

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.10.011

文章编号: 1005-8982(2017)10-0057-05

## 长链非编码 RNA GAS5 在子宫内膜癌中的表达及对肿瘤侵袭的影响

程洁<sup>1</sup>, 王博<sup>2</sup>

(解放军 451 医院 1. 妇产科, 2. 腔镜外科, 陕西 西安 710054)

**摘要:** **目的** 探讨长链非编码 RNA GAS5 在子宫内膜癌组织中的表达及其对子宫内膜癌 HEC-1A 细胞侵袭能力的影响。 **方法** 筛选 2013 年 1 月 - 2015 年 12 月间于解放军 451 医院妇产科行手术切除的子宫内膜癌患者的癌及癌旁组织 50 例, 分析 lncRNA-GAS5 在组织中的表达水平及临床意义; 通过重组质粒在子宫内膜癌 HEC-1A 细胞中过表达 lncRNA-GAS5, 采用 Transwell 侵袭小室模型检测过表达 lncRNA-GAS5 后 HEC-1A 细胞侵袭能力变化, qRT-PCR 检测 microRNA-21 的表达变化, qRT-PCR 及 Western blot 检测 PTEN 表达变化。 **结果** lncRNA-GAS5 在子宫内膜癌组织中表达水平低于对应癌旁组织 ( $t=4.013, P<0.05$ ), 子宫内膜癌组织中长链非编码核糖核酸生长组织特异性转录本 5 (lncRNA-GAS5) 低表达与肿瘤淋巴结转移 ( $t=2.389, P=0.017$ ) 及高 FIGO 分期 (III+IV 期,  $t=2.131, P=0.021$ ) 差异有统计学意义; lncRNA-GAS5 重组质粒转染 HEC-1A 细胞后可抑制细胞的侵袭能力 ( $t=7.654, P=0.008$ ); qRT-PCR 检测发现过表达 lncRNA-GAS5 后 microRNA-21 (miR-21) 的表达水平升高 ( $t=23.533, P<0.05$ ), qRT-PCR 及 Western blot 结果证实, 过表达 lncRNA-GAS5 后可促进 PTEN 的表达 ( $P<0.05$ )。 **结论** lncRNA-GAS5 在子宫内膜癌组织中表达降低, lncRNA-GAS5 可能通过下调 miR-21 的表达进而恢复 PTEN 的表达来抑制子宫内膜癌转移。

**关键词:** lncRNA-GAS5; 子宫内膜癌; 侵袭; microRNA-21; PTEN

**中图分类号:** R711

**文献标识码:** A

## Expression of long noncoding RNA GAS5 in endometrial carcinoma and its role in tumor invasion

Jie Cheng<sup>1</sup>, Bo Wang<sup>2</sup>

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, 2. Department of Endoscopic Surgery, the 451st Hospital of PLA, Xi'an, Shanxi 710054, China)

**Abstract:** **Objective** To study the expression of long noncoding RNA GAS5 (lncRNA-GAS5) in endometrial carcinoma and its role in regulation of cell invasion. **Methods** Endometrial carcinomas and the matched tumor adjacent tissues were collected from 50 cases who received surgical treatment in our hospital between January 2013 and December 2015. The expression of lncRNA-GAS5 was detected by qRT-PCR. LncRNA-GAS5 over-expression plasmid was transfected into HEC-1A cells. Transwell invasion assay model was used to measure cell invasion. The expressions of miR-21 and PTEN were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** The expression of lncRNA-GAS5 in the endometrial carcinoma tissues was significantly lower than that in the adjacent tissues ( $t=4.013, P<0.05$ ). Low expression of lncRNA-GAS5 was associated with lymphatic metastasis ( $t=2.389, P=0.017$ ) and advanced FIGO stage (stage III and IV;  $t=2.131, P=0.021$ ). Over-expression of lncRNA-GAS5 could significantly suppress the invasive ability of HEC-1A cells ( $t=7.654, P=0.008$ ). Moreover, over-expression of lncRNA-GAS5 promoted miR-21 and PTEN expressions ( $P<0.05$ ). **Conclusions** lncRNA-GAS5 expression is

收稿日期: 2016-12-08

[通信作者] 王博, E-mail: wangbob1212@163.com; Tel: 13038933400

lowered in endometrial carcinoma tissues and associated with cell invasion. LncRNA-GAS5 may suppress metastasis of endometrial carcinoma by inhibiting miR-21/PTEN axis.

**Keywords:** lncRNA-GAS5; endometrial carcinoma; invasion; miR-21; PTEN

子宫内膜癌(endometrial carcinoma)是女性生殖系统常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,由于其早期症状隐匿,手术后易复发且化疗敏感性低等生物学特点,子宫内膜癌已成为危害我国女性身体健康的重大公共卫生问题<sup>[2]</sup>。子宫内膜癌病理类型复杂,其中子宫内膜腺癌是最常见的病理类型之一<sup>[3]</sup>,子宫内膜腺癌细胞生物学特性的研究对于寻找新的治疗靶点及提高我国子宫内膜癌诊治水平具有重要意义。

长链非编码核糖核酸(long noncoding ribonucleic acid, lncRNA)是一类长度>200个核苷酸的非编码单链RNA<sup>[4]</sup>,在肿瘤生长、转移等生物学过程中发挥重要调节作用<sup>[5]</sup>。最新研究指出,长链非编码核糖核酸生长组织特异性转录本5(long noncoding RNA-growth arrest-specific transcript 5, lncRNA-GAS5)在癌症进展过程中具有重要的调节作用<sup>[6]</sup>,而其在子宫内膜癌中的临床意义及生物学功能尚不清楚。本研究通过检测 lncRNA-GAS5 的表达及对子宫内膜癌 HEC-1A 细胞侵袭过程的调控作用,研究 lncRNA-GAS5 在子宫内膜癌生长中的临床意义及作用机制,为子宫内膜癌的分子诊断与靶向治疗提供一定的理论依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床标本及主要试剂

筛选 2013 年 1 月-2015 年 12 月解放军 451 医院妇产科行手术切除并经病理检查证实为子宫内膜腺癌患者的肿瘤及对应癌旁组织(距肿瘤边缘>2 cm)50 例,平均年龄( $43.2 \pm 1.3$ )岁。RNA 提取试剂 Trizol 及转染试剂 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 购自美国 Invitrogen 公司。lncRNA-GAS5 过表达质粒及阴性对照质粒, lncRNA-GAS5 引物、PTEN 引物及  $\beta$ -actin 引物均委托上海吉玛生物科技有限公司设计合成。miR-21 茎环引物及 qPCR 引物购自广州锐博公司。RT-PCR 试剂盒 [PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit (Perfect Real Time)] 及 real-time PCR 试剂盒 [SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II(Tli RNaseH Plus)]均购自宝生物工程(大连)有限公司。兔抗人 PTEN 多克隆抗体及鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自美国 CST 公司。子宫内膜癌 HEC-1A 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。ECL 发光试剂盒

(WBKLS0500)购自美国密理博公司。transwell 小室(3422)购自美国康宁公司。Matrigel 基质胶(356234)购自美国 BD 公司。

### 1.2 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

按 Trizol 说明书采用苯酚-氯仿抽提法,分别提取组织及 HEC-1A 细胞中总 RNA,经紫外分光光度计检测,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.9~2.1 之间者为合格样品。取 500 ng 总 RNA 为模板,按 RT-PCR 试剂盒说明书配制逆转录反应体系,采用 Random 6 及 Oligo-dT 双引物法逆转录细胞内 lncRNA 及 mRNA,采用茎环引物法逆转录 microRNA。逆转录完成后,以 2  $\mu$ l cDNA 配制 Real-time PCR 体系,按 real-time PCR 说明书要求扩增靶基因。

### 1.3 质粒转染 HEC-1A 细胞

HEC-1A 细胞接种于 6 孔板中,接种密度以过夜培养后融合度可达 50% 为准。依据 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 说明书,以无血清 DMEM 培养基做溶媒配制转染试剂及质粒工作液,分别向 HEC-1A 细胞中转染 lncRNA-GAS5 质粒(GAS5 组)及阴性对照质粒(NC 组)。转染 6 h 后更换为含 10% 胎牛血清的完全培养基。

### 1.4 Transwell 小室模型检测 HEC-1A 侵袭

HEC-1A 细胞在转染 48 h 后消化、重悬,并调整密度为  $1 \times 10^5$  个/ml。基质胶包被的 Transwell 小室上室中每孔接种 100  $\mu$ l。下室均每孔加入 750  $\mu$ l 完全培养基。培养 24 h 后,吸出上室内培养基,并洗涤小室,4% 多聚甲醛固定后使用结晶紫染色,棉棒擦去上室面残余细胞,在显微镜下计数下室面细胞数量。

### 1.5 Western blot 检测

收集转染 72 h 的 HEC-1A 细胞,使用 RIPA 裂解液裂解细胞,BCA 法测定总蛋白浓度。每孔上样 50  $\mu$ g 蛋白后以 BIO-RAD 垂直电泳系统分离目的蛋白,以 1:1 000 稀释的 PTEN 及  $\beta$ -actin 一抗结合相应目的蛋白,以 1:5 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔二抗结合一抗,ECL 法发光检测蛋白相对表达量。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用  $t$

检验。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 lncRNA-GAS5 在子宫内膜癌及癌旁组织中的表达及临床意义

子宫内膜癌组织中 lncRNA-GAS5 的相对表达量低于对应癌旁组织  $[(4.256 \pm 0.117) \text{ vs } (7.346 \pm 0.851), t=4.013, P<0.05]$ 。进一步对附表所列的临床病理特征进行分类和统计分析,存在淋巴结转移患者的 lncRNA-GAS5 相对表达量低于无淋巴结转移患者  $[(2.128 \pm 0.041) \text{ vs } (4.843 \pm 0.037), t=2.389, P=0.017]$ ;FIGOIII+IV 期患者的 lncRNA-GAS5 相对表达量低于 FIGOI+II 期患者  $[(1.383 \pm 0.201) \text{ vs } (4.517 \pm 0.028), t=2.131, P=0.021]$ ;而按年龄、停经与否及组织学分级进行分组比较时,组间 lncRNA-GAS5 相对表达量差异无统计学意义。见附表。

### 2.2 过表达 lncRNA-GAS5 对 HEC-1A 细胞侵袭功能的影响

采用瞬时转染技术,以脂质体 2 000 为媒介包裹质粒,将 lncRNA-GAS5 质粒或 NC 质粒转染入 HEC-1A 细胞中。通过 qRT-PCR 检测证实,lncRNA-GAS5 质粒能提高 HEC-1A 细胞内 lncRNA-GAS5 的表达水平 ( $t=21.162, P=0.002$ , 见图 1A)。细胞于 Transwell 小室内培养 24 h 后,通过显微镜观察,与 NC 组相比,lncRNA-GAS5 组在侵袭试验小室下室面细胞数量减少  $[(35.217 \pm 3.414) \text{ vs } (19.525 \pm 1.367), t=7.654, P=0.008]$ ,见图 1B,提示肿瘤细胞的侵袭能力受到抑制。

### 2.3 过表达 lncRNA-GAS5 对 HEC-1A 细胞中 miR-21/PTEN 轴表达的影响

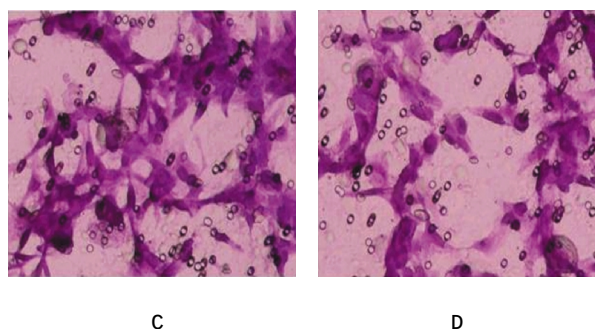
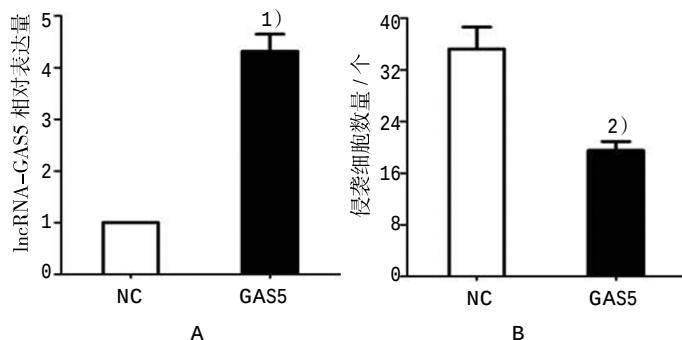
lncRNA 是一种能通过分子海绵效应结合目标基因而发挥基因表达调节作用的分子。生物信息学

研究表明,促癌基因 miR-21 可能是 lncRNA-GAS5 的靶向目标之一。在 HEC-1A 细胞内过表达 lncRNA-GAS5 后,通过 qRT-PCR 检测证实 miR-21 的表达水平下降  $[(3.291 \pm 0.045) \text{ vs } (1.129 \pm 0.018), t=23.533, P<0.05]$ ,见图 2A。对 miR-21 的靶基因 PTEN 的 qRT-PCR 检测和 Western blot 检测表明,PTEN mRNA  $[(1.231 \pm 0.041) \text{ vs } (3.432 \pm 0.126), t=23.327, P<0.05]$ ,图 2B] 及蛋白  $[(0.179 \pm 0.011) \text{ vs } (0.721 \pm 0.023), t=22.581, P<0.05]$ ,见图 2C、2D。水平均较 NC 组出现升高,提示 lncRNA-GAS5 可能是通过抑制 miR-21 而间接促进 PTEN 表达而现抗肿瘤细胞侵袭作用的。

附表 lncRNA-GAS5 表达与子宫内膜癌患者临床病理特征的关系 ( $n=50, \bar{x} \pm s$ )

| 项目                             | lncRNA-GAS5 相对表达量 | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值          |
|--------------------------------|-------------------|------------|---------------------|
| 年龄                             |                   |            |                     |
| <50 岁                          | 4.119 ± 0.231     | 0.134      | 0.777               |
| ≥50 岁                          | 4.428 ± 0.102     |            |                     |
| 停经与否                           |                   |            |                     |
| 已停经                            | 4.193 ± 0.221     | 0.241      | 0.581               |
| 未停经                            | 4.348 ± 0.204     |            |                     |
| 组织学分级                          |                   |            |                     |
| G <sub>1</sub> ~G <sub>2</sub> | 4.089 ± 0.107     | 1.121      | 0.143               |
| G <sub>3</sub>                 | 4.313 ± 0.112     |            |                     |
| 淋巴结转移                          |                   |            |                     |
| 无                              | 4.843 ± 0.037     | 2.389      | 0.017 <sup>1)</sup> |
| 有                              | 2.128 ± 0.041     |            |                     |
| FIGO 分期                        |                   |            |                     |
| I + II                         | 4.517 ± 0.028     | 2.131      | 0.021 <sup>2)</sup> |
| III + IV                       | 1.383 ± 0.201     |            |                     |

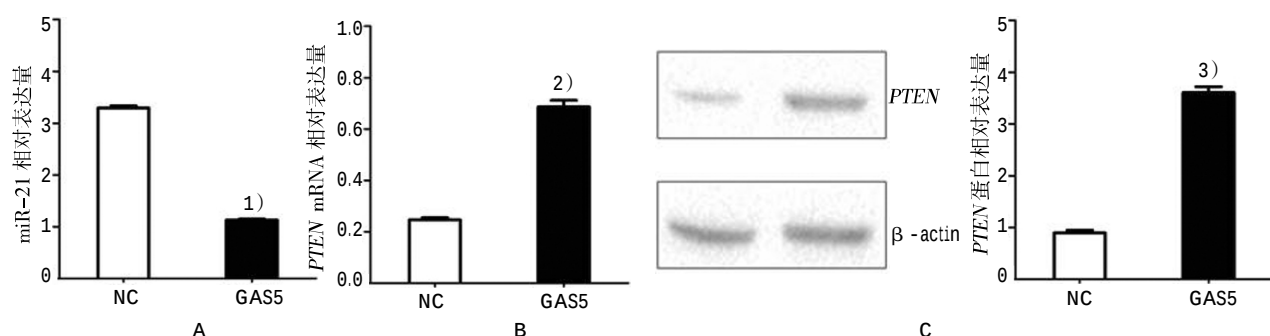
注:1) 淋巴结转移者与无淋巴结转移者比较,  $P<0.05$ ;2) FIGO I+II 期者与 III+IV 期者比较,  $P<0.05$



A: 过表达质粒转染提高 HEC-1A 细胞内 lncRNA-GAS5 表达,1)与 NC 组比较,  $P<0.05$ ;B: 过表达 lncRNA-GAS5 抑制 HEC-1A 细胞侵袭,2)与 NC 组比较,  $P<0.05$ ;C: NC 组;D: lncRNA-GAS5 质粒

图 1 过表达 lncRNA-GAS5 对 HEC-1A 细胞侵袭的影响





A: 过表达 lncRNA-GAS5 抑制 HEC-1A 细胞内 miR-21 表达,1) 与 NC 组比较,  $P < 0.05$ ; B: 过表达 lncRNA-GAS5 下调 HEC-1A 细胞内 PTEN mRNA 表达,2) 与 NC 组比较,  $P < 0.05$ ; C: 过表达 lncRNA-GAS5 下调 HEC-1A 细胞内 PTEN 蛋白表达,3) 与 NC 组比较,  $P < 0.05$

图 2 过表达 lncRNA-GAS5 对 HEC-1A 细胞 miR-21/PTEN 表达的影响

### 3 讨论

子宫内膜癌发病过程复杂、症状呈现非特异性,因而在确诊时大部分患者已处于疾病晚期,难以获得根治性治疗<sup>[7]</sup>。因而,寻找早期诊断及预后评价标志物已成为提高子宫内膜癌诊治水平的重要方法。

越来越多的证据显示,包括 miRNA 及 lncRNA 在内的多种非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA) 对细胞的生理及病理过程具有重要影响<sup>[8-9]</sup>。lncRNA-GAS5 在组织发育和疾病的发生过程中均具有重要作用,例如流行病学证据表明,与健康人群相比 lncRNA-GAS5 的表达在 2 型糖尿病患者的循环血中降低,通过 qPCR 对其进行绝对定量发现,循环血中 lncRNA-GAS5  $< 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  的人群患糖尿病的概率是其他人群的 12 倍之多<sup>[10]</sup>。在慢性肝炎中的研究结果表明, lncRNA-GAS5 能够通过下调 NS3 蛋白而抑制丙肝 HCV 病毒的复制<sup>[11]</sup>。近年来较多的研究揭示了 lncRNA-GAS5 的异常表达对肿瘤患者预后的评估价值<sup>[12-13]</sup>, SONG 等<sup>[14]</sup>的 Meta 分析研究表明,在多种肿瘤中 lncRNA-GAS5 的低表达均预示着患者总生存期(overall survival date)的缩短。分子生物学研究在微观层面证实 lncRNA-GAS5 能够通过抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡<sup>[15]</sup>及抑制细胞迁移、侵袭<sup>[16]</sup>等种途径发挥抑癌基因效应。

在本研究中,通过对临床组织标本中 lncRNA-GAS5 的表达检测证实 lncRNA-GAS5 低表达于子宫内膜癌组织当中。以患者不同临床病理特征为亚组的分析表明, lncRNA-GAS5 高表达与肿瘤患者淋巴结转移及高 FIGO 分期密切相关,初步论证了 lncRNA-GAS5 在子宫内膜癌侵袭转移中具有一定的调控作用。为进一步探讨 lncRNA-GAS5 在子

宫内膜癌细胞中的生物学功能,本研究应用重组质粒特异性过表达子宫内膜癌 HEC-1A 细胞中 lncRNA-GAS5,通过 Transwell 侵袭小室模型证实过表达 lncRNA-GAS5 对细胞侵袭能力有明显抑制。

lncRNA 的作用机制较为复杂,其中一种重要机制即是作为分子海绵与 microRNA 结合进而抑制其对下游相应靶 mRNA 的沉默效应<sup>[17]</sup>。通过在 Starbase 等生物信息学网站的检索表明<sup>[18]</sup>, miR-21 可能是 lncRNA-GAS5 的结合分子之一,而且 miR-21 已被证实在子宫内膜癌中具有重要的抑癌效应<sup>[19]</sup>。综上,可推测, lncRNA-GAS5 的抗子宫内膜癌侵袭作用可能是通过抑制 miR-21 的表达和功能来实现的。为证实这一假说,本研究通过基因转染技术,过表达 HEC-1A 细胞内 lncRNA-GAS5,通过 qRT-PCR 检测发现,过表达 lncRNA-GAS5 可明显抑制 HEC-1A 细胞内 miR-21 的表达水平。在多种肿瘤中都证实 PTEN 基因是 miR-21 的下游抑制靶点之一。PTEN 基因属于 PTP (protein tyrosine phosphatases) 基因家族成员,作为一种磷酸酶,PTEN 的双重特异性磷酸酶特性能使磷酸化的 Tyr、Ser、Thr 都去磷酸化,由于许多癌基因的产物都是通过磷酸化而刺激细胞生长,因而,PTEN 具有巨大的抑癌潜能<sup>[20]</sup>。通过进一步研究发现,在过表达 lncRNA-GAS5 后 HEC-1A 细胞内 PTEN 的表达水平也有所提高。至此,本研究初步探明了 lncRNA-GAS5 的作用机制是通过抑制 miR-21/PTEN 轴而实现的。

综上所述, lncRNA-GAS5 在子宫内膜癌组织中表达下降。 lncRNA-GAS5 可能通过抑制 miR-21 表达进而促进 PTEN 的表达而抑制子宫内膜癌细胞的侵袭。

## 参 考 文 献:

- [1] 郑金丹,张颖,刘丽丽.沉默 SUMO-1 基因对人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖的影响[J].中国现代医学杂志,2014,24(28):1-4.
- [2] 岑福柱,谭广萍.子宫内膜癌 DACH1 基因启动子甲基化的检测及其临床意义研究[J].中国现代医学杂志,2014,24(28):35-37.
- [3] 王飞艳,徐红,何中慧,等.Ebp50、Ezrin 在子宫内膜癌中的表达及意义[J].中国现代医学杂志,2013,23(33):32-36.
- [4] LIU Y R, TANG R X, HUANG W T, et al. Long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma: novel insights into their mechanism[J]. World J Hepatol, 2015, 7(28): 2781-2791.
- [5] SUGIHARA H, ISHIMOTO T, MIYAKE K, et al. Noncoding RNA expression aberration is associated with cancer progression and is a potential biomarker in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 27824-27834.
- [6] PICKARD M R, WILLIAMS G T. Molecular and cellular mechanisms of action of tumour suppressor GAS5 lncRNA[J]. Genes (Basel), 2015, 6(3): 484-499.
- [7] 伍宗惠,詹平,邹倩,等.真核表达质粒 EX-Y2069-M 29 的构建及 LRP16 基因在人子宫内膜癌 HEC-1-B 细胞中的表达[J].中国现代医学杂志,2014,24(30):8-13.
- [8] MCGILL M R, JAESCHKE H. MicroRNAs as signaling mediators and biomarkers of drug- and chemical-induced liver injury[J]. J Clin Med, 2015, 4(5): 1063-1078.
- [9] YIN D D, ZHANG E B, YOU L H, et al. Downregulation of lncRNA TUG1 affects apoptosis and insulin secretion in mouse pancreatic  $\beta$  cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(5): 1892-1904.
- [10] CARTER G, MILADINOVIC B, PATEL AA, et al. Circulating long noncoding RNA GAS5 levels are correlated to prevalence of type 2 diabetes mellitus[J]. BBA Clin, 2015, 4: 102-107.
- [11] QIAN X, XU C, ZHAO P, et al. Long non-coding RNA GAS5 inhibited hepatitis C virus replication by binding viral NS3 protein[J]. Virology, 2016, 492: 155-165.
- [12] ZHAO X, WANG P, LIU J, et al. Gas5 exerts tumor-suppressive functions in human glioma cells by targeting miR-222[J]. Mol Ther, 2015, 23(12): 1899-1911.
- [13] CAO Q, WANG N, QI J, et al. Long noncoding RNA-GAS5 acts as a tumor suppressor in bladder transitional cell carcinoma via regulation of chemokine (C-C motif) ligand 1 expression[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(1): 27-34.
- [14] SONG W, WANG K, ZHANG R J, et al. Long noncoding RNA GAS5 can predict metastasis and poor prognosis: a meta-analysis[J]. Minerva Med, 2016, 107(1): 70-76.
- [15] GAO J, LIU M, ZOU Y, et al. Long non-coding RNA growth arrest-specific transcript 5 is involved in ovarian cancer cell apoptosis through the mitochondria-mediated apoptosis pathway[J]. Oncol Rep, 2015, 34(6): 3212-3221.
- [16] CHEN L, YANG H, XIAO Y, et al. Lentiviral-mediated over-expression of long non-coding RNA GAS5 reduces invasion by mediating MMP2 expression and activity in human melanoma cells[J]. Int J Oncol, 2016, 48(4): 1509-1518.
- [17] PARASKEVOPOULOU M D, HATZIGEORGIOU A G. Analyzing MiRNA-LncRNA Interactions[J]. Methods Mol Biol, 2016 (1402): 271-286.
- [18] LI J H, LIU S, ZHOU H, et al. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Database issue): D92-97.
- [19] TSUKAMOTO O, MIURA K, MISHIMA H, et al. Identification of endometrioid endometrial carcinoma-associated microRNAs in tissue and plasma[J]. Gynecol Oncol, 2014, 132(3): 715-721.
- [20] LIM H J, CROWE P, YANG J L. Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(4): 671-689.

(张西倩 编辑)