

linc00152 通过调控 DNMT3A 和 DNMT3B 促进人宫颈癌细胞生长与侵袭

彭芳*, 陈艳宇, 王贵明, 周扬帆

(广东省第二人民医院病理科, 广东 广州 510317)

摘要: 探讨 linc00152 在宫颈癌中的生物学功能及其调控机制。运用 qRT-PCR 检测人宫颈癌细胞与正常宫颈上皮细胞中 linc00152 的表达; 转染 sh-linc00152、si-DNMT3A 和 si-DNMT3B 于 HeLa 细胞以敲低细胞中 linc00152、DNMT3A 和 DNMT3B 的表达水平, 采用 qRT-PCR 与 Western blot 法检测转染效率; 采用 Western blot 法检测 sh-linc00152 对甲基化转移酶(DNMT)3A 和 3B 蛋白表达水平的影响; 采用 MTT、Transwell 侵袭实验检测 sh-linc00152、si-DNMT3A 以及 si-DNMT3B 对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖与侵袭的影响。结果显示, linc00152 在宫颈癌细胞中的表达水平明显高于正常宫颈上皮细胞($P < 0.01$); 在 HeLa 细胞中, sh-linc00152 组 DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达水平明显低于 sh-control 组; sh-linc00152 组、si-DNMT3A 以及 si-DNMT3B 组 HeLa 细胞的存活率及穿过基质胶的 HeLa 细胞数量均明显低于各自对照组。linc00152 可能通过调控 DNMT3A 和 DNMT3B 信号通路促进人宫颈癌细胞生长与侵袭。

关键词: linc00152; 宫颈癌; 甲基化转移酶 3A; 甲基化转移酶 3B; 生长与侵袭

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A

Linc00152 promotes the growth and invasion of human cervical cancer cells by regulating DNMT3A and DNMT3B

PENG Fang*, CHEN Yanyu, WANG Guiming, ZHOU Yangfan

(Department of Pathology, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, Guangdong, China)

Abstract: To explore the biological function and regulation mechanism of linc00152 in cervical cancer. qRT-PCR was used to detect the expression of linc00152 in human cervical cancer cells and normal cervical epithelial cells. Transfection of sh-linc00152 and si-DNMT3A, as well as si-DNMT3B knockdown the expression of linc00152, DNMT3A, DNMT3B in HeLa cells, the efficiency of transfection were detected by qRT-PCR and Western blot. Western blot was conducted to detect the expressions of DNMT3A and DNMT3B protein regulated by sh-linc00152. The proliferation and invasion ability of human cervical cancer HeLa cells regulated by sh-linc00152 and si-DNMT3A, as well as si-DNMT3B in vitro were evaluated by MTT and transwell invasion assays. The expression of linc00152 in cervical cancer cells was significantly higher than that in normal cervical epithelial cells. Western blot showed that the level of DNMT3A and DNMT3B protein in sh-linc00152 group was significantly lower than that in sh-control group. The viability and the invasion ability of HeLa cells in sh-linc00152 group and si-DNMT3A, as well as si-DNMT3B group were significantly lower than those in the control group. linc00152 may promote the growth and invasion of human cervical cancer cells by regulating DNMT3A and DNMT3B signaling pathways.

Key words: linc00152; cervical cancer; methyltransferase 3A; methyltransferase 3B; growth and invasion

宫颈癌是女性最常见的癌症类型之一, 特别是

在发展中国家。此外, 宫颈癌也是导致女性癌症死亡相关的第四大常见因素^[1]。近年来宫颈癌的发病状态呈年轻化趋势, 尽管早期癌症患者可通过手术与放疗等获益, 但仍有部分患者预后不良, 大多死于转移与复发。因此, 阐明宫颈癌发生及转移的

分子机制对促进新型治疗策略的发展至关重要。

长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸、有功能的非编码 RNA。多项研究报道 lncRNA 参与细胞多方面生物学状态并且与肿瘤发展密切相关,但只有少部分 lncRNA 的功能特点和分子机制得到证实。其中, lnc00152 由 828 个核苷酸组成, 位于 2p11.2 染色体。最初在肝癌中被发现具有差异低甲基化状态, 并且被证实其通过多种机制来调节基因表达, 包括表观遗传修饰^[2] 和 lncRNA-miRNA^[3] 和 lncRNA-蛋白质相互作用^[2]。多项研究已表明, lnc00152 在多种恶性肿瘤中, 如胃癌^[4]、胆囊癌^[5]、肾透明细胞癌^[6] 表达上调并发挥癌基因样作用。然而, lnc00152 在宫颈癌中的生物学功能及其机制尚不清楚。因此, lnc00152 在调控宫颈癌的发生、发展中的作用亟待研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人宫颈癌细胞株 SiHa 和 HeLa 细胞以及人正常宫颈上皮细胞株 End1/E6E7 细胞购于中国科学院细胞库, RNeasy Mini Kit 购于 Qiagen 公司, Reverse Transcription Kit 与 SYBR Green 染料购于 Biorad 公司, RNA 抽提试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

引物序列: lnc00152: 5'-TTGATGGCTTGAA-CATTTGG-3' and 5'-TCGTGA TTTTCGGTGTCTGT-3'; β -actin:: 5'-TCACCAACTGGGACGACATG-3' and 5'-GT C ACCGGAGTCCATCACGAT-3', 均由 Qiagen 公司合成, sh-linc00152、sh-control、si-DNMT3A、si-DNMT3B、si-control、Lipofectamine 2000、Transwell 小室均购于美国 Invitrogen 公司, MTT 购于美国 Sigma 公司, DNMT3A、DNMT3B 和 β -actin 抗体以及二抗购于美国 Santa Cruz 公司。

1.2 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 lnc00152 的表达

培养 SiHa、HeLa 细胞以及 End1/E6E7 细胞, 用 RNA 抽提试剂盒抽提三种细胞中的总 RNA, 再经逆转录试剂盒合成 cDNA 存于 -70°C 。qRT-PCR 扩增反应体系包括 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , 10x miScript Universal Primer 2 μL , 10x miScript Primer Assay 2 μL , Template cDNA 1 μg , RNase-free water 加至共 20 μL 。循环体系为: Cycle 1: 37°C 15 min, 3 个循环; Cycle 2: 94°C 5 sec, 55°C 5 sec, 70°C 5 sec, 40 个循环; Cycle 3: 4°C 5 sec, 在

CFX96 实时荧光定量 PCR 系统上检测。以 β -actin 为内参, 所测定的 lnc00152 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析。

1.3 Western blot 法检测 lnc00152 对 DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达的影响

培养 HeLa 细胞, 将 sh-linc00152 和 sh-control 转染质粒按转染说明分别转染于 HeLa 细胞中, 细胞分为 sh-linc00152 和 sh-control 两组, 其中 sh-control 为对照组, 转染后细胞继续培养 48 h 后收获细胞。RIPA 裂解细胞并提取两组细胞总蛋白, 用 BCA 法测定细胞的蛋白浓度, 每组取等量样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳后转膜, 封闭 1h, 加入 DNMT3A、DNMT3B 抗体或 β -actin 抗体, 4°C 过夜, TBST 洗膜, 加二抗孵育 1h, 洗膜, ECL 发光, X 片曝光、显影、定影, 扫描图片, 并计算结果。

1.4 MTT 实验

培养 HeLa 细胞, 将 sh-linc00152、sh-control、si-DNMT3A、si-DNMT3B 以及 si-control 转染质粒按转染说明分别转染于 HeLa 细胞中。细胞分为 sh-linc00152、sh-control、si-DNMT3A、si-DNMT3B 以及 si-control 组, 其中 sh-control 组为 sh-linc00152 组的对照组, si-control 组为 si-DNMT3A 和 si-DNMT3B 组的对照组。分别取上述五组 HeLa 细胞接种于 96 孔板中, 每组设 5 个复孔, 培养至临近饱和, 每孔加灭菌 MTT 液 (5 mg/ml) 20 μL , 孵育 4 h 后取出, 每孔中加入 DMSO 150 μL , 低速振荡 10 min, 选择 570nm 波长在酶标仪上测定各孔吸光值, 记录结果, 实验重复 3 次。

1.5 Transwell 侵袭实验

细胞培养与分组同 MTT 实验。在 transwell 小室中铺加 8 μL 稀释好的基质胶, 过夜形成基质膜。取 100 μL 即含 1×10^5 个细胞/ml 的细胞稀释液, 接种于 transwell 小室上层, 下腔加 500 μL 含 20% FBS 的培养液后, 置于 37°C 温箱中孵育 36 h, 取出, 用棉签擦弃小室上层未迁移的细胞, PBS 液轻洗, 4% 多聚甲醛固定、结晶紫染色下层穿出细胞, PBS 液洗, 倒置, 晾干。光学显微镜下观察并摄相, 随机选取 4 个高倍视野进行细胞计数, 取平均值, 实验重复 3 次。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。所有结果均以均数 $\pm$ 标准差表示, 两组间比较采用 t 检验, 当 $P < 0.05$ 时, 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 宫颈癌细胞中 linc00152 表达水平

qRT-PCR 检测结果显示,人宫颈癌细胞株 SiHa 和 HeLa 细胞中 linc00152 的表达水平分别为 $(1.633 \pm 0.086, 1.926 \pm 0.107)$, 与正常宫颈上皮细胞株 End1/E6E7 细胞的表达水平 (0.426 ± 0.068) 比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1)。

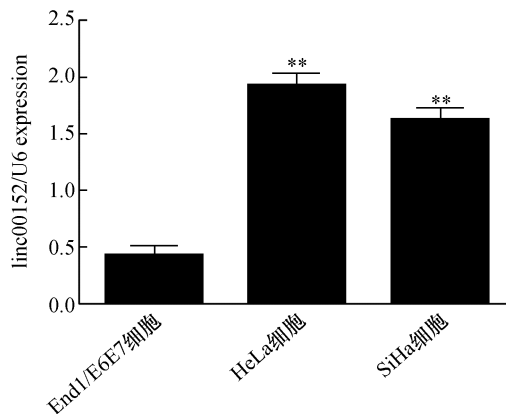


图 1 qRT-PCR 检测 linc00152 的表达
与 End1/E6E7 细胞相比, ** $P < 0.01$ 。

2.2 转染 sh-linc00152、si-DNMT3A 和 si-DNMT3B 后 HeLa 细胞中 linc00152、DNMT3A 和 DNMT3B 的表达

qRT-PCR 检测结果显示,转染 sh-linc00152 组 HeLa 细胞中 linc00152 的表达水平明显低于 sh-control 组 (图 2), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); Western blot 检测结果显示,转染 si-DNMT3A、si-DNMT3B 组 HeLa 细胞中 DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达水平明显低于 si-control 组 (图 3), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果提示 sh-linc00152、si-DNMT3A 和 si-DNMT3B 均转染成功。

2.3 linc00152 对 DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达的影响

研究显示, DNMT3A 和 DNMT3B 与宫颈癌的进展有关,且受非编码 RNA 的调控。为明确在宫颈癌细胞中 linc00152 对 DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达的影响,采用 Western blot 检测。结果显示,在 HeLa 细胞中, sh-linc00152 组 DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达水平明显低于 sh-control 组 (图 4), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

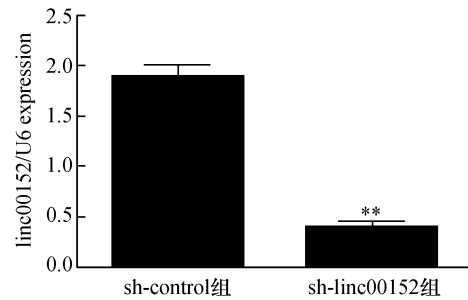


图 2 HeLa 细胞中 sh-linc00152 表达
与 sh-control 组相比, ** $P < 0.01$;

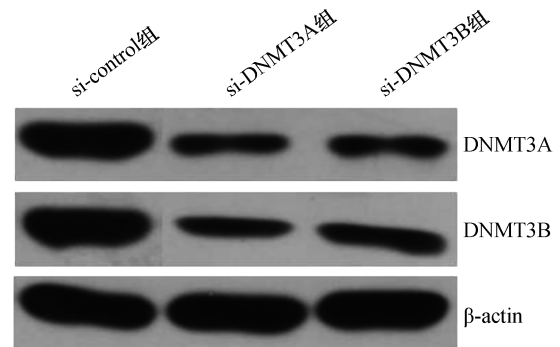


图 3 HeLa 细胞中 DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达

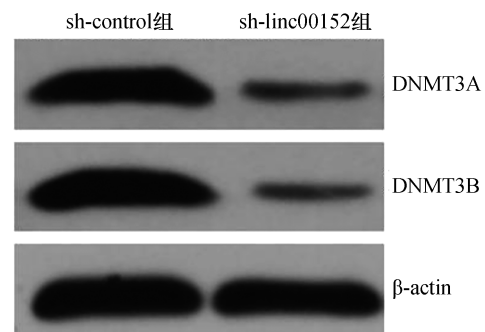


图 4 DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达

2.4 linc00152 对人宫颈癌细胞增殖的影响

MTT 结果显示,在 HeLa 细胞中, sh-linc00152 组、si-DNMT3A 以及 si-DNMT3B 组 HeLa 细胞的 OD 值分别为 $(0.413 \pm 0.061, 0.409 \pm 0.0531, 0.407 \pm 0.048)$, 与 sh-control 组, si-control 组相比 $(0.750 \pm 0.063, 0.743 \pm 0.080)$, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5)。提示在 HeLa 细胞干扰 linc00152、DNMT3A 以及 DNMT3B 表达能抑制 HeLa 细胞的增殖。

2.5 linc00152 对人宫颈癌细胞侵袭的影响

Transwell 结果显示,在 HeLa 细胞中, sh-linc00152

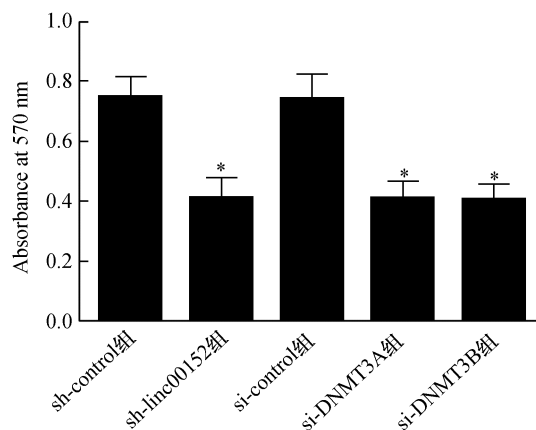
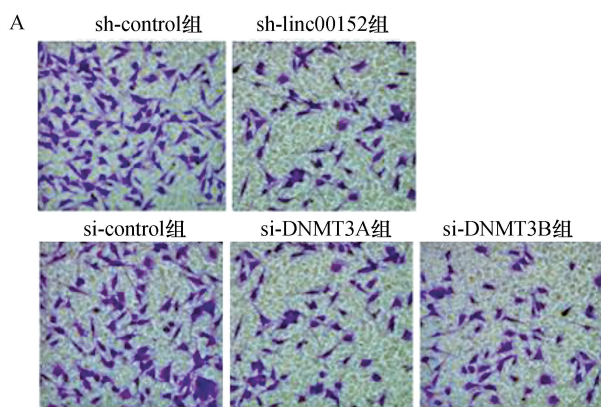


图5 MTT 法检测细胞增殖能力

与 sh-control 组, si-control 组相比, * $P < 0.05$ 。



组和 si-DNMT3A 以及 si-DNMT3B 组 HeLa 细胞穿过基质胶的细胞数量分别为 (65 ± 5) 、 (71 ± 4) 、 (73 ± 5) , 与 sh-control 组, si-control 组 (115 ± 7) 、 (126 ± 6) 相比, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 5)。提示在 HeLa 细胞干扰 linc00152、DNMT3A 以及 DNMT3B 表达能抑制 HeLa 细胞的侵袭。

3 讨 论

近年来, lncRNA 在肿瘤发生、发展中的生物学功能及其分子机制已经成为研究热点。越来越多研究已经证实了 lncRNA 参与肿瘤的发生发展^[7],

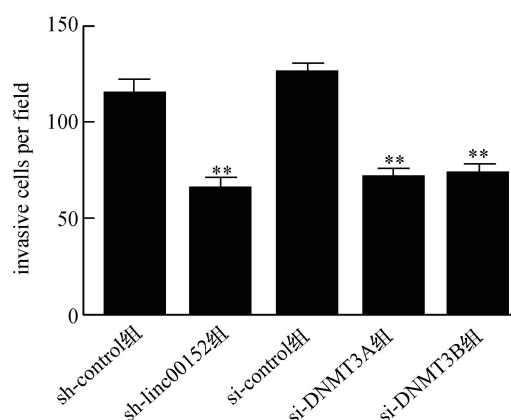


图6 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力

与 sh-control 组, 或 si-control 组相比, ** $P < 0.01$ 。

如肝癌^[8]、胃癌^[9]、尿路上皮癌^[10-11], 并在恶性肿瘤中表达失调及功能异常。在体外研究中显示^[12], linc00152 在胃癌细胞系中的表达明显高于正常胃粘膜上皮细胞, 在胃癌细胞中敲低其表达可抑制细胞增殖和克隆形成, 可促进 G1 期细胞周期停滞、触发晚期凋亡, 抑制上皮细胞-间充质转化 (EMT) 与细胞的迁移与侵袭。研究表明^[13], 在肝癌 MHCC-97H 细胞株中, linc00152 的转录本主要存在细胞核中, 且 linc00152 在体外可促进细胞增殖, 在体内可促使肿瘤生长。此外, 微阵列分析显示, linc00152 通过与上皮细胞粘附分子 (EPCAM) 启动子结合可以激活雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 途径, 从而调节肿瘤细胞的增殖、分裂以及肿瘤的发生。Cai 等^[5]证实, 在胆囊癌中, linc00152 明显促进癌细胞增殖、转移与抑制凋亡。Wu 等^[6]研究发现在肾癌细胞系中 linc00152 表达上调不仅能促进细胞增殖与侵袭, 还

能抑制 G1 期细胞周期阻滞并抑制细胞凋亡。本次研究通过采用 qRT-PCR 技术在宫颈癌细胞与正常宫颈细胞中检测发现, linc00152 在宫颈癌细胞中的表达明显高于正常宫颈细胞, 与上述研究相符。进一步通过 MTT 实验、Transwell 实验研究发现, 在宫颈癌细胞中敲低 linc00152 的表达能明显抑制宫颈癌细胞的增殖和侵袭, 表明 linc00152 在宫颈癌中发挥癌基因样作用。

DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 是一类参与 DNA 甲基化的酶, 通过影响 DNA 甲基化, 在多种生命活动进程中发挥重要作用, 如染色质结构的调控、X 染色体的失活和基因组的稳定^[14]。哺乳动物中 DNA 甲基转移酶家族可分为: DNA 甲基化维持酶 (DNMT1) 以及 DNA 从头甲基化酶 (DNMT3A 和 DNMT3B)。目前, 随着对表观遗传学的深入研究, DNA 甲基化在转录沉默和抑癌基因功能丢失中发

挥重要作用^[15]。无论基因组 DNA 过甲基化或去甲基化均可能导致抑癌基因的突变或改变其转录过程,进而引起细胞表型的改变。近年来, DNA 异常甲基化与恶性肿瘤之间的相关性也引起了众多学者的关注,并获得了一些进展。研究证实 DNA 甲基转移酶 (DNMT) 在多种恶性肿瘤,如胃癌^[16]、肝癌^[17]、肺癌^[18]中表达增加。DNMT3A 和 DNMT3B 与宫颈癌的进展有关^[19]。此外,非编码 RNA 在哺乳动物中调控 DNA 甲基转移酶的重要作用已被证实,同时已有相关调控机制的研究^[20]。同样地,在本研究中,我们观察到在宫颈癌细胞中敲低 linc00152 可显著抑制 DNMT3A 和 DNMT3B 表达。本研究还观察到在宫颈癌细胞中敲低 DNMT3A 和 DNMT3B 后亦能抑制宫颈癌细胞的增殖和侵袭。

综上所述,linc00152 在宫颈癌细胞中表达增高且抑制 linc00152 的表达,能够抑制宫颈癌细胞增殖与侵袭,其作用可能是通过调控 DNMT3A 和 DNMT3B 信号通路发挥的。这些结果为 linc00152 参与宫颈癌发生发展的可能分子机制提供了一个新的思路,linc0015 也有望成为宫颈癌患者潜在的治疗靶点。

参考文献:

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2) : 87-108.
- [2] CHEN WM, HUANG MD, SUN DP, et al. Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes tumor cell cycle progression by binding to EZH2 and repressing p15 and p21 in gastric cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7 (9) : 9773-87.
- [3] YUE B, CAI D, LIU C, et al. Linc00152 functions as a competing endogenous RNA to confer oxaliplatin resistance and holds prognostic values in colon cancer[J]. Mol Ther, 2016, 24 (12) : 2064-77.
- [4] YU Y, YANG J, LI Q, et al. LINC00152: a pivotal oncogenic long non-coding RNA in human cancers[J]. Cell Prolif, 2017, 50 (4) : e12349.
- [5] CAI Q, WANG ZQ, WANG SH, et al. Upregulation of long non-coding RNA LINC00152 by SP1 contributes to gallbladder cancer cell growth and tumor metastasis via PI3K/AKT pathway[J]. Am J Transl Res, 2016, 8 (10) : 4068-81.
- [6] WU Y, TAN C, WENG WW, et al. Long non-coding RNA Linc00152 is a positive prognostic factor for and demonstrates malignant biological behavior in clear cell renal cell carcinoma[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6 (2) : 285-99.
- [7] GUPTA RA, SHAH N, WANG KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. Nature, 2010, 464 (7291) : 1071-8.
- [8] YANG X, XIE X, XIAO YF, et al. The emergence of long non-coding RNAs in the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2015, 360 (2) : 119-24.
- [9] SHAO Y, YE M, JIANG X, et al. Gastric juice long noncoding RNA used as a tumor marker for screening gastric cancer [J]. Cancer, 2014, 120 (21) : 3320-8.
- [10] WANG L, FU D, QIU Y, et al. Genome-wide screening and identification of long noncoding RNAs and their interaction with protein coding RNAs in bladder urothelial cell carcinoma [J]. Cancer Lett, 2014, 349 (1) : 77-86.
- [11] HIRATA H, HINODA Y, SHAHRYARI V, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes aggressive renal cell carcinoma through Ezh2 and interacts with miR-205 [J]. Cancer Res, 2015, 75 (7) : 1322-31.
- [12] ZHAO J, LIU Y, ZHANG W, et al. Long non-coding RNA Linc00152 is involved in cell cycle arrest, apoptosis, epithelial to mesenchymal transition, cell migration and invasion in gastric cancer[J]. Cell Cycle, 2015, 14 (19) : 3112-23.
- [13] JI J, TANG J, DENG L, et al. LINC00152 promotes proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting EpCAM via the mTOR signaling pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6 (40) : 42813-24.
- [14] XU GL, BESTOR TH, BOURCHIS D, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene [J]. Nature, 1999, 402 (6758) : 187-91.
- [15] LOPEZ-SERRA P, ESTELLER M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer [J]. Oncogene, 2012, 31 (13) : 1609-22.
- [16] YANG J, WEI X, WU Q, et al. Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer [J]. Mol Med Rep, 2011, 4 (6) : 1139-43.
- [17] PARK HJ, YU E, SHIM YH. DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation in human hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2006, 233 (2) : 271-8.
- [18] WANG L, WANG J, SUN S, et al. A novel DNMT3B subfamily, DeltaDNMT3B, is the predominant form of DNMT3B in non-small cell lung cancer [J]. Int J Oncol, 2006, 29 (1) : 201-7.
- [19] POOMIPARK N, FLATLEY JE, HILL MH, et al. Methyl donor status influences DNMT expression and global DNA methylation in cervical cancer cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17 (7) : 3213-22.
- [20] DENIS H, NDLOVU MN, FUKS F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms [J]. EMBO Rep, 2011, 12 (7) : 647-56.

(本文编辑:秦旭平)