

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.08.005

文章编号: 1005-8982(2016)08-0022-06

论著

长链非编码核糖核酸牛磺酸上调基因 1 在乳腺癌中的表达及其对细胞增殖凋亡的影响

赵筱倩, 陆肖玮

(江苏省无锡市妇幼保健院 乳腺病科, 江苏 无锡 214000)

摘要:目的 探讨长链非编码核糖核酸(lncRNA)牛磺酸上调基因 1(*TUG1*)在乳腺浸润性导管癌(IDC)中的表达及其对乳腺癌细胞增殖及凋亡功能的影响。**方法** 筛选 2013 年 1 月~12 月该院乳腺病科行手术切除并经病理检查证实为 IDC 患者的乳腺癌及对应癌旁组织 40 例。运用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测 lncRNA-*TUG1* 在 IDC 患者肿瘤及癌旁组织中的表达水平, 整理分析 lncRNA-*TUG1* 表达与患者临床病例资料间的相关性;采用 lncRNA-*TUG1* 特异性 siRNA 转染人乳腺癌 MCF-7 细胞,采用 CCK-8 试验检测转染 siRNA 后 MCF-7 细胞增殖能力的变化;流式细胞仪检测转染后 MCF-7 细胞凋亡变化。采用 qRT-PCR、Western-blot 检测转染后 *P27* 表达变化。**结果** lncRNA-*TUG1* 在 IDC 组织中表达水平显著高于对应癌旁组织($t=4.273, P<0.001$), IDC 组织中 lncRNA-*TUG1* 高表达与肿瘤直径增大($P=0.033$)及高 TNM 分期($P=0.045$)显著相关;lncRNA-*TUG1* 特异性 siRNA 转染 MCF-7 细胞后可显著抑制细胞增殖($P=0.041$)并上调凋亡细胞比例($t=3.206, P=0.007$);qRT-PCR 及 Western-blot 结果证实, 沉默 lncRNA-*TUG1* 后可显著促进 *P27* mRNA 及蛋白表达水平($P<0.001$)。**结论** lncRNA-*TUG1* 在 IDC 组织中表达上调并与肿瘤恶性临床病理特征有关,lncRNA-*TUG1* 可能通过下调抑癌基因 *P27* 的表达来促进 IDC 生长。

关键词: lncRNA-*TUG1*; 乳腺浸润性导管癌; 增殖; 凋亡; *P27*

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expression of long noncoding RNA *TUG1* and its role in cell proliferation and apoptosis of breast cancer

Xiao-qian Zhao, Xiao-wei Lu

(Department of Breast Diseases, Wuxi Maternal and Child Health-Care Hospital of Jiangsu Province, Wuxi, Jiangsu 214000, China)

Abstract: Objective To study the expression of long noncoding RNA *TUG1* (lncRNA-*TUG1*) in invasive ductal carcinoma (IDC) and its role in regulating cell proliferation and apoptosis. **Methods** Forty IDC and matched tumor adjacent tissues were collected between January and December in 2013. The expression of lncRNA-*TUG1* tissues were detected by qRT-PCR. The relationship between lncRNA-*TUG1* and clinical features was analyzed by student-*t* test. lncRNA-*TUG1* siRNA was transfected into MCF-7 cells. CCK-8 assay and flow cytometry (FCM) were used to measure cell proliferation and apoptosis, respectively. The expression of *P27* in transformed cells was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** The expression of lncRNA-*TUG1* was significantly higher in IDC tissues than in tumor adjacent tissues ($P < 0.001$). High expression of lncRNA-*TUG1* was positively associated with large tumor diameter ($P = 0.033$) and advanced TNM stage ($P = 0.045$). Knockdown of lncRNA-*TUG1* significantly suppressed cell proliferation and induced apoptosis in MCF-7 cells ($P < 0.05$). *P27* expression was upregulated when lncRNA-*TUG1* was silenced ($P < 0.05$). **Conclusions** lncRNA-*TUG1* is overexpressed in IDC tissues and associated with cell growth. lncRNA-*TUG1* may promote IDC progression by inhibiting *P27* expression.

Keywords: lncRNA-*TUG1*; invasive ductal carcinoma; proliferation; apoptosis; *P27*

收稿日期: 2015-10-30

[通信作者] 陆肖玮, E-mail: zhaoxiaoq1980@126.com; Tel: 13815100097

乳腺癌是女性生殖系统常见恶性肿瘤^[1],由于其具有发病隐匿、进展快及术后易复发的特点,已成为危害我国女性身体健康的重大公共卫生问题^[2]。乳腺浸润性导管癌(invasive ductal carcinoma, IDC)是乳腺癌较为常见且恶性程度较高的病理类型之一^[3],对 IDC 细胞分子生物学特性的研究对于寻找 IDC 新的治疗靶点及提高我国乳腺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)是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码单链 RNA^[4]。越来越多的证据表明^[5], lncRNA 能够通过多种方式调节包括肿瘤生长、转移及血管生成在内的多种病理过程来促进恶性肿瘤的发生、发展。lncRNA 的异常表达及其所发挥的生物学功能是近年来乳腺癌分子病理学的研究热点之一。最新研究指出,长链非编码核糖核酸牛磺酸上调基因 1(long noncoding ribonucleic acid taurine up-regulated gene 1, lncRNA-TUG1)在癌症进展过程中具有重要的调节作用^[6],而其在乳腺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-TUG1 的表达及对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡过程的调控作用,研究 lncRNA-TUG1 在乳腺癌生长中的临床意义及作用机制,为乳腺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 1~12 月于江苏省无锡市妇幼保健院乳腺病科行手术切除并经病理检查证实为 IDC 患者的乳腺癌及对应癌旁组织(距肿瘤边缘 >2 cm) 40 例。平均年龄(51.2 ± 1.1)岁。所有患者术前均未行新辅助放化疗。所得组织标本均保存于液氮当中。lncRNA-TUG1 siRNA 及阴性对照 siRNA 均购自上海吉玛生物科技有限公司, CCK-8 试剂盒及 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒均购自上海生工生物科技有限公司, lncRNA-TUG1 引物(正向引物 5'-TAGCAGTTCCCAATCCTTG-3'; 反向引物 5'-TAGCAGTTCCCAATCCTTG-3'), P27 引物(正向引物 5'-GATGGACGCCAGACAAGC-3'; 反向引物 5'-CTCCTGCCATTTCGTATCTGC-3'), β-actin 引物(正向引物 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'; 反向引物 5'-GCTGTACCTTCACCGTTCC-3')由上海生工生物科技有限公司合成, RNA 提取试剂盒 fast200 购

自上海飞捷生物科技有限公司, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒 [PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)]及实时定量聚合酶链反应(Real-time PCR)试剂盒 [SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)]均购自宝生物工程(大连)有限公司, 兔抗人 P27 多克隆抗体及鼠抗人 β-actin 单克隆抗体购自美国 CST 公司, 胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司, 1 × DMEM 液体培养基购自美国 HyClone 公司, 人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 及乳腺癌细胞 MCF-7 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒及 ECL 试剂盒均购自上海碧云天生物技术研究所。

1.2 RNA 提取及荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

按 fast200 说明书分别提取癌、癌旁组织及 MCF-10A、MCF-7 细胞中总 RNA, 经紫外分光光度计检测, OD260/OD280 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。逆转录完成后, 以 2 μl cDNA 配制 Real-time PCR 体系, 按 Real-time PCR 说明书要求扩增靶基因。

1.3 细胞培养

MCF10A 及 MCF-7 细胞均接种于含 10% 胎牛血清的 1 × DMEM 培养基中, 在含 5% 二氧化碳 CO₂ 的 37℃ 培养箱中以饱和湿度进行培养。待细胞稳定传代 2~3 代后, 取对数生长期细胞进行后续试验。

1.4 细胞转染

MCF-7 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® 2000 说明书, 以无血清 DMEM 培养基按表 1 配制转染体系, 分别向 MCF-7 细胞中转染 lncRNA-TUG1 siRNA 及 NC siRNA。转染 6 h 后更换为含 10% 胎牛血清的完全培养基。

1.5 CCK-8 检测

分别收集转染 24、48 及 72 h 后的 MCF-7 细胞, 重悬后以 2 000/孔接种于 96 孔板中, 调整细胞悬液体积为 100 μl/孔, 培养至细胞贴壁。每孔加入

表 1 6 孔板转染体系 (每孔)

总体积	DMEM	Lipo 2000+DMEM	siRNA+DMEM
2 ml	1 500 μl	5 μl+250 μl	100 pmol+250 μl

10 μ l CCK-8 溶液,继续孵育 2 h,弃上清液,15 min 内用酶标仪检测 450 nm 波长下的光密度(optical density, OD)值。

1.6 细胞凋亡检测

MCF-7 细胞转染 72 h 后使用 PBS 溶液洗涤细胞 2 次,按试剂盒说明书要求,采用 Binding buffer (1 \times)重悬细胞并调整细胞密度至 2×10^5 /ml,于检测管中加入 195 μ l 细胞悬液后加入 5 μ l Annexin V-FITC,避光孵育 15 min 后,使用 200 μ l Binding buffer (1 \times)洗涤细胞并以 1 000 r/min 离心细胞 3 min,再次以 190 μ l Binding buffer(1 \times)溶液重悬细胞后加入 10 μ l Propidium Iodide,避光孵育 15 min 后于流式细胞仪上进行检测。

1.7 Western blot 检测

收集转染 72 h 的 MCF-7 细胞,使用 RIPA 裂解液裂解细胞,BCA 法测定总蛋白浓度。垂直电泳分离蛋白后,以 1:1 000 稀释的 P27 及 β -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。

1.8 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验或 ANOVA 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IDC 及癌旁组织中 lncRNA-TUG1 的表达差异

IDC 组织中 lncRNA-TUG1 的相对表达量为 (5.186 ± 0.231),而对应癌旁组织中 lncRNA-TUG1 表达量仅为 (1.644 ± 0.047)。Student-*t* 检验证明两组标本间 lncRNA-TUG1 表达差异具有统计学意义 ($t=4.273, P < 0.001$),见图 1。

2.2 IDC 组织中 lncRNA-TUG1 异常表达与患者临床特征间的相关性

为探究 IDC 组织中 lncRNA-TUG1 的异常表达是否会影响 IDC 患者的临床病理表现,笔者对表 2 所列的临床病理特征进行二分类,并计算 lncRNA-TUG1 相对表达量。经统计学分析发现,IDC 组织中高表达水平的 lncRNA-TUG1 与肿瘤直径增大 (>2 cm)及高 TNM 分期(III+IV 期)具有一定的相关性。提示 lncRNA-TUG1 在乳腺癌进展过程中可能

具有一定的生物学功能。

2.3 沉默 lncRNA-TUG1 对 MCF-7 细胞增殖凋亡的影响

笔者通过 PCR 检测证实,乳腺癌 MCF-7 细胞中 lncRNA-TUG1 的相对表达量高于人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A ($P < 0.001$),见图 2A,其表达差异约 2.31 倍。然后,笔者采用瞬时转染技术,以 Lipo-

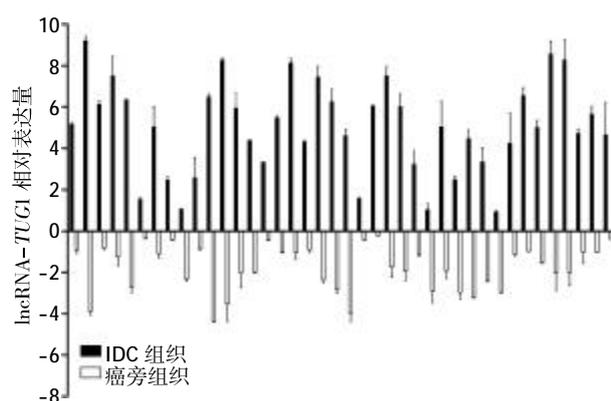


图 1 lncRNA-TUG1 在 IDC 组织中的表达

表 2 lncRNA-TUG1 表达与乳腺癌患者临床病理特征的关系 ($n=40, \bar{x} \pm s$)

项目	lncRNA-TUG1 相对表达量	P 值
年龄		
<50 岁	5.179 ± 0.201	0.737
≥ 50 岁	5.281 ± 0.132	
绝经与否		
已绝经	5.193 ± 0.111	0.868
未绝经	5.134 ± 0.207	
肿瘤直径		
<2 cm	3.483 ± 0.097	0.033 [†]
≥ 2 cm	6.959 ± 0.114	
肿瘤数量		
1 个	5.374 ± 0.211	0.068
≥ 2 个	5.937 ± 0.182	
组织学分级		
G ₁ -G ₂	5.089 ± 0.107	0.083
G ₃	5.313 ± 0.132	
淋巴结转移		
无	5.043 ± 0.037	0.057
有	5.588 ± 0.071	
TNM 分期		
无	4.117 ± 0.068	0.045 [†]
有	5.883 ± 0.120	

注:† $P < 0.05$

fectamine[®] 2000 为媒介, 将 lncRNA-*TUG1* 特异性 siRNA 或 NC siRNA 转染入 MCF-7 细胞中。通过 qRT-PCR 检测证实,lncRNA-*TUG1* 特异性 siRNA 能敲低细胞内 lncRNA-*TUG1* 的表达水平 ($P < 0.001$), 见图 2B。

成功沉默 MCF-7 细胞内 lncRNA-*TUG1* 表达

后,笔者首先采用 CCK-8 法检测 lncRNA-*TUG1* 表达水平变化对 MCF-7 细胞增殖能力的影响。如图 3A 所示,与 NC 组比较,敲低 lncRNA-*TUG1* 后可显著抑制 MCF-7 细胞增殖能力 ($P = 0.041$)。如图 3B、3C 所示,进一步通过流式细胞仪检测发现沉默 lncRNA-*TUG1* 对 MCF-7 细胞的凋亡具有显著的促

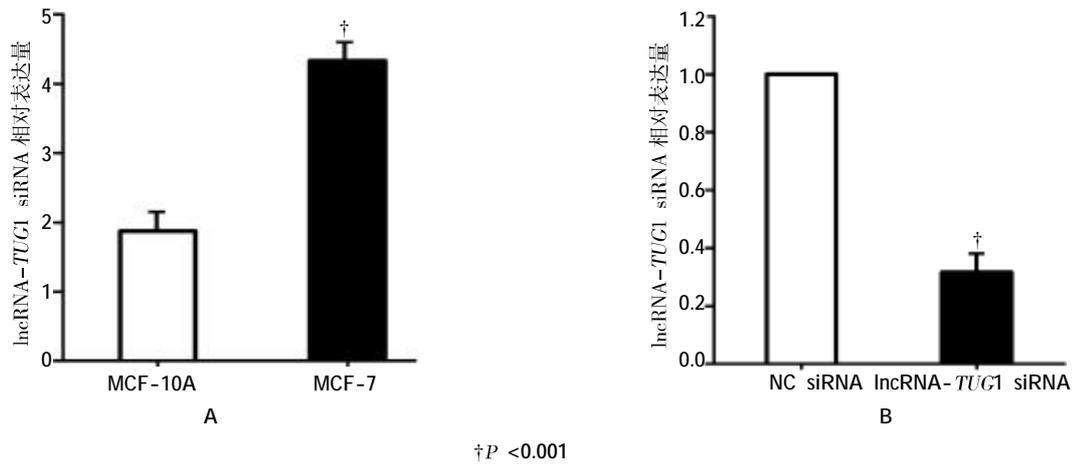
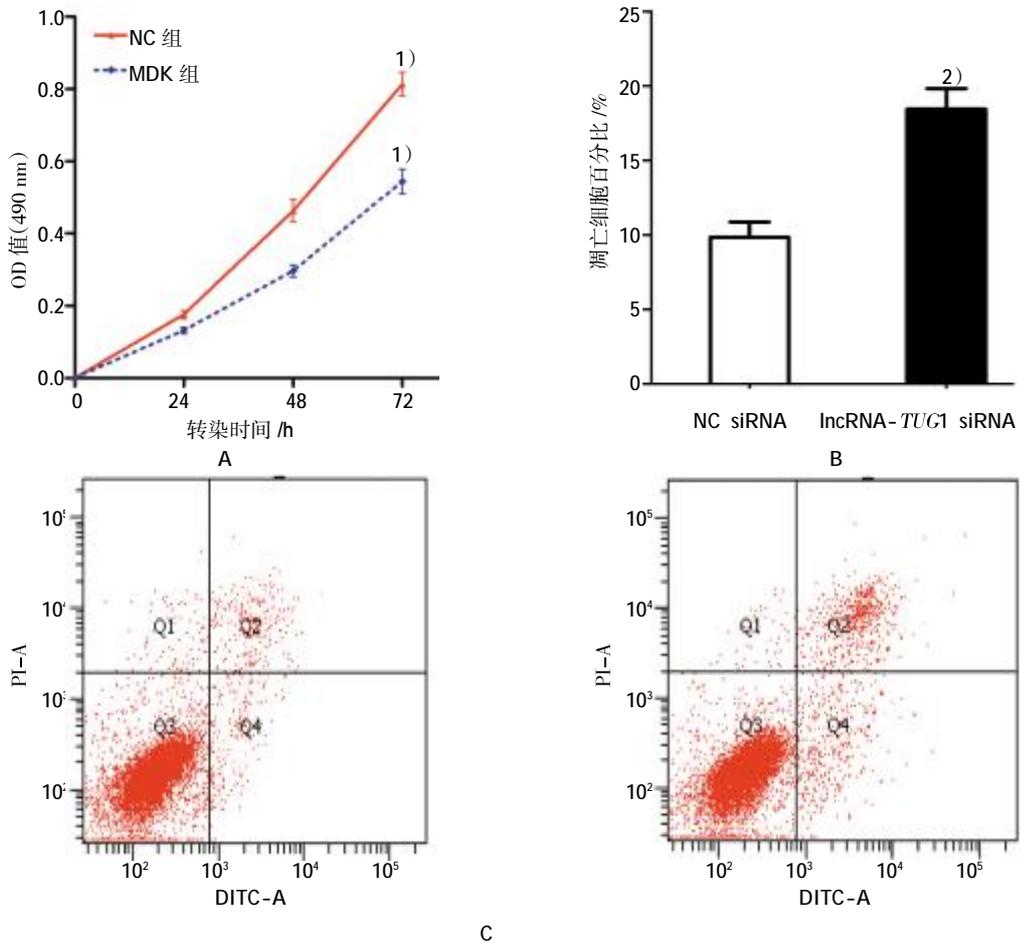


图 2 siRNA 沉默 MCF-7 细胞 lncRNA-*TUG1* 表达



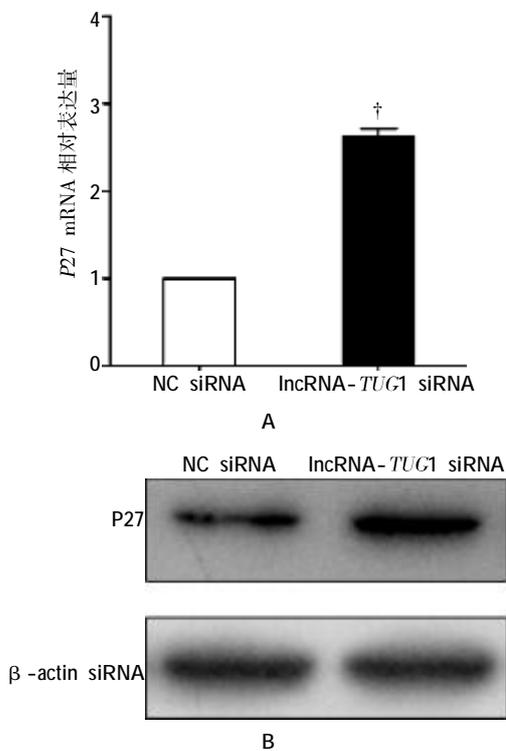
A: 下调 lncRNA-*TUG1* 表达可显著提高 MCF-7 细胞增殖; B、C: 下调 lncRNA-*TUG1* 表达可显著促进 MCF-7 细胞凋亡。1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$

图 3 沉默 lncRNA-*TUG1* 对 MCF-7 细胞增殖凋亡的影响

进作用[(18.435 ± 1.377)vs(9.833 ± 1.024), $t=3.206$, $P=0.007$]。

2.4 下调 lncRNA-TUG1 对 MCF-7 细胞中 P27 表达的影响

P27 是一种具有细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinases, CDKs) 活性抑制作用的蛋白, 能与细胞周期蛋白-CDK 复合物结合来抑制细胞周期进展, 最终抑制细胞增殖。笔者在 MCF-7 细胞内沉默 lncRNA-TUG1 表达后, 通过 qRT-PCR 和 Western-blot 检测发现, P27 mRNA 及蛋白水平均较 NC 组出现升高($P<0.001$), 见图 4A、4B, 提示 lncRNA-TUG1 可能是通过抑制 P27 表达而现促肿瘤细胞生长作用的。



A: 沉默 lncRNA-TUG1 能升高 MCF-7 细胞内 P27 mRNA 的表达($†P<0.01$); B: 沉默 lncRNA-TUG1 升高 MCF-7 细胞内 P27 蛋白表达水平

图 4 沉默 lncRNA-TUG1 对 MCF-7 细胞 P27 表达的影响

3 讨论

在全球, 女性乳腺癌年患病人数逾百万。目前, 无论是我国^[7]还是西方发达国家^[8], 乳腺癌发病率均占女性恶性肿瘤发病首位。随着分子生物学技术的进步, 生物靶向治疗已成为乳腺癌重要的辅助治疗手段, 曲妥珠单抗(Trastuzumab, 商品名赫赛汀)及帕

妥珠单抗(Omnitarg, 商品名奥密塔克)已在乳腺癌治疗上获得巨大成功^[9-10]。因而, 寻找和研究有效的乳腺癌分子治疗靶点对改善广大乳腺癌患者预后具有重要意义。

目前, 越来越多的证据显示, 包括微小核糖核酸(microRNA)及 lncRNA 在内的多种非编码核糖核酸(noncoding RNA, ncRNA)对细胞的生理及病理过程具有重要影响。并且, 针对 ncRNA 在疾病中的异常表达, 具有极大的药物研发潜力, 目前已有 miR-122 和 miR-34 2 个 microRNA 进入了临床研究阶段^[11]。lncRNA-TUG1 是近年来新发现的 1 种 lncRNA, 其对于组织发育及多种良恶性疾病的发展均具有调控作用, 在小鼠大脑皮层发育的多个关键时期均能够检测到 lncRNA-TUG1 表达的显著上调^[12]。而在恶性肿瘤中, lncRNA-TUG1 的异常表达具有重要的临床治疗监测及预后评价意义, Zhang 等^[13]的研究表明, lncRNA-TUG1 在骨肉瘤组织中的表达显著上调且与肿瘤体积增大、术后化疗抵抗及高 Enneking 分期显著相关, 生存分析曲线结果也证实高表达的 lncRNA-TUG1 预示着较短的术后无瘤生存时间和总生存时间。因而, lncRNA-TUG1 表达水平的改变被认定与肿瘤进展、转移和复发密切相关。

在本研究中, 笔者首先在临床组织标本中检测证实, lncRNA-TUG1 高表达于浸润性乳腺导管癌组织当中。以患者不同临床病理特征为亚组的分析表明, lncRNA-TUG1 高表达与 IDC 患者肿瘤直径增大及高 TNM 分期密切相关, 本研究结果与在骨肉瘤、膀胱癌^[14]及脑胶质瘤^[15]中的研究结果相一致。为进一步探讨 lncRNA-TUG1 在乳腺癌细胞中的生物学功能, 笔者应用 siRNA 特异性敲低 MCF-7 细胞中 lncRNA-TUG1 表达, 通过 CCK-8 试验及流式细胞仪分析证实沉默 lncRNA-TUG1 能够抑制细胞增殖并促进细胞凋亡的发生。组织学及细胞学实验结果一致表明, lncRNA-TUG1 在乳腺癌细胞生长过程中具有一定的促进作用。

位于人类染色体 12p12.0 ~ 12p13.1 处的 P27 基因, 能编码 1 个长度为 198 个氨基酸的多肽。P27 能分别与 Cyclin E-CDK2 和 Cyclin D-CDK4 结合形成三元复合物而抑制 CDK 的活性, 通过阻碍细胞周期进展而实现抗细胞增殖效应^[16]。研究表明^[15], 多梳蛋白抑制复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 能通过对 P27 启动子 H3K27 位点进行甲基化修饰而抑制 P27 的表达。而肝细胞癌中的 lncR-

NA-*TUG1* 能够通过 PRC2 复合物中 EZH2 和 SUZ12 两种组分的结合而将 PRC2 募集至抑癌因子 KLF2 的启动子区域,进而促进 HCC 的生长和转移^[7]。综上,笔者推测,IncRNA-*TUG1* 的促乳腺癌细胞生长作用可能是在表观遗传学层面通过启动子区域甲基化修饰作用而抑制 P27 的表达来实现的。为证实这一假说,笔者通过 siRNA 转染技术,特异性敲低 MCF-7 细胞内 IncRNA-*TUG1* 的表达,通过 qRT-PCR 检测及 Western-blot 检测发现,沉默 IncRNA-*TUG1* 可明显提高 MCF-7 细胞内 P27 的表达水平,初步探明了 IncRNA-*TUG1* 的作用机制。

综上所述,IncRNA-*TUG1* 在浸润性乳腺导管癌组织中表达升高。IncRNA-*TUG1* 可能通过下调 P27 的表达来抑制乳腺癌细胞的生长。因此,IncRNA-*TUG1* 在乳腺癌生物靶向治疗中具有一定的研发价值。

参 考 文 献:

- [1] 张磊,许培权.三阴性乳腺癌的系统治疗策略[J].现代肿瘤医学,2015,23(18):2686-2690.
- [2] 莫文菊,丁小文,谢尚闹,等.紫杉醇通过 mTOR 信号通路影响乳腺癌细胞的增殖迁移[J].中国医师杂志,2015,17(7):1005-1008.
- [3] 肖宇,雷玉涛,赵红梅,等.41 例双侧原发性乳腺癌的临床病理特征分析[J].现代肿瘤医学,2014,22(12):2859-2863.
- [4] 王莹,辛彦.Hippo 通路和相关长链非编码 RNA(LncRNA)与肿瘤关系的研究进展[J].现代肿瘤医学,2015,23(21):3190-3193.
- [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] Özgür E, Mert U, Isin M, et al. Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells[J]. Clin Exp Med, 2013, 13(2): 119-126.
- [7] 郑莹,吴春晓,张敏璐.乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J].中国癌症杂志,2013,23(8):561-569.
- [8] Trotter K, Schneider SM, Turner BS. Group appointments in a breast cancer survivorship clinic[J]. J Adv Pract Oncol, 2013, 4(6): 423-431.
- [9] Tolaney SM, Barry WT, Dang CT, et al. Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for node-negative, HER2-positive breast cancer[J]. N Engl J Med, 2015, 372(2): 134-141.
- [10] Suparna BW, Sherry XY, 王卓路,等.贝伐单抗联合化疗的乳腺癌新辅助治疗[J].中国普通外科杂志,2013,22(11):1377-1378.
- [11] 徐敏敏,马清华,武佳,等.腺病毒介导 miR-122 联合化疗药物 ADM 对肝癌细胞杀伤作用的研究[J].浙江理工大学学报,2010,27(6):919-923.
- [12] 牟丽丽,雷灿,钟小灵,等.长非编码 RNA-Tug1 在大脑皮层发育过程中的初步研究[J].中国科学:生命科学,2015,45(2):156-165.
- [13] Zhang Q, Geng PL, Yin P, et al. Down-regulation of long non-coding RNA TUG1 inhibits osteosarcoma cell proliferation and promotes apoptosis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(4): 2311-2315.
- [14] Han Y, Liu Y, Gui Y, et al. Long intergenic non-coding RNA TUG1 is over expressed in urothelial carcinoma of the bladder [J]. J Surg Oncol, 2013, 107(5): 555-559.
- [15] Cai H, Xue Y, Wang P, et al. The long noncoding RNA TUG1 regulates blood-tumor barrier permeability by targeting miR-144 [J]. Oncotarget, 2015, 6(23): 19759-19779.
- [16] 刘镜文,魏茂富,邱小灵.P27 在乳腺癌及正常乳腺组织中的表达及其意义[J].中国现代医生,2012,50(26):92-93.
- [17] Qiu M, Xu Y, Wang J, et al. A novel lncRNA, LUADT1, promotes lung adenocarcinoma proliferation via the epigenetic suppression of P27[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: Doi: 10.1038/cddis.2015.203.

(张蕾 编辑)