden of disease study [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(11):1553-1568
- [2] Weigt J, Malfertheiner P. Metastatic disease in the stomach[J]. *Gastrointest Tumors*, 2015, 2(2):61-64
- [3] 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
- [4] Li L, Zhang L, Zhang Y, et al. Increased expression of LncRNA BANCR is associated with clinical progression and poor prognosis in gastric cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 72:109-112
- [5] Wang Y, Gu J, Lin X, et al. LncRNA BANCR promotes EMT in PTC via the Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4):5865-5870
- [6] 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(1):68-80
- [7] Ma S, Yang D, Liu Y, et al. LncRNA BANCR promotes tumorigenesis and enhances adriamycin resistance in colorectal cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(8):2062-2078
- [8] Chen S, Li P, Xiao B, et al. Long noncoding RNA HMLincRNA717 and AC130710 have been officially named as gastric cancer associated transcript 2 (GACAT2) and GACAT3, respectively[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(9):8351-8352
- [9] Sun M, Nie F, Wang Y, et al. LncRNA HOXA11-AS promotes proliferation and invasion of gastric cancer by scaffolding the chromatin modification factors PRC2, LSD1, and DNMT1[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(21):6299-6310
- [10] Nie F, Yu X, Huang M, et al. Long noncoding RNA ZFAS1 promotes gastric cancer cells proliferation by epigenetically repressing KLF2 and NKD2 expression [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24):38227-38238
- [11] 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
- [12] Li R, Zhang L, Jia L, et al. Long non-coding RNA BANCR promotes proliferation in malignant melanoma by regulating MAPK pathway activation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e100893
- [13] 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
- [14] Jiang J, Shi SH, Li XJ, et al. Long non-coding RNA BRAF-regulated lncRNA 1 promotes lymph node invasion, metastasis and proliferation, and predicts poor prognosis in breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6):9543-9552
- [15] Zheng H, Xu J, Hao S, et al. Expression of BANCR promotes papillary thyroid cancer by targeting thyroid stimulating hormone receptor [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2):2009-2015
- [16] Wang Y, Lin X, Fu X, et al. Long non-coding RNA BANCR regulates cancer stem cell markers in papillary thyroid cancer via the RAF/MEK/ERK signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(2):859-866
- [17] Zhang J, Du Y, Zhang X, et al. Downregulation of BANCR Promotes Aggressiveness in Papillary Thyroid Cancer via the MAPK and PI3K Pathways[J]. *J Cancer*, 2018, 9(7):1318-1328

[收稿日期] 2018-07-19



欢迎投稿 欢迎订阅