

网络出版时间: 2018-8-10 15:54 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.001.html>

◇基础医学研究◇

p53 通过调控长链非编码 RNA lncRNAp53urlnc 对舌鳞癌细胞的影响

周洁^{1,2} 朱友明^{1,2} 邹多宏^{1,2}

摘要 目的 研究长链非编码 RNA(lncRNA) 与 p53 的表达之间的关系以及敲低 lncRNAp53urlnc 对舌鳞癌细胞(SCC3) 的影响。方法 在 SCC3 细胞中分别敲低和过表达 p53 后, 分别提取各组 RNA 和蛋白, Western blot 法检测 p53 蛋白的表达, 实时定量 PCR(qRT-PCR) 技术检测 lncRNAp53urlnc 的表达。构建 shlncRNAp53urlnc 载体, 包装病毒, 并感染 SCC3 细胞, qRT-PCR 检测转染效率, 采用 MTT 法、集落形成试验检测 shlncRNAp53urlnc 对 SCC3 细胞生长影响。结果 p53 敲低使 lncRNAp53urlnc 表达明显下调, p53 过表达使 lncRNAp53urlnc 上调; 敲低 lncRNAp53urlnc 表达促进 SCC3 细胞增殖。结论 p53 通过正调控 lncRNAp53urlnc 抑制 SCC3 细胞增殖。

关键词 长链非编码 RNA; lncRNAp53urlnc; p53

中图分类号 R 739; R 730

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)10-1489-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.001

非编码 RNA(noncoding RNA) 是人类基因中不编码蛋白质的 RNA, 是人类基因转录过程中不可缺少的一部分, 主要包括短链、中链、长链非编码 RNA^[1]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) 是指长度大于 200 nt 的非编码蛋白, 是非编码 RNA 的重要组成部分, 由于其特定的位置及功能, 近年来越来越多的实验证明可以运用 lncRNA 作为肿瘤的生物标志物和治疗的靶向^[2]。p53 是一种重要的抑癌基因, 自 1979 年被首次报道以来, p53 作为抑癌基因的功能逐渐被揭示, 且有研究^[3] 显示 lncRNA 的一部分与 p53 基因通路相一致, 这暗示着 lncRNA 与 p53 基因在细胞水平上存在联系。鉴于

此, 本课题组运用基因芯片技术筛选了一个表达受 p53 正调控的新 lncRNA(ENST00000437008), 命名为 lncRNAp53urlnc(p53 upregulated lncRNA), 作为研究对象。该研究主要是为了验证 p53 和 lncRNAp53urlnc 之间的关系, 探讨其对舌鳞癌细胞的影响, 希望为临床应用提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞 人舌鳞癌细胞系 SCC3、人胚胎肾细胞系 293T、大肠杆菌 DH5 α 均由安徽医科大学口腔医学实验室提供和保存。

1.2 主要试剂和仪器 高糖 DMEM、胎牛血清(美国 Gibco 公司); PBS 缓冲液(美国 Solarbio 公司); 胰蛋白酶、嘌呤霉素四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 试剂(美国 Sigma 公司); 慢病毒包装试剂(上海和元技术有限公司); 蛋白定量试剂盒、CO₂ 恒温孵箱(美国 Thermo 公司); shlncRNAp53urlnc 质粒、shctrl 质粒、PCR 引物(上海生工生物工程股份有限公司); actin 抗体、p53 抗体(美国 Santa Cruz 公司); 山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司); RNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司); 逆转录试剂盒、qRT-PCR 试剂(日本 TaKaRa 公司); DNA 片段回收试剂盒、质粒提取试剂盒(美国 Axygen 公司); 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(上海碧云天生物技术有限公司); 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene 公司); 落地恒温振荡器(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 应用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液培养 SCC3 和 293T 细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温恒湿培养箱内培养。当细胞增殖融合达培养皿 80% 时, 使用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 按 1 × 10⁴/cm² 密度传代培养。取生长状态良好的 SCC3 和 293T 细胞用于本研究。

1.3.2 药物处理 为了寻找到新的受 p53 调控的 lncRNA, 本课题组对含有 p53 诱导上调系统的 H1299 细胞进行基因芯片分析(H1299 细胞以及相

2018-04-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 31501103)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

² 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究中心
实验室, 合肥 230032

作者简介: 周洁, 女, 硕士研究生;

邹多宏, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zdhy@ahmu.edu.cn

应的基因芯片分析由中国科学技术大学吴缅实验室完成与提供),发现了大量的受 p53 诱导上调和下调的 lncRNA。本课题组对其中上调和下调倍数较高的 lncRNA 进行了验证,其中一条 lncRNA (ENST00000437008) 上调变化倍数较明显,本课题组将其命名为 lncRNAp53urlnc (p53 upregulated lncRNA),lncRNAp53urlnc 是一个位于 3 号染色体长度为 838 bp 的长片段非编码 RNA,lncRNAp53urlnc 共含有 5 个外显子。收集生长状态良好的对数期 H1299 细胞,制成细胞悬液,以 1×10^6 个/孔细胞数接种到 6 孔板继续培养。次日,使用含 $1 \mu\text{g/ml}$ 盐酸阿霉素的 PBS 处理 H1299 细胞,分别于 0、6、12 h 收集相应时间点获取 H1299 细胞的 RNA 和蛋白,使用 Western blot 法检测细胞中 p53 的表达,使用 qRT-PCR 检测细胞中 lncRNAp53urlnc 的表达。

1.3.3 重组质粒载体的构建 本实验主要使用 polk.1 和 flag 质粒载体构建 6 个质粒载体,具体分为以下 3 组: ① plko.1-shp53 及 plko.1-shp53-ctrl (中国科学技术大学吴缅实验室获取); ② flag-p53 及 flag 空载体(中国科学技术大学吴缅实验室获取); ③ plko.1-shlncRNAp53urlnc 及 plko.1-shlncRNAp53urlnc-ctrl。载体引物由上海生工技术服务有限公司设计和合成。Sh-lncRNAp53urlnc-1 与 Sh-lncRNAp53urlnc-2 序列如下: Sh-lncRNAp53urlnc-1: 5'-CCGGTATGGGAGGTCTCTGAGATCTCGAGATCTCAGAGACCTCCCATATTTTTG-3'; Sh-lncRNAp53urlnc-2: 5'-AATTCAAAAATATGGGAGGTCTCTGAGATCTCAGATCTCAGAGACCTCCCATATA-3'。

1.3.4 慢病毒包装和转染 SCC3

1.3.4.1 慢病毒包装 收集对数期生长状态良好的 293T 细胞,选择合适的密度接种于 6 孔板上,带细胞增殖融合至培养皿 50% 时,分别取携带上述目的基因片段的载体 ($2 \mu\text{g}$) 和病毒包装质粒 ($2 \mu\text{g}$ pGag、 $2 \mu\text{g}$ pRev、 $1 \mu\text{g}$ pVsvg) 共转染 293T 细胞,完全培养基培养 48 h,收集上清液, $0.45 \mu\text{m}$ PVDF 滤器过滤,分装, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱储存。

1.3.4.2 慢病毒转染 转染前 1 d,收集对数期生长状态良好的 SCC3 细胞,选择合适的密度接种于 6 孔板上,带细胞增殖融合至培养皿 30% 时,加入各病毒液以及 $2 \mu\text{l}$ 的 $8 \mu\text{g/ml}$ polybrene,孵育 4 h 后加入嘌呤霉素筛选 1~2 周。

1.3.5 qRT-PCR 检测 慢病毒转染后,分别提取转染后各组 SCC3 细胞中的总 RNA,进行 qRT-PCR 定量检测各组 lncRNA 的表达水平。使用 TRIzol 提

取试剂盒,按操作指南,分别提取各组细胞的总 RNA。采用 PrimeScript™ RT-PCR kit 逆转录试剂盒合成相应 cDNA。qRT-PCR 检测 lncRNAp53urlnc 和 actin 基因的相对表达量,实时定量仪检测。所有测定进行 3 次重复。所有 PCR 引物由上海生工生物工程公司进行设计,引物序列见表 1。

表 1 基因扩增引物列表

目的基因	引物序列(5'-3')
lncRNAp53urlnc	F: AGAAAATTATGGCATGCCGTT
	R: CAGCTGGTATCATATCTCAGA
	F: CTGGAACGGTGAAGGTGACA
actin	R: AAGGGACTTCCTGTAACAATG

1.3.6 Western blot 检测 慢病毒转染后,分别于第 3 天收集细胞,PBS 液离心漂洗细胞 3 次。使用 RIPA 蛋白裂解液提取蛋白,BCA 试剂盒测定各样本蛋白的浓度,选择 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。根据蛋白分子量的大小选择电泳时间,然后转膜至 PVDF 膜。5% 脱脂蛋白在室温下封闭 2 h 后,将膜在 p53 和 actin 特异性一抗中 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。TBST 清洗 3 次,加入对应二抗,室温孵育 1 h,TBST 清洗 3 次。发光检测仪曝光后收集相应发光信号,分析各组 p53 相对表达量。所有测定进行 3 次重复。

1.3.7 MTT 法检测 选择对数生长期状态良好的 SCC3 细胞分别转染 shlncRNAp53urlnc 和 shctrl 后,按 2×10^3 个/孔均匀接种于 96 孔板,每组设 3 个复孔,每孔加入 $200 \mu\text{l}$ 的 DMEM 培养液,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 恒温恒湿培养箱中,分别培养 0、6、12、24、48、72 h 后,加入 MTT (5 mg/ml) $20 \mu\text{l}$ /孔,继续培养 4 h 后吸去孔内培养液,加入 DMSO $150 \mu\text{l}$ /孔,避光低速震荡 10 min。使用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度值,绘制各组细胞生长曲线。所有测定进行 3 次重复。

1.3.8 集落形成实验检测 选取生长状态良好的对数期 shlncRNAp53urlnc 和 shctrl 组的 SCC3 细胞,常规消化传代,细胞计数后调整细胞浓度,以 3×10^2 个/孔接种于 6 孔板中,每孔加含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液 2 ml,培养 14 d。吸去培养液,PBS 清洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定 15 min 后使用 1% 结晶紫染色液染色 4 h,清洗晾干,肉眼观察,拍照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析与 q 检验,实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意

义。

2 结果

2.1 p53 上调 lncRNAp53urlnc 表达 阿霉素处理 H1299 细胞后,分别获取 H1299 细胞的 RNA 和蛋白,使用 Western blot 法检测细胞中 p53 的表达,使用 qRT-PCR 法检测细胞中 lncRNAp53urlnc 的表达。经过 0、6、12 h 梯度时间点显示,p53 和 lncRNAp53urlnc 的表达均随着时间而增大,与芯片结果一致。见图 1。

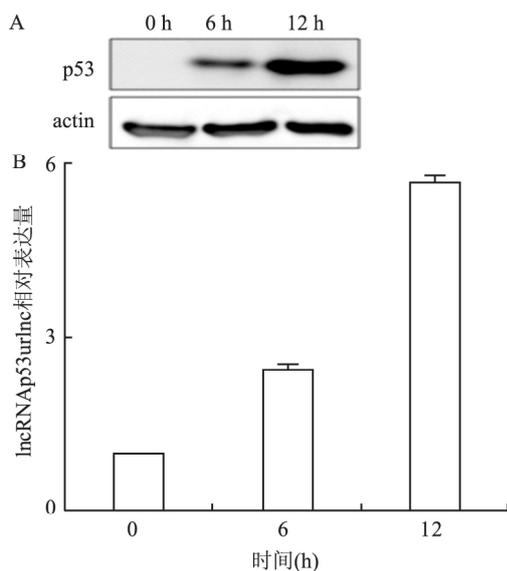


图1 阿霉素处理 H1299 细胞后 p53 和 lncRNAp53urlnc 的变化

A: 加入阿霉素后 p53 的表达情况; B: 加入阿霉素后 lncRNAp53urlnc 的表达情况

2.2 敲低和过表达 p53 对 SCC3 细胞中 lncRNAp53urlnc 表达的影响 为了研究 lncRNAp53urlnc 与口腔癌的关系,本课题组包装 shctrl 和 shp53 病毒,并分别感染 SCC3 细胞,使用 Western blot 法检测细胞中 p53 的表达,qRT-PCR 法检测细胞中 lncRNAp53urlnc 的表达。结果显示,shp53 组 p53 表达明显低于 shctrl 组,同时 shp53 组 lncRNAp53urlnc 的表达也明显低于 shctrl 组 (shp53 组: 0.283 ± 0.419 , shctrl 组: 1.030 ± 0.638 , $F = 217.558$, $P = 0.001$),见图 2; flag 空载体和 flag-p53 转染 SCC3 细胞后,使用 Western blot 法检测细胞中 p53 的表达,qRT-PCR 法检测细胞中 lncRNAp53urlnc 的表达,结果显示: flag-p53 组 p53 表达水平明显高于 flag 组,同时 flag-p53 组 lncRNAp53urlnc 的表达水平也明显高于 flag 组 (flag-p53 组: 4.725 ± 0.188 , flag 组: 1.021 ± 0.970 , $F =$

851.028 , $P < 0.001$),见图 3。以上结果表明: lncRNAp53urlnc 的表达与 p53 呈正相关性。

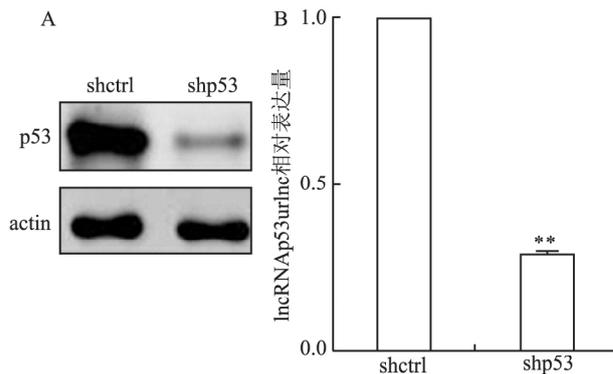


图2 敲低 p53 表达对 SCC3 细胞中 lncRNAp53urlnc 表达的影响

A: shctrl 组和 shp53 组 p53 蛋白的表达; B: shctrl 组和 shp53 组 lncRNAp53urlnc 的表达; 与 shctrl 组比较: ** $P < 0.01$

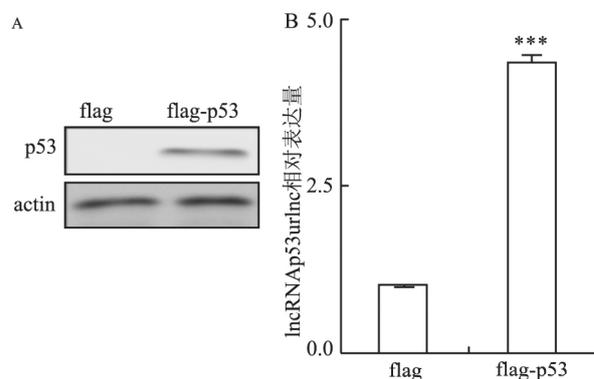


图3 过表达 p53 对 SCC3 细胞中 lncRNAp53urlnc 表达的影响

A: flag 组和 flag-p53 组 p53 蛋白的表达; B: flag 组和 flag-p53 组 lncRNAp53urlnc 的表达; 与 flag 组比较: *** $P < 0.001$

2.3 shlncRNAp53urlnc 干扰 lncRNAp53urlnc 的表达 使用 qRT-PCR 法检测 shlncRNAp53urlnc 组和 shctrl 组中 lncRNAp53urlnc 的表达水平,结果显示 shlncRNAp53urlnc 组 lncRNAp53urlnc 的水平明显低于 shctrl 组 ($F = 191.201$, $P < 0.05$)。这表明 shlncRNAp53urlnc 成功下调 lncRNAp53urlnc 的表达。见图 4。

2.4 shlncRNAp53urlnc 对 SCC3 细胞生长的影响

MTT 细胞增殖实验检测感染 shlncRNAp53urlnc 病毒后 SCC3 细胞增殖能力,结果显示 shlncRNAp53urlnc 组细胞增殖速度明显高于 shctrl 组。采用集落形成实验来检测 shlncRNAp53urlnc 组 SCC3 细胞集落形成能力,经过 14 d 显示: shlncRNAp53urlnc 组细胞形成的集落数量明显高于 shctrl

组($F = 111.722, P < 0.05$)。结果表明:敲低 SCC3 细胞中 lncRNAp53urlnc 的表达可以促进细胞增殖生长。见图 5、6。

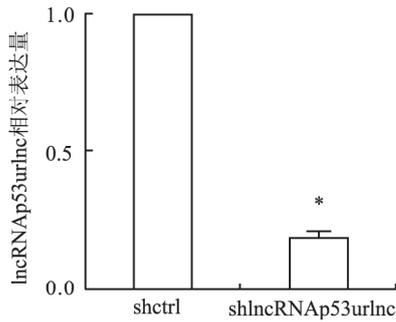


图4 转染 shlncRNAp53urlnc 目的基因后对 SCC3 细胞中 lncRNAp53urlnc 表达的影响与 shctrl 组比较: * $P < 0.05$

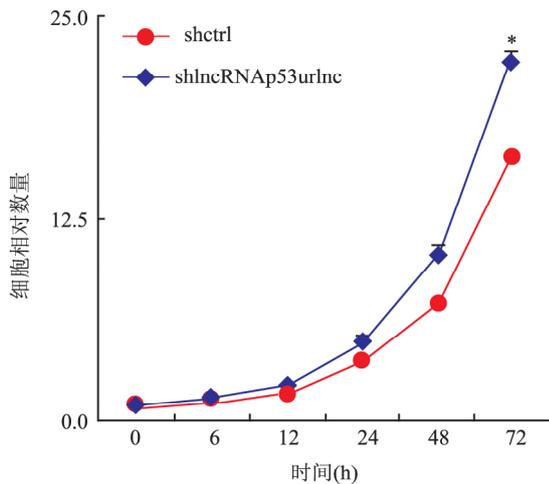


图5 MTT 法检测 shlncRNAp53urlnc 组 SCC3 细胞数量的变化与 shctrl 组比较: * $P < 0.05$

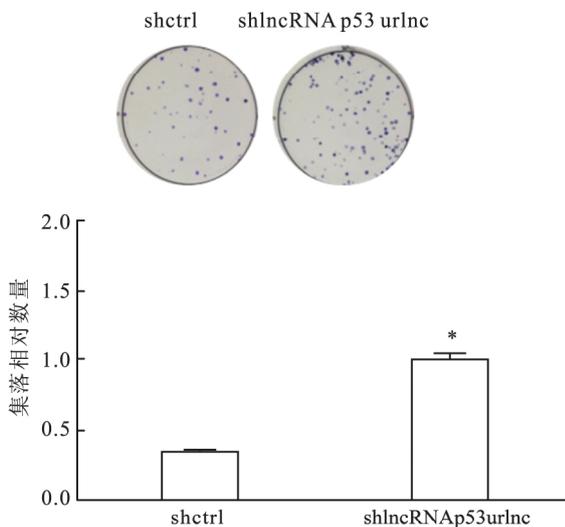


图6 集落形成实验检测 shlncRNAp53urlnc 组 SCC3 细胞集落情况与 shctrl 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

p53 作为重要的肿瘤抑制基因,可能通过抑制与 DNA 复制相关的细胞基因或基因产物而发挥作用,包括阻滞细胞周期、促进细胞凋亡、维持基因组稳定、抑制肿瘤血管生成等。长链非编码 RNA (lncRNA) 是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA。研究^[3]表明,lncRNA 在剂量补偿效应、表观遗传调控、细胞周期调控和细胞分化调控等众多生命活动中发挥重要作用,lncRNA 参与了 X 染色体沉默、基因组印记以及染色质修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等多种重要的调控过程,其表达或功能异常与癌症、退行性神经疾病等关系密切,具体表现在序列和空间结构上的异常、表达水平的异常、与结合蛋白相互作用的异常等。研究^[3]显示 lncRNA 和 p53 信号通路存在显著的相关性。

p53 的反应过程是一个快速的活化过程,并且对细胞存亡有着精密的调控机制,受多种因素调控,例如蛋白质和 RNA 等。p53 蛋白的翻译后调控是控制 p53 活化结果的一个重要因素^[4-6]。调控 p53 的一个关键因素就是 MDM2 蛋白,可以通过泛素蛋白酶途径结合 p53 来控制自身的稳定性^[7-8]。这样的磷酸化结果可以通过抑制 p53 泛素化来维持 p53 的稳定,并且特定残基的磷酸化也许是调节 p53 激活的一条重要途径^[9-10]。除了蛋白质,其他类型的调控分子也可以参与 p53 的调控,例如 microRNA^[7]。目前多种肿瘤研究表明,功能性长链非编码 RNA 与 p53 存在着密切联系。

长链非编码 RNA 主要存在于细胞核与细胞质中的一类 RNA,通过将染色质复合物调节到合适的目的基因序列中来实现可调节的特异性^[10]。lncRNA 可以调节转录过程,调节细胞周期,部分 lncRNA 可以与基因沉默有关的染色质修饰物结合来调节转录抑制,如 Polycomb 组(PCG)蛋白、组蛋白 H3 赖氨酸 9(H3K9 甲基化,组蛋白赖氨酸甲基化酶)等;另一方面,部分 lncRNA 可以通过与表观遗传活化因子的相互作用来促进转录激活,如 H3K4 甲基转移酶 MLL1 复合物^[11]。lncRNA-p21 是最早发现的影响 p53 转录的核心组件之一,研究^[12]显示 lncRNA 下调和抑制 p53 所产生的基因库存在大部分的重叠,这就说明 lncRNA-p21 是抑制 p53 表达的主要 RNA,此类 RNA 主要抑制核糖核蛋白 K(hnRNP K)这类蛋白是在 p53 信号通路中作为阻遏基因,与相关基因结合从而抑制 p53 的合成。ln-

lncRNA 以往一直作为癌基因或抑癌基因来研究,但近年来越来越多的实验^[3]证明 lncRNA 和 p53 信号通路存在显著的相关性。大量研究^[13]已证实 p53 可以诱导促进 lncRNA 的生成,而 lncRNA 也可以通过结合特殊位点影响染色质的构象来促进 p53 的表达。lncRNA 与 p53 的相互作用可以进一步抑制肿瘤细胞的生长。

舌鳞癌是口腔鳞状细胞癌中最常见的一种肿瘤。鉴于 p53 和 lncRNA 对肿瘤特殊作用,本课题组进行了本研究并加以验证。实验表明:细胞在用阿霉素诱导后,p53 表达逐渐上调,同时伴随着 lncRNAp53urlnc 的上调。构建重组基因载体,分别敲低和过表达 SCC3 细胞中的 p53 基因,结果显示,敲低 p53 表达时,lncRNAp53urlnc 水平下调;过表达 p53 基因时,lncRNAp53urlnc 水平上调,证实 lncRNAp53urlnc 与 p53 水平呈正相关性。进一步实验显示敲低 lncRNAp53urlnc 可以 SCC3 促进细胞增殖。因此,可以得出结论,p53 通过正调控 lncRNAp53urlnc 来抑制 SCC3 细胞的增殖。但 lncRNAp53urlnc 是如何受 p53 基因调控的分子机制仍有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells[J]. *Nature*, 2012, 489 (7414): 101–8.
[2] Sanchez Y, Huarte M. Long non-coding RNAs: challenges for diag-

- nosis and therapies[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2013, 23 (1): 15–20.
[3] Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals[J]. *Nature* 2009, 458 (7235): 223–7.
[4] Appella E, Anderson C W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses[J]. *Eur J Biochem* 2001, 268 (10): 2764–72.
[5] Bode A M, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4 (10): 793–805.
[6] Kruse J P, Gu W. SnapShot: p53 posttranslational modifications[J]. *Cell* 2008, 133 (5): 930.
[7] Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression[J]. *Nat Rev Cancer* 2012, 12 (9): 613–26.
[8] Guttman M, Donaghy J, Carey B W, et al. LincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation[J]. *Nature*, 2011, 477 (7364): 295–300.
[9] Oda K, Arakawa H, Tanaka T, et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53[J]. *Cell* 2000, 102 (6): 849–62.
[10] Bulavin D V, Saito S, Hollander M C, et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation[J]. *EMBO J*, 1999, 18 (23): 6845–54.
[11] Schaukowitz K, Kim T K. Emerging epigenetic mechanisms of long non-coding RNAs[J]. *Neuroscience*, 2014, 264: 25–38.
[12] Kim K, Choi J, Heo K, et al. Isolation and characterization of a novel H1.2 complex that acts as a repressor of p53-mediated transcription[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (14): 9113–26.
[13] Sánchez Y, Segura V, Marín-Béjar O, et al. Genome-wide analysis of the human p53 transcriptional network unveils a lncRNA tumour suppressor signature[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5812.

Effect of p53 on tongue squamous cell carcinoma cells through regulation of long chain noncoding RNA lncRNAp53urlnc

Zhou Jie^{1,2} Zhu Youming^{1,2} Zou Duohong^{1,2}

(¹Stomatologic College of Anhui Medical University Hefei 230032;

²The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the relationship between the long non-coding RNA (lncRNA) and the expression of p53 and the effect of knocking down lncRNAp53urlnc in tongue squamous cell carcinoma (SCC3). **Methods** The expression of p53 in SCC3 cells was knocked down and overexpressed, and then the RNA and protein of each group was collected. The expression of p53 protein was detected by Western blot and the expression of lncRNAp53urlnc was detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). shlncRNAp53urlnc lentiviral vector was constructed, and then shlncRNAp53urlnc lentiviral vector was transfected into SCC3 cells, the efficiency of the vector was detected by qRT-PCR. The proliferation of SCC3 cells was detected by MTT and colony forming assay. **Results** p53 knockdown reduced the expression of lncRNAp53urlnc significantly and p53 overexpression significantly increased lncRNAp53urlnc. Knockdown the expression of lncRNAp53urlnc can promote the proliferation of SCC3 cell. **Conclusion** lncRNAp53urlnc inhibits the proliferation of SCC3 cell, which is positive regulated by p53.

Key words long non-coding RNA; lncRNAp53urlnc; p53