

LncRNA BLACAT1 促进星形细胞瘤的增殖、侵袭和迁移

周黄贵,张德龙,刘俊,刘杰,毛捷

(皖南医学院附属弋矶山医院神经外科,安徽 芜湖 241000)

摘要:目的 探讨 lncRNA BLACAT1 在不同 WHO 分级的星形细胞瘤样本的表达差异,以及 BLACAT1 对星形细胞瘤的生物学功能的影响。方法 运用 qRT-PCR 技术检测本院星形细胞瘤样本的 lncRNA BLACAT1 表达量,分析 lncRNA BLACAT1 的表达量与 WHO 分级是否相关。运用 RTCA 增殖实验、划痕实验、Transwell 侵袭/迁移实验检测 NC 组(阴性对照)和 silence 组(敲减 BLACAT1)在细胞增殖、侵袭、迁移功能上的变化。结果 星形细胞瘤 WHO 分级越高,lncRNA BLACAT1 的表达量越高 ($P < 0.001$)。在 RTCA 增殖实验中,silence 组增殖速率 120 h 后明显慢于 NC 组 ($P < 0.01$),在划痕实验中,在 12 h、24 h 两个时间点测得 silence 组的划痕愈合速度慢于 NC 组 ($P < 0.01$)。Transwell 侵袭、迁移实验中 silence 组 24 h 后穿透到底面的细胞数量显著少于 NC 组 ($P < 0.01$)。结论 星形细胞瘤分期分级越高,lncRNA BLACAT1 的表达量越高。lncRNA BLACAT1 对星形细胞瘤的增殖、侵袭、迁移能力有促进作用。

关键词: lncRNA BLACAT1; 星形细胞瘤; 增殖; 侵袭; 迁移

中图分类号: R730.264

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2018)06-0515-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.06.002

Long noncoding RNA BLACAT1 promotes astrocytoma cell proliferation, migration and invasion

Zhou Huanggui, Zhang Delong, Liu Jun, Liu Jie, Mao Jie

(Department of Neurosurgery, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** We investigate the expression difference of long noncoding RNA of bladder cancer associated transcript 1 (lncRNA BLACAT1) in different WHO grading astrocytoma specimens and the effects of lncRNA BLACAT 1 on the potential biological function of astrocytoma. **Methods** We used qRT-PCR technique to detect the expression of lncRNA BLACAT1 in clinical astrocytoma specimens from Yijishan Hospital of Wannan Medical College, and then analyzed whether the expression of lncRNA BLACAT1 was associated with WHO grading of astrocytoma. We detected the function changes of cell proliferation, invasion and migration in the negative control (NC) group and silence group (knockdown BLACAT1) by the application of Real Time Cell Analysis (RTCA) proliferation test, Scratch test, Transwell cell invasion/migration test. **Results** The higher the WHO grading and staging of astrocytoma was, the higher the lncRNA BLACAT1 expression was ($P < 0.001$). RTCA test results showed that the proliferation rate of silence group was significantly slower than that of the negative control group after 120 hours ($P < 0.01$). Scratch test results showed that the scratches of the silence group healed more slowly than those of the negative control group when measured at the time points of 12 hours and 24 hours ($P < 0.01$). **Conclusion** of the Transwell migration and invasion assay showed that the number of astrocytoma cells penetrated to the bottom surface after 24 hours in the silence group was smaller than that in the NC group ($P < 0.01$). Conclusion The higher the staging and grading of astrocytoma, the higher the expression of lncRNA BLACAT1. LncRNA BLACAT1 promotes the function of astrocytoma cell proliferation, invasion and migration.

Key words: long noncoding RNA BLACAT1; astrocytoma; proliferation; invasion; migration

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81572486)

第一作者简介:周黄贵(1992-),男,在读硕士研究生,研究方向:胶质瘤的基础与临床,E-mail:1510647694@qq.com

通信作者简介:毛捷(1970-),男,博士,硕士研究生导师,教授,研究方向:胶质瘤的基础和临床,E-mail:myw921@yahoo.com

癌症是人类生命的最大威胁之一,并已成为全世界学术研究的热点。据估计,我国2015年约有430万例新发肿瘤病例、280万例因肿瘤死亡病例^[1]。2015年中国中枢系统肿瘤死亡率较高,为中国十大高病死率肿瘤之一^[2]。星形细胞瘤为人类中枢神经系统最多见的原发性肿瘤。如今,星形细胞瘤主要依赖外科手术治疗,术后辅以放疗、化疗等,其中以手术疗效最为确切,而化疗仍未取得满意疗效^[3]。因此深入研究星形细胞瘤发生发展的分子机制有助于寻找潜在的药物靶点。lncRNA是继siRNA、miRNA之后被发现的一种与人类疾病广泛相关的RNA。lncRNA的定义为,长度大于200 bp,无蛋白质编码能力的RNA序列。越来越多的研究表明lncRNA在人类诸多疾病中扮演重要的角色,如lncRNA HOTAIR参与炎症反应和免疫应答^[4],调控人类胶质瘤细胞周期^[5]。BLACAT1 (bladder cancer associated transcript 1, non-protein coding),长度为2,994 bp,在人类各组织中广泛存在。有研究指出^[6],BLACAT1在血清中的表达量可作为结直肠癌的肿瘤标记物。其它有研究表明,lncRNA BLACAT1能通过抑制在结直肠癌细胞周期中阻滞G₀/G₁期、抑制P15表达来调节结直肠癌细胞周期和细胞增殖,其表达量与患者的预后相关^[7]。lncRNA BLACAT1也可以促进非小细胞肺癌的增殖、侵袭、迁移^[8]。BLACAT1是否参与脑星形细胞瘤的发生发展仍无相关报道。本研究主要探讨lncRNA BLACAT1

在星形细胞瘤中的表达量变化情况及其对星形细胞瘤细胞增殖、侵袭、迁移功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 星形细胞瘤样本 本实验所使用的星形细胞瘤组织样本均来自安徽省芜湖市弋矶山医院,共计78例,正常组织样本14例。时间范围2013年1月—2017年12月。星形细胞瘤患者入选年龄标准是40~90岁,诊断为星形细胞瘤(WHO I~IV级),29例低级别星形细胞瘤、49例高级别星形细胞瘤样本,平均年龄为(58.32±10.47)岁。无严重慢性病、其它肿瘤病史、放射物接触史、致癌化学物质接触史等情况。星形细胞瘤样本来源入选部位:颞叶、额叶、岛叶、顶叶、胼胝体区。所有入选病人及其家属均同意参与科研项目并签署知情同意书,本研究得到医院伦理委员会同意。样本取出后暂放于冰盒中,30 min内转移到液氮中储存。本实验提取的RNA样本均保存于-80℃冰箱。

1.1.2 人类星形细胞瘤细胞株 人类星形细胞瘤细胞株(LN382,U87MG)购自中科院上海细胞库。细胞培养使用含10%血清的DMEM高糖培养基培养(HyClone)。所有细胞均在5%CO₂的37℃培养箱中培养。

1.1.3 试剂/试剂盒 见表1。

表1 试剂/试剂盒说明

用途	试剂/试剂盒名称	公司
总RNA提取	TRIzol reagent	Invitrogen™
lncRNA逆转录	RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622	Thermo
PCR荧光染料(SYBR)	QuantiNova™ SYBR® Green PCR kit	QuantiNova
目的基因敲减	lncRNA BLACAT1 siRNA/NC	锐博公司
助转染试剂	riboFECT™ CP	锐博公司

1.2 方法 我们使用siRNA抑制lncRNA BLACAT1的表达。将星形细胞瘤细胞株LN382和U87分别分为silence组(转染lncRNA BLACAT1 siRNA)和NC组(转染negative siRNA)。用RTCA增殖实验、划痕实验、Transwell侵袭/迁移实验检测NC组和silence组在细胞增殖侵袭迁移功能上的变化。

1.2.1 Quantitative Real-Time PCR 我们应用Trizol法从组织或细胞中提取总RNA。取1 μg星形细胞瘤组织或星形细胞瘤细胞的总RNA作为逆转录模板。按照K1622逆转录试剂盒说明书进行逆转录。逆转录成后使用QuantiNova™ SYBR® Green PCR kit在QuantStudio3仪器上进行荧光定量PCR,实验

具体操作步骤遵循对应试剂盒说明书。引物:GAPDH (product length=123 bp) Forward 5'-GCCTGCTTC ACCACCTTCT-3'; GAPDH Reverse 5'-GAACGGG AAGCTCACTGG-3'; lncRNA BLACAT1 (product length=120 bp) Forward 5'-GAATCGGACAAGGA GGAAGA-3'; lncRNA Reverse 5'-TGGTGGTGAT GAGTTTAGATGCT-3'。

1.2.2 细胞转染 lncRNA BLACAT1 siRNA及negative siRNA采购于锐博公司。转染试剂为广州锐博公司提供的riboFect™ CP。siRNA BLACAT1序列5'-GCATCTAAACTCATACCA-3'。按siRNA终浓度100 nM进行转染。转染具体步骤遵循ribo-

Fect™ CP 试剂盒说明书。

1.2.3 RTCA 细胞增殖实验 RTCA (Real Time Cellular Analysis, 实时细胞分析), 是一种新型的反映细胞生物学状态的细胞检测系统。xCELLigence RT-CA DP 使用无创电阻抗监测, 以无标签的实时方式量化细胞增殖、形态变化和附着质量。常应用于细胞迁移、细胞黏附、细胞体外低氧等研究。

本实验将仪器置于标准的 CO₂ 细胞培养箱中, 并通过连接到孵化器外部的控制单元(笔记本电脑)的电缆进行供电和控制。向 E-Plate 检测板中加入 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基 50 μl 并测定背景阻抗值。收集对数期细胞并计数, 调整细胞悬液浓度 3.4 × 10⁴ 个/毫升, 向 E-Plate 检测板中加入 150 μl 的细胞, 室温超净台内放置 30 min。将加入细胞的 E-Plate 检测板放入检测台上(检测台预先放入培养箱中), 进行实时动态的细胞增殖检测。过夜检测后, 按照 100 nM 的浓度加入 siRNA 进行转染。将 E-plate 板的 16 个孔分为两组, 其中 8 个孔转染 lncRNA BLACAT1 siRNA silence, 8 个孔转染 NC, 继续进行实时动态检测, 即可获得 siRNA 介导的细胞效应曲线。

1.2.4 细胞划痕实验 此实验在 6 孔板中进行, 以下为单个星形细胞瘤细胞系的单次实验, 每个实验重复 3 次。在 6 孔板每孔均匀接种约 1.2 × 10⁵ 个细胞, 细胞铺板率为 40%~50%, 接种 24 h 后(细胞密度约为 60%)取 3 个孔转染 lncRNA BLACAT1 siRNA, 3 个孔转染 negative siRNA。转染 24 h 后(细胞密度约为 90%)取其中一个 silence 和一个 NC 孔的细胞提取 RNA 测定转染效率, 其余 2 个 silence 孔和两个 NC 孔用 50 μl 移液枪的枪头进行划痕实验。实验孔经过划痕后更换无血清培养基并以此时为 0 h, 依次记录 0 h、12 h 和 24 h 划痕生长照片, 并测定距离。划痕愈合率按照以下公式计算:

0 h 和第 n h 划痕距离分别记为: D_{0h} 和 D_{nh}

$$\text{愈合率 } R = \frac{D_{0h} - D_{nh}}{D_{nh}}$$

1.2.5 Transwell 迁移实验 本实验使用 Conning Transwell 小室, 以下为单个细胞株的单次实验。在 Transwell 小室的上室中每孔加入 150 μl 细胞数量约为 1.2 × 10⁵ 个/毫升的转染后细胞悬液(无血清培养基), 选取 6 个小室为 silence, 6 个小室为 NC, 下室加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。以接种时间为 0 h, 第 24 h 取出小室插件, 用棉签轻轻擦去 Transwell 小室内侧面细胞, 4% 多聚甲醛固定 10 min 后, 结晶紫染色拍照。

1.2.6 Transwell 侵袭实验 本实验使用 Conning

Transwell 小室, 以下为单个星形细胞瘤细胞株的单次实验。使用 BD Matrigel™ 低浓度基质胶, 用无血清培养基 1:7 稀释后备用。向 conning transwell 板的每个小室插件中加入 30 μl 基质胶稀释液, 使其均匀分布在上室底面。待基质胶凝固后, 在下室中加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在上室加入 1.2 × 10⁵/ml 转染后细胞悬液 150 μl (用无血清培养基悬浮)。将一个 Transwell 板中的 12 个小室分为两 NC 组和 silence 组, 将对应的转染后细胞用移液枪接种到每组的 6 个孔中。接种 24 h 后取出小室插件, 棉签轻轻擦去 Transwell 小室内侧面细胞, 用 PBS 轻轻洗两遍。用 4% 多聚甲醛固定 10~15 min, 再用 0.1% 结晶紫溶液染色 10~15 min, 用 PBS 液洗去多余结晶紫, 小室插件自然干燥后在显微镜下拍照。

1.3 统计学方法 计量资料均使用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。实验组和对照组之间的比较采用两独立 Student's t-test 和多组间比较采用 ANOVA。统计分析使用 R 语言完成。

2 结果

2.1 LncRNA BLACAT1 的表达量与星形细胞瘤 WHO 分级显著正相关 BLACAT1 的表达量在肿瘤组 (9.65 ± 6.51) 中较正常组 (1.00 ± 0.55) 显著上调, P < 0.001。低级别星形细胞瘤组的 BLACAT1 表达量 (5.20 ± 2.38) 低于高级别星形细胞瘤组 (12.29 ± 6.75), 见图 1。

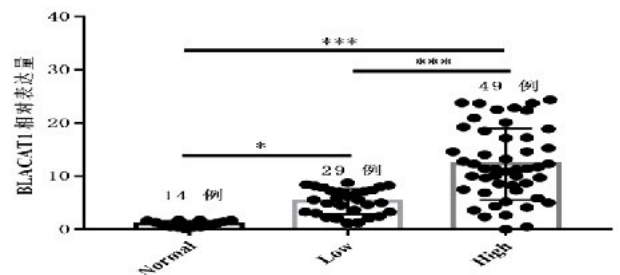


图1 LncRNA BLACAT1 在星形细胞瘤组织样本中的相对表达量

注: 图形中显著性标示: * 表示 P < 0.05, *** 表示 P < 0.001。Normal 指正常组织组, Low 指低级别星形细胞瘤组, High 指高级别星形细胞瘤组

2.2 siRNA 能显著抑制 lncRNA BLACAT1 的表达 由于 BLACAT1 在肿瘤组织中显著上调, 因此实验选用 siRNA 对 BLACAT1 进行敲减。在使用 siRNA 转染 LN382 和 U87MG 细胞后的 24 h, 使用 qPCR 技术验证转染效率, 结果显示 lncRNA BLACAT1 的表达量在 silence 组 (0.54 ± 0.08) 较 NC 组 (1.00 ± 0.13) 显著下降, P < 0.001, 见图 2。说明我们实验中

使用的 siRNA 能有效抑制 lncRNA BLACAT1 的表达。

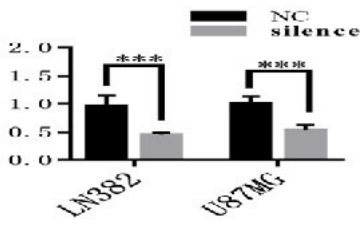


图 2 siRNA silence 抑制星形细胞瘤细胞系 LN382 和 U87MG 的抑制效率测定
注:***表示 $P < 0.001$

2.3 lncRNA BLACAT1 可促进星形细胞瘤的增殖、侵袭、迁移 RTCA 增殖实验证实 NC 组增殖速度明显快于 silence 组,见图 3。在 Transwell 侵袭及迁移试验中,NC 组侵袭及迁移能力明显强于 silence 组,见图 4。在划痕实验中,silence 组愈合速度明显慢于 NC 组,见图 5。以上结果表明,lncRNA BLACAT1 可促进星形细胞瘤的增殖、侵袭、迁移。

3 讨论

星形细胞瘤是最致命的和最难治疗的神经上皮肿瘤之一。目前,星形细胞瘤的主要治疗方法为手术治疗、药物治疗、放射治疗或者综合治疗^[9]。星形细胞瘤

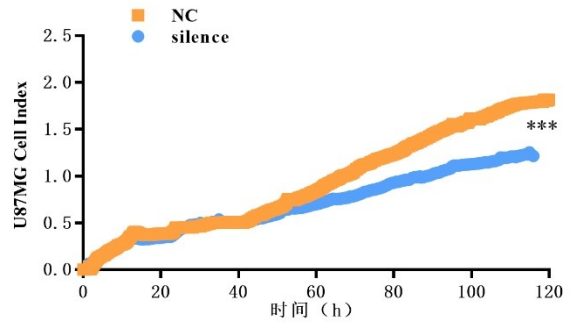
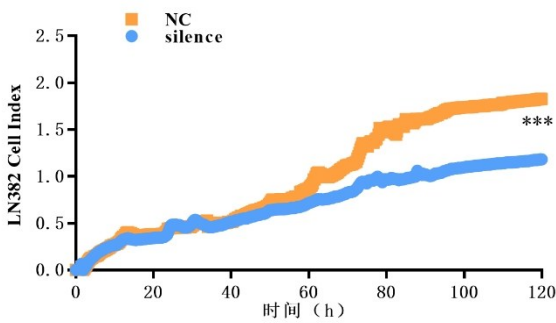


图 3 RTCA 增殖实验

注:A. LN382 的 RTCA 增殖实验;B. U87MG 的 RTCA 增殖实验;120 h,NC 组细胞增殖速率明显大于 silence 组,***表示 $P < 0.001$

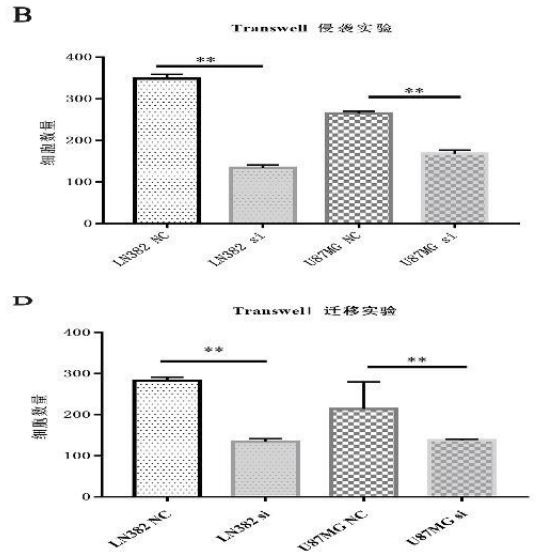
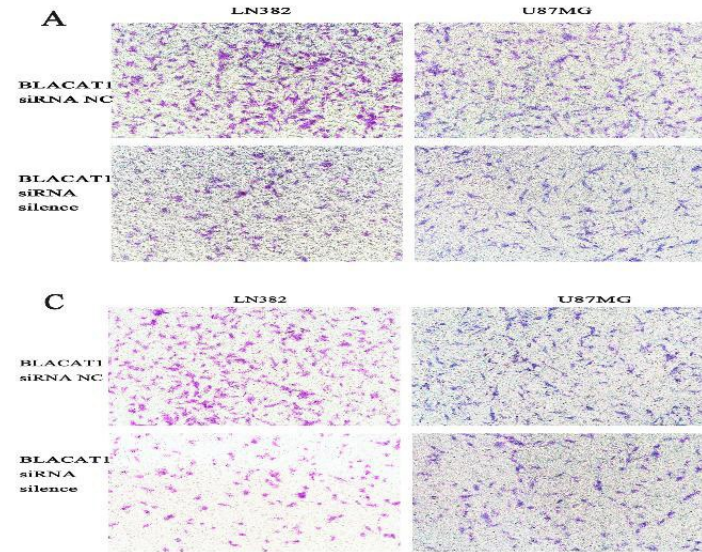


图 4 Transwell 侵袭及迁移实验

注:A. 在 100×显微镜下 Transwell 迁移实验所拍得的图片,结晶紫染色;B. 100×显微镜下每个视野细胞侵袭数统计对比,***表示 $P < 0.01$;C. 在 100×显微镜下 Transwell 侵袭实验所拍得的图片,结晶紫染色;D. 100×显微镜下每个视野细胞迁移数统计对比,***表示 $P < 0.01$

的确切发病机制尚不明确,探寻星形细胞瘤发生发展的分子机制有助于改进星形细胞瘤的诊断和治疗。

中被报道为促癌因素,此外,lncRNA BLACAT1 也可能成为胃癌的诊断、预后生物指标及潜在治疗靶标^[10]。lncRNA BLACAT1 在膀胱癌的淋巴结转移、

LncRNA BLACAT1 在非小细胞肺癌、结直肠癌

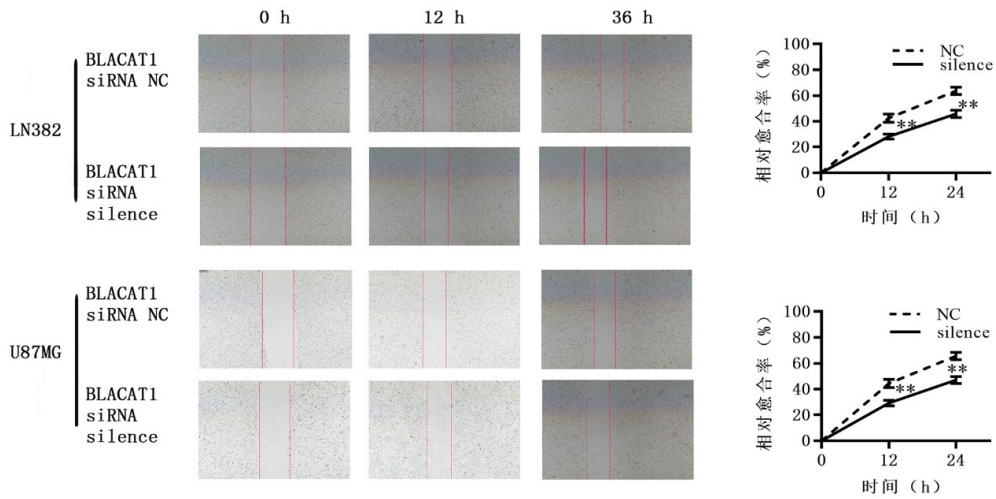


图5 细胞划痕实验

注:A. LN382 细胞系的细胞划痕实验,40×显微镜下图片;B. LN382 划痕实验愈合速率统计图, **表示 $P < 0.01$; C. U87MG 细胞系的细胞划痕实验,40×显微镜下图片;D. U87MG 细胞系划痕实验愈合率统计图, **表示 $P < 0.01$

不良预后中也发挥着重要的作用^[1]。但 lncRNA BLACAT1 在星形细胞瘤中的功能仍未确定。本研究通过 qPCR 实验发现 lncRNA BLACAT1 与星形细胞瘤的分期分级显著相关 ($P < 0.001$)。RTCA 增殖、Transwell 侵袭/迁移、划痕实验证实敲减 lncRNA BLACAT1 可显著抑制星形细胞瘤的增殖、侵袭、迁移,这证实 lncRNA BLACAT1 在星形细胞瘤中也起到促癌作用。lncRNA BLACAT1 对星形细胞瘤的诊断、治疗和预防有潜在的价值,BLACAT1 可能成为潜在的星形细胞瘤预后标记物和药物靶点。

本研究样本来源于单家医院,其覆盖面有限,并且正常样本数量较少。BLACAT1 是否在更丰富的样本中仍呈现差异表达有待研究。本研究虽然明确了 BLACAT1 在星形细胞瘤中的功能,但其机制仍不清楚。研究人员在 Starbase 数据库中预测 BLACAT1 与 miR-204 有预测结合位点,这可能成为下一步研究方向。另外血清中的 BLACAT1 表达量与患者 WHO 分级以及预后有无关联也有待研究。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary [J]. Acta Neuropathologica, 2016, 131(6): 803-820.
- [3] Gutin PH, Posner JB. Neuro-oncology: diagnosis and management of cerebral gliomas—past, present, and future. [J]. Neurosurgery, 2000, 47(1): 1.
- [4] Obaid M, Udden S M N, Deb P, et al. LncRNA HOTAIR regulates lipopolysaccharide-induced cytokine expression

and inflammatory response in macrophages [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 15670.

- [5] Zhang K, Sun X, Zhou X, et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner [J]. Oncotarget, 2015, 6(1): 537-546.
- [6] Dai M, Chen X, Mo S, et al. Meta-signature LncRNAs serve as novel biomarkers for colorectal cancer: integrated bioinformatics analysis, experimental validation and diagnostic evaluation [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 46572.
- [7] Su J, Zhang E, Han L, et al. Long noncoding RNA BLACAT1 indicates a poor prognosis of colorectal cancer and affects cell proliferation by epigenetically silencing of p15 [J]. Cell Death & Disease, 2017, 8(3): e2665.
- [8] Ye JR, Liu L, Zheng F. Long Noncoding RNA Bladder Cancer Associated Transcript 1 Promotes the Proliferation, Migration, and Invasion of Nonsmall Cell Lung Cancer Through Sponging miR-144 [J]. DNA and Cell Biology, 2017, 36(10): 845-852.
- [9] Kabel A, Modais K, Salim A, et al. Astrocytoma: Insights into Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Management [J]. Journal of Cancer Research and Treatment, 2018, 6: 70-73.
- [10] Hu Y, Pan J, Wang Y, et al. Long noncoding RNA linc-UBC1 is negative prognostic factor and exhibits tumor pro-oncogenic activity in gastric cancer [J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(1): 594-600.
- [11] 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.

收稿日期: 2018-11-26; 修回日期: 2018-12-01