

长链非编码 RNA HOTAIR 对肾癌细胞增殖和凋亡的影响

夏明^{1,2}, 黄卫人², 蔡志明^{1,2}

摘要 目的 探讨长链非编码 RNA (lncRNA) HOTAIR 对肾癌细胞系 786-O 和 ACHN 增殖和凋亡的影响。方法 两种细胞系转染针对 HOTAIR 的小干扰 RNA (siRNA), 利用 qRT-PCR 检测干扰效率, 再分别以噻唑蓝 (MTT) 法、ELISA 法和 Hoechst 染色法检测 HOTAIR 表达降低后 786-O 和 ACHN 细胞在增殖和凋亡方面的变化。结果 siRNA 可有效降低 HOTAIR 表达 ($P < 0.05$); 减少 HOTAIR 含量可显著抑制两种细胞的增殖 ($P < 0.05$), 同时增加细胞凋亡 ($P < 0.05$)。结论 HOTAIR 具有促进肾癌细胞生长的作用。

关键词 肾癌; 长链非编码 RNA; HOTAIR; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号 R 737.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)08-1095-05

肾癌是一种常见泌尿系统肿瘤, 占成人肿瘤发病率 3%^[1], 且近年来发病率增长幅度最高。目前, 早中期肾癌主要利用手术治疗^[2], 但仍有 1/3 肾癌患者属于晚期, 对放、化疗不敏感^[3]。因此, 深入探索肾癌发生的详细分子机制将对肾癌早期诊断及中晚期治疗具有重要益处。

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一类转录本大小长于 200 个核苷酸的不翻译 RNA, 在人类基因组中, 保守估计大约有 23 000 个 lncRNA^[4]。lncRNA 可在多个水平如转录、转录后及表观遗传等调控基因表达, 参与物种进化、细胞分化、器官形成、胚胎发育、物质代谢等基础生命活动, 并参与恶性肿瘤等多种疾病发生^[5]。HOTAIR (hox transcript antisense intergenic RNA) 是一种研究较多的 lncRNA, 其异常表达与乳腺癌、肝癌、食管癌和肺癌等多种肿瘤相关, 提示其是一种重要的癌

症发生相关因子^[6-9]。该研究旨在体外观察 HOTAIR 对肾癌细胞生长的影响, 如细胞增殖、凋亡的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肾癌细胞系 786-O 和 ACHN 均购自中国科学院上海生命科学院细胞库。

1.1.2 试剂 Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司)、DMEM 培养基、谷氨酰胺、青霉素-链霉素混合液胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司)、四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO) (美国 Sigma aldrich 公司)、人胱天蛋白酶 3 (Caspase-3) ELISA 检测试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司); 人 HOTAIR-siRNA (5'-UUAAGUCUAGGAAUCAG-CACGAAGC-3')、阴性对照 (5'-UUCUCCGAACGU-GUCACGUTT-3') (上海吉玛公司)。

1.1.3 主要仪器 高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司)、NanoDrop2000 超微量分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司)、Thermal Cycler C1000 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司)、Light Cycler 480II 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)、THZD 型台式恒温振荡器 (江苏省太仓市实验设备厂)、DTX880 荧光检测仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 细胞培养 人肾癌细胞 786-O、ACHN 培养于含 10% FBS、1% 谷氨酰胺、1% 青霉素-链霉素混合液的 DMEM 培养基中, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养, 隔天换液, 常规消化、传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 细胞转染 取对数生长期细胞接种于 6 孔、96 孔或 24 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁且融合度达到 40%~60% 时, 将 HOTAIR-siRNA、阴性对照序列 (NC) 分别由 Lipofectamine 2000 转染入细胞, 置 37℃ 孵育 6 h, 随后弃转染液, 换 10% FBS 的正常 DMEM 培养基继续培养。

1.4 qRT-PCR 检测 HOTAIR 表达量 收集转染后 48 h 细胞, 按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA。根据逆转录及 qRT-PCR 试剂盒说明设置反应条件及

2015-04-29 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 (编号: 81272840); 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81201579)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属深圳市第二人民医院临床学院, 深圳 518035

² 深圳市第二人民医院泌尿生殖系统肿瘤研究重点实验室和医学重编程技术重点实验室, 深圳 518035

作者简介: 夏明, 男, 硕士研究生;

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

参数,以 GAPDH 为内参,进行逆转录合成 cDNA 及 qRT-PCR 扩增。引物序列均由华大基因合成,HOTAIR 上游引物: 5'-GGGTGGCTCACTCTTCTGGC-3',下游引物: 5'-TGGCCTTGCCCGGGCTTGTG-3'; GAPDH 上游引物: 5'-CGCTCTCTGCT CCTCCTGT-TC-3',下游引物: 5'-ATCCGTTGACTCCGACCT-TCAC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析, $\Delta Ct = Ct_{HOTAIR} - Ct_{GAPDH}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{HOTAIR} - Ct_{GAPDH})_{\text{干扰组}} - (Ct_{HOTAIR} - Ct_{GAPDH})_{\text{对照组}}$ 。

1.5 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期细胞接种于 96 孔细胞培养板,24 h 后转染,设置两组,阴性对照组(NC 组)和 HOTAIR 转染组,每组设置 5 个复孔,分别于转染后 24、48、72 h 进行 MTT 检测。实验终止前 4 h 加入 MTT 溶液 10 μ l/孔,继续培养 4 h 后弃培养液,加入 DMSO 150 μ l/孔,震荡 10 min 后,在酶标仪波长 490 nm 处检测各孔光密度(optical density, OD) 值。计算并统计生长抑制率(growth inhibitory rate, GIR, %) = $1 - (OD_{HOTAIR} / OD_{NC}) \times 100\%$ 。

1.6 ELISA 法检测细胞凋亡 在 24 孔板中接种对数生长期细胞,24 h 后按对照组及干扰组进行转染,每组设 6 个复孔,转染 48 h 后消化收集细胞,用 PBS 重悬后反复冻融致细胞裂解。将细胞裂解液加入已经包被 Caspase-3 抗体的聚苯乙烯板的反应孔中,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,弃液后洗板 3 次,再加入辣根过氧化物酶标记工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,弃液再洗板 5 次后加入底物溶液,避光显色 20 min,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。

1.7 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡 将对数生长期细胞接种于 12 孔板(内含细胞爬片),24 h 后转染,转染 48 h 后取出 PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,去固定液,再用 PBS 洗 1~2 次,加入 Hoechst33342 染色液,染色 5~15 min,再用 PBS 洗 2 次,将爬片取出,反盖在滴有抗荧光淬灭封片液的载玻片上,稍晾干后荧光显微镜下观察拍照,再统计被致密蓝染的凋亡细胞。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,上述实验均重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。图表用 GraphPad Prism 5.0 生成。

2 结果

2.1 siRNA 可显著降低细胞内 HOTAIR 表达 在肾癌细胞株 786-O 与 ACHN 内,与对照组相比,干扰组细胞内 HOTAIR 表达均降低,分别为对照组的 25.13% 及 40.84%,差异均有统计学意义($t = 6.05$ 、 5.94 , $P < 0.05$),见图 1。表明转染 HOTAIR siRNA 可成功下调 786-O 及 ACHN 细胞内 HOTAIR 的表达。

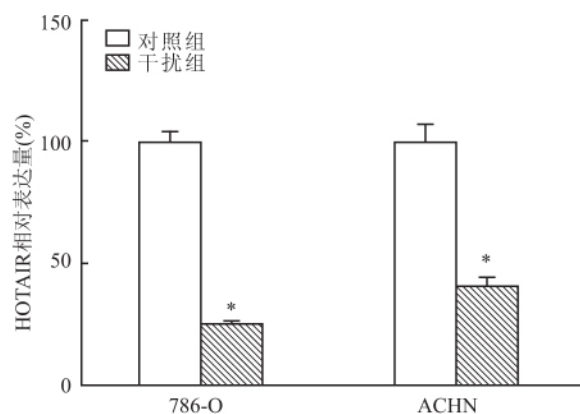


图 1 qRT-PCR 检测 HOTAIR 相对表达量差异
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 下调 HOTAIR 表达可抑制 786-O 和 ACHN 细胞增殖 MTT 法结果显示,HOTAIR siRNA 转染 786-O 细胞后 24、48、72 h 较对应时间对照组 OD 值明显降低($t_{24h} = 4.294$, $t_{48h} = 88.00$, $t_{72h} = 15.68$; $P < 0.05$)。抑制率最高可达(28.16 $\pm$ 1.18) %。见图 2A。HOTAIR siRNA 干扰 ACHN 细胞后 24、48、72 h 较对应时间对照组 OD 值明显降低($t_{24h} = 83.66$, $t_{48h} = 24.58$, $t_{72h} = 24.48$; $P < 0.05$)。抑制率最高可达(35.27 $\pm$ 5.95) %。见图 2B。

2.3 下调 HOTAIR 表达可增加 786-O 和 ACHN 的细胞凋亡 在肾癌细胞 786-O 及 ACHN 中,siRNA 干扰组的 Caspase-3 相对活性分别为对照组的 1.49 倍($t = 6.309$, $P < 0.01$)及 1.50 倍($t = 9.075$, $P < 0.05$)。见图 3。

Hoechst 染色法检测显示,上述两个细胞系中,HOTAIR siRNA 干扰组相比于对照组的凋亡细胞均显著增多,见图 4。统计后,786-O 细胞系干扰组凋亡率是对照组的 1.67 倍($t = 19.42$, $P < 0.05$),而 ACHN 细胞系内干扰组凋亡率是对照组的 2.49 倍($t = 19.15$, $P < 0.01$),见图 5。

3 讨论

HOTAIR 是第一个被发现具有反式转录调控作

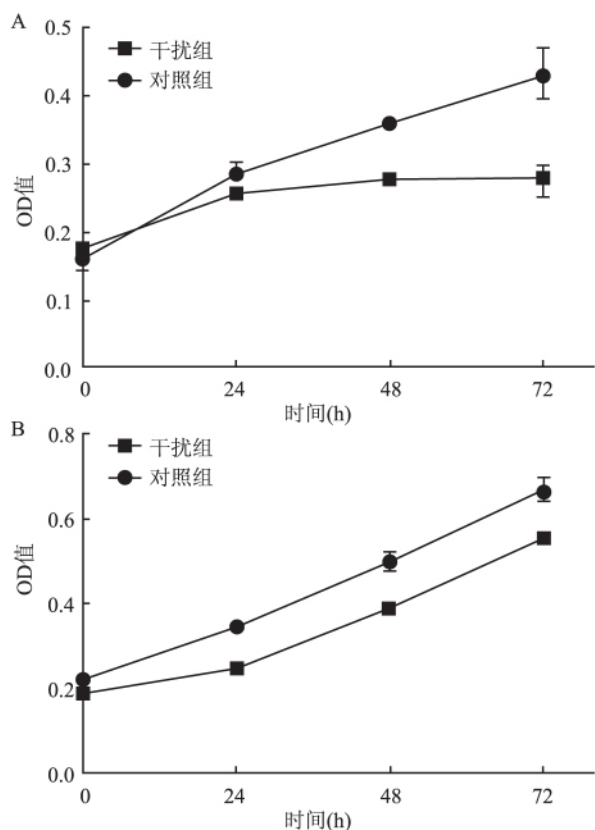


图2 HOTAIR对细胞增殖的影响

A: 786-O 细胞 B: ACHN 细胞

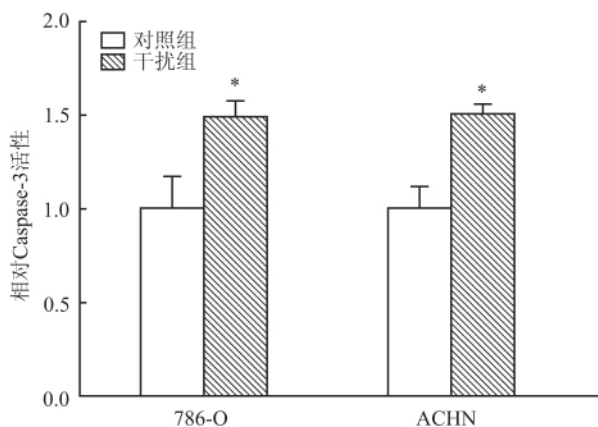


图3 转染后ELISA法测定Caspase-3相对活性变化

与对照组比较: * $P < 0.05$

用的 LncRNA, 仅存在于哺乳动物。人的 HOTAIR 全长 2158 碱基, 基因定位于染色体 12q13.13 的 HOXC11 与 HOXC12 之间, 包括 6 个外显子^[10]。研究^[6-9]表明 HOTAIR 对乳腺癌、肝癌、食管癌、肺癌等癌细胞体外增殖和凋亡有重要影响, 尚未有肾癌方面的报道。已有研究^[11]显示 HOTAIR 在多个肾癌细胞系中存在高表达, 由此推断, HOTAIR 也可能对肾癌细胞生长有重要影响。

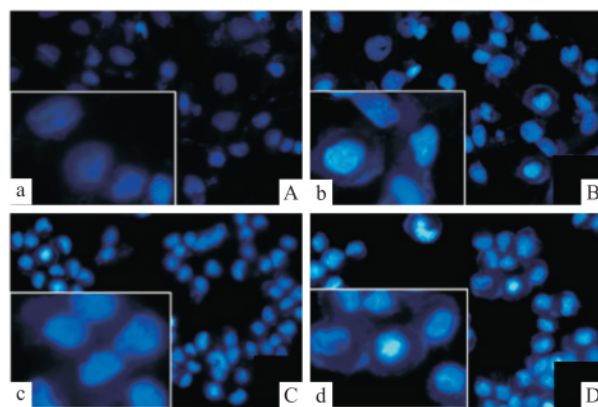


图4 转染后典型凋亡细胞

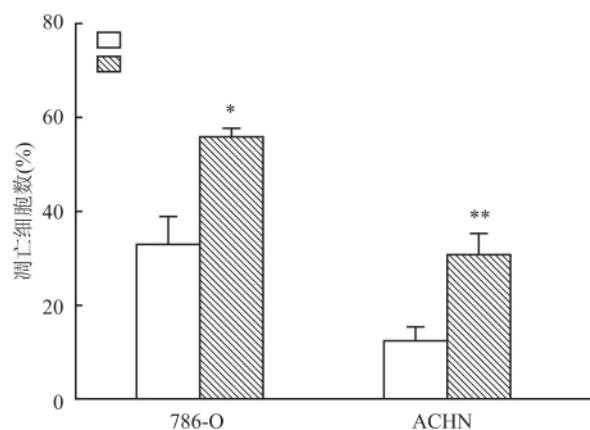
A: 786-O 对照组; B: 786-O 干扰组; C: ACHN 对照组; D: ACHN 干扰组; A、B、C、D: Hoechst 染色 $\times 400$; a、b、c、d: Hoechst 染色 $\times 800$ 

图5 转染后凋亡细胞数变化

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

本研究结果显示 HOTAIR 表达下调可显著抑制细胞增殖, 同时增加细胞凋亡, 从而意味着 HOTAIR 是一种重要的肾癌细胞生长正调控因子, 扮演着“癌基因”的角色, 这与 HOTAIR 在其他肿瘤中的作用相一致。因此, 深入研究 HOTAIR 促进肾癌细胞生长机制对理解肾癌发生、发展以及转移具有非常重要的意义。

前期研究^[12]表明, HOTAIR 可结合哺乳动物多梳蛋白抑制复合体 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 和组蛋白去甲基化酶复合体 (LSD1/REST) 并发挥脚手架作用, 即其 5' 端和 PRC2 结合, 而其 3' 端和 LSD1 复合物结合。PRC2 由甲基转移酶 EZH2、SUZ12 和 EED 三亚基组成, 其中起主要作用的 EZH2 亚基可催化组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸 (histone H3 lysine K27, H3K27) 甲基化, 生成 H3K27me3 (转录抑制标志), 进而招募 PRC2 至特定位置沉默 HOXD 基因座及相关抑制基因如 HOXD10、JAM2、

PCDH10 等转录,从而导致恶性肿瘤的转移或复发^[3]。前期研究^[4]还表明在 EZH2 与 HOTAIR 结合区域和 EZH2 与 BRCA1 结合区域存在重叠,因此 HOTAIR 可竞争性抑制 BRC1 与 EZH2 的结合,这种竞争性结合在染色质水平上调节 PRC2 依赖性的基因转录。此外,HOTAIR 与 EZH2 的结合还依赖于 EZH2 的磷酸化修饰^[5]。EZH2 的苏氨酸残基 345 (T345) 和 487 (T487) 可被细胞周期依赖性蛋白激酶 CDK1 和 CDK2 磷酸化,而 EZH2-T345 磷酸化可增强 HOTAIR 与 EZH2 的亲合力,该位点的突变可破坏 HOTAIR 与 EZH2 的相互作用。总之,HOTAIR 主要通过影响特定基因位点 H3K27 甲基化状态而影响基因表达,最终促进肿瘤细胞的增殖、抑制细胞凋亡。本实验亦初步显示下调 HOTAIR 表达,肾癌细胞 ACHN 和 786-O 中 HOXD10 基因启动子上游 H3K27me3 含量显著降低,但尚需进一步验证(数据未提供)。

综上所述,本实验确定了 LncRNA HOTAIR 对肾癌细胞增殖的正调控作用,为肾癌的诊断和治疗提供了新的候选分子,为进一步研究分子机制奠定了基础。

(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] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11–30.
- [2] Ficarra V, Schips L, Guille F, et al. Multiinstitutional European validation of the 2002 TNM staging system in conventional and papillary localized renal cell carcinoma [J]. Cancer, 2005, 104(5): 968–74.
- [3] Basu B, Eisen T. Perspectives in drug development for metastatic renal cell cancer [J]. Target Oncol, 2010, 5(2): 139–56.

- [4] Pan Y F, Feng L, Harries L W, et al. Role of long non-coding RNAs in gene regulation and oncogenesis [J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(15): 2378–83.
- [5] Harries L W. Long non-coding RNAs and human disease [J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(4): 902–6.
- [6] Yang Z, Zhou L, Wu L M, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation [J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(5): 1243–50.
- [7] Chen F J, Sun M, Li S Q, et al. Upregulation of the long non-coding rna hotair promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis [J]. Mol Carcinog, 2013, 52(11): 908–15.
- [8] Nakagawa T, Endo H, Yokoyama M, et al. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 436(2): 319–24.
- [9] Gupta R A, Shah N, Wang K C, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. Nature, 2010, 464(7291): 1071–6.
- [10] He S, Liu S, Zhu H. The sequence, structure and evolutionary features of HOTAIR in mammals [J]. BMC Evol Biol, 2011, 11: 102.
- [11] 裴昌松, 范方田, 武 艺. 肾癌细胞系中 HOTAIR 表达的测定及稳定高表达 HOTAIR 肾癌细胞株的建立 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2014, 34(5): 548–52.
- [12] Tsai M C, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes [J]. Science, 2010, 329(5992): 689–93.
- [13] Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, et al. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibit pro-oncogenic activity in pancreatic cancer [J]. Oncogene, 2012, 32(13): 1616–25.
- [14] Wang L, Zeng X, Chen S, et al. BRCA1 is a negative modulator of the PRC2 complex [J]. EMBO J, 2013, 32(11): 1584–97.
- [15] Zeng X, Chen S, Huang H. Phosphorylation of EZH2 by CDK1 and CDK2: a possible regulatory mechanism of transmission of the H3K27me3 epigenetic mark through cell divisions [J]. Cell Cycle, 2011, 10(4): 579–83.

Effect of long non-coding RNA HOTAIR on the proliferation and apoptosis of renal cancer cells

Xia Ming^{1,2}, Huang Weiren², Cai Zhiming^{1,2}

(¹Shenzhen Second Hospital Clinical School of Anhui Medical University, Shenzhen 518035,

²Shenzhen Key Laboratory of Genitourinary Tumor and Key Laboratory of Medical Reprogramming Technology, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen)

Abstract Objective To investigate the effect of long non-coding RNA (LncRNA) Hox transcript antisense intergenic RNA (HOTAIR) on the cell proliferation and apoptosis of renal cancer cell lines 786-O and ACHN. **Methods** Small interfere RNA (siRNA) that aims to down-regulate HOTAIR expression was transfected into two

异氟烷预处理对脑缺血大鼠脑保护作用研究

邱焱¹, 董斌², 蔡晓岚¹

摘要 目的 研究异氟烷预处理局灶性脑缺血成年大鼠模型,通过检测缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血红素氧合酶-1 (HO-1) 以及 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 表达水平揭示其脑保护作用。方法 2 月龄 SD 大鼠随机分为假手术组、单纯大脑中动脉闭塞模型组 (MCAO 组)、异氟烷预处理组 (ISO 组),缺血再灌注采用 90 min 大脑中动脉闭塞 MCAO, MCAO 之前 ISO 组进行 30 min 异氟烷预处理,30 min 空气洗脱。再灌注 24 h 检测神经功能评分及脑梗死面积, MCAO 建模后再灌注 6、24、72 h 收集大鼠脑皮层组织, Western blot 法检测 HIF-1 α 、HO-1 以及 Bcl-2 表达水平。结果 MCAO 组术后 24 h 改良神经损伤严重程度评分 (mNSS 评分) 明显低于 ISO 组 ($P < 0.05$)。再灌注 24 h 检测结果显示, ISO 组神经损伤及脑梗死面积明显小于 MCAO 组 ($P < 0.05$)。建模 6、24 h 后 MCAO 组和 ISO 组 HIF-1 α 、HO-1 以及 Bcl-2 表达水平显著上升 ($P < 0.05$), 24 h 达到峰值, 72 h 时间点各指标与假手术组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 ISO 预处理通过上调 HIF-1 α 、HO-1 以及 Bcl-2 表达发挥脑保护作用, 但非长效作用。

关键词 异氟烷; 预处理; 神经保护; Bcl-2; 缺氧诱导因子-1 α ; 血红素氧合酶-1

中图分类号 R 971.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1099-04

研究有效措施和药物减少缺血性脑损伤是近年来医学研究的一大热点^[1]。最初发现于大脑和心脏的预处理现象是可用于降低缺血性损伤的方法之

一^[2-3]。异氟烷 (isoflurane, ISO) 是临床常用的挥发性麻醉剂,可诱导新生鼠和成年鼠脑的预处理效果^[4]。ISO 的预处理在围手术期可降低脑卒中的发生率,在确保麻醉效果的同时最低程度影响患者脑功能。该研究通过大鼠动物模型神经功能评分、脑梗死面积测定以及相关基因包括缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血红素氧化酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 以及 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 的表达水平,初步揭示 ISO 脑保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 2 月龄健康雄性 SD 大鼠购自中国医科大学实验动物部, 280 ~ 300 g, 随机分为假手术组、异氟烷处理组 (ISO 组) 和单纯大脑中动脉闭塞模型组 (MCAO 组)。ISO 组大鼠在 90 min 大脑中动脉闭塞 MCAO 建模前 24 h 暴露于 2% ISO 30 min, 操作方法参考文献^[5]报道。

1.2 挥发性麻醉药预处理 ISO 预处理方法,通过气管插管 30 min, 给予实验动物吸入 2% ISO 进行诱导,由呼吸机控制通气,保持正常呼气末 O_2 和 CO_2 浓度。吸入和呼出气体有德恩红外分析仪检测 (Capnomac 公司, 芬兰), 麻醉期间肛温保持 (37 ± 0.2) $^{\circ}C$ 。

1.3 MCAO 动物模型制备 大鼠称重后,按 3 ml/kg 体重的剂量应用 10% 水合氯醛腹腔麻醉,麻醉完成后,消毒颈部皮肤,颈正中切口,暴露颈总动脉、颈内及颈外动脉,将头端直径 0.38 mm 尼龙线栓由颈外动脉残端插入颈内动脉,操作轻柔,遇阻力即刻停止,保证线栓插入深度 18 ~ 20 mm,达到阻断鼠大脑中动脉血流的目的。术中检测大鼠肛温、监测心率

2015-03-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81371454)

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

作者简介: 邱焱, 女, 硕士研究生;

蔡晓岚, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: xiaolancai@126.com

renal cell lines respectively, and the transfection efficiency was evaluated by qRT-PCR. Then the MTT assay, Hoechst staining assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect cell proliferation and apoptosis. **Results** The expression of HOTAIR could be down-regulated effectively by the siRNA ($P < 0.05$). Down-regulation of HOTAIR could inhibit the proliferation ($P < 0.05$) and increase apoptosis ($P < 0.05$) of two renal cancer cells. **Conclusion** HOTAIR plays a role in promoting cell growth of renal cancer.

Key words renal cancer; long non-coding RNA; HOTAIR; cell proliferation; apoptosis