

长链非编码 RNA *AFAP1-AS1* 对人舌癌细胞增殖的影响*

张莉, 伍靖, 李晓宇**

(深圳市龙华区人民医院, 广东 深圳 518109)

[摘要] 目的: 观察 *AFAP1-AS1* 在舌鳞癌组织中的表达情况及其对舌癌细胞增殖的影响。方法: 收集手术切除的舌鳞状细胞癌(TSSC)组织及癌旁 0.5cm 外正常组织各 3 例, 利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 技术检测两种组织中 *AFAP1-AS1* 的表达; 利用 *AFAP1-AS1* 的 siRNA 转染人舌癌细胞(Tca8113)后, qRT-PCR 检测 *AFAP1-AS1* 表达, MTS 实验检测 Tca8113 细胞的增殖能力, 流式细胞术检测 Tca8113 细胞周期。结果: 舌鳞癌组织中, *AFAP1-AS1* 的表达明显高于癌旁组织; siRNA 转染能下调 Tca8113 细胞 *AFAP1-AS1* 的表达, *AFAP1-AS1* 表达沉默后, 舌癌细胞的增殖能力减弱, 且细胞周期阻滞。结论: *AFAP1-AS1* 在舌癌组织中高表达促进舌癌细胞的增殖, 有望成为舌癌治疗的新靶点。

[关键词] 长链非编码 RNA; *AFAP1-AS1*; 舌肿瘤; 癌, 鳞状细胞; 细胞增殖; RNA 干扰

[中图分类号] R739.86 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)08-0902-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.08.008

Effect of Long Non-coding RNA *AFAP1-AS1* on Proliferation of Human Tongue Cancer Cell

ZHANG Li, WU Jing, LI Xiaoyu

(People's Hospital of Longhua District in Shenzhen, Shenzhen 518109, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate *AFAP1-AS1* expression in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) and the effect of *AFAP1-AS1* on the proliferation of tongue cancer cell. **Methods:** Fresh tissue samples of 3 patients with tongue squamous cell carcinomas were collected as TSSC group, while 3 cases of normal tissue adjacent to carcinoma were taken as the normal control group. The expression of *AFAP1-AS1* in the two groups was detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). After tongue cancer cells were transfected with siRNA of *AFAP1-AS1*, MTS assay was used to examine the proliferation ability of human tongue cancer cell. And flow cytometry was applied to detect cell cycle. **Results:** The expression of *AFAP1-AS1* in TSCC group was significantly higher than in normal control group. *AFAP1-AS1* silence inhibited the proliferation of tongue cancer cell and induced cell cycle arrest, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** *AFAP1-AS1* in the expression of TSCC tissue could significantly promote the proliferation of tongue cancer cell, which made a promising new therapeutic target for tongue cancer.

[Key words] long non-coding RNA; *AFAP1-AS1*; tongue neoplasms; carcinoma; squamous cell; cell proliferation; RNA interference

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一组内源性、长度超过 200 nt、缺少特异

完整的开放阅读框、无或很少有蛋白编码功能的 RNA 分子。研究认为,长链非编码 RNA 能够在染

*[基金项目] 深圳市龙华区科技创新基金资助项目(20160831A1030167)

** 通信作者 E-mail: 21422278@qq.com

网络出版时间: 2017-8-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170817.1032.003.html>

色质重构、基因转录、翻译及蛋白修饰等多水平上调控基因的表达^[1-2],并参与了包括发育、免疫、生殖等基本生理过程^[3-5]。研究还表明,长链非编码 RNA 参与了肿瘤的发生发展,与多种肿瘤的增殖、凋亡、侵袭转移和预后等密切相关^[6-9]。AFAP1-AS1 (actin filament associated protein 1 antisense RNA 1, AFAP1-AS1) 是一个定位在 AFAP1 基因反义 DNA 链上的长链非编码 RNA,在肿瘤的发生发展过程中具有重要用,尤其在食管癌^[10-11]、胰腺癌^[12]、肺癌^[13-14]、鼻咽癌^[15]、结直肠癌^[16]等多种肿瘤中均高表达,且与多种肿瘤的预后相关。但是,截止到目前,AFAP1-AS1 在舌癌中的表达情况及其作用尚无报道。本研究通过检测 AFAP1-AS1 在舌鳞状细胞癌 (tongue squamous cell carcinoma, TSSC) 组织中的表达,并转染 AFAP1-AS1 的 siRNA 进入人舌癌细胞 (Tca8113),研究其对舌癌细胞生物学行为的影响,揭示 AFAP-AS1 在舌癌中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 组织标本及细胞系 收集 2015 年 12 月 - 2016 年 9 月接受手术切除治疗的新鲜舌癌组织及癌旁 5 cm 正常组织标本各 3 例,所有病例均由病理科确诊是 TSSC,并取得患者的知情同意,患者手术前均未接受过放、化疗。人舌癌细胞系 Tca8113 为中南大学湘雅二医院馈赠。将 Tca8113 分为正常对照组 (NC 组)、siRNA1 组及 siRNA2 组,于含有 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素的 RPMI-1640 培养基中,37 °C 恒温培养。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640 细胞培养基、胎牛血清、胰蛋白酶 (含 EDTA) 均购自 Gibco 公司, RNA 提取试剂 TRIzol 购自罗氏公司,逆转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒均购自 TAKARA 公司。Hiperfect 转染试剂购自 Qiagen 公司,MTS 试剂盒购自 PROMEGA 公司,siRNA 购自英潍捷基公司,所有 PCR 引物均购自上海生工。

1.2 方 法

1.2.1 AFAP1-AS1 表达检测 根据 TRIzol 试剂说明书提取舌癌组织、癌旁组织及 Tca8113 细胞的总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性后,测定总 RNA 浓度;采用实时定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 AFAP1-AS1 的表达 (根据逆转录及荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行),以 β -Actin

为内参,各组相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.2.2 细胞增殖检测 取对数生长期的 Tca8113 细胞,以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中。待细胞生长至 60% 融合时,NC 组、siRNA1 组及 siRNA2 组分别转染阴性对照 siRNA、siRNA1 及 siRNA2 (按照 Hiperfect 脂质体转染试剂说明书进行)。在转染 siRNA 36 h 时收集细胞,以 1 000 个/孔细胞接种于 96 孔板中,于 37 °C,5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养。检测前每孔分别加入 MTS 试剂 20 μ L,避光 37 °C 孵育 2 h,轻轻振荡后,酶标仪 490 nm 波长处测定光密度 (OD) 值。共检测 5 d,每个时间点设置 3 个复孔。

1.2.3 细胞周期检测 收集转染 48 h 后的 Tca8113 细胞,PBS 洗涤细胞 3 次,加入预冷的 70% 乙醇固定细胞过夜。第 2 天收集细胞沉淀,PBS 重悬后,加入碘化丙锭 (PI) 染色液 (含 50 mg/L PI,1 g/L Triton X-100,100 g/L RNase) 混匀,4 °C 避光孵育 30 min,然后流式细胞仪上机检测。

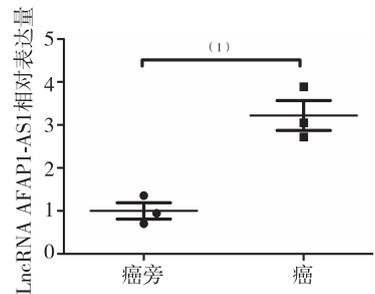
1.3 统计 学 处 理

实验数据用 SPSS 18.0 统计软件进行处理,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 AFAP1-AS1 在人 TSSC 组织中高表达

qRT-PCR 结果显示,LncRNA AFAP1-AS1 在 3 例人 TSSC 组织中的表达明显高于其癌旁组织,均为癌旁组织的 3 倍以上,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。



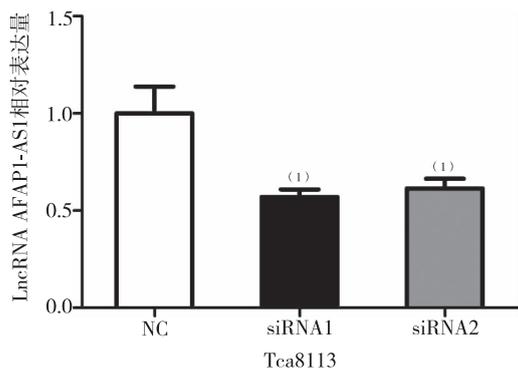
(*) 与癌旁组织相比, $P < 0.05$

图 1 AFAP1-AS1 在 TSSC 组织及癌旁组织中的表达
Fig. 1 The expression of AFAP1-AS1 in TSSC tissues and tumor adjacent tissues

2.2 Tca8113 细胞中 AFAP1-AS1 表达

AFAP1-AS1 的 siRNA 转染舌癌细胞系

Tca8113 后, siRNA1 组及 siRNA2 组中 *AFAP1-AS1* 的表达明显降低, *AFAP1-AS1* 的沉默效果均达到了将近 50%, siRNA1 组及 siRNA2 组与 NC 组的 *AFAP1-AS1* 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 如图 2 所示。siRNA1 的沉默效果较好, 后续试验均用 siRNA1 进行, 称为 siRNA 组。



⁽¹⁾ 与 NC 组比较, $P < 0.01$

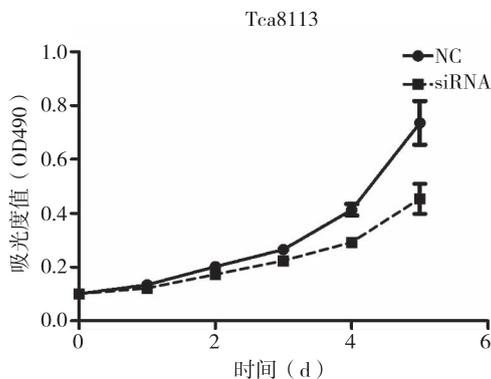
图 2 转染 *AFAP1-AS1* 的 siRNA 后 Tca8113 细胞中 *AFAP1-AS1* 的表达

Fig. 2 The expression of *AFAP1-AS1* in Tca8113 cells after transfection of siRNA of *AFAP1-AS1*

2.3 沉默 *AFAP1-AS1* 表达影响舌癌细胞的增殖能力

与 NC 组比较, siRNA 组 Tca8113 细胞的增殖能力在第 2 天时就已经比对照组低, 第 4 天开始具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。该实验表明下

调 *AFAP1-AS1* 在舌癌细胞系中的表达可显著抑制舌癌细胞的增殖能力。

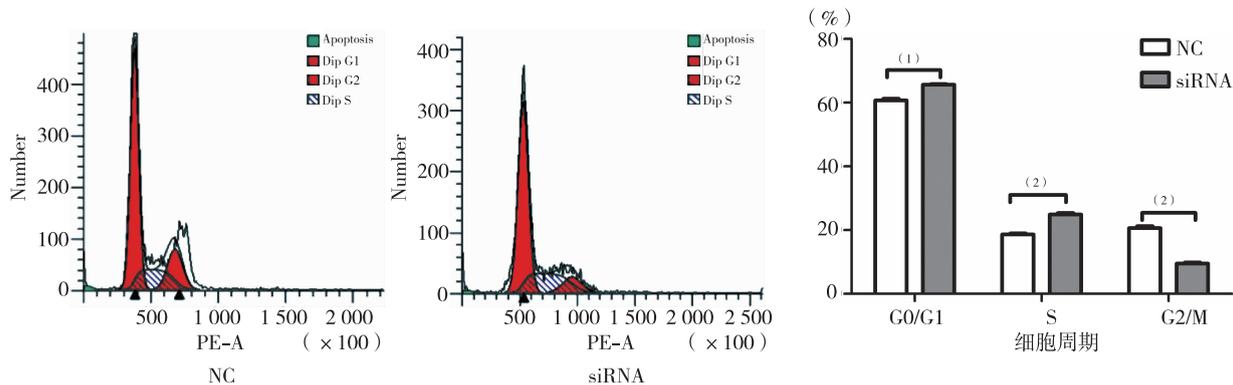


⁽¹⁾ 与阴性对照组比较, $P < 0.05$

图 3 沉默 *AFAP1-AS1* 表达抑制 Tca8113 细胞增殖
Fig. 3 The effect of *AFAP1-AS1* on Tca8113 cells proliferation ability

2.4 沉默 *AFAP1-AS1* 表达影响舌癌细胞的细胞周期进程

人舌癌细胞 Tca8113 中转染 *AFAP1-AS1* 的 siRNA 48 h 时, 利用流式细胞技术检测舌癌细胞的细胞周期, 结果显示, 沉默 *AFAP1-AS1* 表达的舌癌细胞处于 G0/G1 期和 S 期的细胞明显高于对照组, 而处于 G2/M 期的细胞则明显低于对照组, 且差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明 *AFAP1-AS1* 能通过促进细胞周期进程而促进细胞生长。见图 4。



与 NC 组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.001$

图 4 *AFAP1-AS1* 对 Tca8113 细胞周期的影响

Fig. 4 The effect of *AFAP1-AS1* on Tca8113 cell cycle

3 讨论

LncRNA 是一组内源性、长度超过 200 nt、缺少

特异完整的开放阅读框、无或很少有蛋白编码功能的 RNA 分子。大量的研究表明, LncRNA 表达失调与多种肿瘤的发生发展相关。早在 2014 年, 便有研究发现 LncRNA UCA1 在 TSSC 组织中高表

达,且其能促进舌癌细胞的迁移,与病人的淋巴结转移相关^[17]。此后,又有文献报道,有多个 LncRNA^[18-20]在 TSSC 组织中表达失调,这些表达失调的 LncRNA 中有些与舌癌患者的病理分级相关,因而这些表达失调的 LncRNA 可能参与了舌癌发生发展的病理过程。最近,Liang J 等^[21]发现,LncRNA *MALAT1* 也在 TSSC 组织中高表达,且其能够通过调控 Wnt/ β -catenin 而促进舌癌细胞侵袭转移,抑制舌癌细胞凋亡。综上可知,舌癌中也存在许多 LncRNA 的表达失调,LncRNA 在舌癌的病理过程中可能也扮演着重要角色。

本研究通过检测舌癌及其对应的癌旁组织中的 LncRNA *AFAP1-AS1*,首次发现 *AFAP1-AS1* 在舌癌组织中显著高表达,沉默 *AFAP1-AS1* 表达后,人舌癌细胞系 Tca8113 的增殖能力明显减弱;流式细胞术检测细胞周期时发现,*AFAP1-AS1* 能够促进舌癌细胞的周期进程。以上实验表明 *AFAP1-AS1* 可能通过促进细胞周期进程而影响舌癌细胞增殖。这是对以往研究所发现的舌癌相关 LncRNA 主要影响舌癌细胞侵袭转移的一大补充,丰富了对 LncRNA 参与舌癌发生发展过程机理的认识。但是,*AFAP1-AS1* 影响舌癌细胞增殖的具体分子机制还有待进一步深入研究。

综上所述,LncRNA *AFAP1-AS1* 作为具有类似致癌基因功能的 LncRNA 分子,能够显著促进舌癌细胞的增殖,进一步深入研究其具体的作用机制,有助于更好的理解舌癌发生发展的过程,也为舌癌的基因靶向治疗提供了新的方向。

4 参考文献

[1] Gong Z, Zhang S, Zhang W, et al. Long non-coding RNAs in cancer [J]. *Sci China Life Sci*, 2012(12): 1120-1124.

[2] Lau E. Non-coding RNA: Zooming in on lncRNA functions [J]. *Nat Rev Genet*, 2014(9):574-575.

[3] Huang B. Long non-coding RNA: dancing on immune stage [J]. *Sci China Life Sci*, 2014(6):643-644.

[4] Tian D, Sun S, Lee JT. The long non-coding RNA, *Jpx*, is a molecular switch for X chromosome inactivation [J]. *Cell*, 2010(3):390-403.

[5] Wang P, Xue Y, Han Y, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA *lnc-DC* controls human dendritic cell differentiation [J]. *Science*, 2014(6181):310-313.

[6] Quagliata L, Matter MS, Piscuoglio S, et al. Long non-coding RNA *HOTTIP/ HOXA13* expression is associated

with disease pro-gression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Hepatology*, 2014(3): 911-923.

- [7] Yang X, Song JH, Cheng Y, et al. Long non-coding RNA *HNF1A-AS1* regulates proliferation and migration in oesophageal adenocarcinoma cells [J]. *Gut*, 2014(6):881-890.
- [8] Lu MH, Tang B, Zeng S, et al. Long non-coding RNA *BC032469*, a novel competing endogenous RNA, upregulates *hTERT* expression by sponging *miR-1207-5p* and promotes proliferation in gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2016(27):3524-3534.
- [9] Xie M, Sun M, Zhu YN, et al. Long non-coding RNA *HOXA-AS2* promotes gastric cancer proliferation by epigenetically silencing *P21/PLK3/DDIT3* expression [J]. *Oncotarget*, 2015(32):33587-33601.
- [10] Luo HL, Huang MD, Guo JN, et al. *AFAP1-AS1* is up-regulated and promotes esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation and inhibits cell apoptosis [J]. *Cancer Med*, 2016(10):2879-2885.
- [11] Wu W, Bhagat TD, Yang X, et al. Hypo-methylation of noncoding DNA regions and overexpression of the long noncoding RNA, *AFAP1-AS1*, in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2013(5):956-966.
- [12] Ye Y, Chen J, Zhou Y, et al. High expression of *AFAP1-AS1* is associated with poor survival and short-term recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *J Transl Med*, 2015(13):137.
- [13] Zeng Z, Bo H, Gong Z, et al. *AFAP1-AS1*, a long noncoding RNA upregulated in lung cancer and promotes invasion and metastasis [J]. *Tumour Biol*, 2016(1):729-737.
- [14] Deng J, Liang Y, Liu C, et al. The up-regulation of long non-coding RNA *AFAP1-AS1* is associated with the poor prognosis of NSCLC patients [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015(75):8-11.
- [15] Bo H, Gong Z, Zhang W, et al. Upregulated long non-coding RNA *AFAP1-AS1* expression is associated with progression and poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015(24):20404-20418.
- [16] Han X, Wang L, Ning Y, et al. Long non-coding RNA *AFAP1-AS1* facilitates tumor growth and promotes metastasis in colorectal cancer [J]. *Biol Res*, 2016(1):36.
- [17] Fang Z, Wu L, Wang L, et al. Increased expression of the long non-coding RNA *UCA1* in tongue squamous cell carcinomas: a possible correlation with cancer metastasis [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2014(1):89-95.

(下转第 914 页)

在对炎症反应的早期预测以及疾病预后评估。最新的研究发现, sTREM1 可以抵抗膜表面 TREM1 的促炎作用, 从而起到抗炎作用, 并与多种炎症疾病发生发展密切相关^[7], 从而初步推测 AM 在受到外界刺激导致 TREM1 表达增加促进炎症级联放大的同时启动炎症反应自我调节机制, 通过其下游产物 sTREM1 表达的增加来抑制炎症反应的进一步扩大。如果外界刺激不能及时去除而持续扩大, 则 sTREM1 调节作用下降从而导致炎症反应继续加重。总之在促炎物质引发炎症反应后, TREM1 通过表达上调来扩大炎症反应, 产生的致炎和抗炎细胞因子可能又反作用于 TREM1 受体, 调节其在细胞的表达, 提示可能存在调控 TREM1 表达的自分泌环。对 TRME1 在 AM 表达以及调控机制的研究可能为将来 ALI、ARDS、脓毒症等多种炎症性疾病的治疗提供新的治疗方法, 需要更进一步深入的研究。

4 参考文献

[1] Siranovi M, Kovac J, Gopcevi S, et al. Human soluble TREM-1: lung and serum levels in patients with bacterial ventilator associated pneumonia [J]. *Acta Clin Croat*, 2011 (3): 345 - 349.

[2] Tintinger GR, van der Merwe JJ, Fickl H, et al. Soluble triggering re-ceptor expressed on myeloid cells in sputum of patients with commu-nity-acquired pneumonia or pulmonary tuberculosis; a pilot study [J]. *Eur Respir J*, 2012 (1): 73 - 76.

[3] Haselmayer P, Daniel M, Tertilt C, et al. Signaling pathways of the TREM-1- and TLR4-mediated neutrophil oxidative burst [J]. *J Innate Immun*, 2009(6): 582 - 591.

[4] Arts RJ, Joosten LA, Dinarello CA, et al. TREM-1 interaction with the LPS/TLR4 receptor complex [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2011(1): 11 - 14.

[5] Molad Y, Pokroy-Shapira E, Carmon V. CpG-oligodeoxynucleotide-induced TLR9 activation regulates macrophage TREM-1 expression and shedding [J]. *Innate Immun*, 2013 (6): 623 - 630.

[6] Zheng H, Heiderscheidt CA, Joo M, et al. MYD88-dependent and -independent activation of TREM-1 via specific TLR ligands [J]. *Eur J Immunol*, 2010(1): 162 - 171.

[7] Gomez-pin AV, Martinez E, Fernandez-ruiz I, et al. Role of MMPs inorchestrating In-flamematory response in human monocytes via a TREM-1-PI3K-NF-kappaB pathway [J]. *J Leukoc Biol*, 2012 Jun; 91(6): 933 - 45.

(2017-03-26 收稿, 2017-06-18 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅

(上接第 905 页)

[18] Jia LF, Wei SB, Gan YH, et al. Expression, regulation and roles of miR-26a and MEG3 in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2014(10): 2282 - 2293.

[19] Gao W, Chan JY, Wong TS. Long non-coding RNA deregulation in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2014(2014): 405860.

[20] Zhang H, Zhao L, Wang YX, et al. Long non-coding RNA HOTTIP is correlated with progression and prognosis

in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2015(11): 8805 - 8809.

[21] Liang J, Liang L, Ouyang K, et al. MALAT1 induces tongue cancer cells' EMT and inhibits apoptosis through Wnt/ beta-catenin signaling pathway [J]. *J Oral Pathol Med*, 2017 (2): 98 - 105.

(2017-05-12 收稿, 2017-07-21 修回)

中文编辑: 周凌; 英文编辑: 乐萍

(上接第 910 页)

[14] Shi J, Zhang C, Yi Z, et al. Explore the variation of MMP3, JNK, p38 MAPKs, and autophagy at the early stage of osteoarthritis [J]. *IUBMB Life*, 2016(4): 293 - 302.

[15] Kong CG, Park JB, Kim MS, et al. High glucose accelerates autophagy in adult rat intervertebral disc cells [J]. *Asian Spine J*, 2014(5): 543 - 548.

[16] Jiang L, Jin Y, Wang H, et al. Glucosamine protects nucleus pulposus cells and induces autophagy via the mTOR-dependent pathway [J]. *J Orthop Res*, 2014 (11): 1532 - 1542.

[17] Zhang Z, Zhu JY, Roh J, et al. TOR signaling promotes accumulation of BZR1 to balance growth with carbon availability in arabidopsis [J]. *Curr Biol*, 2016 (14): 1854 - 1860.

[18] Pellegrini C, Columbaro M, Capanni C, et al. All-trans retinoic acid and rapamycin normalize Hutchinson Gilford progeria fibroblast phenotype [J]. *Oncotarget*, 2015 (30): 29914 - 29928.

(2017-04-19 收稿, 2017-06-28 修回)

中文编辑: 周凌; 英文编辑: 赵毅