

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.12.007

文章编号: 1005-8982(2017)12-0035-05

长链非编码 RNA PRNCR1 对胃癌细胞 增殖、侵袭及转移的研究

蔡毅

(南华大学附属第一医院 急诊内科, 湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 探索胃癌 MGC-803 细胞和人正常胃黏膜上皮 GES-1 细胞中,长链非编码 RNA PRNCR1 的表达,以及沉默 PRNCR1 对胃癌 MGC-803 细胞增殖、侵袭及迁移的影响。**方法** 利用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞中 PRNCR1 表达水平;设计并合成 PRNCR1-siRNA 及对照序列(PRNCR1-NC)转染胃癌细胞,通过 qRT-PCR 检测细胞中 PRNCR1 的沉默效果;利用四甲基偶氮唑盐比色法检测胃癌细胞的增殖;Transwell 实验检测胃癌细胞迁移和侵袭能力的变化。**结果** PRNCR1 在胃癌 MGC-803 细胞中的表达高于人正常胃黏膜上皮 GES-1 细胞,PRNCR1-siRNA 可以下调胃癌 MGC-803 细胞中 PRNCR1 的表达,并可以抑制 MGC-803 细胞的增殖和侵袭转移能力。**结论** PRNCR1-siRNA 能够下调 PRNCR1 的表达,并有效抑制胃癌细胞的增殖和侵袭转移力,为以 PRNCR1 为靶点的胃癌基因治疗奠定理论基础。

关键词: 长链非编码 RNA;前列腺癌非编码 RNA1;增殖;侵袭;转移;胃癌

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Long non-coding RNA PRNCR1 promotes proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells

Yi Cai

(Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, University of South China,
Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To observe the expressions of long non-coding RNA PRNCR1 in gastric cancer MGC-803 cells and normal gastric mucosa epithelial GES-1 cells, and to study the effect of PRNCR1 on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by silencing the expression of PRNCR1. **Methods** siRNA fragments (PRNCR1-siRNA) and control fragments (PRNCR1-NC) were designed, synthesized and transfected to gastric cancer cells. The expression of PRNCR1 was detected by qRT-PCR. Cell proliferation was detected by MTT. Migration and invasion of gastric cancer cells were detected by Transwell assay. **Results** The expression of PRNCR1 in the MGC-803 cells was higher than that in the GES-1 cells. The expression of PRNCR1 was reduced by PRNCR1-siRNA in the MGC-803 cells. The proliferation, invasion and migration of the MGC-803 cells decreased after transfection of PRNCR1-siRNA. **Conclusions** The expression of PRNCR1 can be down-regulated by PRNCR1-siRNA, and PRNCR1-siRNA could inhibit the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells, which provides a theoretical foundation for gene therapy of gastric cancer targeting at PRNCR1 gene.

Keywords: long non-coding RNA; PRNCR1; proliferation; invasion; migration; gastric cancer

胃癌是源自胃黏膜上皮的恶性肿瘤,占全部恶性肿瘤的第 3 位,居消化道恶性肿瘤的首位,占胃恶性

肿瘤的 95%。早期胃癌多无症状或仅有轻微症状,当临床症状明显时,病变已属晚期。由此可见,胃癌严重威胁着人类的健康^[1]。目前,胃癌的致病基因、发病机制及影响预后的因素仍不清楚,因此寻找胃癌发生、发展的致病因素具有重要意义。

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类不具有蛋白质编码功能、长度 >200 nt 的 RNA。最新研究显示, lncRNA 并非既往认为的“噪音”RNA,而是在生物进化过程中高度保守,具有重要调控功能的非编码 RNA^[2]。前列腺癌非编码 RNA1 (prostate cancer non-coding RNA 1, PRNCR1)定位于染色体 8q24,长约 13 kb,已经被证实在前列腺癌、结肠癌中发挥重要作用^[3]。最新研究发现, PRNCR1 的基因多态性与胃癌的患病风险有关^[4]。但 PRNCR1 在胃癌中的作用尚不清楚。本实验通过探索 PRNCR1 在胃癌细胞和人正常胃黏膜上皮细胞中的表达,并通过 RNA 干扰技术沉默胃癌细胞中 PRNCR1 的表达,检测其对胃癌细胞增殖、侵袭及转移能力的影响,为将 PRNCR1 分子作为胃癌基因治疗靶点提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Trizol 细胞裂解液购于北京博润莱特科技有限公司, RNA 反转录试剂、实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, 细胞转染试剂购自美国 Invitrogen 公司, 四甲基偶氮唑盐比色法 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 试剂购自美国 Promega 公司, 细胞侵袭转移检测 transwell 小室购自美国 Milipore 公司, 基质胶购自美国 Sigma 公司, MGC-803 细胞、GES-1 细胞购自上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 PRNCR1-siRNA 的设计和合成 根据 PRNCR1 序列,按照 siRNA 作用靶点设计原则,利用美国 Invitrogen 公司的 siRNA 作用靶点设计软件,委托上海吉玛基因股份有限公司合成相应的 siRNA 及对照序列,分别为 PRNCR1-siRNA、PRNCR1-NC。

1.2.2 细胞培养和转染 MGC-803 细胞、GES-1 细胞用含 100 ml/L 胎牛血清的达尔伯克必需基本培养基 (dulbecco's minimum essential medium, DMEM), 于 37℃、50 ml/L 二氧化碳 CO₂ 细胞培养箱中培养。

适量 MGC-803 细胞接种在 25 mm² 培养皿中,待细胞密度达 70%~80%后,将合成的 PRNCR1-siRNA、PRNCR1-NC 经 Lipofectamine 2000 转染至 MGC-803 细胞中,具体操作按 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书操作。转染后的细胞分别为 PRNCR1-siRNA 组和 PRNCR1-NC 组。

1.2.3 qRT-PCR 检测 PRNCR1 的表达 利用 qRT-PCR 对 PRNCR1 表达进行检测。收集转染 48 h 后的细胞,利用 Trizol 细胞裂解液提取细胞,得总 RNA,并反转录为 cDNA。PRNCR1 定量 PCR 引物。正向引物:5'-CCAGGGGGAACACACAG-3'; 反向引物:5'-AAATGGCAGTTTCCTTCAATG-3'。β-actin 作为看家基因,正向引物:5'-TTGGCTTGACTCAGG ATTTA-3',反向引物:5'-ATGCTATCACCTCCCCTGT G-3'。引物序列合成由深圳华大基因公司完成。反应条件:95℃预变性 4 min,95℃变性 12 s,59℃退火 35 s,共 41 个循环。每组 3 个复孔,实验重复 3 次,将所得数据绘制成柱状图。

1.2.4 MTT 实验检测 MGC-803 细胞增殖 取转染 48 h 后且处于对数生长期的 MGC-803 细胞,常规洗涤 2 遍,用胰蛋白酶消化细胞,离心重悬后制成单细胞悬液,并调整细胞浓度为 3×10⁴ 个/ml,加入细胞悬液 200 μl/孔,每组设 7 个复孔。共培养 5 个 96 孔板,分别培养 1~5 d,检测 1 板/d。每天于实验结束前 4 h,加入 5 mg/ml MTT 20 μl/孔,放入孵箱继续培养 4 h,弃上清液,加入二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 150 μl/孔,震荡 11 min,使 MTT 的还原产物充分溶解,于 490 nm 处测定细胞的光密度 (optical density, OD) 值。

1.2.5 Transwell 实验检测 MGC-803 细胞侵袭和转移能力 MGC-803 细胞转染 48 h 后,通过 Transwell 实验检测细胞侵袭和转移力的变化,每组设 3 个复孔。胰蛋白酶消化各组细胞,无菌磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗 3 遍,离心后用牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 10 g/L 无血清培养基重悬细胞,将细胞密度调整为 1×10⁵ 个/ml,事先用基质胶包被好 Transwell 小室中上室的基底膜,每组细胞悬液中取 150 μl 加入上室中,将小室放入 24 孔板中,下室中加入含有胎牛血清的培养基 500 μl,培养 36 h。结束后,将小室取出, PBS 轻轻冲洗,棉签擦去小室上室内层的细胞,95%乙醇固定 6 min,4 g/L 结晶紫溶液染色后,倒置显微镜下计数,每样本随机选取 5 个视野进行计数后取平均值,绘

制柱状图。检测 MGC-803 细胞转移能力时,小室的上室中无需基质胶包被基底膜,其他步骤与上述方法相同。

1.3 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,用 t 检验或重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PRNCR1 在 MGC-803 细胞中高表达

收集对数生长期的 MGC-803 和 GES-1 细胞,提取细胞总 RNA,qRT-PCR 检测 PRNCR1 的表达。结果显示,经标准化后,GES-1 细胞 PRNCR1 相对表达量为 (1.000 ± 0.051),MGC-803 细胞 PRNCR1 相对表达量为 (3.146 ± 0.783),经 t 检验,差异有统计学意义 ($t = 6.844, P = 0.017$),与 GES-1 细胞比较,PRNCR1 在 MGC-803 细胞中高表达。见图 1。

2.2 PRNCR1-siRNA 下调 MGC-803 细胞中 PRNCR1 的表达

PRNCR1-siRNA 及对照序列转染 MGC-803 细胞后 48 h,抽提细胞总 RNA,qRT-PCR 检测其表达。结果显示,经标准化后,PRNCR1-NC 组 PRNCR1 相对表达量为 (1.000 ± 0.153),PRNCR1-siRNA 组细胞 PRNCR1 相对表达量为 (0.488 ± 0.091),经 t 检验,差异有统计学意义 ($t = 7.841, P = 0.009$),PRNCR1-siRNA 组 PRNCR1 表达较 PRNCR1-NC 组下调。见图 2。

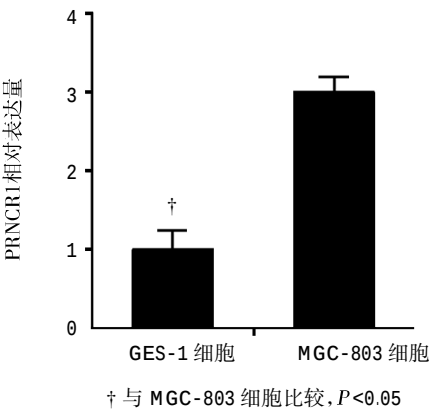


图 1 细胞中 PRNCR1 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 PRNCR1-siRNA 抑制 MGC-803 细胞增殖

MTT 实验检测 PRNCR1-siRNA 对 MGC-803 细胞增殖的影响,PRNCR1-siRNA 与 PRNCR1-NC 组术后 24、48、72、96 和 124 h 测量的 OD 值比较,采用重复测量数据的方差分析,结果:①不同时间点的 OD 值有差异 ($F = 8.105, P = 0.014$);②PRNCR1-siRNA 组与 PRNCR1-NC 组的 OD 值有差异 ($F = 16.217, P = 0.008$),PRNCR1-siRNA 组较 PRNCR1-NC 组 OD 值低,增殖速度较慢;③PRNCR1-siRNA 组与 PRNCR1-NC 组的 OD 值变化趋势有差异 ($F = 7.814, P = 0.032$),从检测后第 3 天开始,PRNCR1-siRNA 组细胞的增殖速度较 PRNCR1-NC 组缓慢。见图 3 和附表。

2.4 PRNCR1-siRNA 抑制 MGC-803 细胞的侵袭

PRNCR1-siRNA 及对照序列转染 MGC-803 细胞 48 h 后,结果显示,PRNCR1-siRNA 组穿过 Matrigel 包被的微孔膜的细胞数目为 (21.635 ± 7.424) 个 / 高倍镜,PRNCR1-NC 组穿过 Matrigel 包被的微孔膜的

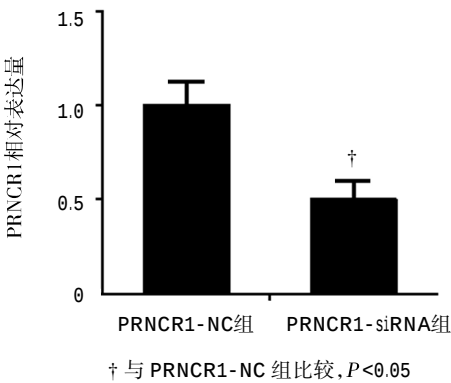


图 2 两组细胞 PRNCR1 表达变化 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

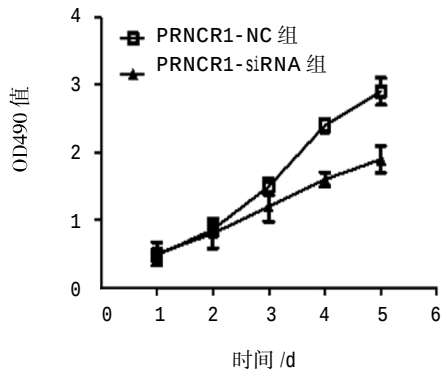


图 3 PRNCR1-siRNA 对细胞增殖的影响

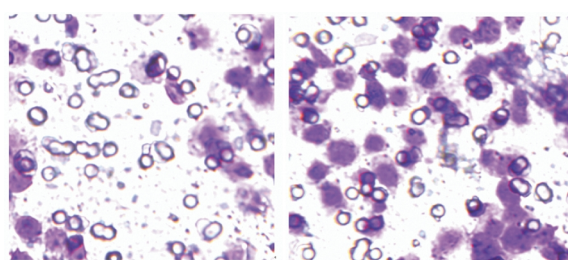
附表 两组各时间点 OD 值比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
PRNCR1-NC 组	0.481 ± 0.100	0.863 ± 0.090	1.501 ± 0.121	2.407 ± 0.104	2.901 ± 0.201
PRNCR1-siRNA 组	0.503 ± 0.171	0.804 ± 0.221	1.201 ± 0.221	1.614 ± 0.107	1.915 ± 0.224

细胞数目为 (52.471 ± 9.518) 个/高倍镜,经 t 检验,差异有统计学意义($t=10.471, P=0.025$),PRNCR1-siRNA 组穿过 Matrigel 包被的微孔膜的细胞数目少于 PRNCR1-NC 组。说明沉默 PRNCR1 表达后,可以抑制 MGC-803 细胞的侵袭能力。见图 4。

2.5 PRNCR1-siRNA 抑制 MGC-803 细胞迁移

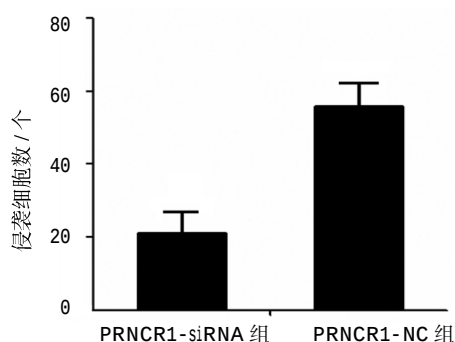
PRNCR1-siRNA 及对照序列转染 MGC-803 细胞 48 h 后,PRNCR1-siRNA 组穿过 Matrigel 包被的微孔膜的细胞数目为 (23.534 ± 5.176) 个/高倍镜,PRNCR1-NC 组穿过 Matrigel 包被的微孔膜的细胞数目为 (41.512 ± 8.873) 个/高倍镜,经 t 检验,差异有统计学意义($t=9.214, P=0.017$),PRNCR1-siRNA 组穿过 Matrigel 包被的微孔膜的细胞数目少于 PRNCR1-NC 组,说明沉默 PRNCR1 表达后,可以抑制 MGC-803 细胞的迁移能力。见图 5。



PRNCR1-siRNA组

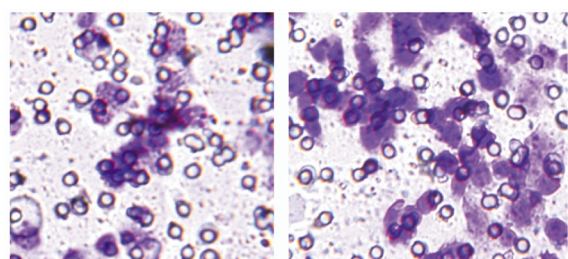
PRNCR1-NC组

A 显微镜下直观图 ($\times 100$)



B 侵袭细胞数比较

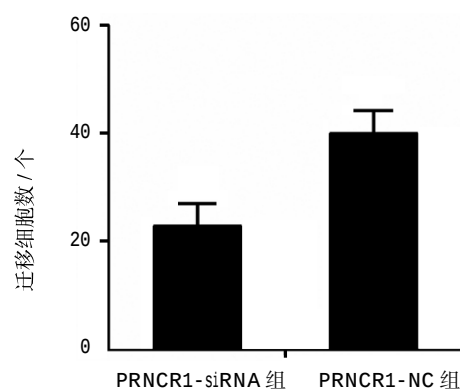
图 4 MGC-803 细胞侵袭能力的变化



PRNCR1-siRNA组

PRNCR1-NC组

A 显微镜下直观图 ($\times 100$)



B 迁移细胞数比较

图 5 MGC-803 细胞迁移能力的变化

3 讨论

lncRNA 仅仅是 RNA 聚合酶 II 的转录副产物,在生物体内没有任何生物学功能,但最近发现,lncRNA 不仅可在多种层面上对基因的表达进行调控,而且与多种疾病的发生密切相关。目前大量相关研究证实,lncRNA 的异常表达会导致其调控的下游功能基因异常表达,最终导致机体产生严重的病理变化,更有甚者诱导肿瘤的发生、发展^[5]。肺腺癌转移相关转录子 -1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript-1, MALAT-1) 是一类存在于细胞核内的长链非编码 RNA。研究证实,MALAT-1 的异常表达与人类多种肿瘤的发生、发展密切相关,包括宫颈癌、前列腺癌、胰腺癌等,并与一些肿瘤的远处转移、术后复发及药物治疗耐药有关^[6]。PRENSNER 等^[7]研究发现,在前列腺癌中长链非编码 RNA PCGEM1 过表达,PCGEM1 可促进前列腺癌细胞的恶性增殖,并与患者的不良预后相关。lncRNAs 可以在人的循环血液中检测到,并在肿瘤中异常表达,说明 lncRNAs 很可能成为肿瘤的特异性诊断标志物。有研究报道,与健康对照组血清比较,长链非编码 RNA XLOC_006844、LOC152578 及 XLOC_000303 在结肠癌患者血清中表达升高,提示这 3 种 lncRNAs 很可能成为结肠癌诊断的新指标^[8]。循环血清中的 lncRNA HOTAIR 可以作为乳腺癌早期诊断的生物学指标^[9]。由此可见,lncRNAs 在肿瘤的发生、发展中发挥着至关重要的作用。

lncRNAs 在胃癌的研究中也有许多研究进展,LIU 等^[10]研究发现,H19 通过 RUNX1 促进胃癌的增殖和侵袭。PANDAR 的高表达预示着胃癌患者预后不良^[11]。LI 等^[12]发现,PRNCR1 的基因多态性可能是

胃癌的一个致病因素。但 PRNCR1 在胃癌中的作用并不清楚,因此,研究其在胃癌细胞中的表达及其在胃癌发生、发展中的作用,将有助于更加全面地了解胃癌发生、发展的原因。

2011 年,CHUNG 等^[13]研究发现,PRNCR1 基因在前列腺癌细胞中表达上调,沉默前列腺癌细胞中 PRNCR1 的表达,可降低雄激素受体(androgen receptor, AR)的转录活性,表明 PRNCR1 在前列腺癌中通过调控 AR 的转录活性促进前列腺癌的发生。有研究显示,PRNCR1 的基因多态性与结肠癌及胃癌的易感性相关^[14]。此外,PRNCR1 表达上调可以促进结肠癌细胞的增殖,沉默其表达可以抑制结肠癌细胞的细胞周期。而 PRNCR1 在胃癌细胞中的作用尚未有研究报道,其作用的分子机制更有待进一步研究。

本实验合成靶向人 PRNCR1 基因的双链 siRNA 序列,直接转染入胃癌细胞中,通过 qRT-PCR 检测转染后 siRNA 的沉默效果,通过 MTT 实验验证胃癌细胞增殖能力的变化,通过细胞侵袭转移实验验证胃癌细胞侵袭和迁移能力的变化,最终证实沉默 PRNCR1 在胃癌细胞中的表达可以抑制胃癌细胞的增殖、侵袭及转移能力,为以 PRNCR1 为靶点的胃癌基因治疗奠定理论基础。

参 考 文 献:

- [1] WANG S, ZHAO D, TIAN R, et al. FGF19 contributes to tumor progression in gastric cancer by promoting migration and invasion[J]. *Oncol Res*, 2016, 23(4): 197-203.
- [2] PARALKAR V R, TABORDA C C, HUANG P, et al. Unlinking an lncRNA from its associated cis element[J]. *Mol Cell*, 2016, 62(1): 104-110.
- [3] YANG L, QIU M, XU Y, et al. Upregulation of long non-coding RNA PRNCR1 in colorectal cancer promotes cell proliferation and cell cycle progression[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 318-324.
- [4] LI L J, JIA F, BAI P, et al. Association between polymorphisms in long non-coding RNA PRNCR1 in 8q24 and risk of gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1): 299-303.
- [5] FANG Y, FULLWOOD M J. Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(1): 42-54.
- [6] ZHANG Y, WANG T, HUANG H Q, et al. Human MALAT-1 long non-coding RNA is overexpressed in cervical cancer metastasis and promotes cell proliferation, invasion and migration[J]. *J BUON*, 2015, 20(6): 1497-1503.
- [7] PRENSNER J R, SAHU A, IYER M K, et al. The lncRNAs PCGEM1 and PRNCR1 are not implicated in castration resistant prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(6): 1434-1438.
- [8] WANG F, REN S, CHEN R, et al. Development and prospective multicenter evaluation of the long noncoding RNA MALAT-1 as a diagnostic urinary biomarker for prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22): 11091-11102.
- [9] JIAO F, HU H, YUAN C, et al. Elevated expression level of long noncoding RNA MALAT-1 facilitates cell growth, migration and invasion in pancreatic cancer[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(6): 2485-2492.
- [10] LIU G, XIANG T, WU Q F, et al. Long noncoding RNA H19-Derived miR-675 enhances proliferation and invasion via RUNX1 in gastric cancer cells[J]. *Oncol Res*, 2016, 23(3): 99-107.
- [11] PETROVICS G, ZHANG W, MAKAREM M, et al. Elevated expression of PCGEM1, a prostate-specific gene with cell growth-promoting function, is associated with high-risk prostate cancer patients[J]. *Oncogene*, 2004, 23(2): 605-611.
- [12] LI L, SUN R, LIANG Y, et al. Association between polymorphisms in long non-coding RNA PRNCR1 in 8q24 and risk of colorectal cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013, 32(1): 104.
- [13] CHUNG S, NAKAGAWA H, UEMURA M, et al. Association of a novel long non-coding RNA in 8q24 with prostate cancer susceptibility[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(1): 245-252.

(童颖丹 编辑)