

网络出版时间: 2020-8-21 15:19 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200820.1449.003.html>

长链非编码 RNA FAM83H-AS1 对胃癌细胞周期、增殖和转移的影响及作用机制

王涛, 马牧原, 叶晓锋

摘要 目的 研究长链非编码 RNA 序列相似性家族 83 成员 H 反义 RNA 1 (lncRNA FAM83H-AS1) 对胃癌细胞周期、增殖和转移的影响,并探讨其作用的可能机制。方法 qRT-PCR 检测 FAM83H-AS1 在胃癌细胞系 MKN-45、SGC-7901、MGC-803 和人永生化的正常胃上皮细胞 GES-1 中的表达水平,选择表达最高的胃癌细胞系进行 FAM83H-AS1 小干扰核糖核酸 (siRNA) 感染,分为 si-NC 组和 si-FAM83H-AS1 组。qRT-PCR 检测各组细胞中 FAM83H-AS1 的表达水平;流式细胞仪检测 FAM83H-AS1 对细胞周期的影响;MTS 和平板克隆实验检测 FAM83H-AS1 对细胞增殖能力的影响;Transwell 实验检测 FAM83H-AS1 对细胞转移能力的影响;Western blot 检测 FAM83H-AS1 对 cyclinD1 和细胞周期蛋白依赖激酶 4 (CDK4) 以及上皮间质转化过程 (EMT) 标志蛋白的表达影响。结果 qRT-PCR 检测结果显示 FAM83H-AS1 在胃癌细胞系的表达水平高于在人永生化的正常胃上皮细胞 GES-1 中的表达 ($P < 0.05$),选择表达水平最高的胃癌细胞系 MKN-45 转染 FAM83H-AS1 siRNA, qRT-PCR 结果显示 si-FAM83H-AS1 组细胞中 FAM83H-AS1 的表达降低 ($P < 0.05$); si-FAM83H-AS1 组 MKN-45 细胞增殖和转移能力下降,细胞中细胞周期蛋白 cyclinD1 和 CDK4 蛋白的表达降低,EMT 标志蛋白 E 钙黏蛋白表达增加, N 钙黏蛋白和波形蛋白表达降低。结论 干扰 FAM83H-AS1 的表达抑制胃癌细胞增殖和转移能力。FAM83H-AS1 可能是胃癌治疗的新型靶标。

关键词 胃癌; lncRNA FAM83H-AS1 反义 RNA 1; 细胞周期; 增殖; 转移; 上皮间质转化

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)09-1327-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.09.003

胃癌是全球第五大最常见的肿瘤,也是第三大最致命的肿瘤,在中国,每年报告超过 40 万例新病例,占全球总数的 42%^[1]。在过去的几十年中,尽

管胃癌的诊断和治疗得到了显著改善,但患者的 5 年生存率仍然很低^[2],因此有必要探索胃癌新型治疗靶标的分子机制和鉴定。研究^[3]报道表观遗传学在胃癌的进展中发挥重要调控作用,长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 属于表观遗传学的一种,在人类恶性肿瘤的发病机制中具有重要作用。lncRNA 序列相似性家族 83 成员 H 反义 RNA 1 (lncRNA family with sequence similarity 83 member H antisense RNA 1, lncRNA FAM83H-AS1) 是新近发现的 lncRNA 之一,在肝细胞肝癌、结直肠癌和卵巢癌等恶性肿瘤中高表达,发挥促癌基因作用^[4-6]。Da et al^[7]报道 FAM83H-AS1 在胃癌组织中表达上调,并与胃癌患者的淋巴结转移和预后相关。该文探讨了 FAM83H-AS1 在胃癌中发挥的具体作用。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与材料 人胃癌细胞系 MKN-45、SGC-7901、MGC-803 和人永生化的正常胃上皮细胞 GES-1 (美国 ATCC 细胞库), DMEM-F12 培养基、RPMI1640 培养基和胎牛血清 (美国 gibco 公司), PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录, SYBR Premix Ex Taq™ qRT-PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), siRNA (广州锐博生物), 细胞周期检测试剂盒和 BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (上海碧云天生物), MTS 试剂 (美国 Biovision 公司), Transwell 小室 (美国 BD 公司); 蛋白裂解液 (北京索莱宝生物), cyclinD1、CDK4、E 钙黏蛋白、N 钙黏蛋白和波形蛋白抗体 (美国 proteintech 公司)。

1.2 细胞培养与转染 MKN-45 和 SGC-7901 细胞培养基为 RPMI1640 培养基, MGC-803 和 GES-1 细胞培养基为 DMEM-F12, 胎牛血清浓度均为 10%, 培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。将呈对数生长期的 MKN-45 细胞以 1.0×10^5 个/孔铺至 6 孔板中, 分为对照组 (si-NC) 和实验组 (si-FAM83H-AS1), 将 NC siRNA 和 FAM83H-AS1 siRNA 与 lip2000 混匀后加入各组细胞中, 放至培养箱中培养。

2020-05-18 接收

基金项目: 宁夏回族自治区卫生系统科研项目 (编号: 2015-NW-154)

作者单位: 宁夏医科大学总医院肿瘤外科, 银川 750001

作者简介: 王涛, 男, 硕士研究生;

叶晓锋, 男, 本科, 主任医师, 责任作者, E-mail: xiaowing222@163.com

1.3 qRT-PCR 检测 FAM83H-AS1 的表达 胰酶消化离心收集细胞,加入 TRIzol 试剂裂解细胞,提取细胞中总 RNA。按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒将 RNA 反转录 cDNA,并以 cDNA 为模板,按照 SYBR Premix Ex Taq™ qRT-PCR 试剂盒配制反应体系进行 qRT-PCR,按 2 步反应进行,即 95 °C 预变性 5 s,以 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 30 s 进行 40 个循环。每个反应样品设置 3 个复孔,获得各样品的循环阈值(threshold cycle, Ct),以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 FAM83H-AS1 相对表达量。FAM83H-AS1 引物 F: 5'-TAGGAAACGAGCGAGCCC-3', R: 5'-GCTTTGGGTCTCCCCTTCTT-3'。内参 GAPDH 引物 F: 5'-GGGAGCCAAAAGGGTCAT-3', R: 5'-GAGTCCTTC-CACGATACCAA-3'。

1.4 MTS 收集生长状态良好的 MKN-45 细胞以 2 000 个/孔铺至 96 孔板中,分为对照组 (si-NC) 和实验组 (si-FAM83H-AS1),每组设置 5 个复孔,按上述 siRNA 转染方法进行转染,分别在转染 0、24、48、72 h 时,每孔加入 20 μ l MTS 试剂在培养箱中孵育 2 h,全波长扫描仪检测 490 nm 的吸光度(optical density, OD) 值。

1.5 平板克隆形成实验 收集生长状态良好的 MKN-45 细胞以 300 个/孔铺至 6 孔板中,分为 si-NC 和 si-FAM83H-AS1,每组设置 3 个复孔,按上述 siRNA 转染方法进行转染,细胞形成肉眼可见的细胞克隆团时终止培养, PBS 洗 3 次,甲醇固定 10 min,结晶紫染色,计数克隆团个数。

1.6 Transwell 实验 收集 6 孔板中转染 48 h 的各细胞,基础培养基洗 3 次后细胞计数, 1×10^5 个细胞重悬于 100 μ l 基础血清培养基中加至 Transwell 小室膜上,膜下加入含 10% 胎牛血清的 500 μ l 培养基,每组设置 3 个复孔,放置细胞培养箱中培养。12 h 后终止培养,将未转移的细胞洗去,甲醇固定 10 min,结晶紫染色,显微镜下计数。

1.7 Western blot 检测蛋白表达 收集 6 孔板中转染 48 h 的各细胞,加入蛋白裂解液,超声裂解 10 min, 4 °C 高速离心 20 min,去除细胞碎片。检测蛋白浓度,加入上样缓冲液煮沸变性,进行电泳分离蛋白(80 V, 2 h),蛋白湿转至 PVDF 膜上(350 mA, 2 h),5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 4 °C 一抗孵育过夜,室温二抗孵育 2 h, ECL 超敏化学发光曝光, Image J 软件进行蛋白灰度值分析。

1.8 统计学处理 用 SPSS 17.0 软件进行分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验分析两组间的差异,方差

分析检测 3 组及以上的差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FAM83H-AS1 在胃癌细胞系中的表达水平 采用 qRT-PCR 检测 FAM83H-AS1 在人胃癌细胞系 MKN-45、SGC-7901、MGC-803 和人永生正常胃上皮细胞 GES-1 中的表达情况, FAM83H-AS1 在胃癌细胞中的表达高于在人永生正常胃上皮细胞 GES-1 中的表达,在 MKN-45 细胞中的表达最高($P < 0.05$),见图 1。

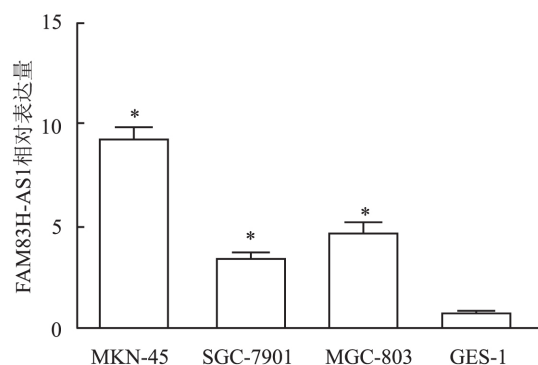


图 1 qRT-PCR 检测 FAM83H-AS1 在胃癌细胞系中的表达情况与 GES-1 比较: * $P < 0.05$

2.2 FAM83H-AS1 siRNA 转染效果 验证 FAM83H-AS1 siRNA 干扰 MKN-45 细胞中 FAM83H-AS1 的表达效果。与 si-NC 相比, si-FAM83H-AS1 组中 FAM83H-AS1 相对表达量降低($P < 0.05$)。FAM83H-AS1 siRNA 可以干扰 MKN-45 细胞中 FAM83H-AS1 的表达,见图 2。

2.3 流式细胞仪检测细胞周期 FAM83H-AS1 siRNA 转染胃癌细胞 MKN-45 48 h 后,与 si-NC 组相比, si-FAM83H-AS1 组细胞阻滞在 G0/G1 期($P < 0.05$),见图 3。

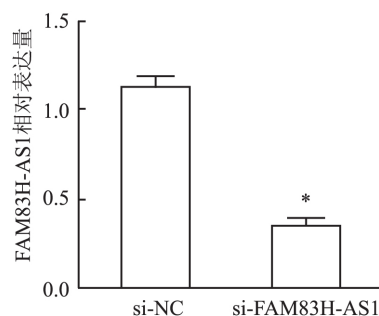


图 2 qRT-PCR 验证 FAM83H-AS1 干扰慢病毒转染效果与 si-NC 比较: * $P < 0.05$

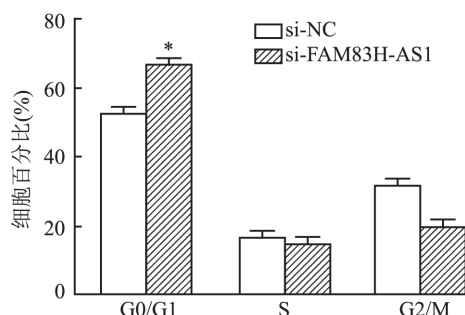


图3 MTS检测干扰FAM83H-AS1的表达
对MKN-45细胞周期的影响
与si-NC比较: * $P < 0.05$

2.4 MTS检测细胞增殖能力 FAM83H-AS1 siRNA转染胃癌细胞MKN-45 48 h后,MTS实验检测结果显示与si-NC组相比,si-FAM83H-AS1组细胞增殖能力降低($P < 0.05$),见图4。

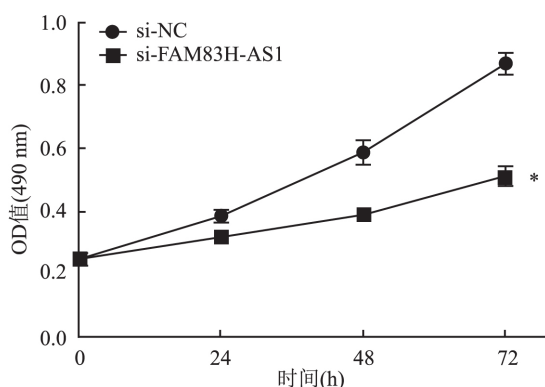


图4 MTS检测干扰FAM83H-AS1的表达
对MKN-45细胞增殖的影响
与si-NC比较: * $P < 0.05$

2.5 平板克隆检测细胞克隆形成 平板克隆形成实验检测显示与si-NC组比较,si-FAM83H-AS1组细胞克隆形成能力降低($P < 0.05$),见图5。

2.6 Transwell实验检测细胞转移能力 FAM83H-AS1 siRNA转染胃癌细胞MKN-45 48 h后Transwell实验检测显示与si-NC组相比,si-FAM83H-AS1组转移能力降低($P < 0.05$),见图6。

2.7 FAM83H-AS1对细胞周期蛋白的影响 收集转染48 h的各组蛋白,Western blot实验显示与si-NC组相比,si-FAM83H-AS1组细胞中cyclinD1和细胞周期蛋白依赖激酶4(cyclin dependent kinase 4, CDK4)蛋白的表达降低($P < 0.05$),见图7、表1。

2.8 FAM83H-AS1对上皮间质转化过程(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响 收集

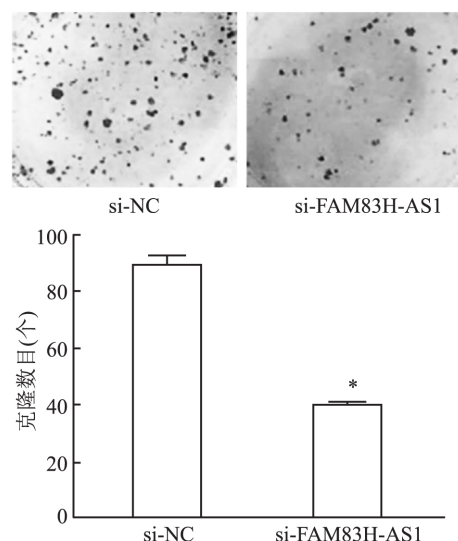


图5 平板克隆实验检测干扰FAM83H-AS1的表达
对MKN-45细胞克隆形成能力的影响
与si-NC比较: * $P < 0.05$

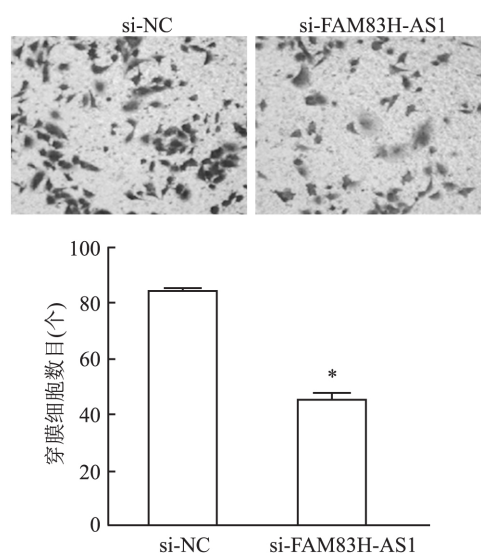


图6 Transwell实验检测干扰FAM83H-AS1的表达
对MKN-45细胞转移能力的影响 ×200
与si-NC比较: * $P < 0.05$

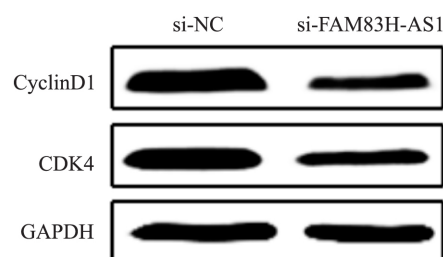


图7 Western blot实验检测干扰FAM83H-AS1的表达
对MKN-45细胞中周期蛋白的影响

转染48 h的各组蛋白,Western blot实验显示与si-

NC 组相比, si-FAM83H-AS1 组细胞中 EMT 标志蛋白 E 钙黏蛋白表达增加, N 钙黏蛋白和波形蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 见图 8、表 2。

表 1 各组细胞中细胞周期蛋白的相对表达量 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组	蛋白相对表达量	
	cyclinD1	CDK4
si-NC	2.49 ± 0.58	2.01 ± 0.82
si-FAM83H-AS1	0.84 ± 0.12	0.76 ± 0.09
<i>t</i>	5.36	4.25
<i>P</i>	0.003	0.005

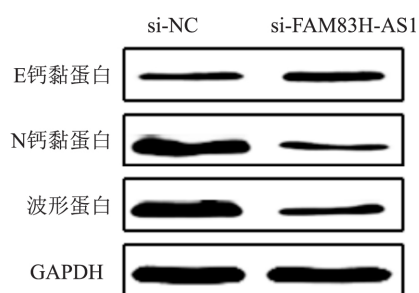


图 8 western blot 实验检测干扰 FAM83H-AS1 的表达对 MKN-45 细胞 EMT 的影响

表 2 各组细胞中 EMT 标志蛋白的相对表达量 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组	蛋白相对表达量		
	E 钙黏蛋白	N 钙黏蛋白	波形蛋白
si-NC	0.19 ± 0.03	0.97 ± 0.15	1.05 ± 0.20
si-FAM83H-AS1	0.56 ± 0.07	0.12 ± 0.06	0.14 ± 0.02
<i>t</i>	2.34	3.29	3.41
<i>P</i>	0.027	0.010	0.004

3 讨论

个体化精准治疗—分子靶向治疗已经应用于其它晚期恶性肿瘤治疗^[8],但由于胃癌强大的异质性,胃癌的分子靶向药物目前仍处于临床研究阶段^[9],因此在分子水平探索胃癌的进展机制,有助于胃癌治疗靶点的研究。

lncRNA 的发现为研究胃癌恶性表型的潜在生物学机制提供了见解, lncRNA 是长度 > 200 个核苷酸的 RNA,其可通过与蛋白质、RNA 和 DNA 或其他细胞大分子相互作用介导各种细胞生物学过程^[3]。胃癌中越来越多表达失调的 lncRNA 逐渐被发现,其中胃癌组织中 FAM83H-AS1 表达增加,并且是胃癌总生存率和无进展生存期的危险因素^[7]。而研究^[5-6]报道 FAM83H-AS1 在肝细胞肝癌组织、结直肠癌组织、卵巢癌等多种恶性肿瘤中高表达,与肿瘤患者不良病理参数和患者预后不良相关,并且

FAM83H-AS1 与这些肿瘤的恶性生物学行为密切相关。敲低 FAM83H-AS1 可以显著抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[4]。siRNA 抑制细胞中 FAM83H-AS1 的表达后降低结直肠癌细胞的增殖、迁移并增加凋亡^[5]。FAM83H-AS1 是否与胃癌增殖转移有关引起了关注,本文在细胞水平检测了 FAM83H-AS1 在胃癌中的表达情况,结果显示 FAM83H-AS1 在胃癌细胞中表达上调,并选择其表达最高的 MKN-45 胃癌细胞系抑制 FAM83H-AS1 的表达,生物学功能实验显示干扰 FAM83H-AS1 的表达诱导胃癌细胞阻滞在 G0/G1 期,并抑制胃癌细胞的增殖活性和转移能力。与 Shan et al^[10]报道的沉默 FAM83H-AS1 表达可抑制膀胱癌细胞增殖和迁移,并诱导 G0 / G1 期细胞周期停滞的研究一致。

FAM83H-AS1 在胃癌中为促癌因子,其发挥作用的具体机制仍需进一步研究。细胞周期调控失控导致肿瘤细胞的恶性增殖是肿瘤的重要特征,在生理状态下细胞具有严密的周期调控机制,其中细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶发挥关键作用。细胞周期蛋白 CyclinD1 是原癌基因,由于基因扩增、转录增强和染色体易位等导致其蛋白过度表达,过度表达的 CyclinD1 与 CDK4 结合,两者均是周期正性调控因子,促使细胞从 G0/G1 期进入 S 期,促进细胞分裂增殖^[11]。本文采用 Western blot 实验检测表明抑制 FAM83H-AS1 的表达后,胃癌细胞中 cyclinD1 和 CDK4 蛋白的表达降低。表明 FAM83H-AS1 可能通过减少细胞周期 cyclinD1 和 CDK4 蛋白的表达抑制细胞的增殖。EMT 是上皮细胞转化为具有间质表型的细胞的生物学过程,其在胚胎发育生理过程和肿瘤转移病理过程中均发挥重要作用^[12]。研究^[13]报道抑制肿瘤细胞的 EMT,肿瘤细胞的侵袭转移能力减弱,EMT 是肿瘤转移的重要机制之一,Western blot 实验结果显示干扰 FAM83H-AS1 的表达后,胃癌细胞中上皮细胞标志分子 E-cadherin 蛋白表达增加,而间质细胞标志物分子 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达降低。表明 FAM83H-AS1 在胃癌中通过调控 EMT 促进细胞转移。

参考文献

- [1] Rawla P. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention[J]. Prz Gastroenterol 2019, 14(1): 26-38.
- [2] Wang F H, Shen L, Li J, et al. The Chinese society of clinical oncology (CSCO): clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric cancer[J]. Cancer Commun 2019, 39(1): 10.

- [3] Lin M T ,Song H J. Long non-coding RNAs involved in metastasis of gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol* 2018 ,24(33) : 3724 - 37.
- [4] Ma Y K ,Shen T H. Upregulation of lncRNA FAM83H-AS1 in hepatocellular carcinoma promotes cell proliferation ,migration and invasion by Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019 ,23(18) : 7855 - 62.
- [5] Lu S ,Dong W ,Zhao P. lncRNA FAM83H-AS1 is associated with the prognosis of colorectal carcinoma and promotes cell proliferation by targeting the Notch signaling pathway [J]. *Oncol Lett* , 2018 ,15(2) : 1861 - 68.
- [6] Dou Q ,Xu Y ,Zhu Y ,et al. lncRNA FAM83H-AS1 contributes to the radioresistance , proliferation , and metastasis in ovarian cancer through stabilizing HuR protein [J]. *Eur J Pharmacol* 2019 ,852 (1) : 134 - 41.
- [7] Da J ,Liu P ,Wang R. Upregulation of the long non-coding RNA FAM83H-AS1 in gastric cancer and its clinical significance [J]. *Pathol Res Pract* 2019 ,215(10) : 152616 - 25.
- [8] Bílek O ,Holánek M ,Berkovcová J ,et al. Uncommon EGFR mutations in non-small cell lung cancer and their impact on the treatment [J]. *Klin Onkol* 2019 ,32(Supplementum 3) : 6 - 12.
- [9] 刘瑾 ,高源 ,徐农. 胃癌靶向治疗的现状和研究进展 [J]. *肿瘤学杂志* 2018 ,24(12) : 1147 - 52.
- [10] Shan H ,Yang Y ,Zhu X ,et al. FAM83H-AS1 is associated with clinical progression and modulates cell proliferation , migration , and invasion in bladder cancer [J]. *J Cell Biochem* 2019 ,120 (3) : 4687 - 93.
- [11] 李建省 ,杨维建 ,旦孝三 等. 肠瘤康基于 p16/CyclinD1 /CDK4 /Rb 通路对结肠癌 HT29 细胞的影响 [J]. *西部中医药* 2018 ,31 (12) : 10 - 3.
- [12] Škovierová H ,Okajčková T ,Strnád J ,et al. Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis (Review) [J]. *Int J Mol Med* 2018 ,41(3) : 1187 - 200.
- [13] Hong X. Silencing of lysyl oxidase-like 2 inhibits the migration , invasion and epithelial-to-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells through the Src/FAK signaling pathway [J]. *Int J Oncol* 2019 ,54(5) : 1676 - 90.

Effect and mechanism of long-chain non-coding RNA FAM83H-AS1 on cell cycle , proliferation and metastasis of gastric cancer

Wang Tao , Ma Muyuan , Ye Xiaofeng

(The Second Dept of Oncology Surgery ,General Hospital of Ningxia Medical University ,Yinchuan 750001)

Abstract Objective To study the effect of long non-coding RNA family with sequence similarity 83 member H antisense RNA 1 (lncRNA FAM83H-AS1) on cell cycle , proliferation and metastasis of gastric cancer cells , and explore its possible mechanisms. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression level of FAM83H-AS1 in gastric cancer cell lines MKN-45 ,SGC-7901 ,MGC-803 and human immortalized normal gastric epithelial cell line GES-1. The highest expression of gastric cancer cell line was selected for FAM83H-AS1 siRNA infection , which was divided into si-NC group and si-FAM83H-AS1 group. The expression of FAM83H-AS1 in each group was detected by qRT-PCR. The effect of FAM83H-AS1 on cell cycle was detected by flow cytometry. The effect of FAM83H-AS1 on cell proliferation was detected by MTS and plate cloning assay. The effect of FAM83H-AS1 on cell metastasis ability was detected by Transwell assay. Western blot was used to detect the effect of FAM83H-AS1 on the expression of cyclinD1 and cyclin dependent kinase 4 (CDK4) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) marker proteins. **Results** The results of qRT-PCR showed that the expression level of FAM83H-AS1 in gastric cancer cell lines was higher than that in human immortalized normal gastric epithelial cell line GES-1 ($P < 0.05$) , and the gastric cancer cell line MKN-45 with the highest FAM83H-AS1 expression level was selected to transfect FAM83H-AS1 siRNA. qRT-PCR results showed that the expression of FAM83H-AS1 decreased in si-FAM83H-AS1 cells ($P < 0.05$) , the proliferation and metastasis ability and the expression of cyclinD1 and CDK4 proteins in si-FAM83H-AS1 group MKN-45 cells decreased , the expression of EMT marker protein E-cadherin protein increased , and the expression of N-cadherin and Vimentin protein decreased. **Conclusion** Interference with the expression of FAM83H-AS1 inhibits the proliferation and metastasis of gastric cancer cells. FAM83H-AS1 may be a novel target for the treatment of gastric cancer.

Key words gastric cancer; lncRNA FAM83H-AS1; cell cycle; proliferation; metastasis; epithelial-mesenchymal transition