

网络出版时间: 2020/5/29 13:03 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1643.021.html>

长链非编码 RNA PVT1 通过 miR-17-5p 调控肝癌细胞增殖与迁移的机制研究

崔士猛¹ 杜渐¹ 罗海峰¹ 闻庆平² 苗壮² 温超² 吴越²

摘要 目的 探讨肿瘤调控因子长链非编码 RNA(lncRNA)PVT1 对肝癌(HCC) 细胞增殖与迁移能力的影响及机制。方法 通过 TCGA 数据库对 HCC 中 PVT1 的表达水平进行分析。采用瞬时转染技术构建 PVT1 敲低细胞系。通过 CCK-8 实验及划痕实验检测 PVT1 对 HCC 细胞增殖与迁移能力的影响。采用生物信息预测和荧光素酶实验验证 PVT1 与 miR-17-5p 的靶向结合情况。利用共转染实验验证 PVT1 能够通过 miR-17-5p 实现对 HCC 细胞增殖与迁移的调控。结果 PVT1 在 HCC 组织和细胞中高表达。敲低 PVT1 后 HCC 细胞增殖与迁移能力显著降低。荧光素酶实验证实 PVT1 能够与 miR-17-5p 靶向结合, 并且 miR-17-5p 介导了 PVT1 对 HCC 细胞增殖和迁移能力的调控作用。结论 lncRNA PVT1 能够通过靶向抑制 miR-17-5p 从而促进 HCC 细胞的增殖和迁移。

关键词 PVT1; miR-17-5p; 肝癌; 迁移; 增殖

中图分类号 R 73

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0932-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.021

研究表明^[1-2]长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 在多种癌症类型的基因组改变、诊断、预后和治疗预测中发挥着关键作用。到目前为止, lncRNA 在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 中已被证实在肿瘤细胞生长、化疗敏感性、药物诱导的细胞凋亡、肿瘤干细胞调控、治疗结果预测和病毒性肝炎相关进展中发挥重要作用^[3-5]。因此, lncRNA 作为 HCC 发病机制的调控因子, 被认为是潜在的癌症治疗靶点。

TCGA 数据库表明 PVT1 在 HCC 组织中表达明显上调。课题组的细胞水平研究显示, PVT1 促进了 HCC 细胞增殖与迁移; 通过生物信息学软件预测提

2020-03-02 接收

基金项目: 辽宁省自然科学基金(编号: 20170540266)

作者单位: 大连医科大学附属第一医院¹普外科、²麻醉科, 大连 116011

作者简介: 崔士猛, 男, 硕士, 主治医师;

吴越, 女, 硕士, 副主任医师, 责任作者, E-mail:
wuyue0903@126.com

示 PVT1 存在与 miR-17-5p 靶向结合的位点; 而 miR-17-5p 在 HCC 中常呈低表达并影响其发生发展。现通过实验证明 PVT1 与 miR-17-5p 之间存在特异性调控关系, 进而影响 HCC 细胞的增殖和迁移能力, 为 PVT1 调控 HCC 细胞的分子机制奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 细胞株 HepG2 和 HuH7 购自上海中乔新舟公司; DMEM、胎牛血清及胰酶均购自美国 Gibco 公司。培养基通过 DMEM 添加 10% 胎牛血清进行配置, 4 °C 保存不超过 1 周。细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中, 每 1~2 d 换液 1 次, 待细胞生长融合度达到 80%~90% 时对细胞进行传代。

RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、TRIzol 提取试剂均购自北京碧云天公司; cDNA 逆转录试剂盒及 SYBR Green RealTime PCR MasterMix 购自美国 Invitrogen 公司; CCK-8 试剂盒及 Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司; lncPVT1 及 siPVT1 由上海吉玛公司构建; miR-17-5p 模拟物、抑制剂及阴性对照寡核苷酸由上海吉玛基因设计及合成; 双荧光素报告基因试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 转染前对细胞进行观测, 待细胞融合度达到 50%~70% 时对细胞进行 si-PVT1 及 miRNA 的转染, NC 为空载体, 作为阴性对照。使用 Lipofectamine 3000 染试剂进行转染实验, 根据说明书步骤将细胞放入培养箱 37 °C、5% CO₂ 的环境培养 6 h 左右, 随后对细胞进行换液。提取 RNA 在转染后 24 h, 蛋白提取在转染后 48~72 h。si-PVT1 由吉玛基因设计并构建: F: 5'-ATAGGATCCCCATGCT-GGG-3', R: 5'-ATACGCTCGAGTCCGGAG-3'。

1.2.2 PCR 定量 使用 TRIzol 对处理后的细胞进行总 RNA 提取, 随后加入氯仿进行 12 000 r/min 离心 20 min, 获取上清液, 并加入异丙醇 -20 °C 过夜, 第 2 天进行 12 000 r/min 离心 20 min, 随后使用 75% 乙醇进行清洗。NanoDrop 检测 RNA 的浓度及

纯度。随后进行逆转录合成 cDNA。PVT1-F: 5'-TGAGAACTGTCCTTACGTGACC-3', PVT1-R: 5'-AGAGCACCAAGACTGGCTCT-3'; miR-17-5p-F: 5'-CGGCGGCAAAGTGCCTACAG-3', miR-17-5p-R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; GAPDH-F: 5'-TGT-TCGTCATGGGTGTGAAC-3', GAPDH-R: 5'- ATG-GCATGGACTGTGGTCAT-3'。

1.2.3 双荧光素酶实验 将野生型 Wt-PVT1 和突变型 Mut-PVT1 序列插入到 pGL4.74 载体中, 构建 Luc-PVT1-WT 和 Luc-PVT1-MUT。所有的细胞 24 孔板过夜后, 进行 Luc-PVT1-WT/Luc-PVT1-MUT 与 miR-17-5p 共转染, 共转染时间 12~24 h。采用双荧光素酶报道系统检测荧光素酶活性。

1.2.4 CCK-8 实验 以 2×10^3 /孔的细胞量将细胞接种于 96 孔板中, 设置 3 个复孔, 置于恒温培养箱中培养 24 h, 24 h 后使用 CCK-8 试剂盒, 按照说明书, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 培养箱孵育 2 h, 然后使用酶标仪检测波长在 450 nm 处的吸光度 (optical density, OD) 值, 计算细胞增殖/抑制率。细胞增殖/抑制率 (%) = (对照组 OD 值 - 敲降组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$

1.2.5 划痕实验 每株细胞待生长至约 90% 融合时, 用移液枪头进行划痕, 使用力度均匀, 宽窄一致, 分别对细胞进行 0、24 h 的观测并记录。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) 进行统计分析。采用独立 *t* 检验分析两组间的差异。组间数据比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA PVT1 在 HCC 中呈高表达 为了探

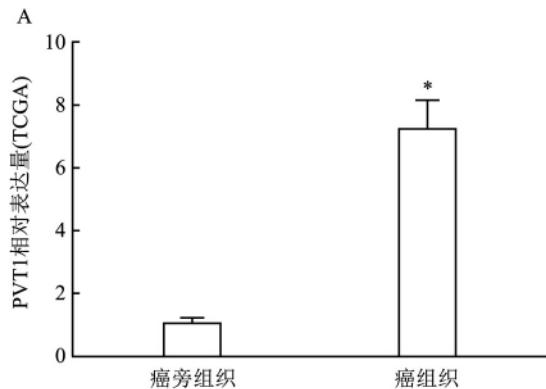


图 1 lncRNA PVT1 在肝癌组织和细胞中高表达

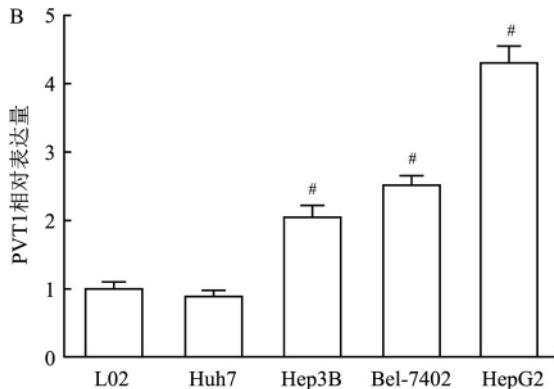
A: PVT1 在癌和癌旁组织表达情况; B: PVT1 在肝癌细胞系中的表达情况; 与癌旁组织比较: * $P < 0.05$; 与 L02 比较: # $P < 0.05$

究 PVT1 在 HCC 组织中的表达情况, 首先通过 TCGA 数据库 - 生信网站 (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 对 PVT1 在 HCC 中的表达进行评估, 见图 1A。结果显示在 HCC 中 PVT1 的表达明显增高 ($P < 0.05$)。为探究 PVT1 在 HCC 细胞中的表达情况, 使用 L02 细胞系作为对照, 对 Huh7、HepG2、Hep3B 和 Bel-7402 细胞进行 PVT1 的检测, 见图 1B, 结果显示 PVT1 在后 3 者中表达增高 ($P < 0.05$)。

2.2 lncRNA PVT1 促进肝癌细胞增殖和迁移 选取 Hep3B 和 Bel-7402 细胞系进行功能评价实验。首先通过转染技术构建 PVT1 低表达细胞系, 进行转染效率的检测。结果证实 si-PVT1 能够显著降低细胞中 PVT1 表达, 见图 2A。与阴性对照组 (si-NC) 比较, CCK-8 显示 PVT1 敲低后细胞增殖能力显著下降。见图 2B。并且敲低 PVT1 抑制了肝癌细胞迁移能力, 见图 2C、D ($P < 0.05$)。

2.3 PVT1 能够与 miR-17-5p 靶向结合 通过生信网站 STARBASE 和 miRcode 对 PVT1 进行 miRNA 靶点预测, 见图 3A。结果显示 miR-17-5p 存在与 PVT1 靶向结合的位点 (mimic-NC 为阴性对照组, mimic-17-5p 为实验组)。为了证实预测位点的存在, 使用荧光酶实验在 2 种细胞系中进行验证, 见图 3B。结果提示 Wt 组 miR-17-5p 能够与 PVT1 结合 ($P < 0.05$)。分析 HCC 细胞系中 miR-17-5p 的表达, 结果显示 miR-17-5p 在 HCC 细胞中表达明显下降, 见图 3C。另一方面, 通过 TCGA 数据库对 PVT1 与 miR-17-5p 的表达进行了相关性分析, 见图 3D。结果表明 PVT1 与 miR-17-5p 表达呈现负相关 ($P < 0.01$)。以上实验证明了 PVT1 能与 miR-17-5p 结合且二者表达呈负相关。

2.4 PVT1 通过 miR-17-5p 影响肝癌细胞增殖和



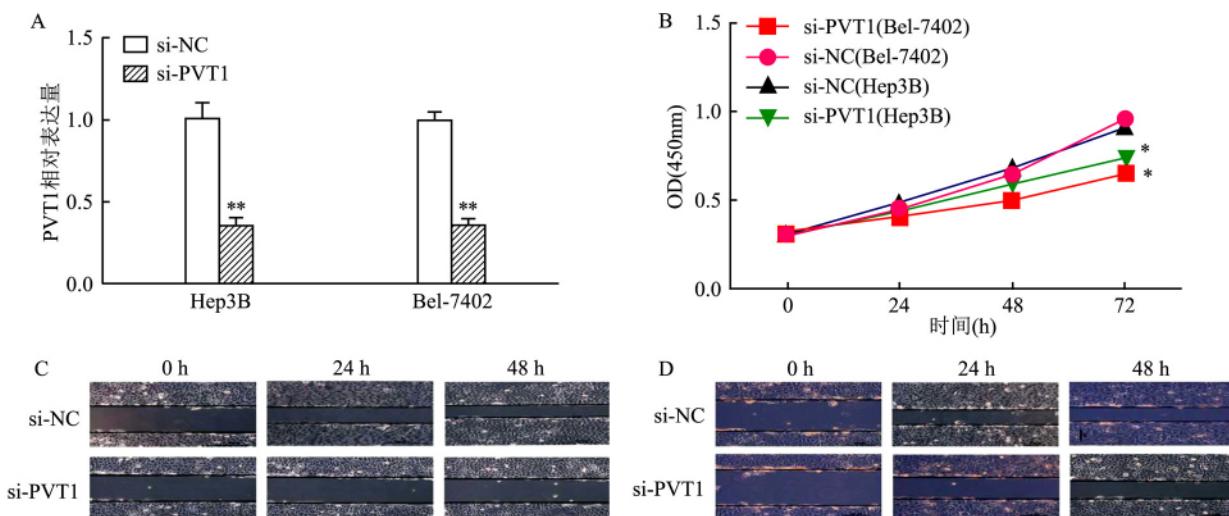


图 2 长链非编码 RNA PVT1 影响肝癌细胞增殖和迁移

A: PVT1 的转染效率; B: 细胞的生存能力; C: 敲低 PVT1 后 Hep3B 细胞的迁移能力; D: 敲低 PVT1 后 Bel-7402 细胞的迁移能力; 与 si-NC 比较: ** $P < 0.05$, * $P < 0.05$

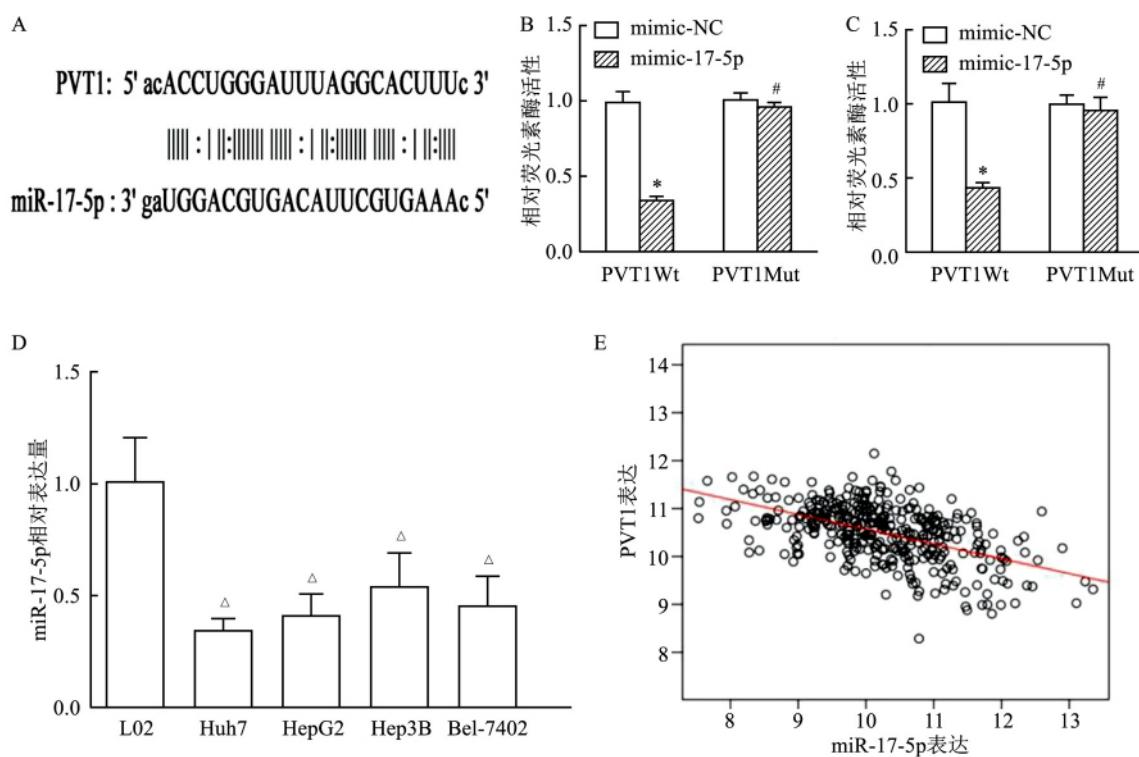


图3 PVT1与miR-47-5p靶向结合

A: Targetscan 预测结合位点; B: Hep3B 细胞系相对荧光素酶活性; C: Bel-7402 细胞系相对荧光素酶活性; D: miR-17-5p 相对表达量; E: PVT1 与 miR-17-5p 表达的相关性(Spearman-correction: 0.4993 , p-value: 6.547e-24 , Sample: n = 357) ; 与 PVT1Wt mimic-NC 比较: * P < 0.05 ; 与 PVT1Mut mimic-NC 比较: # P < 0.05 ; 与 L02 比较: △ P < 0.05

迁移能力 为了验证 PVT1 是通过 miR-17-5p 靶向结合从而影响 HCC 细胞的生物学功能。对敲低 PVT1 的细胞系进行 miR-17-5p 的检测, 见图 4A。结果提示敲低 PVT1 后导致 miR-17-5p 表达升高($P < 0.05$)。

<0.05)。通过共转染实验验证 miR-17-5p 抑制了 PVT1 对 HCC 细胞增殖的影响, 见图 4B。划痕实验证明 miR-17-5p 抑制了 PVT1 诱导的 HCC 细胞迁移, 见图 4C。上述结果表明 PVT1 对 HCC 细胞增殖

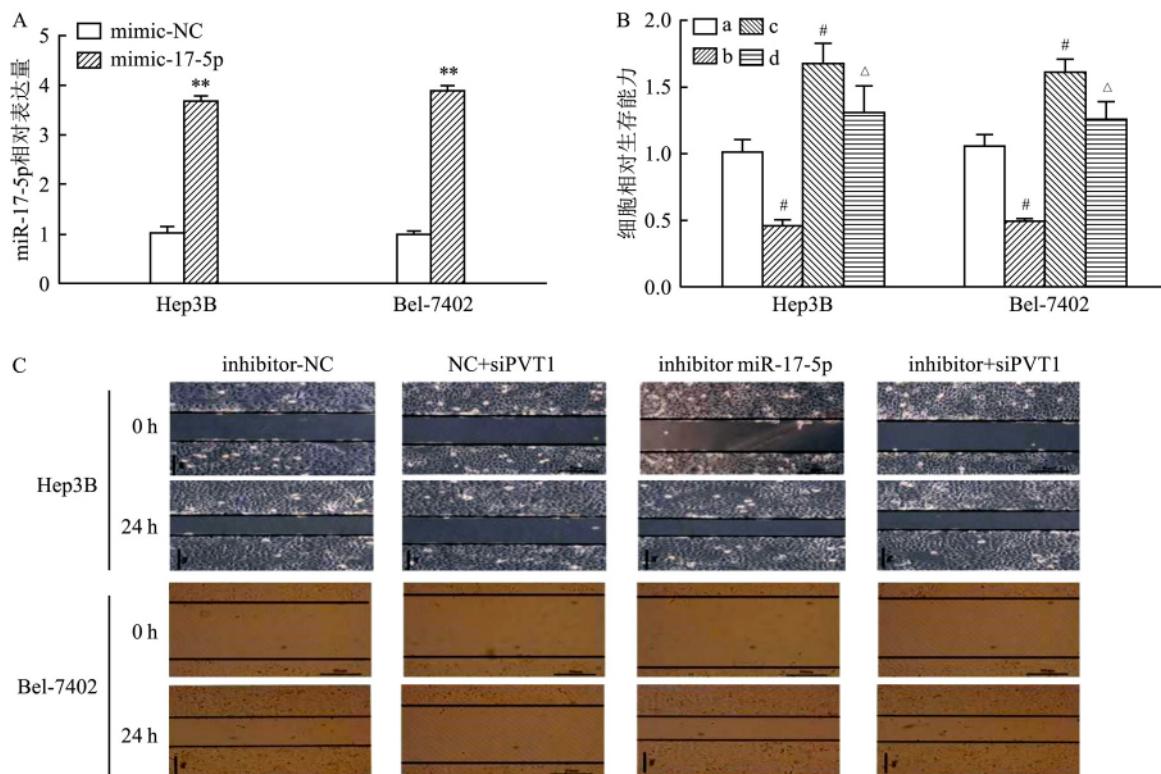


图4 PVT1 通过 miR-17-5p 促进 HCC 细胞增殖和迁移

A: miR-17-5p 转染效率; B: CCK -8 测定细胞生存能力; C: 细胞迁移能力的测定; a: inhibitor-NC; b: siPVT1 + inhibitor-NC; c: inhibitor; d: inhibitor + siPVT1; 与 mimic-NC 比较: ** $P < 0.01$; 与 inhibitor-NC 组比较: # $P < 0.05$; 与 inhibitor 组比较: △ $P < 0.05$

和迁移能力的影响机制是通过 miR-17-5p 发挥作用。

3 讨论

研究^[6-7]发现 PVT1 能够参与肿瘤细胞多种生物学功能,包括影响细胞增殖、侵袭和迁移、代谢等过程。本实验探究了 PVT1 对 HCC 细胞增殖及迁移能力的影响。近年来不断有研究证实 ceRNA 是 lncRNA 发挥调控肿瘤细胞功能的具有重要意义的调控机制。lncRNA 可通过靶向结合某些 miRNA,并间接的抑制 miRNA 对其靶基因的调控作用,从而实现了对肿瘤发生、发展的影响。有研究^[8]发现,PVT1 能够作为辅助肿瘤诊断或判断患者预后的标志物。本研究通过 TCGA 数据库分析了 PVT1 在 HCC 组织中的表达情况,并在细胞系中证实了 PVT1 在肝癌细胞中的高表达趋势。

miRNAs 被认为是各种肿瘤的独立调控因子,在 ceRNA 机制上也发挥着特定的作用。一般认为 miRNA 是 lncRNA 调控肿瘤发生的靶基因,通过与 lncRNAs 相互作用或靶向 mRNA 参与许多人类肿瘤的生物学过程。miR-17-5p 参与肝癌的多种生物学

效应且能在很大程度上提高癌细胞生长^[7]。除了 miR-17-5p 外,其他 miRNA 例如 miR-181a-5p 也与癌细胞的生命活动息息相关^[9]。lncRNA PVT1 能否作为 ceRNA 参与对 miR-17-5p 表达的调控需要进一步验证。

本研究证实 PVT1 能够与 miR-17-5p 靶向结合,并通过共转染实验证明了 lncRNA PVT1 对肝癌细胞的影响是通过抑制 miR-17-5p 从而发挥作用。为了探寻 PVT1 在肝癌细胞中的潜在分子机制,通过荧光素酶实验证实了数据库的预测结果。实验结果表明 PVT1 可以与 miR-17-5p 靶向结合。进一步实验显示 PVT1 通过阻断 miR-17-5p 的表达,正向调控肝癌细胞增殖和能力。但其靶基因和下游的目标蛋白都是哪些分子,这些问题有待进一步研究。

参考文献

- [1] Bhan A ,Soleimani M ,Mandal S S. Long noncoding RNA and cancer: A new paradigm [J]. Cancer Res ,2017 ,77(15) : 3965 -81.
- [2] Li J ,Li Z ,Zheng W , et al. LncRNA-ATB: An indispensable cancer-related long noncoding RNA [J]. Cell Prolif ,2017 ,50 (6) .

- [3] Li W ,Dong X ,He C , et al. LncRNA SNHG1 contributes to sorafenib resistance by activating the Akt pathway and is positively regulated by miR-21 in hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res* ,2019 ,38(1) : 183.
- [4] Xing Q ,Li R ,Xu A , et al. Genetic variants in a long noncoding RNA related to Sunitinib Resistance predict risk and survival of patients with renal cell carcinoma [J]. *Cancer Med* ,2019 ,8 (6) : 2886 – 96.
- [5] Saeinasab M ,Bahrami A R ,González J , et al. SNHG15 is a bi-functional MYC-regulated noncoding locus encoding a lncRNA that promotes cell proliferation , invasion and drug resistance in colorectal cancer by interacting with AIF [J]. *J Exp Clin Cancer Res* ,2019 ,38(1) : 172.
- [6] Zheng Y ,Tian X ,Wang T , et al. Long noncoding RNA Pvt1 regulates the immunosuppression activity of granulocytic myeloid-de-
- rived suppressor cells in tumor-bearing mice [J]. *Mol Cancer* ,2019 ,18(1) : 61.
- [7] Vafadar A ,Mokaram P ,Erfani M , et al. The effect of decitabine on the expression and methylation of the PPP1CA , BTG2 , and PTEN in association with changes in miR-425b , miR-47 , and miR-481b in NALM6 cell line [J]. *J Cell Biochem* ,2019 ,120 (8) : 13156 – 67.
- [8] Yazdi N ,Houshmand M ,Atashi A , et al. Long noncoding RNA PVT1: potential oncogene in the development of acute lymphoblastic leukemia [J]. *Turk J Biol* ,2018 ,42(5) : 405 – 13.
- [9] Krauss S ,Nalavade R ,Weber S , et al. Upregulation of miR-25 and miR-481 family members correlates with reduced expression of ATXN3 in lymphocytes from SCA3 patients [J]. *MicroRNA* ,2019 ,8(1) : 76 – 85.

Long non-coding RNA PVT1 regulates cell proliferation and metastasis through miR-17-5p in hepatocellular carcinoma

Cui Shimeng ,Du Jian ,Luo Haifeng , et al

(Dept of General Surgery ,The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University ,Dalian 116011)

Abstract **Objective** To elucidate the role of long non-coding RNA (lncRNA) ,a novel tumor regulator ,PVT1 in hepatocellular carcinoma (HCC) . **Methods** According to the analysis of TCGA database ,PVT1 was highly expressed in HCC. Transient transfection was used to construct PVT1 knockdown cell lines. CCK-8 assay and scratch assay were used to evaluate the ability of cell growth and metastasis. Bioinformatics prediction and luciferase assay were used to validate the targeted binding of PVT1 to miR-17-5p. The co-transfection experiment was used to verify the effect of PVT1 on proliferation and metastasis through miR-17-5p. **Results** The results showed that PVT1 was highly expressed in HCC tissues and cell lines. Knockdown of PVT1 decreased the ability of cells proliferation and metastasis. Luciferase assay confirmed that PVT1 could bind to miR-17-5p ,and miR-17-5p mediated the effect of PVT1 on the proliferation and metastasis of HCC cells. **Conclusion** lncRNA PVT1 can enhance the proliferation and metastasis of HCC cells through miR-17-5p. The above results indicate the important role of PVT1 in HCC and provide a good prospect for future targeted therapy.

Key words PVT1; miR-17-5p; hepatocellular carcinoma; metastasis; proliferation