

网络出版时间: 2021-9-7 15:32 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1401.013.html>

长链非编码 RNA FAS-AS1 对胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭的影响

孙立波, 卞尔保, 程 梦, 张正伟, 黄克兵, 陈 杰, 岳小宇, 赵 兵

摘要 目的 探讨长链非编码 RNA FAS-AS1 在胶质瘤细胞中的表达及其对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭的影响。方法 使用 qRT-PCR 分别检测临床标本、胶质瘤细胞系中 FAS-AS1 表达丰度。采用 FAS-AS1 质粒转染人脑胶质瘤细胞系 U251、SF126 细胞, qRT-PCR 检测转染效率, 通过 MTT 形成实验及克隆实验检测 FAS-AS1 对细胞增殖能力的影响; 通过 Transwell 实验检测 FAS-AS1 对细胞迁移影响; 通过基质胶构建生物膜结合 Transwell 实验检测 FAS-AS1 对胶质瘤细胞侵袭的影响。结果 胶质瘤组织及人脑胶质瘤细胞系中 FAS-AS1 的表达下调; FAS-AS1 质粒转染成功构建过表达 FAS-AS1 胶质瘤细胞模型, FAS-AS1 过表达抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭。结论 FAS-AS1 在胶质瘤中表达下调并能抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移及侵袭。

关键词 LncRNA; FAS-AS1; 胶质瘤; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)11-1745-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.013

胶质瘤是颅内最常见的神经系统恶性肿瘤, 具有高恶性及高侵袭性。由于颅内结构的复杂及胶质瘤细胞的生物学特性, 胶质瘤患者往往需要手术治疗及辅助放化疗^[1]。即使在目前理想治疗条件下, 胶质瘤患者的复发率及病死率仍较高。

长链非编码 RNA (long chain non-coding RNA, LncRNA) 是一种缺乏蛋白编码能力的 RNA 转录本, 其在细胞的生物学活动中起着重要的调控作用。FAS 反义 RNA 又称 FAS-AS1 或 SAF, 是一种位于 10q23.31 区域的长链非编码 RNA, 由 FAS 基因内含子 1 的反义链转录而来^[2]。FAS 基因是肿瘤坏死因子受体超家族中的一员, 与其特定的 FAS 配体 (FASL) 相结合, 激活外源性凋亡途径。近年来, 有研究表明 FAS-AS1 参与 FAS 介导的凋亡途径的调控^[3], 并且 FAS-AS1 与可溶性 FAS 受体的表达呈负

相关。目前已有文献^[4]报道, FAS-AS1 在乳腺癌及 B 淋巴瘤细胞中均呈特异性低表达。但 FAS-AS1 在胶质瘤细胞中的作用尚未见报道。为了探讨 FAS-AS1 对胶质瘤细胞的作用, 该研究以人脑胶质瘤细胞系 U251、SF126 细胞为对象, 探讨 FAS-AS1 对胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 人脑胶质瘤细胞系 U251、SF126 细胞购自中国科学院上海细胞库。细胞置于 37℃、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中, 用添加了 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养, 细胞呈单层贴壁生长。平均 48~72 h 进行细胞换液。在倒置相差显微镜下进行观察, 当贴壁达 80% 以上时, 用胰酶进行消化传代。

1.1.2 主要试剂 FAS-AS1 过表达质粒由上海吉凯基因合成; Vector 对照组质粒由上海生工技术有限公司设计合成; 去内毒素质粒中提试剂盒 (美国 Magen 公司); 大肠杆菌 DH5a (上海生工生物工程有限公司); 氨苄霉素、MTT 试剂、胰蛋白酶、多聚甲醛、结晶紫染料 (上海碧云天生物技术有限公司); 胎牛血清 (FBS)、青-链霉素 (美国 Gibco 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS)、高糖培养基 DMEM (美国 Hyclone 公司); 转染试剂 Regent、转染缓冲液 Buffer (美国 Polyplus 公司); RNA 快速提取试剂盒 (美国 Genuine 公司); DEPC 水 (美国 LEAGENE 公司); 无水乙醇、Mix、GAPDH、FAS-AS1 引物 (上海生工技术有限公司); TB Green (日本 TaKaRa 公司); Matrigel 基质胶 (美国 BD 公司); Transwell 小室 (美国 Corning 公司)。

1.1.3 主要仪器 NAPCO-8800 型恒温细胞培养箱 (美国 SHELLAB 公司); SW-9800 型超净工作台 (苏州泰安空气技术有限公司); TS100 型倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司); FlexCycler 逆转录仪 (德国 ANALYTIKJENA 公司); Nanophotometer 超微量分光光度计 (德国 IMPLLEN 公司); CFX Connect™ 实

2021-07-15 接收

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划 (编号: 1804h08020270)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院神经外科, 合肥 230601

作者简介: 孙立波, 男, 硕士研究生;

赵 兵, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail:

aydzhb@126.com

时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司);Centrifuge-5242 型台式高速离心机、Centrifuge-5417R 台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);多功能微孔板酶标仪(ThermoFisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 临床组织标本的收集 选取安徽医科大学第二附属医院神经外科 2016 年 8 月-2020 年 6 月期间入院手术的脑胶质瘤患者组织标本 10 例,所有患者均为第一次手术,且在此之前未曾进行放疗及化疗,术后的病理报告确诊为胶质瘤;并选取同期脑外伤患者组织标本 10 例为对照,所有患者均为第一次手术且术前未诊断为胶质瘤。所有标本在切除后均保存于无菌冻存管中,低温转运,并于 -80°C 标本库中长期低温保存。

1.2.2 RNA 提取 剪取临床样本组织 50 g 研磨,每管加入 800 μl TRIzol,160 μl 三氯甲烷,(TRIzol:三氯甲烷=1:5)混匀后,13 200 r/min 离心 15 min,取上清液,加入等体积异丙醇,于 -20°C 静置 30~60 min。13 200 r/min 离心 15 min。每管加入无酶水 225 μl ,无水乙醇 675 μl (无酶水:无水乙醇=1:3)洗脱,翻转振荡,13 200 r/min 离心 15 min,开盖晾干后,加 20 μl 无酶水,于 -80°C 保存。

1.2.3 FAS-AS1 质粒构建 FAS-AS1 完整序列在 Pubmed 上查找,FAS-AS1 对应的质粒由上海生工公司设计合成。将含 FAS-AS1 质粒的大肠杆菌菌液接种于含氨苄霉素培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 14~16 h 扩增菌液。3 000 r/min 离心 10 min,收集菌液。按照质粒提取试剂盒步骤,依次加入 2.5 ml Buffer E1 高速重悬菌液,2.5 ml Buffer E2、2.5 ml Buffer E3 上下颠倒与菌液混匀,3 000 r/min 离心 5 min,使用 Clear Midi Syringe 活塞过滤,收集滤液,再依次加入 1/3 体积的 Buffer E4、4 ml Buffer E5、4 ml Buffer-PW2 至 HiPure EF Midi Column 柱中,3 000 r/min 离心 2 min,弃去废液,最后加入 Buffer TE,3 000 r/min 离心 2 min,收集质粒,保存于 -20°C 。

1.2.4 细胞的瞬时转染 取对数生长期的 U251 细胞,使用不含抗生素的 DMEM 于 6 孔板中培养细胞 24 h。每孔依次加入 200 μl Buffer 缓冲液、800 ng 质粒、4 μl 转染试剂 Reagent 混合液,分为 FAS-AS1 过表达组及对照组。静置混合液 10 min 后均匀转染至各孔,24 h 后进行观察。

1.2.5 qRT-PCR 检测细胞转染效率 用 RNA 快速提取法提取 FAS-AS1 过表达组及对照组细胞总 RNA。使用分光光度计测各组 RNA 浓度。根据

RNA 的不同浓度加 DEPC 水配平两组总 RNA 量为 600 ng,Mix 2 μl ,最后加 DEPC 水使总体积为 10 μl 。在逆转录仪上以 20 μl 体系,将 RNA 逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR,底物 1.6 μl ,引物 3.2 μl ,TB Green 5.2 μl 。FAS-AS1 引物序列为:5'-GCTCTCTCATCTTGGCTGAA-3'(正向引物);5'-GAGCCATGTAGTGGGAAGA-3'(反向引物);以 GAPDH 为内参,序列为:5'-AGCAAGAGCA-CAAGAGGAAG-3'(正向引物);5'-GGTTGAGCA-CAGGGTACTTT-3'(反向引物)。利用 CFX ConnectTM 实时定量 PCR 仪进行 PCR 扩增,使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算对应的 RNA 表达量。

1.2.6 MTT 法检测细胞增殖能力 取对数生长期的 U251 细胞,于 6 孔板中分别使用 FAS-AS1 和 Vector 质粒进行转染 24 h 后收集 FAS-AS1 过表达组及对照组中的细胞,在倒置相差显微镜下使用细胞计数板进行细胞计数,分别在 96 孔板中接种 3 000、6 000、9 000 个细胞,24 h 后加 MTT 试剂 100 μl ,4 h 后加 DMSO 100 μl ,并于酶标仪下进行吸光度的检测。

1.2.7 克隆形成实验检测细胞增殖能力 收集 6 孔板中 FAS-AS1 过表达组和对照组的细胞,于倒置相差显微镜下使用细胞计数板进行细胞计数,分别于另一个 6 孔板中加入 200、400、600 个细胞,培养 1 周后,使用 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 15 min,并于白光灯下进行拍照,计算各孔中的细胞克隆数目。

1.2.8 Transwell 检测细胞迁移能力 收集 6 孔板中 FAS-AS1 过表达组和对照组中的细胞,使用细胞计数板于倒置相差显微镜下进行细胞计数,使用 0% DMEM 水化 Transwell 小室,将 2×10^4 个细胞接种于小室中,在 24 孔板中加 600 μl 30% DMEM,覆盖小室底部。于恒温细胞培养箱培养 24 h 后,使用 4% 多聚甲醛固定 30 min,并使用 0.1% 结晶紫染色 15 min,于相差倒置显微镜下观察,计算细胞穿过小室膜的数目。

1.2.9 Transwell 检测细胞侵袭能力 将 Matrigel 基质胶和 0% DMEM 以 1:3 的比例配制,于每个 Transwell 小室中加入 60 μl ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温细胞培养箱中 4 h 凝固。胰酶消化收集 6 孔板中 FAS-AS1 过表达组和对照组中的细胞,使用细胞计数板于倒置相差显微镜下进行细胞计数,将 1×10^5 个细胞接种于含 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室中,在 24 孔板中加 600 μl 30% DMEM,覆盖小室底

部。于恒温细胞培养箱培养 48 h 后,使用 4% 多聚甲醛固定 30 min,并使用 0.1% 结晶紫染色 15 min,于相差倒置显微镜下观察,计算细胞穿过小室膜的数目。

1.3 统计学处理 使用 Prism 软件做图并采用 SPSS 19.0 统计软件对结果进行分析,每组数据重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;两组样本间比较采用 t 检验,多组样本间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FAS-AS1 在临床胶质瘤样本中的表达 收集临床胶质瘤患者的样本(术后病理已确诊为胶质瘤)及正常脑组织样本,提取标本组织中 RNA,使用 qRT-PCR 验证两组中 FAS-AS1 的表达情况。如图 1 所示,胶质瘤样本中 FAS-AS1 的表达较对照组中明显降低,差异有统计学意义($t = 3.339$, $df = 18$, $P = 0.0033$)。

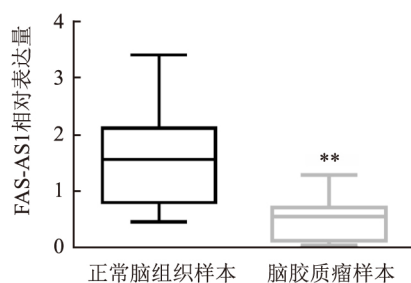


图 1 FAS-AS1 在胶质瘤中的表达
与正常脑组织比较: ** $P < 0.01$

2.2 FAS-AS1 在不同胶质瘤细胞系中的表达情况 取对数生长期的 HEB、U251、SF126 细胞,使用 RNA 快速提取法提取其总 RNA,使用 qRT-PCR 检测 3 种细胞中 FAS-AS1 的表达情况,如图 2 所示, FAS-AS1 在高级别胶质瘤细胞系中(U251、SF126) 较正常胶质细胞中(HEB) 表达明显降低,差异有统计学意义($F = 38.65$, $P = 0.0072$)。

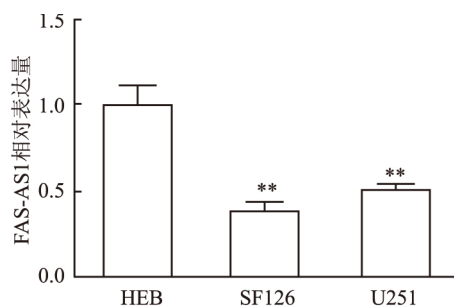


图 2 FAS-AS1 在胶质瘤细胞系中的表达
与 HEB 细胞比较: ** $P < 0.01$

2.3 FAS-AS1 过表达的胶质瘤细胞模型构建 采用 qRT-PCR 检测转染的效率。如图 3 所示,在 SF126 细胞系中,与对照组相比, FAS-AS1 过表达组中的 FAS-AS1 表达水平明显上调,差异有统计学意义($t = 12.06$, $df = 2$, $P = 0.0068$)。在 U251 细胞系中,与对照组相比, FAS-AS1 过表达组中的 FAS-AS1 表达水平明显上调,差异有统计学意义($t = 10.84$, $df = 2$, $P = 0.0084$)。结果提示 FAS-AS1 质粒转染 U251、SF126 细胞成功,可使 U251、SF126 细胞过表达 FAS-AS1。

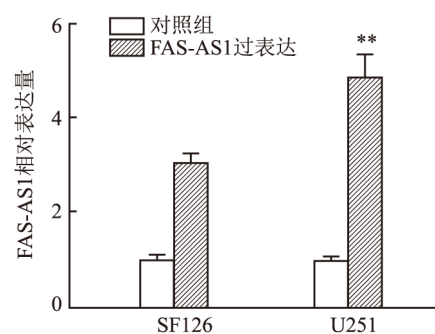


图 3 FAS-AS1 转染 SF126 及 U251 细胞后 FAS-AS1 的相对表达量
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.4 过表达 FAS-AS1 抑制 U251 及 SF126 胶质瘤细胞增殖能力 采用 MTT 法检测 U251 细胞的增殖能力, FAS-AS1 过表达组的 OD 值较转染空载质粒的对照组明显减少, OD 值差异有统计学意义($t = 5.586$, $df = 4$, $P = 0.0050$)。采用克隆形成实验检测 SF126 细胞的增殖能力,如图 4 所示,两组细胞的增殖数目差异有统计学意义($t = 15.32$, $df = 2$, $P = 0.0042$)。上述结果提示 FAS-AS1 过表达抑制胶质瘤细胞的增殖。

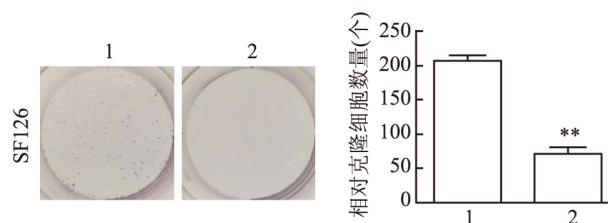


图 4 FAS-AS1 对 SF126 细胞增殖能力的影响
1: 对照组; 2: FAS-AS1 过表达; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.5 过表达 FAS-AS1 抑制 SF126 及 U251 胶质瘤细胞迁移能力 采用 Transwell 实验方法检测 FAS-AS1 对胶质瘤细胞迁移能力的影响。由图 5 所示,在 SF126 细胞系中, FAS-AS1 过表达组的细胞迁移数目较对照组数目明显减少,差异有统计学意义(t

$= 13.01$ $df = 4$ $P = 0.0002$)。在 U251 细胞系中, FAS-AS1 过表达组的细胞迁移数目较对照组数目也明显减少, 差异有统计学意义 ($t = 16.37$ $df = 4$ $P = 0.0001$)。上述结果提示 FAS-AS1 过表达抑制胶质瘤细胞的迁移能力。

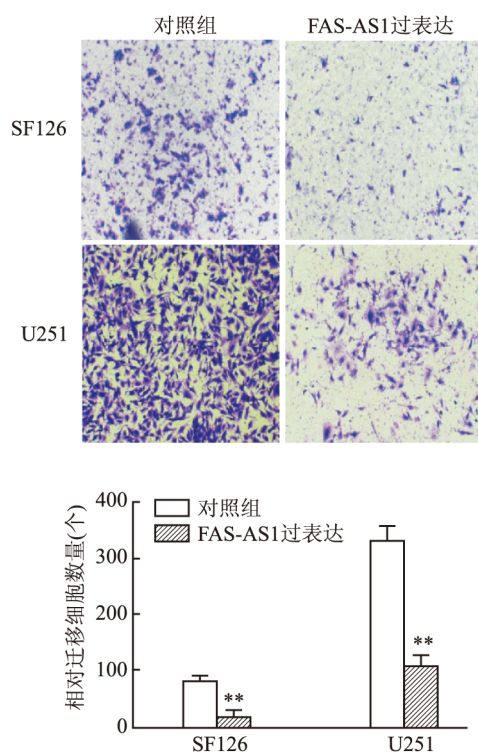


图5 FAS-AS1 对 SF126 细胞迁移能力的影响 $\times 200$
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.6 过表达 FAS-AS1 抑制 SF126 及 U251 胶质瘤细胞侵袭能力 采用基质胶构建生物膜结合 Transwell 实验方法检测 FAS-AS1 对胶质瘤细胞侵袭能力的影响。如图 6 所示, 在 SF126 细胞系中, FAS-AS1 过表达组的细胞侵袭数目较对照组数目明显减少, 差异有统计学意义 ($t = 17.03$ $df = 4$ $P = 0.0001$)。在 U251 细胞系中, FAS-AS1 过表达组的细胞侵袭数目较对照组数目也明显减少, 两组细胞数差异有统计学意义 ($t = 10.82$ $df = 2$ $P = 0.0084$)。上述结果提示 FAS-AS1 过表达抑制胶质瘤细胞的侵袭能力。

3 讨论

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤^[5], 包括星形细胞瘤、室管膜瘤、少突胶质细胞瘤、胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤^[6]。其血管丰富、生长迅速, 具有高浸润性的特点, 易侵犯周围正常脑组织, 患者预后较差, 中位生存期在确诊后不足 2 年^[7]。

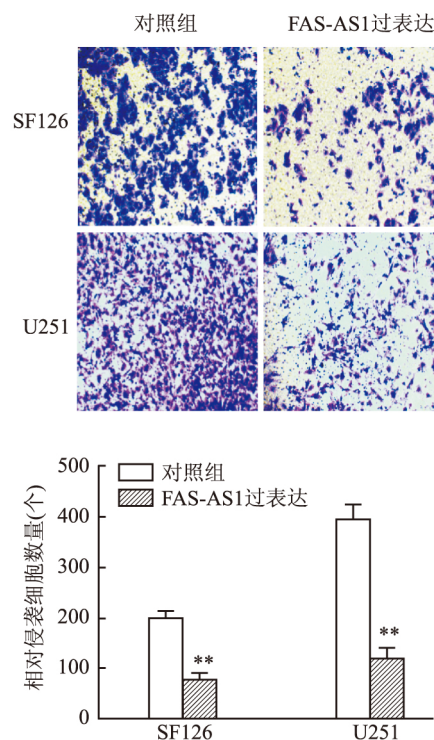


图6 FAS-AS1 对 SF126 细胞侵袭能力的影响 $\times 200$
与对照组比较: ** $P < 0.01$

目前治疗手段主要是手术切除及术后辅助放化疗, 但治疗效果不佳。因此, 探讨胶质瘤发病的分子机制有助于寻找其新的靶向治疗。近年来越来越多的研究表明表观遗传学调控, 尤其是非编码 RNA, 在胶质瘤中起重要作用。

LncRNA 是由超过 200 个核苷酸单位组成的 RNA, 不具有编码蛋白质的功能, 但其在表观遗传学调控中具有重要意义^[8-9]。目前大量文献表明, 众多 lncRNA 参与胶质瘤的发生发展, 并调控胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等生物学行为。例如 lncRNA BLACAT1 通过 Wnt/ β -catenin 信号增强胶质瘤的增殖和侵袭能力^[10], lncRNA LINC00473 通过损伤 miR-637/CDK6 轴促进胶质瘤细胞增殖和侵袭^[11], lncRNA UCA1 通过 miR-206/Clock 轴促进细胞生长和侵袭^[12]。

LncRNA FAS-AS1 是 FAS 的反义 RNA^[13], 其在心脏、肝脏、肌肉等组织中均有表达。并且有研究^[14]表明其可促进炎症的产生, Xi et al^[15]报道了 FAS-AS1 在非小细胞肺癌中低表达, Sayad et al^[3]研究表明 FAS-AS1 在 B 淋巴瘤细胞中低表达。但 FAS-AS1 在胶质瘤中的表达及其对胶质瘤细胞生物学功能的影响目前尚未有文献报道。

本研究通过检测临床胶质瘤样本与正常脑组织

样本中 FAS-AS1 的表达,发现 FAS-AS1 在胶质瘤中呈低表达。同样的,FAS-AS1 在高级别胶质瘤细胞系中低表达。为了探究 FAS-AS1 对胶质瘤细胞生物学功能的影响,采用过表达的 FAS-AS1 质粒转染胶质瘤细胞系。结果显示过表达 FAS-AS1 抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力。以上研究结果提示 FAS-AS1 可能作为胶质瘤治疗新的靶标。

参考文献

- [1] Schwartz C, Romagna A, Machegger L, et al. Extensive leptomeningeal intracranial and spinal metastases in a patient with a supratentorial glioblastoma multiforme, IDH-wildtype [J]. *World Neurosurg*, 2018, 120(12): 442–7.
- [2] Ali M A, Shaker O G, Khalefa A A, et al. Serum long noncoding RNAs FAS-AS1 & PVT1 are novel biomarkers for systemic lupus erythematosus [J]. *Br J Biomed Sci*, 2020, 77(4): 208–12.
- [3] Sayad A, Ajifathali A, Amidieh A A, et al. Fas-antisense long noncoding RNA and acute myeloid leukemia: is there any relation [J]. *Asian Pac Cancer Prev*, 2018, 19(1): 45–8.
- [4] 周树伟, 苏蓓蓓, 周 勇. FAS-AS1 在乳腺癌组织中的表达及其对宿主基因 sFAS 表达的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(12): 949–52.
- [5] Chen L, Zeng D, Xu N, et al. Blood-brain barrier- and blood-brain tumor barrier-penetrating peptide-derived targeted therapeutics for glioma and malignant tumor brain metastases [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(45): 41889–97.
- [6] 徐雅娣, 赵 兵, 卞尔保 等. DNMT1 抑制剂 DC_517 对胶质瘤细胞增殖和侵袭的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(11): 1962–7.
- [7] Osuka S, Van Meir E G. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(2): 415–26.
- [8] Ramos A D, Attenello F J, Lim D A, Uncovering the roles of long noncoding RNAs in neural development and glioma progression [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 625(20): 70–9.
- [9] Joung J, Engreitz J M, Konermann S, et al. Erratum: Genome-scale activation screen identifies a lncRNA locus regulating a gene neighbourhood [J]. *Nature*, 2017, 549(7672): 418.
- [10] Li X S, Qi S J, Ma D Z, et al. Long non-coding RNA BLACAT1 promotes the proliferation and invasion of glioma cells via Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(6): 4703–8.
- [11] Zhang Q S, Wang G W, Xu L P, et al. Long non-coding RNA LINC00473 promotes glioma cells proliferation and invasion by impairing miR-637/CDK6 axis [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3896–903.
- [12] Huang Z, Zhao X Y, Wu X W, et al. LncRNA UCA1 facilitated cell growth and invasion through the miR-206/CLOCK axis in glioma [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(6): 316.
- [13] Villamizar O, Chambers C B, Mo Y Y, et al. Fas-antisense long noncoding RNA is differentially expressed during maturation of human erythrocytes and confers resistance to Fas-mediated cell death [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2016, 58(12): 57–66.
- [14] Zhu J K, He T D, Wei Z X, et al. LncRNA FAS-AS1 promotes the degradation of extracellular matrix of cartilage in osteoarthritis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(10): 2966–72.
- [15] Xi Y, Shen W Y, Jin C H, et al. PVT1 promotes the proliferation and migration of non-small cell lung cancer via regulating miR-148/RAB34 signal axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 1819–32.

Effects of long-stranded non-coding RNA FAS-AS1 on proliferation, migration and invasion of glioma cells

Sun Libo, Bian Erbao, Cheng Meng et al

(Dept of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the expression of long chain non-coding RNA FAS-AS1 in glioma cells and its effect on the proliferation, migration and invasion of glioma cells. **Methods** The abundance of FAS-AS1 expression in clinical samples and glioma cell lines was detected by qRT-PCR. Human glioma cell lines U251 and SF126 were transfected with FAS-AS1 plasmid. The transfection efficiency was detected by qRT-PCR, the effect of FAS-AS1 on cell proliferation was detected by MTT formation test and cloning test, the effect of FAS-AS1 on cell migration was detected by Transwell assay, and the effect of FAS-AS1 on glioma cell invasion was detected by matrix gel biofilm combined with Transwell experiment. **Results** The expression of FAS-AS1 in glioma tissue and human glioma cell line was down-regulated; the glioma cell model with overexpression of FAS-AS1 was successfully constructed by FAS-AS1 plasmid transfection, and the overexpression of FAS-AS1 inhibited the proliferation, migration and invasion of glioma cells. **Conclusion** FAS-AS1 is down-regulated in gliomas and can inhibit the proliferation, migration and invasion of glioma cells.

Key words LncRNA; FAS-AS1; glioma; proliferation; migration; invasion