

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.13.007
文章编号: 1005-8982(2018)13-0040-05

临床研究·论著

长链非编码 RNA SBF2-AS1 在肺癌组织中的表达及作用研究*

杜玮¹, 周建龙¹, 叶丹²

(1. 广州军区广州总医院 内六科, 广东 广州 510010;
2. 广州市番禺区何贤纪念医院, 广东 广州 511400)

摘要: 目的 探讨长链非编码 RNA SBF2-AS1 在肺癌组织中的表达及对非小细胞肺癌细胞系 A549 及 H1299 细胞增殖、凋亡等的影响。**方法** 51 例肺癌组织标本(包括癌组织及癌旁组织), 实时荧光定量聚合酶链反应检测 SBF2-AS1 的表达量, 分析其与临床病例特征的关系; 用 siRNA 干扰 A549 及 H1299 细胞 SBF2-AS1 的表达, MTT 及流式细胞术分别检测其对细胞增殖、凋亡及周期的影响。**结果** SBF2-AS1 在癌组织中的表达量是癌旁组织的 5.05 倍; 且其表达水平与淋巴结转移、临床病理分期有密切关系。A549 及 H1299 细胞中 SBF2-AS1 的表达量被 siRNA 干扰下降后, 细胞的增殖减慢, 凋亡增加, 细胞周期被阻滞于 G₁/G₀ 期。**结论** SBF2-AS1 在肺癌组织中高表达, 可成为新的潜在的肺癌预测、预后判断的分子标志物及治疗靶点。

关键词: 长链非编码 RNA; SBF2-AS1; 肺癌; 增殖; 凋亡; 周期

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Expression and effect of long non-coding RNA SBF2-AS1 in lung cancer tissue and non-small cell lung cancer*

Wei Du¹, Jian-long Zhou¹, Dan Ye²

(1. The 6th Department of Internal Medicine, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 2. Hexian Memorial Hospital, Panyu, Guangzhou, Guangdong 511400, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of long non-coding RNA SBF2-AS1 in lung cancer tissues and its effect on growth and apoptosis of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** qRT-PCR was used to test the expression of SBF2-AS1 in 51 lung cancer tissues and matched adjacent normal tissues. Its correlations with the clinical parameters were analyzed. siRNA was used to knock down SBF2-AS1 expression in A549 and H1299 cells, its roles in cell growth and apoptosis were investigated by MTT and flow cytometry. **Results** The expression of SBF2-AS1 in the lung cancer tissues was significantly upregulated as compared with the matched adjacent normal tissues. Increased SBF2-AS1 expression was significantly correlated with tumor stage and lymph node metastasis. Knocking down SBF2-AS1 significantly reduced cell growth, promoted cell apoptosis, and resulted in cell cycle arrest at G₁/G₀ phase. **Conclusions** High expression of SBF2-AS1 is involved in lung cancer progression and SBF2-AS1 may be a potential target for diagnosis of NSCLC and gene therapy.

Keywords: long non-coding RNA; SBF2-AS1; lung cancer; proliferation; apoptosis; cell cycle

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一类转录本长度 <200 nt 的 RNA 分子, 其不编码任

何的蛋白质, 而是以 RNA 的形式存在。lncRNA 早期普遍被认为是基因组转录的噪音, 不具有任何生物学

收稿日期: 2017-08-11

* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金 (No: A2015240)

功能^[1-3]。随着近年研究的深入, 一些 lncRNA 的功能被逐渐阐明, 发现 lncRNA 在表观遗传水平的调控、转录调控及转录后调控, 对肿瘤的发生发展及胚胎干细胞上面都发挥重要作用^[1-3]。已有数据表明 SBF2-AS1 作为 1 个新的 lncRNA 在肺癌组织中高表达^[4], 因此本研究选其为实验对象, 验证其在肺癌组织中的表达情况, 并研究其与肺癌病例特征的关系, 并进一步研究探讨其对肺癌细胞生物学功能的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2011 ~ 2015 年广州军区广州总医院肺癌组织样本, 纳入标准: ①经病理确诊的肺癌患者; ②患者术前均未行放、化疗。手术切除癌组织及癌旁组织立即放入液氮, 而后置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。所有标本均经病理检查确诊。患者签署知情同意书并获医院伦理委员会审核通过。

1.2 主要试剂

RNA 逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司), MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), PE-Annexin-V/7-AAD 细胞凋亡试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司), Lipofectamine RNAimax reagent (美国 Invitrogen 公司)。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取及 qRT-PCR 检测 采用 Trizol 法提取肺癌及癌旁组织总 RNA, 分光光度计法测定提取 RNA 的浓度及纯度。按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书 2 步法完成逆转录反应, 得到 cDNA。qRT-PCR 检测癌组织及癌旁组织 SBF2-AS1 的表达量。SBF2-AS1 的 qRT-PCR 引物序列为 5'-AGACCATGTGGACCTGTCACTG-3' (正向引物) 5'-GTTTGGAGTGCTAGAAATCTGTC-3' (反向引物); 内参 GAPDH (磷酸甘油醛脱氢酶) 的引物序列为 5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3' (正向引物) 5'-ACCAGGCGCCCAATACG-3' (反向引物)。

1.3.2 细胞培养及质粒转染 培养 A549 细胞, 在转染前 1 天铺 6 孔板, 使细胞密度在 70% 左右, 铺好细胞后的第 2 天按照 Lipofectamine RNAimax reagent 的说明书转染细胞。siRNA 序列为分别为 si204: 5'-CAG AAGGAGUCUACUGCUAAG-3'; si1021: 5'-GCAAGCC UGCAUGGUACAUTT-3'。

1.3.3 细胞增殖速率检测 在转染 24 h 后用 96 孔板铺细胞, 每个孔铺 2 000 个细胞, 3 个复孔。然后 37℃, 5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱培养。按照 MTT 说明书分别检测 24、48、72 和 96 h 时的 450 nm 波长吸光度。做出细胞的增值曲线。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞的凋亡和周期 用不含 EDTA 的胰酶消化转染后的细胞, 检测细胞凋亡时按照 PE-Annexin-V/7-AAD 细胞凋亡试剂盒说明书双染细胞, 流式检测, 分析早期凋亡及晚期凋亡细胞比例。检测细胞周期时, 细胞离心, 去上清, 用预冷的 PBS 洗 2 遍, 然后用 75% 的乙醇重悬, -20℃ 固定过夜, 离心, PBS 洗涤后加 10 mg/L 溴化丙啶和 0.1% 的 RNase A 的 PBS 溶液 300 μl, 室温避光染色 10 min 后, 流式细胞仪检测细胞周期, 分析细胞 G₁/G₀、S 期及 G₂ 期细胞比例变化。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数的比较采用配对 *t* 检验或独立样本 *t* 检验, 两组以上样本均数的比较采用析因设计的方差分析, 分类资料采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SBF2-AS1 在非小细胞肺癌中的表达及与临床病例特征的关系

已有关于非小细胞肺癌中长链非编码 RNA 表达谱的数据表明, SBF2-AS1 在肺癌中高表达。本研究在 48 例肺癌患者组织样本中检测 SBF2-AS1 的表达量, 结果表明与正常组织比较, 肺癌组织 SBF2-AS1 表达量升高。其相对表达量为正常组织的 5.05 倍 (*P* < 0.05)。并且 SBF2-AS1 的表达量与淋巴结转移、临床病理分期有密切关系。见附表。

2.2 SBF2-AS1 在 293T、H1299 及 A549 细胞中的表达

SBF2-AS1 在非小细胞肺癌细胞系 A549、H1299 的表达量与 293T 相比差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 结果见图 1 所示。选定 A549 和 H1299 细胞作为研究对象, 进行后续实验。

2.3 SBF2-AS1 对 A549 细胞增殖的影响

两条 siRNA (si204, si1021) 都能干扰 SBF2-AS1 的表达, 导致 SBF2-AS1 的表达量降低, 见图 2 所示, 但 si1021 的效果优于 si204, 因此选择 si1021 进行后

续试验。MTT 细胞增殖实验结果表明，SBF2-AS1 的表达被干扰降低后导致 A549 和 H1299 细胞的增殖速率减慢，见图 3。空白对照组（blank 组）与 siRNA-NC 组相比差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），si1021 组与 siRNA-NC 组比较差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

2.4 SBF2-AS1 对 A549 和 H1299 细胞凋亡的影响

siRNA-NC 组与 blank 组比较差异无统计学意义，si1021 组细胞凋亡率与 siRNA-NC 组细胞凋亡率比较，A549 为（ 11.31 ± 1.792 ）% vs（ 3.35 ± 2.014 ）%（ $P <$

附表 SBF2-AS1 在肺癌组织样本中的表达及与临床病例特征的关系 例

项目	样本总量	高表达	低表达	χ^2 值	P 值
性别					
男性	32	15	17	0.375	0.760
女性	16	9	7		
年龄					
≤ 65 岁	22	13	9	1.340	0.385
≥ 65 岁	26	11	15		
是否吸烟					
否	14	9	5	1.610	0.341
是	34	15	19		
TNM 分期					
I	24	8	16	5.330	0.042
II、III	24	16	8		

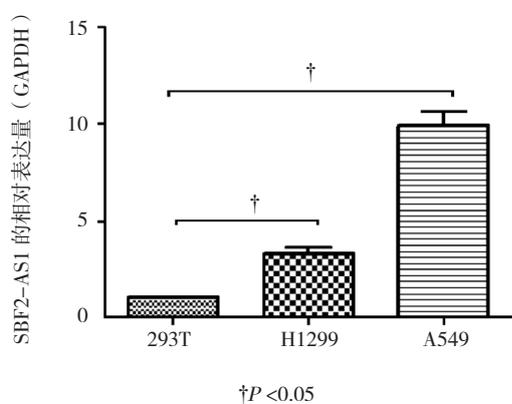


图 1 SBF2-AS1 在 293T、H1299 及 A549 细胞中的表达

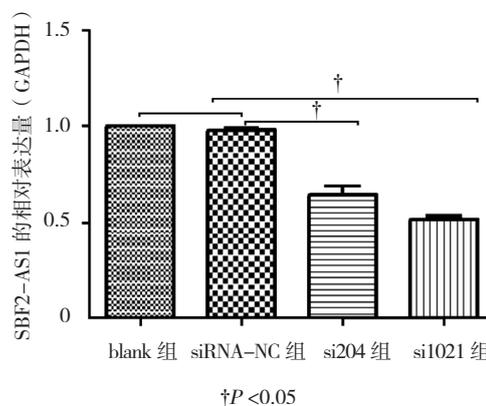


图 2 si204 和 si1021 干扰 SBF2-AS1 的表达

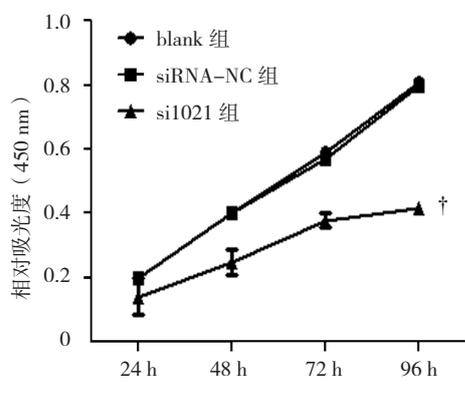
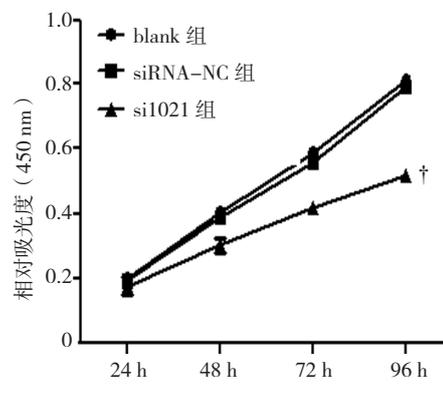


图 3 SBF2-AS1 对 A549 和 H1299 细胞增殖的影响



0.05); H1299 为 $(17.89 \pm 1.792) \%$ vs $(9.16 \pm 2.014) \%$ ($P < 0.05$)。结果表明 si1021 干扰 SBF2-AS1 表达量下降后, A549 及 H1299 细胞凋亡增加, 所以 SBF2-AS1 促进肿瘤生存。见图 4。

2.5 SBF2-AS1 对 A549 和 H1299 细胞周期的影响

2 种细胞各个时期细胞比例 siRNA-NC 组与

blank 组比较差异无统计学意义。对于 A549 细胞来说, 与 siRNA-NC 组比较, si1021 组 G₁/G₀ 细胞由 65.66% 增至 72.84%, 而 S 期 + G₂ 期细胞由 $(34.34 \pm 2.32) \%$ 降至 $(27.16 \pm 1.59) \%$ ($P < 0.05$), 对 H1299 细胞来说, 与 NC 组比较, si1021 组 G₁/G₀ 细胞由 67.84% 加至 84.67%, 而 S 期 + G₂ 期细胞由 $(32.16 \pm 2.32) \%$ 降至 $(15.33 \pm 1.59) \%$ ($P < 0.05$)。见图 5。

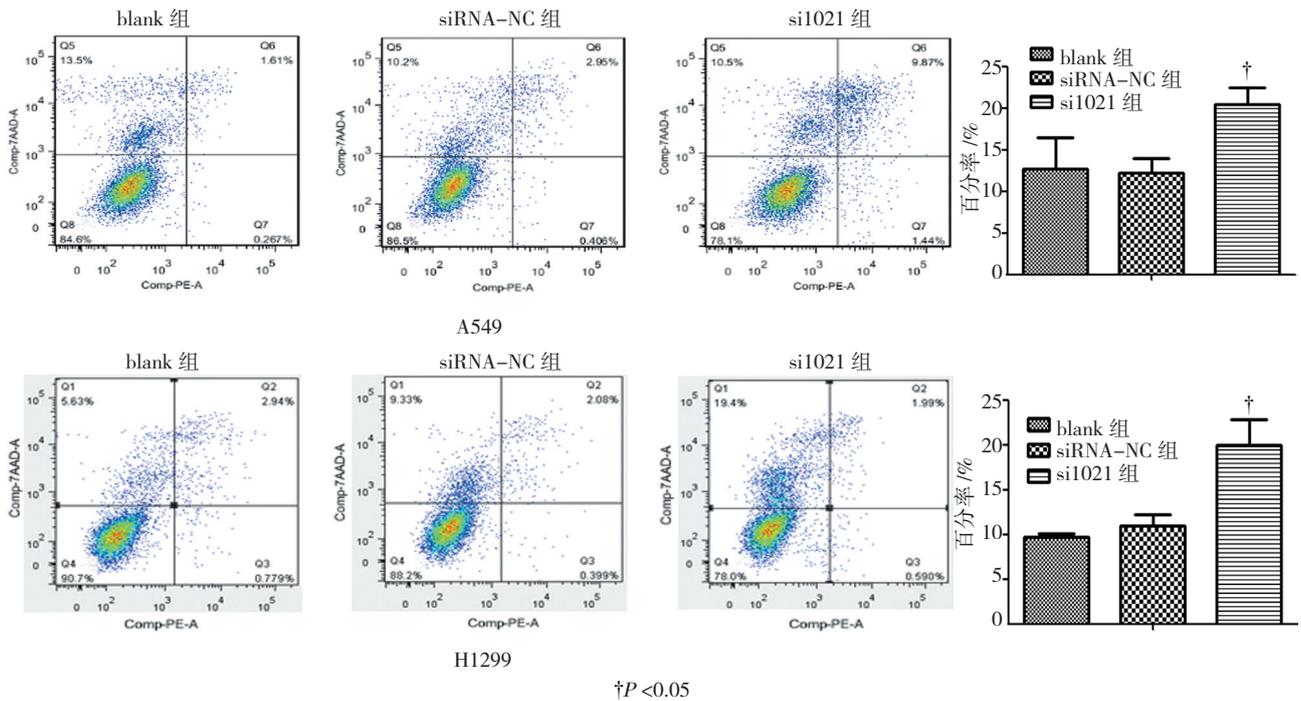
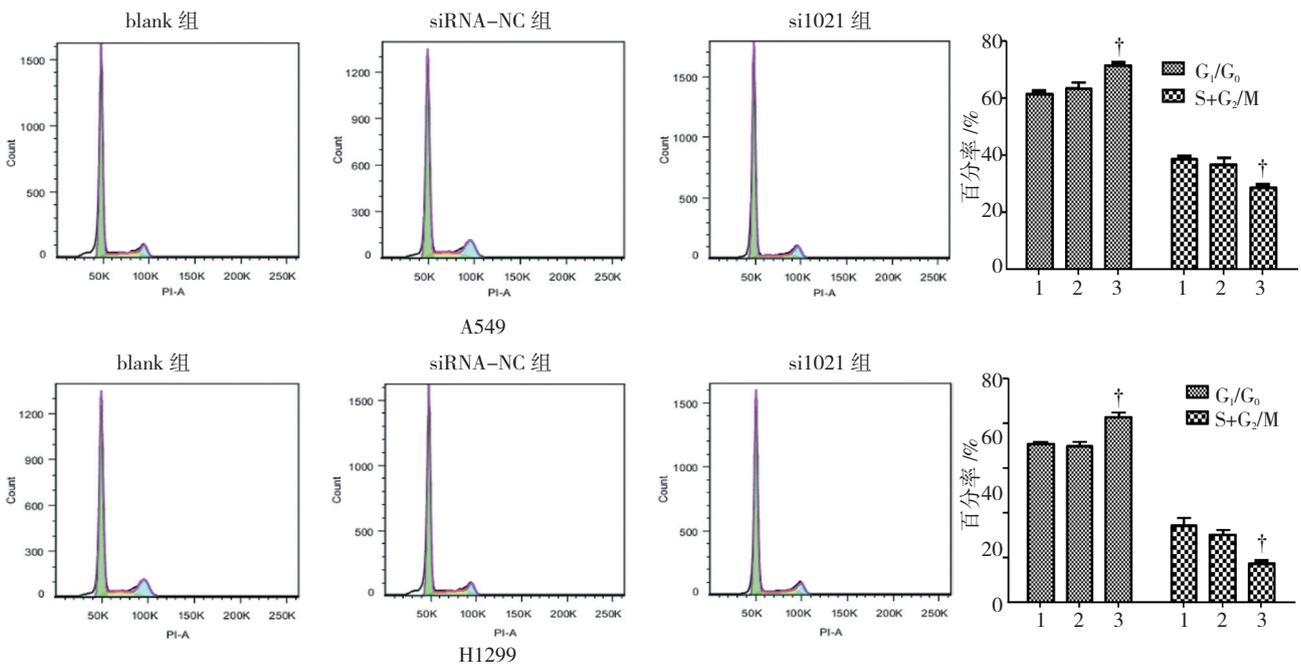


图 4 SBF2-AS1 对 A549 及 H1299 细胞凋亡的影响



1: blank 组; 2: siRNA-NC 组; 3: si1021 组。† $P < 0.05$

图 5 SBF2-AS1 对 A549 和 H1299 细胞周期的影响

3 讨论

近年来,随着 lncRNA 的深入研究,大量研究结果表明 lncRNA 与实体瘤如脑^[5-6]、肺^[7-8]、乳腺^[9]、胰腺^[10-11]、肝^[12]等有密切关系。这为癌症的研究提供了更为广阔的思路。对于肺癌来说,众多特异性的 lncRNA 也逐渐被发现。

SBF2-AS1 作为一个新发现的 lncRNA,并未有相关功能研究的报导。首先根据仅有的数据提示,检测其在肺癌及癌旁组织表达量的差异,发现其在癌组织中高表达。并由此进一步分析其表达量与临床病理特征的关系,发现其与肺癌临床病理分期及淋巴结转移关系密切。在非小细胞肺癌细胞株 A549 和 H1299 用 siRNA 干扰 SBF2-AS1 的表达,使其表达水平下降之后,分析 SBF2-AS1 对肺癌细胞株功能的影响。发现随着 SBF2-AS1 的表达下调,A549 和 H1299 细胞增殖均减慢,流式细胞术分析发现,细胞凋亡比例增加,细胞周期出现 G₁/G₀ 阻滞。已有诸多相关研究表明,lncRNA 可通过调节细胞增殖与凋亡之间的平衡来调控细胞生长,这也是 lncRNA 发挥功能的 1 个机制,如 lncRNA GAS5^[13]、PCGEM1^[14]、PCAT-1^[15]、CCAT2 等^[16]功能的相关研究,SBF2-AS1 亦可通过影响细胞周期调控细胞增殖。

综上所述,SBF2-AS1 在肺癌组织中高表达且其表达量与患者的临床病理分期及淋巴结转移相关。该 lncRNA 的高表达还会通过对凋亡和细胞周期的调节加快肺癌细胞株的增殖速率。新的 lncRNA SBF2-AS1 功能的发现及阐明提供了新的肺癌诊断及预后判断的分子标志物,及潜在的治疗靶点。但其具体转录调控机制还有待进一步阐明。

参 考 文 献:

- [1] ESTELLER M. Non-coding RNAs in human disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(12): 861-74.
- [2] PONTING C P, OLIVER P L, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641.
- [3] WANG K C, CHANG H Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2011, 43(6): 904-914.
- [4] WEI T Y, JUAN C C, HISA J Y, et al. Protein arginine methyltransferase 5 is a potential onco-protein that upregulates G1 cyclins/cyclin-dependent kinases and the phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling cascade[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(9): 1640-1650.
- [5] ALOYZ R, XU Z Y, BELLO V, et al. Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIIH subunit XPD[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(19): 5457-5462.
- [6] ZHANG X, SUN S, PU J K, et al. Long non-coding RNA expression profiles predict clinical phenotypes in glioma[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 48(1): 1-8.
- [7] JI P, DIEDERICH S, WANG W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(39): 8031-8041.
- [8] YANG F, HUO X S, YUAN S X, et al. Repression of the long non-coding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis[J]. *Mol Cell*, 2013, 49(6): 1083-1096.
- [9] XING Z, LIN A, LI C, et al. lncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals[J]. *Cell*, 2014, 159(5): 1110-1125.
- [10] BRUNNER A L, BECK A H, EDRIS B, et al. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers[J]. *Genome Biol*, 2012, 13(8): R75.
- [11] YANG F, YI F, ZHENG Z, et al. Characterization of a carcinogenesis-associated long non-coding RNA[J]. *RNA Biol*, 2012, 9(1): 110-116.
- [12] ASKARIAN-AMIRI M E, CRAWFORD J, FRENCH J D, et al. SNORD-host RNA Zfas1 is a regulator of mammary development and a potential marker for breast cancer[J]. *RNA*, 2011, 17(5): 878-891.
- [13] MOURTADA-MAARABOUNI M, PICKARD M R, HEDGE V L, et al. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2009, 28(2): 195-208.
- [14] SRIKANTAN V, ZOU Z, PETROVICS G, et al. PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(22): 12216-12221.
- [15] PRENSNER J R, IYER M K, BALBIN O A, et al. Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 742-749.
- [16] QIU M T, XU Y T, YANG X, et al. CCAT2 is a lung adenocarcinoma-specific long non-coding RNA and promotes invasion of non-small cell lung cancer[J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(6): 5375-5380.

(张西倩 编辑)