

长链非编码RNA PGM5-AS1在非小细胞肺癌中表达及分子机制

张霖 周昌盛 虞晓明 刘瑜 谢奇朋

[摘要] 目的 探讨长链非编码RNA(lncRNA)PGM5-AS1在非小细胞肺癌中的表达及其作用机制。方法 采用实时定量PCR检测26例肺鳞癌和28例肺腺癌的癌组织与正常组织中PGM5-AS1的表达,并利用软琼脂克隆增殖实验检测过表达PGM5-AS1后肺癌细胞的增殖能力。结果 TCGA数据库中PGM5-AS1在肺鳞癌和肺腺癌中表达均较正常组织下调(t 分别=3.43、6.27, P 均 <0.05)。在本次研究肺癌标本库中,无论肺鳞癌还是肺腺癌的癌组织中的PGM5-AS1表达均较正常组织明显下调(t 分别=23.72、27.45, P 均 <0.05)。过表达PGM5-AS1后,H520(PGM5-AS1)及H2170(PGM5-AS1)较对照细胞的细胞集落数明显减少(t 分别=8.22、8.19, P 均 <0.05)。结论 lncRNA PGM5-AS1在肺癌中表达下降,可能通过抑制细胞增殖来发挥抑癌功能。

[关键词] 非小细胞肺癌; 长链非编码RNA; PGM5-AS1; 细胞增殖

Expression and molecular mechanism of lncRNA PGM5-AS1 in non-small cell lung cancer tissues ZHANG Lin, ZHOU Changsheng, YU Xiaoming, et al. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Cangnan County People's Hospital, Wenzhou 325800, China

[Abstract] **Objective** To explore the expression of lncRNA PGM5-AS1 in lung cancer tissues and its molecular mechanism. **Methods** The expression levels of lncRNA PGM5-AS1 in lung cancer tissues and adjacent normal tissues were detected by quantitative real-time PCR. The proliferation ability of lung cancer cells was detected by cloning and proliferation of soft agar after overexpression of lncRNA PGM5-AS1 in vitro. **Results** The expression of PGM5-AS1 in lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma was down-regulated in the TCGA database when compared with normal tissues ($t=3.43, 6.27, P<0.05$). In this study, the expressions of PGM5-AS1 in tumor tissues were significantly lower than that in normal tissues regardless of lung squamous cell carcinoma or lung adenocarcinoma ($t=23.72, 27.45, P<0.05$). Moreover, after overexpression of PGM5-AS1, the cell colony amounts of H520 (PGM5-AS1) and H2170 (PGM5-AS1) were significantly less than those of the control cells ($t=8.22, 8.19, P<0.05$). **Conclusion** The decreased expression of lncRNA PGM5-AS1 in lung cancer may play a role in suppressing cancer by inhibiting cell proliferation.

[Key words] non-small cell lung cancer; lncRNA; PGM5-AS1; cell proliferation

在全球范围内,肺癌是目前发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一,每年约有180万新发患者,同

时约有160万患者因此死亡^[1]。据2015年中国肿瘤登记年报显示,我国肺癌的发病率、死亡率均位于八大肿瘤第一位。其预后与病程有着密切关系,随着病程的发展,患者5年生存率明显下降^[2]。而将近60%的肺癌患者在首次诊断肺癌时,已是肺癌晚期,失去了治疗的最有效时机,预后较差^[3]。因此,早发现、早诊断肺癌是降低病死率的有效途径。越来越多的证据表明长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是一种新兴的癌症生物学功能调节

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.06.004

基金项目:温州市科技局项目(2017Y0908)

作者单位:325800 浙江苍南,苍南县人民医院呼吸与危重症医学科(张霖、周昌盛、虞晓明);温州医科大学附属第一医院胸外科(刘瑜);温州医科大学附属第二医院/育英儿童医院检验科(谢奇朋)

通讯作者:谢奇朋,Email:pandon2002@163.com

剂,可以作为潜在的癌症诊断、预后和靶向治疗的生物标志物^[4]。PGM5-AS1是近年来新发现的lncRNA,已有研究报道该基因在乳腺癌、胃癌、肺癌等多种肿瘤中表达降低^[5],然而尚未有关于PGM5-AS1在肺癌中的表达及具体的生物学功能和分子机制的研究。本次研究旨在研究lncRNA PGM5-AS1在肺癌中的表达、作用机制及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料 收集2015年1月至2017年12月期间在温州医科大学附属第一医院胸外科就诊的52例肺癌患者的组织标本,包括癌组织与癌旁组织。术中切取肺癌及癌旁组织立即置于液氮中,用于提取RNA。H520细胞和H2170细胞购自美国ATCC细胞库,琼脂糖与2×细胞培养基由Sigma公司生产,TRIzol及逆转录试剂由Invitrogen公司生产, PolyJet™ DNA转染试剂由SignaGen公司生产,引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将H520细胞置于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中,H2170细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,在5% CO₂、37℃饱和湿度的无菌恒温箱内培养。根据不同细胞的生长情况定期换液和传代。

1.2.2 细胞转染 当细胞生长状态良好,并且细胞密度达到80%时将细胞转至6孔板中培养,待细胞生长到80%融合时,将目的质粒(2 μg)和DNA转染试剂PolyJet(6 μl)混合后转入细胞中,然后用嘌呤霉素(5 μg/ml)筛选重组质粒稳定转染细胞株。然后将筛选得到的细胞株在不含筛选试剂的完全培养基中至少传代两次。

1.3 观察指标

1.3.1 TCGA数据库中PGM5-AS1在肺癌中的表达

本次研究通过下载TCGA数据库中的RNA-seq V2的level 3数据并进行生物信息学分析。采用R包edgeR分析肺腺癌和肺鳞癌中癌组织和癌旁组织配对的样本中PGM5-AS1差异表达量。

1.3.2 人肺癌组织中lncRNA PGM5-AS1表达 采用TRIzol法提取组织及细胞中总RNA,反转录反应参照AMV反转录试剂盒说明,在20 μl体系中加2 μg总RNA进行cDNA的合成。采用实时定量荧光PCR检测lncRNA PGM5-AS1表达:实时定量荧光PCR选用2×SYBR Green PCR Master Mix,

取适量cDNA作为模板,引物浓度0.4 μmol/L,15 μl体系进行扩增,每个待测样本设置3个平行样,根据目标基因设计合成相应上下游引物进行PCR扩增,以β-actin作为内参照。引物序列见表1。3次独立实验后得到的数据运用公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行分析。

表1 引物序列

目标基因	序列
PGM5-AS1	
上游	5'-GGGCGGCTGAAGAAAAGAAGAATG-3'
下游	5'-TCAACAGACGGCTTCAGTGCTG-3'
β-actin	
上游	5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'
下游	5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'

1.3.3 细胞集落数 首先采用PGM5-AS1过表达质粒在H520和H2170细胞过表达PGM5-AS1,并建立稳定转染细胞H520(PGM5-AS1)、H2170(PGM5-AS1)及其对照细胞H520-Vector、H2170-Vector。然后取出已配置好的1.25%琼脂糖溶液,微波炉中加热至沸腾后放于42℃水浴锅中防止凝固,取1.2 ml的1.25%琼脂糖溶液与1.8 ml 2×细胞培养基于15 ml的离心管中,混匀后加入6孔板中,铺板时速度要快,平整,防止凝固,且不能有气泡。4 h后,按照如下体系铺上层胶:1.25%琼脂糖 0.264 ml、2×细胞培养基 0.736 ml、细胞数 1×10^4 。先将1.25%琼脂糖与2×细胞培养基混合预热,取对数生长期的单层培养细胞(H520-PGM5-AS1及其对照细胞和H2170-PGM5-AS1及其对照细胞),用0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,计数,加入相应细胞数后铺板。4 h后,用3层封口膜密封,在37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养,21 d后开始观察,采用显微镜4倍镜拍照并统计含32个细胞以上的克隆数,即细胞集落数。

1.4 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。计量资料采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析 TCGA数据库中PGM5-AS1在肺癌中的表达见图1

由图1A、1B可见,PGM5-AS1在肺腺癌和肺鳞癌的癌组织中表达较癌旁组织明显降低(t 分别为3.43、6.27, P 均 < 0.05)。

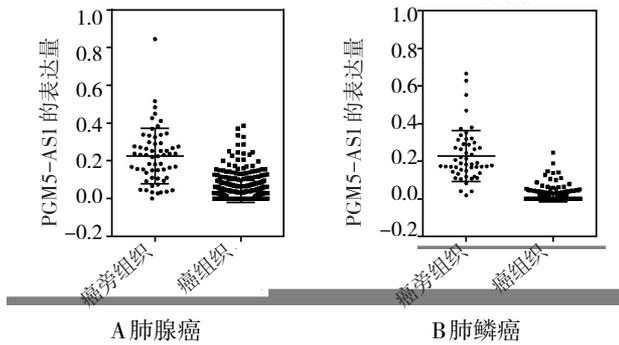


图1 TCGA数据库中PGM5-AS1在肺癌中的表达

2.2 人肺鳞癌和肺腺癌样本中PGM5-AS1的表达见图2

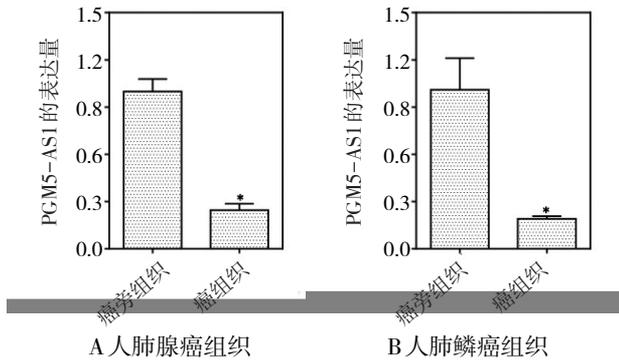


图2 人肺鳞癌和肺腺癌样本中PGM5-AS1的表达

由图2A、2B可见,与配对的癌旁组织比较,肺鳞癌和肺腺癌组织中PGM5-AS1表达均明显降低,差异具有统计学意义(t 分别=23.72、27.45, P 均<0.01)。

2.3 过表达PGM5-AS1抑制肺癌细胞锚定非依赖性生长见图3

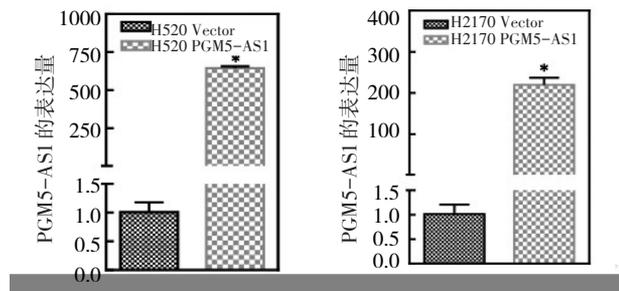


图3 PGM5-AS1在H520和H2170细胞中的表达

由图3可见,在H520和H2170细胞中成功过表达PGM5-AS1。H520(PGM5-AS1)和H2170(PGM5-AS1)较其对照细胞中PGM5-AS1的表达明显增高(t 分别=20.75、7.24, P 均<0.05)。

2.4 过表达PGM5-AS1作用于H520和H2170细胞后的特征性图像及细胞集落数

2.4.1 过表达PGM5-AS1作用于H520、H2170细胞3周后的特征性图像见图4

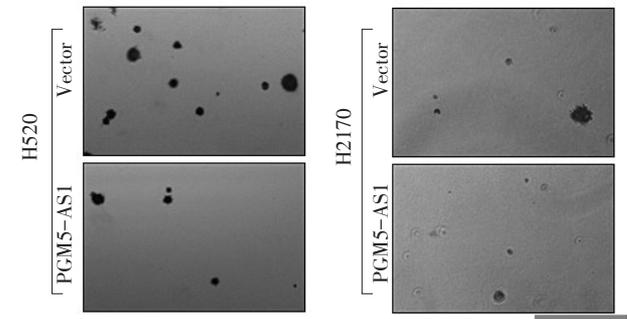


图4 过表达PGM5-AS1作用于H520、H2170细胞3周后的特征性图像($\times 100$ 倍)

由图4可见,过表达PGM5-AS1作用于软琼脂中的H520、H2170细胞3周后,H520(PGM5-AS1)和H2170(PGM5-AS1)较其对照细胞(H520-Vector、H2170-Vector)的细胞集落数明显减少。

2.4.2 过表达PGM5-AS1作用于H520、H2170细胞3周后的细胞集落数见图5

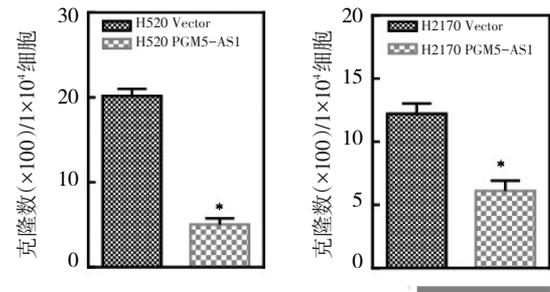


图5 过表达PGM5-AS1作用于H520、H2170细胞3周后超过32个细胞的克隆数

由图5可见,H520(PGM5-AS1)和H2170(PGM5-AS1)中超过32个细胞的克隆数(即细胞集落数)较其对照细胞明显减少(t 分别=8.22、8.19, P 均<0.05)。

3 讨论

肺癌是全世界发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,严重威胁到人类健康和生命安全,其中非小型细胞肺癌中肺腺癌和肺鳞癌大约占有所有肺癌患者的80%。早期肺癌患者通常缺乏明显的症状而不能被早期诊断,大部分被诊断的患者都是晚期肺癌。尽管近年来,以手术为主的综合治疗已取得明显的进步,但是患者5年生存率仍然低于15%^[6]。因此,新的早期诊断标记物的发现和新靶向药物的研究是非常重要的且极其迫切的。lncRNA是由RNA聚合酶II转录并经可变剪接而来缺乏开放阅读框的一

类转录本,长度在200 nt至100 kb之间,且不编码蛋白质的RNA^[7]。它们通常以RNA的形式在多种层面上(表观遗传学调控转录调控以及转录后调控等)调控靶基因的表达水平^[8]。研究报道,lncRNA在肿瘤的发生发展过程中均具有极其重要的作用,它既可作为原癌基因促进肿瘤的生成,亦可作为抑癌基因来抑制肿瘤细胞的增殖迁移等^[9]。除此之外,许多癌症的发生发展均伴随着lncRNA的异常表达。近年来研究报道有多种lncRNA如MALAT1^[10,11]、HOTAIR^[12]、SCAL1^[13]、MEG3^[14]等在肺癌中异常表达,并在肺癌的发生发展中发挥重要作用。

PGM5-AS1是一个位于人类第9号染色体PGM5基因的反义链的长链非编码RNA基因^[15],但在肺癌中具体作用机制目前国内外尚未见相关报道。本次研究前期通过TCGA数据库发现lncRNA PGM5-AS1在肺腺癌和肺鳞癌的癌组织中均较正常组织表达下调。本次研究采集临床肺癌样本库利用实时定量PCR技术分析lncRNA PGM5-AS1的表达,结果显示,无论肺腺癌还是肺鳞癌,肺癌组织中PGM5-AS1较正常组织表达下调(P 均 <0.05)。为深入探究PGM5-AS1在肺癌中发挥的具体作用,本次研究初步选用H520和H2170细胞作为研究对象,利用过表达载体建立稳定过表达PGM5-AS1的细胞H520(PGM5-AS1)及其对照细胞H520-Vector, H2170(PGM5-AS1)及其对照细胞H2170-Vector。结果发现,H520(PGM5-AS1)和H2170(PGM5-AS1)较其对照细胞中PGM5-AS1的表达明显增高(P 均 <0.05)。接着采用软琼脂集落形成实验,将H520(PGM5-AS1)和H2170(PGM5-AS1)及其对照细胞种于软琼脂中,结果发现过表达PGM5-AS1明显抑制肺癌细胞锚定非依赖性生长,即PGM5-AS1可能通过抑制细胞增殖来发挥其抑癌功能。

综上所述,lncRNA PGM5-AS1参与调节肺癌的发生、发展,可能作为肺癌的一个潜在生物标志物和治疗靶点。但由于临床病例较少,其具体作用机制尚需扩大样本量及实验室进一步研究。

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.

- 2 Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- 3 Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, et al. Non-small cell lung cancer, version 6.2015[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2015, 13(5): 515-524.
- 4 Lin C, Yang L. Long noncoding RNA in cancer: wiring signaling circuitry[J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(4): 287-301.
- 5 Slaby O, Laga R, Sedlacek O. Therapeutic targeting of non-coding RNAs in cancer[J]. Biochem J, 2017, 474(24): 4219-4251.
- 6 Yu H, Xu Q, Liu F, et al. Identification and validation of long noncoding RNA biomarkers in human non-small-cell lung carcinomas[J]. J Thorac Oncol, 2015, 10(4): 645-654.
- 7 Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments[J]. The Lancet, 2017, 389(10066): 299-311.
- 8 Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Epidemiology of lung cancer in China[J]. Thoracic cancer, 2015, 6(2): 209-215.
- 9 Esteller M. Non-coding RNAs in human disease[J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(12): 861-874.
- 10 Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(13): 2491-2509.
- 11 Kretz M, Siperashvili Z, Chu C, et al. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR[J]. Nature, 2013, 493(7431): 231-235.
- 12 Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3): 155-159.
- 13 Hung CL, Wang LY, Yu YL, et al. A long noncoding RNA connects c-Myc to tumor metabolism[J]. P Natl Acad Sci Usa, 2014, 111(52): 18697-18702.
- 14 Gutschner T, Hämmerle M, Eissman M, et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells[J]. Cancer Research, 2013, 73(3): 1180-1189.
- 15 Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(39): 8031-8041.

(收稿日期 2018-03-19)

(本文编辑 蔡华波)