

肾癌细胞系中 HOTAIR 表达的测定及稳定高表达 HOTAIR 肾癌细胞株的建立

裴昌松^{1,2}, 范方田³, 武艺², 沈存思³, 潘立群^{1*}

(¹南京中医药大学第一临床学院, 江苏 南京 210023; ²徐州医学院第二附属医院泌尿外科, 江苏 徐州 221006; ³南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 目的:检测常用肾癌细胞系中 HOTAIR 的表达情况及建立稳定高表达 HOTAIR 肾癌细胞株。方法:①q-PCR 检测正常肾细胞系(HK-2)和 4 种肾癌细胞系(os-rc-2, kevt-3, achn 和 769-p)中 HOTAIR 的表达;②利用携带 HOTAIR 基因的慢病毒(pLenti GFP Puro-HOTAIR)感染肾癌细胞系(769-p)后,并采用嘌呤霉素(Puro)抗性筛选方法建立高表达 HOTAIR 肾癌细胞株。结果:①5 种细胞系 HOTAIR 表达的高低依次是 kevt-3、os-rc-2、achn、769-p、HK-2;②慢病毒(pLenti GFP Puro-HOTAIR)转染肾癌细胞系(769-p)后,HOTAIR 表达明显升高。结论:①高侵袭性肾癌细胞株(kevt-3、os-rc-2)中 HOTAIR 的表达明显高于低侵袭性肾癌细胞株(achn、769-p)及正常肾细胞株(HK-2);②成功建立稳定表达的 HOTAIR 的 769-p-HOTAIR 细胞系。

[关键词] HOTAIR;慢病毒载体;肾癌

[中图分类号] R737.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)05-548-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20140503

Determination of HOTAIR expression in renal cancer cell lines and establishment of a stable high expression HOTAIR kidney cancer cell line

Pei Changsong^{1,2}, Fan Fantian³, Wu Yi², Shen Cunsi³, Pan Liqun^{1*}

(¹The First Clinical Department, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023; ²Department of Urology, Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006; ³School of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the expression of HOTAIR in common renal carcinoma and normal renal cell lines and establish a renal carcinoma cell line that highly expresses HOTAIR. **Methods:** ① q-PCR was used to detect the expression of HOTAIR in four renal carcinoma cell lines (os-rc-2, kevt-3, achn and 769-p) and a normal renal cell line (HK-2). ② Infection with lentiviral (pLenti GFP Puro-HOTAIR) carrying HOTAIR gene in 769-p cell line and puromycin-resistance screening were performed to establish the cell line that highly expresses HOTAIR. **Results:** ① HOTAIR was expressed in five cell lines (from high to low): kevt-3, os-rc-2, achn, 769-p, and HK-2. ② HOTAIR was high expressed in 769-p after infected with lentiviral (pLenti GFP Puro-HOTAIR). **Conclusion:** ① HOTAIR expression in high metastatic carcinoma cell lines (kevt-3, os-rc-2) was higher than that in low metastatic renal carcinoma cell lines (achn, 769-p) and normal renal cell line (HK-2). ② The 769-p-HOTAIR cell line stably expressed HOTAIR.

[Key words] HOTAIR; lentiviral vector; renal cell cancer

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05): 548-552]

[基金项目] 国家自然科学基金(81373534);教育部博士点基金(20123237110003);江苏省“333 工程”科研资助项目(BRA2013257)

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

在我国,肾癌(renal cell cancer, RCC)是泌尿系统肿瘤中第 2 位常见肿瘤,确诊时已有 20%~30%发生远处转移^[1],即使早期 RCC 术后患者,仍有 20%~30%将发生转移^[2]。转移性肾癌(metastatic RCC, mRCC)对放疗、化疗不敏感,免疫治疗的有效率亦

低于 30%,预后较差^[3]。因此研究 RCC 的转移机制、寻求新的诊疗靶点、提出合理的预防和控制措施是迫在眉睫的任务^[4]。近年来,随着肿瘤转移表观遗传学机制研究的深入,人们发现长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, LncRNA) 与多种肿瘤的发生和转移关系密切^[5]。作为 LncRNA 家族中的一员, HOTAIR 已被证实和乳腺癌、肝癌及结肠癌的转移复发密切相关^[6-9],但其参与肾癌转移的机制研究尚未见报道。在预实验中发现肾癌转移灶中 HOTAIR 的表达明显高于肾癌原发灶、正常肾组织及正常肾小管上皮细胞,这说明 HOTAIR 参与肿瘤转移的表观遗传学机制可能同样存在于肾癌中,参与肾癌的发生及转移。

为考察 HOTAIR 在肾癌侵袭转移中的作用,本实验首先检测不同转移能力的肾癌细胞株 HOTAIR 的表达情况。为了能更充分说明 HOTAIR 是否确实介导肾癌细胞的侵袭转移,而排除细胞系来源差异导致的假阳性或者假阴性结果,课题组将低表达 HOTAIR 的细胞系稳定过表达 HOTAIR,建立稳定表达 HOTAIR 的细胞株,为下一步探讨体内外 HOTAIR 对肾癌侵袭转移的影响提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

高纯度总 RNA 快速提取试剂盒 (Genaray 公司,上海);逆转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit(Fermentas 公司,北京);qPCR 试剂 IQ SYBR Green Supermix(Bio-Rad 公司,美国)。高精度分光光度计为 Merinton SMA4000;定量 PCR 仪为 CFX connect Real-Time PCR System,配套使用的分析软件为 Bio-Rad CFX Manager。相关耗材(Tip 头、EP 管等)(Thermal Scientific Fisher 公司,美国)均为无 RNase、DNase 和无热源的分子生物学耗材。正常肾细胞株 HK-2、人结肠癌细胞 lovo 及肾癌细胞株 os-rc-2、kevt-3、achn 和 769-p (上海细胞库),pMD18T 载体及病毒载体 pLenti CMV GFP Puro 为本实验室自备。

1.2 方法

1.2.1 肾癌细胞系 HOTAIR 基因表达的检测

1.2.1.1 RNA 提取

3 例肾癌新鲜样本(转移灶、原发灶和癌旁)、正常肾细胞株 HK-2 和肾癌细胞株 os-rc-2、kevt-3、achn 和 769-p 按 TRIzol-离心柱法提取细胞总 RNA, -80℃ 保存。

1.2.1.2 逆转录

将得到的 2 份样品 RNA 进行逆转录,整个过程在冰上操作。取总 RNA 约 1 μg 作为模板,先加总 RNA 1 μg、Oligo (dT) 引物 (0.5 μg/μl) 1 μl,加 DEPC 水至总体积 12 μl,混匀后 65℃ 干浴 5 min;然后加 RiboLock Ribonuclease inhibitor(20 U/μl) 1 μl, 5×Reaction Buffer 4 μl, 10 mmol/L dNTP 2 μl,混匀后 37℃ 温育 5 min;最后加入 RevertAid M-Mulv Reverse Transcriptase(200 U/μl) 1 μl,总体积至 20 μl;混匀, 25℃ 干浴 5 min,接着 42℃ 干浴 60 min, 70℃ 干浴 5 min 以终止反应, -70℃ 保存 cDNA。

1.2.1.3 荧光定量实时 PCR

引物为:Homo Actin Forward 5'-TGCCATCCT-AAAAGCCACC-3', Reverse 5'-CAATGCTATCACCT-CCCCTGT-3';Homo HOTAIR Forward:5'-CAAACA-GAGTCCGTTCTCAGTGTCA-3', Reverse 5'-GGTGGAT-TCCTGGGTGGGT-3';HOTAIR PCR 反应体系按照美国 Roche 公司的 SBGreen Mix 的说明书进行。IQ SYBR Green Supermix 12.5 μl,上下游引物 (10 μmol/L)各 1 μl,cDNA 1 μl,加灭菌三蒸水至 24 μl。反应条件 95℃ 5 min 预变性,95℃ 10 s→59℃ 20 s→72℃ 20 s(收集荧光),共反应 40 个循环,循环后设置 70~95℃ 每隔 0.5℃ 读荧光值生成溶解曲线。实验结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对结果进行处理。

1.2.2 稳定表达 HOTAIR 的 769-p-HOTAIR 细胞株的建立

1.2.2.1 HOTAIR 基因的扩增

从人结肠癌细胞 lovo 中按试剂盒说明 TRIzol 离心柱法提取细胞总 RNA。总 RNA 沉淀溶于 100 ml 无核酸酶的水中, -80℃ 保存。取总 RNA 约 1 μg 作为模板,用 Fermentas 公司的反转录系统进行反转录, -70℃ 保存 cDNA。根据目的基因序列设计引物序列,引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,序列如下:Homo-HOTAIR-Forward:5'-CCTCCAGG-CCCTGCCTTCTGCC-3', Homo-HOTAIR-Reverse:5'-CACCACATGTAAAACCTTTATTTATGC-3'。用 Bio-Rad 公司的 PCR 扩增反应体系进行 PCR 扩增,反应条件为:94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 2.5 min, 35 个循环。电泳,并回收目的片段。

1.2.2.2 将扩增目的基因装入 pMD18T 载体及鉴定

由于 Taq 酶在进行 PCR 反应时都会在其产物的 3' 添加 A,故可以将 PCR 产物与 pMD18T 载体直接相连,反应体系按说明书进行。取 5 μl 连接产物转化感受态细胞 XL10-GOLD,挑取 10 株单克隆培

养过夜并抽提质粒,对其进行 PCR 鉴定及双酶切鉴定,将鉴定结果符合预期的单克隆送至上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.2.2.3 pLenti GFP Puro-HOTAIR 的构建

根据目的基因序列及空载 pLenti CMV GFP Puro 的序列设计引物,引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,序列如下:Homo-HOTAIR-BamH I-Forward:5'-ACGGGATCCACATTCTGCCCTGATT-3',Homo-HOTAIR-Sal I-Reverse:5'-AGCGTGCACAC-CACATGTAAAACCTTTA-3'。以 pMD18T-HOTAIR 为模板,Homo-HOTAIR-BamH I-Forward 和 Homo-HOTAIR-Sal I-Reverse 为引物,PCR 反应体系和反应条件参照说明书进行,扩增 HOTAIR 基因。将扩增的 PCR 产物用北京天根生化科技有限公司 DNA 柱式纯化试剂盒回收。HOTAIR 及 pLenti CMV GFP Puro 进行双酶切,37℃酶切 2 h 后电泳并进行割胶回收。连接目的片段和载体,取 5 μl 连接产物转化感受态细胞 XL10-GOLD。挑取 10 株单克隆培养过夜并抽提质粒,对其进行 PCR 鉴定及双酶切鉴定,将鉴定结果符合预期的单克隆送至上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.2.2.4 肾癌细胞株病毒感染及抗性筛选

人肾癌细胞 769-P,10%FBS,1640、MEM 培养基,37℃ 5% CO₂。pLenti GFP Puro-HOTAIR 感染 769-p 细胞。具体方法如下:①靶细胞铺板:在 6 孔板中无抗生素完全培养基中接种 6.4 × 10⁵ 个细胞,37℃、5% CO₂ 过夜;② 稀释病毒:稀释液(靶细胞维持液培养基)1 000 μl + 终浓度 5 μg/ml Polybrene,将慢病毒原液(60 μl)加入到稀释液中(此时细胞个数按 1 × 10⁶ 计,即 MOI=6);③ 移去细胞培养液,加入稀释后的病毒液,同时建立对照(blank、negative),37℃ 5% CO₂ 过夜(感染时细胞融合度为 70%~80%);④ 12~24 h 移去细胞感染后的病毒液,加入 1.5 ml 完全培养液,37℃ 5% CO₂ 过夜;⑤ 根据细胞状态,进行常规传代,传代同时(感染后 48 h),换用含嘌呤霉素(puro)的完全培养基以进行抗性筛选(769-p 筛选浓度为 1.5 μg/ml);⑥ 以后每隔 2 d 换用新的含 puro 的培养基,直至 blank 组细胞全部死亡。存活下来的细胞换用含一半筛选浓度药物的培养基培养,进行为期 1 周的抗性维持。

1.2.2.5 采用定量 PCR,分析转入基因的表达

TRIzol-离心柱法提取细胞总 RNA,以相应溶剂为对照(Blank),取 2 μl RNA 溶液于 Merinton SMA4000 检测,观察 D(260 nm)/D(280 nm)、D

(260 nm)/D(230 nm)比值及连续波长吸收峰,并计算 RNA 溶液浓度,判断 RNA 提取质量:D(260 nm)/D(280 nm) > 1.8 且 < 2.0,则可以满足后续 RT-qPCR 所需。取总 RNA 约 1 μg 作为模板,用 Fermentas 公司的反转录系统进行反转录,-70℃保存 cDNA。内参基因的 GenBank ID 为 Gene ID:58;PCR 产物大小为:85 bp。Homo Actin Forward:5'-TGC-CATCCTAAAAGCCACC-3',Reverse:5'-CAATGCTA-TCACCTCCCCTGT-3',目标基因的 GenBank ID 为:100124700;PCR 产物大小为:94 bp。Homo HOTAIR Forward:5'-CAAACAGAGTCCGTTCACTGTC-A-3',Reverse:5'-GGTGGATTCC-TGGGTGGGT-3',实验采用 Bio-Rad 公司的 qPCR 扩增反应体系进行 PCR 扩增,反应条件为:50℃ 3 min,95℃ 3 min,59℃ 20 s,72℃ 20 s,40 个循环。

实验结果由荧光定量 PCR 分析软件 BIO-RAD CFX Manager 自动进行统计和计算。

2 结果

2.1 HOTAIR 的 mRNA 水平

结果表明,肾癌样本中转移灶 HOTAIR 的表达明显高于原发灶(P = 0.008 6)和癌旁组织(P = 0.006 0)(图 1)。在 5 种细胞系中,HOTAIR 的表达呈不同水平,正常肾细胞 HK-2 HOTAIR 的表达水平明显低于 2 种肾癌细胞株 os-rc-2(P = 0.0173)和 achn(P = 0.0011)。高转移性肾癌细胞系(kevt-3,os-rc-2)中 HOTAIR 的水平明显高于低转移性肾癌细胞株(achn,769-p)(图 2)。

2.2 pMD18T-HOTAIR 鉴定结果

双酶切结果显示,在 2.3、2.7 kb 附近各有 1 个

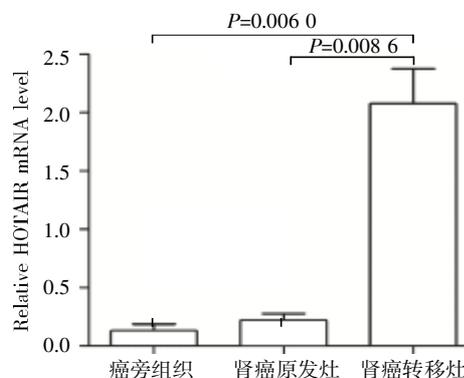


图 1 qPCR 检测肾癌旁组织、肾癌原发灶和转移灶中 HOTAIR 的表达

Figure 1 The expression of HOTAIR in kidney cancer adjacent tissues,kidney primary tumors and metastases by real time PCR

条带,符合 HOTAIR 及 pMD18T 的大小。PCR 验证结果显示在 2.3 kb 处有一条带,与预期结果符合。pMD18T-HOTAIR 测序结果与基因序列一致(图 3)。

2.3 pLenti GFP Puro-HOTAIR 的鉴定

双酶切结果显示,在 2.3、8.2 kb 附近各有 1 个条带,符合 HOTAIR 及 pLenti GFP Puro 的大小。PCR 验证结果显示在 2.3 kb 处有一条带,与预期结果符合。pLenti GFP Puro-HOTAIR 测序结果与基因序列一致(图 4)。

2.4 肾癌细胞荧光定量 PCR 结果

携带 HOTAIR 的慢病毒载体感染的 769-p 细胞高表达 HOTAIR($P = 0.000 5$),而携带 vector 的慢病毒载体感染的 769-p 细胞,HOTAIR 水平无明显变化($P = 0.481 0$)(图 5)。

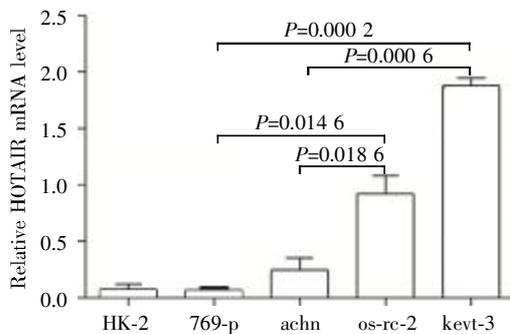
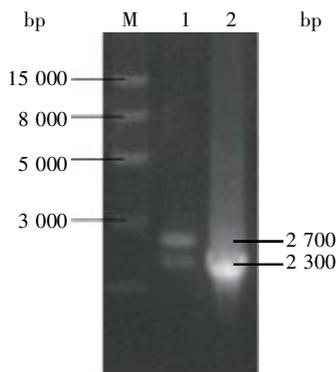


图 2 qPCR 检测 4 种肾癌细胞系 HOTAIR 的表达

Figure 2 The expression of HOTAIR in for kidney cancer cell lines by real time PCR



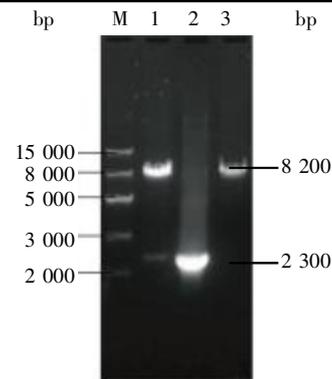
M:DNA Marker;1:双酶切验证;2:PCR 验证。

图 3 逆转录 PCR 鉴定携带 HOTAIR 的载体

Figure 3 Identification with the carrier and HOTAIR by RT-PCR

3 讨论

长期以来,mRCC 的治疗一直是个棘手的问题,究其原因主要是未找到 RCC 的特异性治疗靶点^[10-11]。近年来,随着肿瘤分子生物学的迅猛发展,人们逐渐



M:DNA Marker;1:双酶切验证;2:PCR 验证;3:空载 pLenti GFP Puro 双酶切。

图 4 逆转录 PCR 鉴定携带 HOTAIR 的慢病毒载体

Figure 4 Identification of slow virus carriers and HOTAIR by RT-PCR

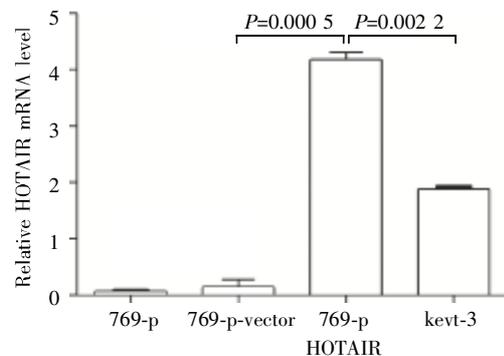


图 5 慢病毒感染后 769-p 细胞系 HOTAIR 的表达

Figure 5 The expression of HOTAIR in 769-p cell line after lentiviral transfection with HOTAIR

认识到,在于包括 RCC 在内的各种人类肿瘤中,各种原因导致的表观遗传学事件(如抑癌基因的沉默,转移基因表达程序的启动等)与肿瘤的发生和转移密切相关^[8,12]。现已证实这些复杂的表观遗传学事件又主要通过 LncRNA 来完成^[5],说明 LncRNA 在肿瘤的发生和转移过程中起到关键的作用。

作为 LncRNA 家族的重要成员,HOTAIR 表观遗传学功能是结合 PRC2 和 LSD1 两个复合体,并介导该复合体到特异性的基因组位点,使该处染色体上的组蛋白 H3K27 发生三甲基化和组蛋白 H3K4 去甲基化,使染色体处于封闭状态,导致基因沉默^[6]。PRC2 是一种重要的基因抑制性复合物,它的亚型 EZH2 在多数肿瘤中异常表达,且与多个肿瘤抑制基因的沉默相关^[13-15]。HOTAIR 在乳腺癌、肝癌和结肠癌的转移灶中过度表达,HOTAIR 作为 PRC2 和 LSD1 的脚手架介导 3 种肿瘤的转移过程^[6-9]。那么,HOTAIR 作为 PRC2 和 LSD1 的脚手架诱导组蛋白甲基化和去甲基化的表观遗传学事件是否参与

RCC的转移机制,国内外未见相关文献报道。

本研究在预试验中检测了3例肾癌组织中HOTAIR的表达,结果表明肾癌转移灶中HOTAIR基因的表达明显高于肾癌原发灶及正常肾组织,这提示HOTAIR极有可能参与了肾癌的转移。为了进一步探讨HOTAIR表达与肾癌转移的关系,本研究首次检测了正常肾细胞和4种肾癌细胞株中HOTAIR的表达,有趣的是kevt-3和os-rc-2两种肾癌细胞株中HOTAIR的表达远远高于achin和769-p两种肾癌细胞株,文献研究发现kevt-3和os-rc-2为高转移性肾癌,而achin和769-p两株细胞是低转移性肾癌细胞^[16],这提示肾癌细胞株的转移侵袭能力可能与HOTAIR的表达水平相关。综合预实验和体外细胞实验的结果,本课题组提出假设,HOTAIR表达水平与肾癌的转移相关。

为了进一步确证HOTAIR表达水平与肾癌细胞系转移侵袭能力的相关性,而排除细胞来源差异的影响,课题组利用携带HOTAIR基因慢病毒载体pLenti GFP Puro-HOTAIR将低表达HOTAIR的细胞株(769-p)构建成了稳定表达HOTAIR的稳定细胞株(769-p-HOTAIR)并进行了验证,为进一步体内和体外研究HOTAIR介导肾癌转移表观遗传学机制研究提供了基础。

目前,关于RCC转移过程中的表观遗传学事件研究还很少,但它却可能是导致RCC转移的关键机制之一^[17]。因此,对RCC转移过程中表观遗传学事件的研究必将能从新的角度揭示RCC发生和转移的分子机制,同时为RCC的诊疗提供新靶点。

[参考文献]

- [1] Sokoloff MH, Dekernion JB, Figlin RA, et al. Current management of renal cell carcinoma [J]. CA Cancer J Clin, 1996, 46(5): 284-302
- [2] Leibovich BC, Pantuck AJ, Mattheu HT, et al. Current staging of renal cell carcinoma [J]. Urol Clin North Am, 2003, 30(1): 481-497
- [3] Stadler WM, Huo D, George C, et al. Prognostic factors for survival with gemcitabine plus 5-fluorouracil based regimens for metastatic renal cancer [J]. J Urol, 2003, 170 (4 Pt 1): 1141-1145
- [4] Prene H, Gil T, Awada A. New therapeutic developments in renal cell cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 69(1): 56-63
- [5] Maruyama R, Suzuki H. Long noncoding RNA involve-

- ment in cancer [J]. BMB Rep, 2012, 45(11): 604-611
- [6] Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. Nature, 2010, 464 (7291): 1071-1076
- [7] Yang Z, Zhou L, Wu LM, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation [J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(5): 1243-1250
- [8] Kogo R, Shimamura T, Mimori K, et al. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers [J]. Cancer Res, 2011, 71(20): 6320-6326
- [9] 范方田, 沈存思, 裴昌松, 等. 肿瘤转移新靶点HOTAIR的研究进展 [J]. 肿瘤, 2012, 32(10): 842-846
- [10] Yuasa T, Takahashi S, Hatake K, et al. Biomarkers to predict response to sunitinib therapy and prognosis in metastatic renal cell cancer [J]. Cancer Sci, 2011, 102(11): 1949-1957
- [11] Van Herpen CM, De Mulder PH. Prognostic and predictive factors of immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 41(3): 327-334
- [12] Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumor suppressor genes [J]. Br J Cancer, 2006, 14(94): 179-183
- [13] Sato T, Kaneda A, Tsuji S, et al. PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1911
- [14] He W, Cai Q, Sun F, et al. linc-UBC1 physically associates with polycomb repressive complex 2 (PRC2) and acts as a negative prognostic factor for lymph node metastasis and survival in bladder cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(10): 1528-1537
- [15] Yu H, Simons DL, Segall I, et al. PRC2/EED-EZH2 complex is up-regulated in breast cancer lymph node metastasis compared to primary tumor and correlates with tumor proliferation in situ [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51239
- [16] Franco OE, Onishi T, Umeda Y, et al. Phenylacetate inhibits growth and modulates cell cycle gene expression in renal cancer cell lines [J]. Anticancer Res, 2003, 23(2B): 1637-1642
- [17] Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Schouten LJ, et al. Genetics and epigenetics of renal cell cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1785(2): 133-155

[收稿日期] 2013-12-29