

## 长链非编码 RNA SPRY4-IT1 对膀胱癌生长的影响

陈明伟<sup>1,2,3</sup>, 黎健发<sup>2,3</sup>, 庄成乐<sup>2,3</sup>, 刘宇辰<sup>2,3</sup>, 陈志聪<sup>2,3</sup>, 何安邦<sup>1,3</sup>, 张巧霞<sup>2</sup>, 黄卫人<sup>1,2,3</sup>, 蔡志明<sup>1,2,3</sup>

**摘要** 目的 研究长链非编码 RNA (LncRNA) SPRY4 内含子转录本 1 (SPRY4-IT1) 对膀胱癌生长的影响。方法 使用 qRT-PCR 法检测 SPRY4-IT1 标本和细胞表达水平并分析其临床病理特征之间的关联; 使用特异性小干扰 RNA (si-SPRY4-IT1) 转染两种膀胱癌细胞, 使用 qRT-PCR 法检测 si-SPRY4-IT1 效果, 再分别以 CCK-8 实验、MTT 实验、划痕实验、ELISA 实验和流式细胞术检测 SPRY4-IT1 对膀胱癌细胞在增殖、迁移和凋亡等方面的影响。结果 SPRY4-IT1 在膀胱癌组织中高表达 (68.33%,  $P=0.0263$ )。SPRY4-IT1 表达水平与病理分级 ( $P<0.05$ ) 和 TMN 分期 ( $P<0.001$ ) 有关。SPRY4-IT1 在 5637 ( $P=0.00229$ ) 和 T24 ( $P=0.00012$ ) 细胞中明显高表达。si-SPRY4-IT1 可显著降低 SPRY4-IT1 表达 ( $P<0.001$ ); si-SPRY4-IT1 可显著抑制两种细胞的增殖、迁移和增加凋亡 ( $P<0.01$ )。结论 SPRY4-IT1 在膀胱癌标本组织和细胞水平中高表达, 有促进膀胱癌细胞生长的作用, 在膀胱癌中起着癌基因的作用。

**关键词** 膀胱癌; 长链非编码 RNA; SPRY4-IT1; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞凋亡

中图分类号 R 737.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0978-07

膀胱癌是最常见的泌尿系统恶性肿瘤, 其发病率在人类肿瘤发病率中位居前列, 并呈明显的上升趋势, 严重危及人类健康<sup>[1]</sup>。尽管目前膀胱癌的诊疗已经取得了长足进步, 但仍有许多问题亟待解决。

2016-03-23 接收

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (编号: 2014CB745200); 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81402103); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (编号: 2014AA020607); 广东省自然科学基金 (编号: 2014A030313717); 深圳市科技计划项目 (编号: JCYJ20150330102720130、GJHZ20150316154912494)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学深圳市第二人民医院临床学院泌尿外科, 深圳 518035

深圳市第二人民医院<sup>2</sup> 中心实验室、<sup>3</sup> 泌尿外科, 深圳 518035

作者简介: 陈明伟, 男, 硕士研究生;

黄卫人, 男, 研究员, 责任作者, E-mail: pony8980@163.com;

蔡志明, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: caizhiming2000@163.com

早中期膀胱癌主要以手术治疗, 晚期膀胱癌患者手术效果较差, 并且对放、化疗多不敏感, 复发率、死亡率高<sup>[2-4]</sup>。所以进一步研究膀胱癌机制对膀胱癌诊疗有重要临床意义, 尤其对放化疗不敏感的晚期患者有重要意义。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, LncRNA) 是一类转录本长度大于 200 个核苷酸的不翻译和编码蛋白的长链 RNA, 目前人类基因组中 LncRNA 大约有 23 000 个, LncRNA 进行大量的研究<sup>[5-7]</sup>, 发现其在肿瘤的发生发展起着重要的作用, 但进一步的在疾病中发生的机制却缺少突破性研究成果。SPRY4-IT1 (SPRY4 intronic transcript 1) (基因 ID: 100642175) 是一种目前研究较成熟的 LncRNA, 其异常表达与乳腺癌、胃癌、肺癌、肾癌和脑肿瘤等多种肿瘤疾病相关联, 提示其可能是一类必要的癌症发生相关联的疾病因子<sup>[8-15]</sup>。文献<sup>[14]</sup>报道 SPRY4-IT1 与膀胱癌的预后等相关, 该研究进一步观察非编码 RNA SPRY4-IT1 对膀胱恶性细胞生过程长的影响及与临床病理特征联系, 为膀胱癌的诊疗提供新的精准医疗靶标, 开辟新的途径。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 膀胱癌患者标本及对应的资料** 随机选用 60 例深圳市第二人民医院生物资源标本库保存的膀胱癌及其配对的癌旁正常组织标本 (2013 年 6 月~2015 年 6 月收集于安徽医科大学第一附属医院泌尿外科、南方医科大学珠江医院泌尿外科、中山大学肿瘤医院泌尿外科以及深圳市第二人民医院泌尿外科等医院行全膀胱手术切除的膀胱癌患者标本, 所取标本均取得患者或家属知情同意书签字, 并且得到各就诊医院和深圳市第二人民医院医学伦理委员会的正式批准)。患者纳入标准: 病理诊断为膀胱恶性肿瘤并接受全膀胱切除手术, 并取得患者或家属知情同意书签字。排除标准: 手术前接受化疗等其他治疗; 病理诊断为膀胱良性肿瘤, 病理诊断为其它的癌症; 拒绝签署同意书。每对标本包括手术切除后经病理证实的膀胱癌组织及其配对癌旁正常组织 (距离癌组织 > 5 cm) 各 1 份。膀胱肿瘤大小

测量采用 1999 年 WHO 的 RECIST 标准即单径测量法,以肿瘤的最大径(cm)的变化代替体积的变化。本研究组织学类型分类采用 WHO 膀胱癌病理分级分类标准(2004 年),临床分期采用国际抗癌组织(UICC)及美国癌症联合会(AJCC)临床分期的标准(2009 年)。

**1.1.2 膀胱癌细胞系及正常细胞** 5637 和 T24 两种膀胱癌细胞系以及正常膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 均购自中科院上海生科院。

**1.1.3 主要试剂** Lipofectamine 2000 转染试剂、TRIzol RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司);1640、DMEM 和 F12 培养基、谷氨酰胺、进口胎牛血清(FBS)(混合 1% 青霉素-链霉素)(美国 Gibco 公司);细胞毒性检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK8)、MTT、DMSO(美国 Sigma aldrich 公司);人胱天蛋白酶 3(human Caspase 3)和 ELISA 检测试剂盒(中国武汉华美生物公司);特异性 si-SPRY4-IT1(5'-CCCAGAATGTTGACAGCTGCCTCT-3')<sup>[12]</sup>、对照组 si-NC(5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3')(苏州吉玛基因股份有限公司)。

**1.1.4 主要仪器** 高速冷冻离心机、微量核酸蛋白检测仪(美国 Thermo 公司);Thermal Cycler C1000 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);实时荧光 Light Cycler 480 II 定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);迷你离心机(江苏其林贝尔公司);酶标检测仪(芬兰 Thermo 公司);恒温水箱(上海比朗公司);流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

**1.2 培养细胞** 膀胱癌(人)细胞 5637、T24 分别培养于 1640 和 DMEM 培养基(含 10% FBS、1% 谷氨酰胺、1% 青霉素-链霉素混合液),放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养,规范换液传代。

**1.3 转染** 在 6、12、24、96 孔细胞培养板取适量细胞铺板培养,贴壁细胞融合度需达到 40%~60%时(部分实验融合度需要达到 90%~100%),遵循生产厂家说明书通过 Lipofectamine 2000 将 siRNA(si-SPRY4-IT1 和 si-NC)转染入细胞,并放置于 37 °C 培养箱继续孵育 4~6 h 后,分别重新换 1640 和 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)继续培养。

**1.4 实时荧光定量 qRT-PCR** 严格依照 TRIzol 试剂说明书提取标本及细胞 RNA,cDNA 逆转录严格遵循 PrimeScript RT Reagent Kit 说明书的规范标准。依据标准的逆转录和实时荧光定量 qRT-PCR 试剂说明书设置相应的反应条件和参数,内参为 GAPDH,进行 cDNA 逆转录合成和相应的 qT-PCR

扩增。上下游引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,SPRY4-IT1 F:5'-TAAGCTTGTA GAGATGGGGGTTTCATCCTGTTGG-3',R:5'-ACTCG AGAAAGACTCCCTTTCCTTAAGCAGATTCAC-3'<sup>[12]</sup>; GAPDH F:5'-CGCTCTCTGCTCCTCCTGTTTC-3',R:5'-ATCCGTTGACTCCGACCTTCAC-3'。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法数据分析,其计算公式为:ΔCt = Ct<sub>SPRY4-IT1</sub> - Ct<sub>GAPDH</sub>, ΔΔCt = 实验组(Ct<sub>SPRY4-IT1</sub> - Ct<sub>GAPDH</sub>) - 阴性对照组(Ct<sub>SPRY4-IT1</sub> - Ct<sub>GAPDH</sub>)。

**1.5 CCK-8 实验** 取适量的细胞于 96 孔板接种培养,隔天分别转染 si-SPRY4-IT1 和 si-NC,实验组和对照组两组各设置 6 个复孔,转染后 0、24、48 和 72 h 各时间点进行 CCK-8 检测。每次加入 CCK-8 溶液相当于各孔总体积的 1/10,即每孔 10 μl,1 h 以后以 450 nm 波长检测细胞光密度(optical density,OD)值,观察两组差异。

**1.6 MTT 实验** 取适量的对数生长期细胞于 96 孔板接种培养,隔天分别转染 si-SPRY4-IT1 和 si-NC,实验组和对照组各设置 6 个复孔,转染后 0、24、48 和 72 h 各时间点进行 MTT 检测。实验终止前 4 h 每孔加入 10 μl MTT 溶液,4 h 后,每孔加入 150 μl 的 DMSO,10 min 震荡,以波长 490 nm 在酶标仪检测各孔细胞 OD 值,观测两不同处理组差异。

**1.7 细胞迁移试验** 取适量的细胞接种于 6 孔板中培养,按照上述实验分组转染 4~6 h 后,每组实验设 3 个复孔,细胞的融合度需达到 90%以上,用 200 μl 无菌移液枪头划线立即在光学显微镜下拍照,放置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中继续培养,24 h 后再次在显微镜下拍照,取 5 个视野,测量划痕两侧细胞间距取平均值,实验重复 3 次。

**1.8 ELISA 实验** 在 24 孔板中接种适量的细胞培养 24 h 后转染 si-RNA,实验组和阴性对照组分别各设 6 个复孔,48 h 后收集细胞,用 PBS 重悬后反复冻融裂解细胞。在已经包被 Caspase-3 抗体的聚苯乙烯板的反应孔中加入细胞裂解液,37 °C 中孵育 30 min,弃液后 3 次洗板;再加入辣根过氧化物酶标记工作液,37 °C 孵育 30 min;弃液再 5 次洗板后加入底物溶液,20 min 避光显色,最后加入终止液。反应终止后 5 min 内用酶标仪在 450 nm 波长下测量每孔 OD 值,OD 值大小可以间接反映 Caspase-3 的酶活性,进而说明细胞凋亡程度。

**1.9 流式细胞仪检测实验** 细胞转染后 48 h,消化收集细胞并洗涤,然后重悬于 200 μl 的结合缓冲液,加入 10 μl Annexin V-FITC 和 5 μl 的 PI 后轻轻

地混匀,避光室温反应 15 min,再加入 300 μl 结合缓冲液,使用流式细胞仪测定细胞凋亡,细胞凋亡率以百分数表示。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,上述所有实验均重复 3 次,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用 *t* 检验比较,多组间采用单因素方差分析比较(CCK-8 和 MTT 实验数据)。图表用 GraphPad Prism 6.0 生成。

## 2 结果

2.1 SPRY4-IT1 在膀胱癌标本和膀胱癌细胞系中高表达以及其表达量与临床病理特征之间的联系 膀胱癌组织中 SPRY4-IT1 表达明显高于癌旁正常组织,其中高表达 41 例(68.33%) ( $t = 6.835, P = 0.0263$ ),见图 1A。进一步研究结果提示:膀胱癌 SPRY4-IT1 表达水平与患者 TMN 分期( $P < 0.001$ )和病理分级( $P = 0.024$ )有关,而与性别、年龄、肿瘤大小和淋巴结转移等无明显相关,见表 1。相对于正常膀胱上皮细胞(SV-HUC-1),膀胱癌细胞在 5637( $t = 6.919, P = 0.00229$ )和 T24( $t = 14.622, P = 0.00012$ )中明显高表达(图 1B)。

表 1 SPRY4-IT1 表达水平与膀胱癌临床病理特征之间的关系 [n(%) ]

变量	总数	SPRY4-IT1 的表达量		P 值
		高(n=41)	低(n=19)	
性别				0.301
男	49	35(71.4)	14(28.6)	
女	11	6(54.5)	5(45.5)	
年龄(岁)				0.763
≤50	17	11(64.7)	6(35.3)	
>50	43	30(69.8)	13(30.2)	
肿瘤大小(cm)				0.498
<3.5	40	28(70)	12(30)	
≥3.5	20	13(65)	7(35)	
病理分级				0.024
低	27	14(51.9)	13(48.1)	
高	33	27(81.8)	6(18.2)	
肿瘤浸润分期(T)				<0.001
Tis/Ta/T1	33	16(48.0)	17(52.0)	
T2/T3或以上	27	25(94.7)	2(5.3)	
淋巴结转移(N)				0.297
N0	56	37(66.1)	19(33.9)	
N1或以上	4	4(100)	0(0.0)	
TNM 分期				<0.001
0/I	31	14(45.2)	17(54.8)	
II/III/IV	29	27(93.1)	2(6.9)	

2.2 si-SPRY4-IT1 可显著下调膀胱癌细胞 SPRY4-IT1 表达 与 si-NC 组比较,在 si-SPRY4-IT1 组细胞 SPRY4-IT1 表达均显著降低,在 5637( $t$

$= 5.391, P = 0.0057$ )和 T24( $t = 17.868, P < 0.001$ )细胞系中差异均有统计学意义,见图 2。表明 si-SPRY4-IT1 可明显下调 5637 及 T24 细胞内 SPRY4-IT1 的表达。

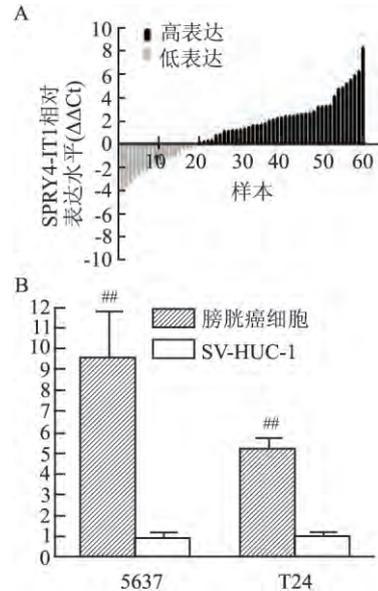


图 1 SPRY4-IT1 在膀胱癌组织和细胞系中的表达

A: SPRY4-IT1 在膀胱组织中的相对表达水平; B: SPRY4-IT1 在膀胱细胞水平(5637 和 T24)的相对表达量;与癌旁组织比较: \*  $P < 0.05$ ;与 SV-HUC-1 比较: ##  $P < 0.01$

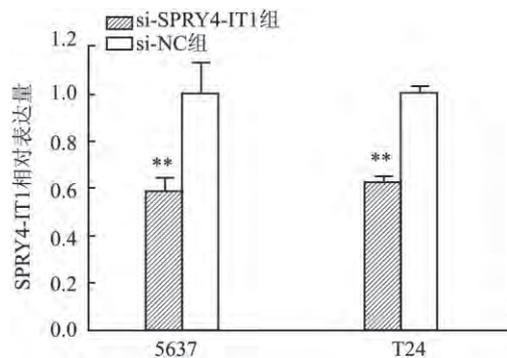


图 2 si-SPRY4-IT1 对 SPRY4-IT1 相对表达量的影响 与 si-NC 组比较: \*\*  $P < 0.01$

2.3 si-SPRY4-IT1 抑制 5637 和 T24 细胞增殖 CCK-8 实验结果显示,si-SPRY4-IT1 转染细胞后 24、48、72 h 较对应时间 si-NC 组 OD 值明显降低,在 5637( $F = 33.948, P < 0.001$ )和 T24( $F = 71.910, P < 0.001$ )细胞系差异均有统计学意义。见图 3。MTT 实验结果显示,与 si-NC 组比较,si-SPRY4-IT1 转染细胞后对应的各时间段 OD 值明显降低,在 5637( $F = 45.730, P < 0.001$ )和 T24( $F = 21.894, P < 0.001$ )差异有统计学意义,见图 4。

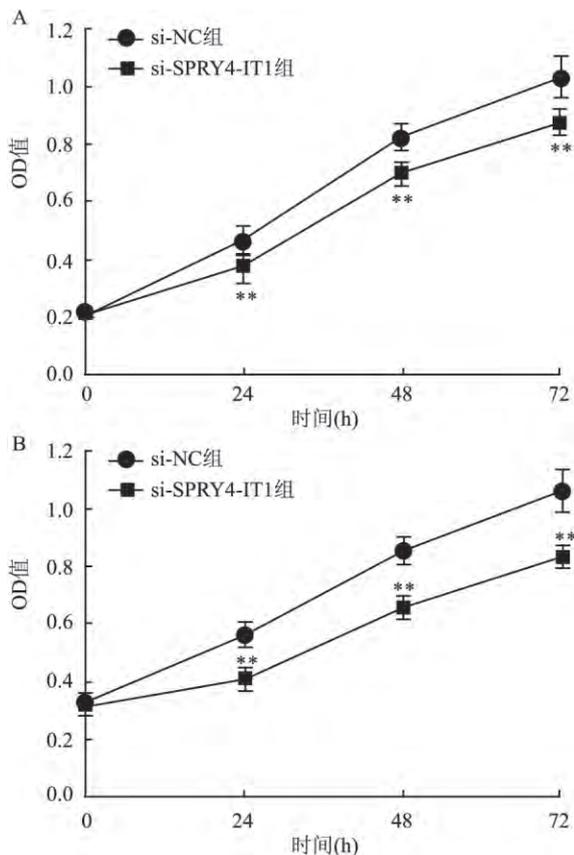


图3 CCK-8 检测 si-SPRY4-IT1 对膀胱癌细胞增殖的影响  
A: 5637 细胞; B: T24 细胞; 与 si-NC 组比较: \*\*  $P < 0.01$

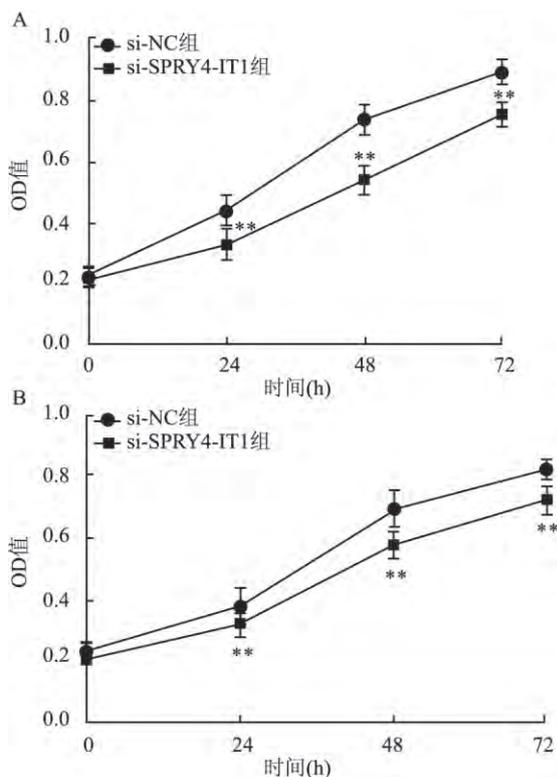


图4 MTT 检测 si-SPRY4-IT1 对膀胱癌细胞增殖的影响  
A: 5637 细胞; B: T24 细胞; 与 si-NC 组比较: \*\*  $P < 0.01$

2.4 si-SPRY4-IT1 可抑制 5637 和 T24 的细胞迁移 与 si-NC 组比较, si-SPRY4-IT1 组膀胱癌细胞系迁移明显被抑制, 在 5637 ( $t = 5.749, P = 0.00454$ ) 和 T24 ( $t = 5.664, P = 0.00479$ ) 细胞系中差异均有统计学意义, 见图 5。

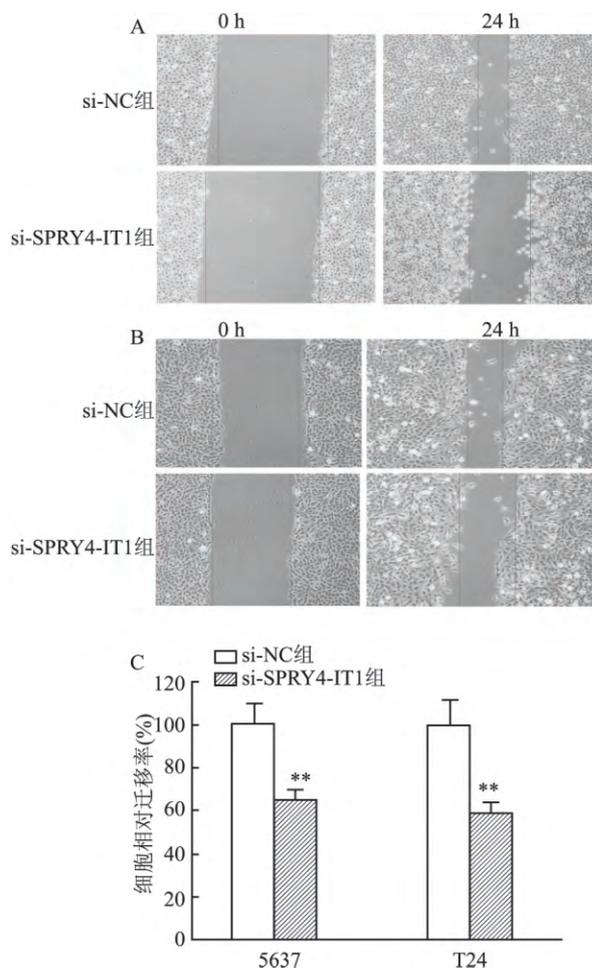


图5 si-SPRY4-IT1 对膀胱癌细胞迁移的影响  
A: 5637 细胞; B: T24 细胞; C: 5637 和 T24 细胞迁移率变化; 与 si-NC 组比较: \*\*  $P < 0.01$

2.5 si-SPRY4-IT1 可增加 5637 和 T24 的细胞凋亡 与 si-NC 组比较, ELISA 实验显示 si-SPRY4-IT1 组的 Caspase-3 相对活性分别显著增加, 在 5637 ( $t = 8.947, P = 0.00086$ ) 和 T24 ( $t = 7.372, P = 0.00180$ ) 细胞系中差异均有统计学意义。流式细胞术实验显示 si-SPRY4-IT1 组的凋亡细胞数目明显增加。见图 6。

### 3 讨论

目前恶性膀胱癌是主要危及人类健康的肿瘤疾病之一, 其主要的治疗方法早期主要是手术治疗, 包

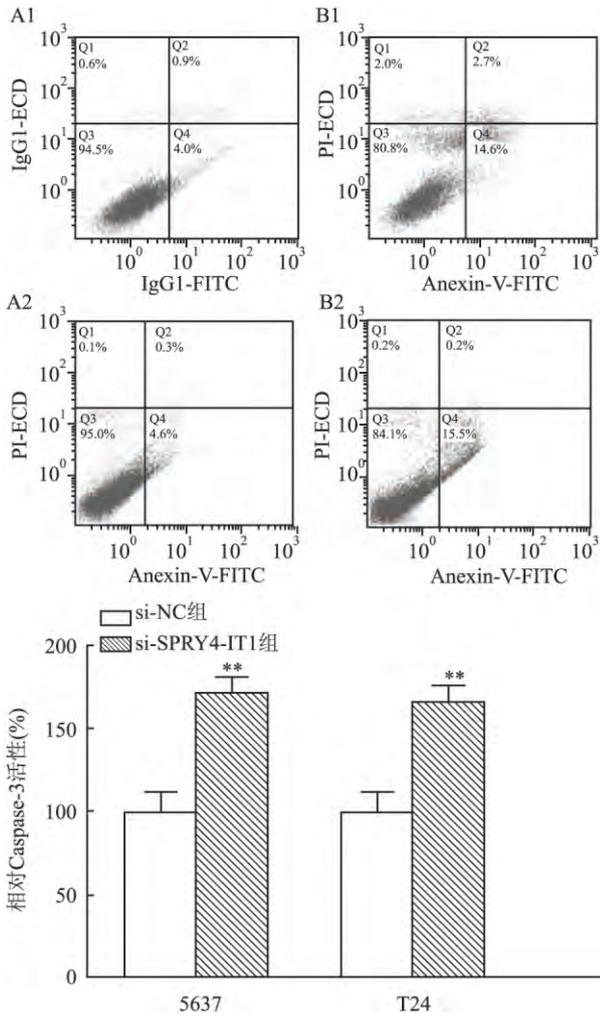


图6 si-SPRY4-IT1对膀胱细胞的凋亡的影响

A: si-NC 组; B: SPRY4-IT1 组; 1: 5637 细胞; 2: T24 细胞; 与 si-NC 组比较: \*\* P < 0.01

括部分电切同时加以辅助化疗,但易复发;对于高级别浸润性以及多发肿瘤等则主张早期全切,但其术后生活质量却明显下降;对于晚期癌症,生存率低,主要放化疗治疗,但易发生耐药等<sup>[1-4]</sup>。因此,探索新的膀胱癌诊断技术、分子标志物以及新的治疗方法极有重要的意义。

非编码 RNA 的研究起步较晚,很长时间内一直被认为是无功能因而被人们忽视转录“噪音”。在过去十年中,研究<sup>[6-9]</sup>显示许多 LncRNA 在各种疾病尤其是肿瘤中异常表达,预示着其在肿瘤的发生发挥重要的调控作用,而进一步的深入研究也证实这种调控作用;相对于在肿瘤中研究较成熟的 microRNA, LncRNA 的研究起步较晚,对于这种在癌症中异常表达的不编码蛋白长链 RNA 的功能和机制有待进一步研究探索,异常表达的 LncRNA 将有助于对肿瘤的诊断治疗以及预后指导。因而,研究膀胱癌

中异常表达的 LncRNA 及其功能机制对于提高膀胱癌的诊疗水平有重要的指导意义。

人的 SPRY4-IT1 碱基序列全长 703 bp,基因位于染色体 5q31.3。虽为抑癌基因 SPRY4 的内含子区转录产物,但 SPRY4-IT1 表现出癌基因的特征。如上所述,SPRY4-IT1 在众多肿瘤起着有重要的调控作用。非编码 RNA SPRY4-IT1 可预测胃癌的预后和促进肿瘤的发生<sup>[9]</sup>,其通过上调 ZNF703 表达量促进乳腺癌细胞增殖<sup>[10]</sup>,与肾透明细胞癌和食管癌密切预后相关,可以调节黑色素瘤的凋亡和侵袭<sup>[11-13]</sup>;同时可以调节滋养层细胞增殖、迁移和凋亡等。由此假设 SPRY4-IT1 可能对膀胱癌细胞生长有重要影响。

本研究显示,相对于癌旁组织和正常上皮细胞,膀胱癌组织和细胞水平中 SPRY4-IT1 明显高表达。进一步研究结果表明 si-SPRY4-IT1 可下调 SPRY4-IT1 表达并且显著抑制细胞增殖、迁移和促进凋亡,SPRY4-IT1 是一种起着癌基因作用,并且正调控膀胱癌细胞生长因子,与文献<sup>[8-15]</sup>报道一致。因此,深入研究 SPRY4-IT1 促进膀胱癌细胞生长机制对理解膀胱癌发生、发展以及转移有非常重要的意义。同时通过研究临床病理资料分析显示 SPRY4-IT1 的表达与病理分级、临床分期等相关,而与年龄、性别以及肿瘤大小等无明显关联,进一步说明 SPRY4-IT1 有重要的临床意义,将其真正转化为临床应用是下一步研究的重点。

随着不断进步的分子生物学技术的发展,尤其是分子筛选技术的进步为 LncRNA 机制研究提供新的方法和途径。研究<sup>[13]</sup>表明细胞质的 SPRY4-IT1 的二级结构含有可能起着特殊作用的数个茎环和假结。在乳腺癌中 SPRY4-IT1 通过上调 ZNF703 mRNA 表达促进人乳腺癌细胞增殖<sup>[10]</sup>,在非小细胞肺癌中 SPRY4-IT1 通过组蛋白甲基化转移酶(EZH2)促进生长和转移等,同时肺癌的侵袭性和转移性能力是通过 SPRY4-IT 部分调节上皮细胞间质转型(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)的作用<sup>[15]</sup>;在胃癌细胞中 SPRY4-IT1 可能通过 DNA 的甲基化而发挥作用,胃癌的转移被发现可能是 SPRY4-IT1 调节 EMT 实现的<sup>[9]</sup>,暗示在膀胱癌存在着类似的调控机制,为进一步研究膀胱癌作用机制提供了思路,推断 SPRY4-IT1 可能在膀胱癌中通过调节某种 mRNA(ZNF703)或 DNA 甲基化进而影响蛋白(EZH2)变化发挥其相应的生物学功能,SPRY4-IT1 影响膀胱癌侵袭能力等可能和其他肿瘤

类似的调节过程即部分调节 EMT 等,但尚需进一步验证。

综上所述,本实验确定了 LncRNA SPRY4-IT1 对膀胱癌细胞增殖、迁移以及凋亡等生长过程的正调控作用,在膀胱癌疾病中起着肿瘤基因的作用,为深入研究其在膀胱癌的作用机制奠定基础。同时可作为膀胱癌治疗的精准医疗生物分子靶标,从而改变目前晚期膀胱癌治疗瓶颈。

(致谢:此文章获得深圳市医疗卫生“三名工程”资助)

### 参考文献

- [1] Tian Y F, Zhou H, Yu G, et al. Prognostic significance of lympho-vascular invasion in bladder cancer after surgical resection: A meta-analysis[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2015, 35(5): 646-55.
- [2] Ecker T H. Biomarker in cisplatin-based chemotherapy for urinary bladder cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 867: 293-316.
- [3] Cambier S, Sylvester R J, Collette L, et al. EORTC nomograms and risk groups for predicting recurrence, progression and disease-specific and overall survival in non-muscle-invasive stage Ta-T1 urothelial bladder cancer patients treated with 1-3 years of maintenance Bacillus Calmette-Guérin[J]. *Eur Urol* 2016, 69(1): 60-9.
- [4] Von Schoen-Angerer T, Wilkens J, Kienle G S, et al. High-dose viscum album extract treatment in the prevention of recurrent bladder cancer: a retrospective case series[J]. *Perm J* 2015, 19(4): 76-83.
- [5] 夏明, 黄卫人, 蔡志明. 长链非编码 RNA HOTAIR 对肾癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报* 2015, 50(8): 1095-9.
- [6] Schmitt A M, Chang H Y. Gene regulation: Long RNAs wire up cancer growth[J]. *Nature* 2013, 500(7464): 536-7.
- [7] Zhuang C, Li J, Liu Y, et al. Tetracycline-inducible shRNA targeting long non-coding RNA PVT1 inhibits cell growth and induces apoptosis in bladder cancer cells[J]. *Oncotarget* 2015, 6(38): 41194-203.
- [8] Liu H, Lv Z, Guo E. Knockdown of long noncoding RNA SPRY4-IT1 suppresses glioma cell proliferation, metastasis and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Int J Clin Exp Pathol* 2015, 8(8): 9140-6.
- [9] Xie M, Nie F Q, Sun M, et al. Decreased long noncoding RNA SPRY4-IT1 contributing to gastric cancer cell metastasis partly via affecting epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 250.
- [10] Shi Y, Li J, Liu Y, et al. The long noncoding RNA SPRY4-IT1 increases the proliferation of human breast cancer cells by upregulating ZNF703 expression[J]. *Mol Cancer* 2015, 14: 51.
- [11] Mazar J, Zhao W, Khalil A M, et al. The functional characterization of long noncoding RNA SPRY4-IT1 in human melanoma cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19): 8959-69.
- [12] Zhang H M, Yang F Q, Yan Y, et al. High expression of long non-coding RNA SPRY4-IT1 predicts poor prognosis of clear cell renal cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(9): 5801-9.
- [13] Khaïtan D, Dinger M E, Mazar J, et al. The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 3852-62.
- [14] Zhao X L, Zhao Z H, Xu W C, et al. Increased expression of SPRY4-IT1 predicts poor prognosis and promotes tumor growth and metastasis in bladder cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol* 2015, 8(2): 1954-60.
- [15] Sun M, Liu X H, Lu K H, et al. EZH2-mediated epigenetic suppression of long noncoding RNA SPRY4-IT1 promotes NSCLC cell proliferation and metastasis by affecting the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cell Death Dis* 2014, 5: e1298.

## Long non-coding RNA SPRY4-IT1 inhibited the progression of bladder cancer

Chen Mingwei<sup>1,2,3</sup>, Li Jianfa<sup>2,3</sup>, Zhuang Chengle<sup>2,3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Urology, Shenzhen Second People's Hospital, Clinical Institute of Anhui Medical University, Shenzhen 518035; <sup>2</sup>Key Laboratory, <sup>3</sup>Dept of Urology, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035)

**Abstract Objective** To investigate the effect of long non-coding RNA (LncRNA) SPRY4 intronic transcript 1 (SPRY4-IT1) on the cell progression of bladder cancer. **Methods** To detect the SPRY4-IT1 expression by qRT-PCR and to analyze the correlation between its expression and clinical pathological features in the specimens and cells of bladder cancer. The specific small interfere RNA (si-SPRY4-IT1) was transfected into two bladder cancer cell lines respectively, and the transfection efficiency was evaluated by qRT-PCR. Then the CCK-8 assay, MTT assay, migration assay, ELISA and flow cytometry assay were used to detect cell proliferation, migration and apoptosis.

# 通用转录因子 GTF II F2 对食管癌细胞增殖、迁移的影响

陈丹丹 耿慧武 潘林鑫 刘晓颖 范礼斌

**摘要** 目的 研究通用转录因子 II F 多肽 2 (GTF II F2) 的表达对食管癌细胞增殖及迁移的影响。方法 人工合成靶向 GTF II F2 基因的 siRNA 序列和阴性对照 siRNA 序列及质粒 pcDNA3.1-GTF II F2-FLAG, 分别转染至食管癌细胞中, 采用克隆形成实验和细胞划痕实验观察其对食管癌细胞增殖和迁移的影响。结果 RNA 干扰技术靶向沉默 GTF II F2 基因表达后, 食管癌细胞增殖和迁移均明显受到了抑制, 而过表达 GTF II F2 对食管癌细胞的增殖和迁移无明显影响。结论

GTF II F2 基因在食管癌细胞 TE-1、ECA-109 的增殖和迁移过程中发挥重要作用, 为进一步了解 GTF II F2 基因抑制 TE-1、ECA-109 细胞增殖和迁移的机制提供了基础。

**关键词** GTF II F2; 基因表达; RNA 干扰; 细胞增殖; 细胞迁移

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0984-06

通用转录因子 II F 多肽 2 (general transcription factor II F subunit 2, GTF II F2) 由 Sopta et al<sup>[1]</sup> 从 HeLa 细胞提取, 在早幼粒细胞性白血病细胞 HL60 cDNA 文库中筛选表达生成的相关蛋白。人的 GTF II F2 基因位于染色体 13q14 上, 全长 750 bp, 包含 8 个外显子和 7 个内含子, 编码 249 个氨基酸残基, 相对分子质量约为 28 ku。GTF II F 参与基因转录的起始、启动子清除、延伸过程, 是由 GTF II F2 的 N-末

端和 GTF II F1 两种亚基组成的四聚体分子。GTF II F2 中间部分通过 RPB5 结合到 RNA 聚合酶 II, 对转录延伸过程起到重要作用。GTF II F2 的 C-末端包含一个非特异性的 DNA 结合结构域, 该蛋白有特有的依赖 ATP 的 DNA 解旋酶活性<sup>[1]</sup>, 很多重要的转录因子以 GTF II F2 为靶分子, 通过与其相互作用影响转录起始复合物的形成, 影响并调节转录过程, 因此 GTF II F2 被认为是转录过程中重要的基本转录因子。研究<sup>[2-3]</sup>证实 GTF II F2 功能发生变化将导致严重的疾病。该研究主要借助 RNA 干扰技术对 GTF II F2 基因表达进行沉默以及过表达 GTF II F2, 研究其表达对食管癌细胞 TE-1、ECA-109 的增殖和迁移的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 质粒、菌株和细胞** pcDNA3.1-GTF II F2-FLAG 质粒、TG1 感受态细胞、食管癌细胞株 TE-1 和 ECA-109 均由安徽医科大学生物实验室保存。

**1.2 主要试剂与仪器** 结晶紫、台盼蓝购自上海生工生物有限公司; siRNA 的序列由通用生物系统(安徽)有限公司合成; Gibco 胎牛血清、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagent、Opti-MEM Reduced serum Medium 购自美国 Invitrogen 公司; EcoR I、EcoR V 限制性内切酶及 Lambda DNA EcoR I + Hind III Marker 均购自加拿大 Fermentas 公司; 改良型 RPMI-1640 培养基、胎牛血清和分光光度计 NanoDrop 2000 购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司; Western 及 IP 细胞裂解液和一抗、二抗稀释液以及 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天公司; GTF II F2

2016-03-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 81201368)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物教研室, 合肥 230032

作者简介: 陈丹丹, 女, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: liuxi-aoying@ahmu.edu.cn

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

**Results** The SPRY4-IT1 expression was obviously up-regulated in 68.33% of cancer samples ( $P=0.0263$ ) and related to bladder cancer histological grade ( $P<0.05$ ) and TNM stage ( $P<0.001$ ). The SPRY4-IT1 expression was obviously increased in 5637 ( $P=0.00229$ ) and T24 ( $P=0.00012$ ). The expression of SPRY4-IT1 could be down-regulated by si-SPRY4-IT1 ( $P<0.001$ ). Si-SPRY4-IT1 could remarkably inhibit the proliferation ( $P<0.001$ ), suppress migration ( $P<0.01$ ) and increase apoptosis ( $P<0.01$ ). **Conclusion** SPRY4-IT1 is up-regulated in bladder cancer tissues and cells. SPRY4-IT1 plays an oncogene role in promoting cell growth of bladder cancer.

**Key words** bladder cancer; long non-coding RNA; SPRY4-IT1; cell proliferation; cell migration; cell apoptosis