

c-Myc 调控长链非编码 RNA7 对舌鳞癌细胞增殖的影响

徐艳雪^{1,2} 韩瞳瞳^{1,2} 朱友明^{1,2} 陈乔尔^{1,2}

摘要 目的 探究由 c-Myc 调控的长链非编码 RNA7 (lncRNA7) 对舌鳞癌细胞增殖的作用。方法 Western blot 检测 pLKO.1-shc-Myc 和 Flag-c-Myc 分别转染至舌鳞癌 SCC3 细胞中原癌基因 c-Myc 的表达情况,qRT-PCR 检测下调或上调 c-Myc 对 lncRNA7 表达水平的影响。将构建的 pLKO.1-shlncRNA7 表达载体转染入 SCC3,获取低表达 lncRNA7 的细胞。MTT 法和细胞克隆实验分别检测敲低 lncRNA7 后对 SCC3 细胞生长和增殖的影响。荧光原位杂交实验检测 lncRNA7 在细胞中的定位。结果 成功下调或上调 SCC3 细胞中 c-Myc 表达,lncRNA7 水平也随之降低或升高。成功敲低 SCC3 细胞中 lncRNA7 表达,SCC3 细胞生长减慢,克隆数量减少。荧光原位杂交实验结果证明 lncRNA7 定位于舌鳞癌细胞 SCC3 的胞质中。结论 敲低受 c-Myc 正调控的 lncRNA7 表达能抑制舌鳞癌细胞增殖,表明 lncRNA7 可能成为舌鳞癌潜在的治疗靶点。

关键词 c-Myc; 长链非编码 RNA7; 舌鳞癌; 细胞增殖

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)09-1354-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.007

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类不具有蛋白编码功能的 RNA 分子,其转录物长度大于 200 个核苷酸。研究显示,lncRNA 是胚胎发生^[1]、干细胞生物学和细胞发育^[2]及癌症进展^[3]中至关重要的调节因子。c-Myc 是一种较早被证实的癌基因,能与一些蛋白编码或非编码 RNA 的启动子调节区域结合,促进细胞分裂,使细胞永生,在多种人类肿瘤的检测中都能发现其表达升高。因此,为了在舌鳞癌中识别参与 c-Myc 功能调控的 lncRNAs,该研究使用携带 c-Myc tet-off 系统的 SCC3 舌鳞癌细胞进行基因芯片分析。经过初步筛选,发现敲低 c-Myc 表达水平,一种新基因 lncRNA7 (lncRNA-RP11-432A1.4,位于 chr7: 100,951,626-400,954,266,序列名称 ENST00000419422) 的表达显著

下调。该实验旨在探究敲低受 c-Myc 调控的 lncRNA7 后,观察舌鳞癌细胞 SCC3 增殖的变化,从而为舌鳞癌的分子靶向治疗提供新契机。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 人源 SCC3 舌鳞癌细胞和人源 293T 胚胎肾细胞均为安徽医科大学口腔实验室保种;DMEM 培养液、青链霉素溶液、胎牛血清、PBS、胰酶溶液购自 GIBCO 公司和 Hyclone 公司;大肠杆菌 DH5 α 为本实验室传代保存;1% 氯化钠、1% 蛋白胨、0.5% 酵母提取物购自上海生工生物工程股份有限公司;慢病毒包装试剂购自上海和元技术有限公司;PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;actin 抗体、c-Myc 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;RNA 提取试剂盒购自美国 Promega 公司;逆转录试剂盒、QRT 反应试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒购自美国 Axygen 公司;蛋白质定量试剂盒购自美国 Thermo 公司;MTT 试剂购自美国 Sigma 公司;DEPC 无酶水,DMSO 试剂购自上海碧云天科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 SCC3 细胞和 293T 细胞分别培养在含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 溶液中,并置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。隔天换液,依据细胞生长情况适时进行传代及冻存,后续实验备用。

1.2.2 载体构建 下调 c-Myc 表达的 pLKO.1-shc-Myc 组及 pLKO.1-shc-cMyc-ctrl 对照组、上调 c-Myc 表达的 Flag-c-Myc 组及 Flag 对照组载体均由中国科学技术大学生命科学院提供。shlncRNA7 载体引物由上海生工技术有限公司设计和合成,扩增得到目的片段 shlncRNA7 F: 5'-CCGGGAAAGGG AAGAAGTCCTCGAGGAGGACTTCTTCCCTTTCC TTTTTG-3', R: 5'-AATTCAAAAAGGAAAGGGAAGAA GTCCTCCTCGAGGAGGACTTCTTCCCTTTC-C-3'。将上述扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离、纯化产

2018-04-25 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH155)

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重点实验室,合肥 230032

作者简介: 徐艳雪,女,硕士研究生;

陈乔尔,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: chqe0111@163.com

物,回收目的片段。限制性内切酶酶切载体 pLKO.1, T4 连接酶在 37 °C 水浴中将目的片段与载体连接,将连接产物转入感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂于氨苄抗性的 LB 固体培养基平板上,37 °C 倒置培养 14 h。选取阳性菌落送公司测序鉴定,证实构建成功。

1.2.3 慢病毒包装与转染 根据实验需要,以上已构建好的携带 pLKO.1-shc-Myc、Flag-c-Myc、pLKO.1-shlncRNA7 的载体均需分别进行慢病毒包装与转染。病毒包装过程中将 2 μ g 携带目的基因的载体以及 3 种包装辅助质粒包括 2 μ g pREV、2 μ g pGag 和 1 μ g pVSVG 共同转染入 293T 细胞(293T 细胞在转染前先接种于 6 孔板中,待密度达到 50%~60% 时进行转染,转染前 1 h 更换新鲜培养基),于不含血清的 DMEM 溶液中培养 6 h,再更换为含有 20% 胎牛血清的 DMEM 溶液,收集 48、72 h 含有病毒的细胞上清液保存于 -80 °C 中。转染 SCC3 细胞前一天胰蛋白酶消化细胞,取适量接种于 6 孔板中,密度 15% 左右,待第 2 天 SCC3 密度达 30% 左右再将以上收集到的含病毒的细胞上清液转入,每孔同时加入 8 mg/L 的 Polybrene 2 μ l。8 h 后更换新鲜培养基,48 h 后接种至 6 孔板,待细胞生长到密度大约 70% 时加入 5 mg/L 嘌呤霉素筛选,24 h 后观察细胞凋亡情况;再吸取上清液,更换新的选择性培养液。在加药筛选 2~3 周情况下能存活的 SCC3 细胞即为转染成功的细胞,死亡的细胞即为未转染成功的细胞。对存活的细胞进行克隆和扩大培养,培养至适当规模时,收集该单克隆抗药细胞。

1.2.4 Western blot 检测 c-Myc 的蛋白表达 SCC3 细胞分为 pLKO.1-shc-Myc-ctrl 对照组、pLKO.1-shc-Myc 组、Flag 对照组和 Flag-c-Myc 组。每组加入 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,分别收集裂解液至 1.5 ml Ep 管中。BCA 法定量测样品的蛋白浓度,每组取等量的蛋白样品,SDS-PAGE 电泳,转膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,TBST 洗膜,每组分别加入 c-Myc 抗体(货号 CST9402,1:1 000 稀释)4 °C 孵育过夜,TBST 清洗 3 次,加入相应二抗室温孵育 1.5 h,TBST 再清洗 3 次,底物化学发光检测法显影。

1.2.5 qRT-PCR 检测 lncRNA7 的表达水平 用 TRIzol 分别提取稳定转染 pLKO.1-shc-Myc 组、pLKO.1-shc-Myc-ctrl 对照组、Flag-c-Myc 组、Flag 对照组、pLKO.1-shlncRNA7 组及 pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组的 SCC3 细胞中的总 RNA。利用 Prime-ScriptTM RT Master Mix 逆转录试剂盒获得 cDNA,-20 °C 保存备用。lncRNA7 引物 F: 5'-GGAAAGG-

GAAGAAGTCCTCCC-3', R: 5'-TCCACAATTCTCTA-TATGACA-3'。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环。以 GAPDH 作为分子内参,待反应完毕以 $\Delta\Delta C_t$ 值来分析各组的结果。pLKO.1-shc-Myc-ctrl 对照组 SCC3 细胞中 lncRNA7 表达量的均数设为 1,计算出 pLKO.1-shc-Myc 组 SCC3 细胞中 lncRNA7 的相对表达量; Flag 对照组 SCC3 细胞中 lncRNA7 表达量的均数为 1,计算出 Flag-c-Myc 组 SCC3 细胞中 lncRNA7 的相对表达量; pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组 SCC3 细胞中 lncRNA7 表达量的均数设为 1,计算 pLKO.1-shlncRNA7 组 SCC3 细胞中 lncRNA7 的相对表达量。

1.2.6 MTT 实验检测 SCC3 细胞生长 将 pLKO.1-shlncRNA7 组和 pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组的 SCC3 细胞接种于 96 孔板,密度为 2×10^3 个/孔,在 0、6、12、24、48、72 h 的 6 个时间点弃原培养液,每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μ l,37 °C 培养 4 h,再弃培养液,每孔新加入 150 μ l 的 DMSO,振荡 10 min,酶标仪 570 nm 处测定各孔的吸光度(OD)值。

1.2.7 细胞克隆实验检测 SCC3 细胞增殖 将 pLKO.1-shlncRNA7 组和 pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组 SCC3 细胞分别接种于 6 孔板,密度为 300 个/孔,培养 10 d。4% 多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 4 h,TBST 清洗。

1.2.8 荧光原位杂交技术检测 lncRNA7 的定位 将细胞标本放在含 10% 固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)的 1 $\times$ PBS 中 5 min 进行预变性。将玻片标本浸入固定液中 2 次,每次 10 min,再将标本依次经体积分数为 70%、90% 和 100% 的冰乙醇,然后干燥。湿盒中倒入 50% 甲酰胺/2 $\times$ SSC 50 ml,37 °C 预热。以地高辛标记 DNA 探针,序列为 ACTCAAT-TCAAATATTTAATGGGTTGTACTCTGGCCATTCAGG-TGAACAAAATCTGCTGG 孵育探针,80 °C 变性 10 min。变性好的样本于湿盒中 37 °C 杂交过夜。次日,将已杂交的玻片标本置于 42~50 °C 体积分数为 50% 甲酰胺/2 $\times$ SSC 中洗涤 3 次,每次 5 min。2 $\times$ SSC 室温下清洗玻片标本。细胞核 Hoechst 染色 1 min,2 $\times$ SSC 洗涤 2 次,指甲油封闭盖片,荧光显微镜下拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间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 不同表达载体转染 SCC3 细胞后 c-Myc 蛋白的表达 将构建好的载体 pLKO.1-shc-Myc 组及其 pLKO.1-shc-Myc-ctrl 对照组转染入 SCC3 细胞,通过 Western blot 检测 c-Myc 蛋白表达情况。结果表明,与 pLKO.1-shc-Myc-ctrl 对照组相比, pLKO.1-shc-Myc 组中 c-Myc 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 同样,将构建好的载体 Flag-c-Myc 及其 Flag 对照组转染入 SCC3 细胞,通过 Western blot 检测 c-Myc 蛋白表达情况。结果表明,与 Flag 对照组相比, Flag-c-Myc 组中 c-Myc 表达水平明显升高 ($P < 0.05$),见图 1。

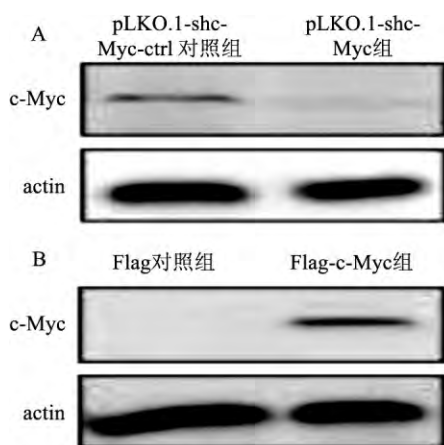


图 1 c-Myc 蛋白表达情况

A: pLKO.1-shc-Myc 组和 pLKO.1-shc-Myc-ctrl 对照组转染入 SCC3 细胞后细胞中 c-Myc 的蛋白表达; B: Flag-c-Myc 组和 Flag 对照组转染入 SCC3 细胞后 c-Myc 的蛋白表达

2.2 c-Myc 表达水平对 lncRNA7 表达的影响 利用 qRT-PCR 检测上述成功表达 shc-Myc 的 SCC3 细胞中 lncRNA7 的表达水平。结果表明,与 pLKO.1-shc-Myc-ctrl 对照组相比, pLKO.1-shc-Myc 组 lncRNA7 的表达水平下降 ($F = 132.589$, $P < 0.05$); 同样,利用 qRT-PCR 检测上述成功过表达 c-Myc 的 SCC3 细胞中 lncRNA7 的表达水平。结果表明,与 Flag 对照组相比, Flag-c-Myc 组 lncRNA7 的表达水平上升 ($F = 602.91$, $P < 0.05$),见图 2。提示在舌鳞癌细胞 SCC3 中 lncRNA7 受 c-Myc 的正调控。

2.3 pLKO.1-shlncRNA7 转染 SCC3 细胞后 lncRNA7 的表达 将构建好的载体 pLKO.1-shlncRNA7 组及其 pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组转染入 SCC3 细胞,通过 qRT-PCR 检测 lncRNA7 的表达水平。结果表明,与 pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组

相比, pLKO.1-shlncRNA7 组中 lncRNA7 表达水平明显降低 ($F = 278.639$, $P < 0.05$),见图 3。

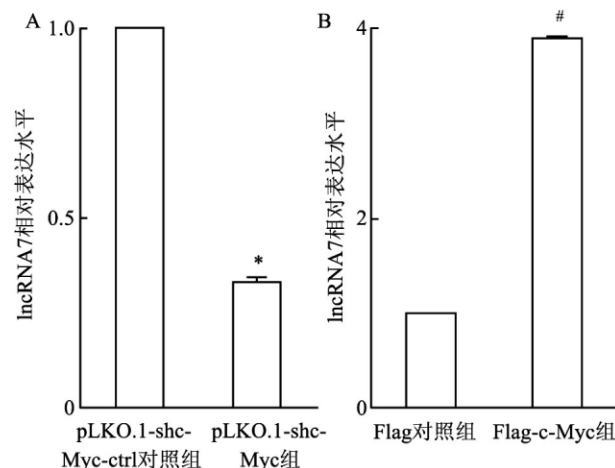


图 2 c-Myc 对 lncRNA7 表达的影响

A: 下调 c-Myc 后 lncRNA7 的表达情况; B: 上调 c-Myc 后 lncRNA7 的表达情况; 与 pLKO.1-shc-Myc-ctrl 对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Flag 对照组比较: # $P < 0.05$

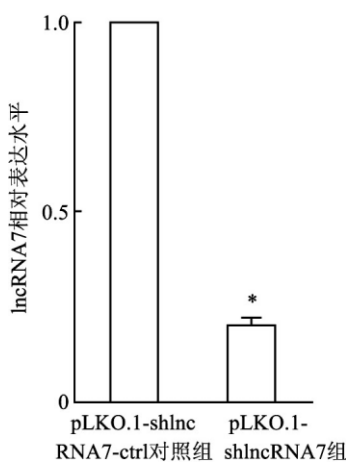


图 3 lncRNA7 表达情况

与 pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 lncRNA7 对 SCC3 细胞生长的影响 利用上述成功表达 shlncRNA7 的 SCC3 细胞进行 MTT 实验。结果表明,与 pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组相比, pLKO.1-shlncRNA7 组在转染 0、6、12、24 h SCC3 细胞生长差异无统计学意义,但转染 48 h 后, pLKO.1-shlncRNA7 组细胞增殖速率明显低于 pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组,且与对照组 SCC3 细胞克隆数差异有统计学意义 ($F = 265.457$, $P < 0.05$),见图 4。

2.5 lncRNA7 对 SCC3 细胞增殖能力的影响 利用上述成功表达 shlncRNA7 的 SCC3 细胞进行细胞

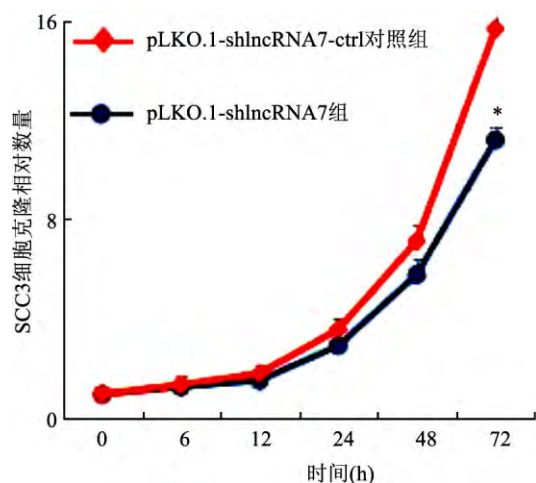


图4 转染 shlncRNA7 后 SCC3 细胞生长情况
与 pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组比较: * $P < 0.05$

克隆实验。结果表明,与 pLKO.1-shlncRNA7-ctrl 对照组相比, pLKO.1-shlncRNA7 组细胞克隆数量明显减少 ($F = 69.120$, $P < 0.05$), 见图 5。

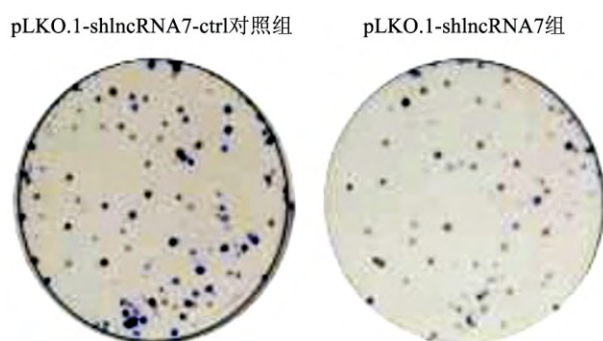


图5 转染 shlncRNA7 后 SCC3 细胞克隆数量情况 结晶紫染色

2.6 lncRNA7 在 SCC3 细胞中的定位 荧光原位杂交实验结果表明 lncRNA7 定位于 SCC3 细胞质中, 见图 6。因此, 可以初步推测 lncRNA7 于细胞质中发挥上述功能。

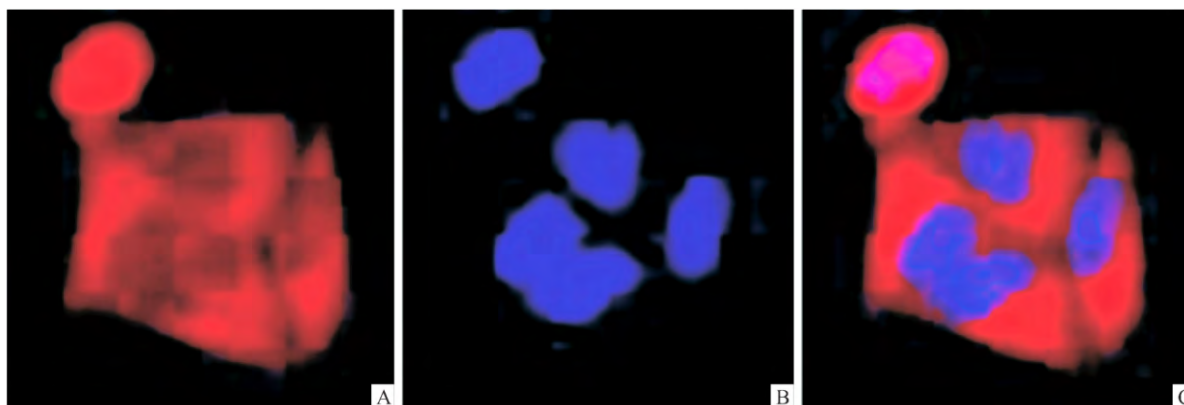


图6 lncRNA7 在细胞中的定位情况 Hoechst 染色 $\times 160$

A: 红色代表 lncRNA7; B: 蓝色代表用 Hoechst 染色的细胞核; C: A 和 B 结合

3 讨论

舌鳞状细胞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤, 具有较高转移率和死亡率^[4]。目前通常采用外科手术联合放疗和化疗等综合手段治疗, 但舌鳞癌患者的 5 年生存率仍然不够理想^[5]。因此, 从基因水平上寻找舌鳞癌潜在的分子机制来改善治疗策略十分必要。

近年来, lncRNA 引起了越来越多学者的关注, 其在肿瘤中的异常表达和突变通过细胞增殖、侵袭和转移促进了肿瘤的发生发展。例如, lncRNA CRNDE 在肝癌细胞中高表达并能促进肝癌进展^[6]; lncRNA LOC554202 在结肠癌中低表达且与 TNM 分期、组织学分级及淋巴结转移等因素相关^[7]。Myc 基因家族是已被发现的一组癌基因。c-Myc 作为 Myc 家族的一员, 通常被认为在细胞周期、增殖、分化和凋亡过程中发挥重要调控作用^[8]。c-Myc 癌基因及其蛋白产物几乎在所有类型恶性疾病中均有表达的升高^[9]。Hu et al^[10]在非小细胞肺癌中通过染色质免疫沉淀等一系列实验证实 c-Myc 可与 lncRNA BCYRN1 基因的启动子区域结合并靶向其上调, 导致细胞运动和侵袭能力增加; 另有研究^[11]显示 lncRNA PCAT-1 能上调 c-Myc 蛋白, 促进前列腺癌细胞增殖, 其通过 Myc 3' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 在转录后水平调控 c-Myc, 并且还观察到 PCAT-1 能够经 miR-34a 干扰 Myc 的调控。因此, 这些证据都表明 c-Myc 与 lncRNA 在肿瘤发生发展中密切相关。然而, 对 c-Myc 相关 lncRNA 在舌鳞癌中作用的研究甚少, 仍有待发展。

本实验通过基因芯片发现了舌鳞癌细胞 SCC3 中受 c-Myc 正调控的 lncRNA7, 并通过下调和上调 c-Myc, 进一步验证其对 lncRNA7 表达水平的影响,

发现 lncRNA7 表达的确受 c-Myc 的正调控。将 SCC3 细胞中敲低 lncRNA7 作为实验组, shctrl 作为对照组进行 MTT 实验, 在最初转染的 0、6、12、24 h, 两组 SCC3 细胞生长基本无差异, 随着时间的延长, 转染 48 h 后开始观察到与对照组相比, shlncRNA7 实验组细胞增殖速率有所降低, 且 SCC3 细胞增殖数与对照组相差也越发显著; 此外, 对两组细胞还进行了细胞克隆实验, shlncRNA7 实验组细胞克隆形成数量明显少于对照组; 通过以上两个实验证实敲低 lncRNA7 可以抑制 SCC3 细胞增殖。最后通过荧光原位杂交实验证实了 lncRNA7 定位于 SCC3 细胞质中, 由此可初步推断敲低 lncRNA7 抑制 SCC3 细胞增殖和克隆是于细胞质中发挥的作用, 这可为进一步探究 lncRNA7 在细胞中的功能提供线索, 也为临床舌鳞癌的基因治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Pauli A, Rinn J L, Schier A F. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(2): 136–49.
- [2] Guttman M, Donaghey J, Carey B W, et al. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation[J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 295–300.
- [3] Gibb E A, Brown C J, Lam W L. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 38.
- [4] Song K B, Liu W J, Jia S S. miR-219 inhibits the growth and metastasis of TSCC cells by targeting PRKCI[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(9): 2957–65.
- [5] Chen J X, Chen J M, Li W Z. MicroRNA-449 targets specificity protein 1 to suppress human tongue squamous cell carcinoma cell proliferation and motility[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(2): 851–6.
- [6] Chen Z L, Yu C, Zhan L, et al. LncRNA CRNDE promotes hepatic carcinoma cell proliferation, migration and invasion by suppressing miR-384[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(10): 2299–309.
- [7] Yang L, Wei H, Xiao H J. Long non-coding RNA Loc554202 expression as a prognostic factor in patients with colorectal cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(20): 4243–7.
- [8] Yang F, Xue X C, Bi J W, et al. Long noncoding RNA CCAT1, which could be activated by c-Myc, promotes the progression of gastric carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(3): 437–45.
- [9] Liao L M, Sun X Y, Liu A W, et al. Low expression of long non-coding XLOC_010588 indicates a poor prognosis and promotes proliferation through upregulation of c-Myc in cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 133(3): 616–23.
- [10] Hu T, Lu Y R. BCYRN1, a c-MYC-activated long non-coding RNA, regulates cell metastasis of non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15: 36.
- [11] Prensner J R, Chen W, Han S M, et al. The long non-coding RNA PCAT-1 promotes prostate cancer cell proliferation through cMyc[J]. *Neoplasia*, 2014, 16(11): 900–8.

Effect of c-Myc-regulated long non-coding RNA7 on proliferation of tongue squamous cell carcinoma

Xu Yanxue^{1,2}, Han Tongtong^{1,2}, Zhu Youming^{1,2}, et al

(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 effect of c-Myc-induced long non-coding RNA7 (lncRNA7) on proliferation of tongue squamous cell carcinoma. **Methods** The expression of c-Myc in SCC3 cells transfected with pLKO.1-shc-Myc or Flag-c-Myc was verified by Western blot, and the effect of down-regulation or up-regulation of c-Myc on lncRNA7 expression was detected by qRT-PCR. pLKO.1-shlncRNA7 expression vector was constructed, which could down-regulate lncRNA7 expression after transfected into SCC3 cells. Effects of lncRNA7 knockdown on the growth and proliferation of SCC3 cells were detected by MTT and cell colony formation assay. The location of lncRNA7 in SCC3 cells was tested by fluorescence in situ hybridization. **Results** The expression of c-Myc in SCC3 cells was successfully down-regulated or up-regulated, and the level of lncRNA7 was also decreased or increased. The expression of lncRNA7 in SCC3 cells was successfully down-regulated, the SCC3 cell growth slowed and clones decreased. The result of fluorescence in situ hybridization showed that lncRNA7 was located in the cytoplasm. **Conclusion** The low expression of lncRNA7 positively regulated by c-Myc can inhibit tongue cancer cell proliferation, which indicates that lncRNA7 may be a potential therapeutic target for tongue squamous cell carcinoma. **Key words** c-Myc; long non-coding RNA7; tongue squamous cell carcinoma; cell proliferation