

长链非编码 RNA ITGβ2-AS1 对胰腺癌细胞增殖和侵袭及迁移能力的影响*

陈世裕^{1,2,3,4}, 喻超^{2,3,4}, 潘耀振^{2,3,4}, 陈玲^{2,3,4}, 李琳^{1,2,3,4}, 杨哲豪^{1,2,3,4},
吕彦霖^{1,2,3,4}, 邓路^{1,2,3,4}, 孙诚谊^{1,2,3,4**}

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 肝胆胰脾重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州省肝胆胰脾疾病研究所, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨长链非编码 RNA(LncRNA)整合素 β2 (ITGβ2)-AS1 在体外对人胰腺癌细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响及其机制。方法: 采用癌症基因组图谱(TCGA)公共数据库分析 ITGβ2-AS1 在胰腺癌组织及癌旁组织中的表达, 通过 qPCR 实验检测 ITGβ2-AS1 分别在人正常胰腺导管上皮细胞及人 PC 细胞株 AsPC-1、CFPAC-1、PANC-1、MIA PaCa-2、Capan-2、BxPC-3、Hs766T 及 SW1990 细胞中的表达, 利用慢病毒载体稳定转染 ITGβ2-AS1 最高的表达细胞, 采用 CCK-8 和平板克隆实验检测 ITGβ2-AS1 对 PANC-1 细胞增殖能力的影响; 通过细胞划痕及 Transwell 实验检测 ITGβ2-AS1 对 PANC-1 细胞侵袭及迁移能力的影响, qPCR 及 Western blot 实验检测干扰 ITGβ2-AS1 后 PANC-1 细胞中 ITGβ2 的基因表达情况。结果: ITGβ2-AS1 在胰腺癌组织中的表达明显高于癌旁组织, 且在各胰腺癌细胞株中的表达显著高于人正常胰腺导管上皮细胞, PANC-1 中表达最高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 干扰 ITGβ2-AS1 后, PANC-1 细胞的增殖、迁移及侵袭能力显著降低, ITGβ2 的表达水平显著下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: LncRNA ITGβ2-AS1 在胰腺癌中高表达, 干扰其表达可抑制胰腺癌细胞的增殖、侵袭及迁移能力和抑制 ITGβ2 的转录及翻译过程。

[关键词] 长链非编码 RNA; 整合素 β2; 胰腺癌; 增殖; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)08-0869-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.08.001

Effect of Long Non-coding RNA ITGβ2-AS1 on Proliferation, Invasion and Migration of Pancreatic Cancer Cells

CHEN Shiyu^{1,2,3,4}, YU Chao^{2,3,4}, PAN Yaozhen^{2,3,4}, CHEN Ling^{2,3,4}, LI Lin^{1,2,3,4},
YANG Zhehao^{1,2,3,4}, LV Yanlin^{1,2,3,4}, DENG Lu^{1,2,3,4}, SUN Chengyi^{1,2,3,4}

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Key Laboratory of Liver, Gallbladder, Pancreas and Spleen of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Guizhou Institute of Hepatobiliary, Pancreatic and Spleen Diseases, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of long non-coding RNA integrin β2 (ITGβ2)-AS1 on proliferation, invasion and migration of human pancreatic cancer cells in vitro and to explore its mechanism preliminarily. **Methods:** The expression of ITGβ2-AS1 in pancreatic cancer tissues and adjacent tissues was analyzed and compared based on the TCGA database and the expression of ITGβ2-

* [基金项目] 国家自然科学基金(81860505, 81860506); 贵州省科学技术厅—贵州医科大学附属医院联合基金[黔科合 LH 字(2016)7229]; 贵州省肝胆外科临床医学研究中心[黔科合平台人才(2017)5404]; 贵州省高层次人才培养计划“十”层次人才, 黔科合平台人才[(2016)5647]; 贵州省科学技术厅—贵阳医学院院士工作站肝胆外科分站[黔科合院士站(2015)4013]; 贵州省孙诚谊“肝胆胰脾疾病诊治”导师工作室, 黔教研合[GZS(2016)09]; 贵州省第四批人才基地—贵州省外科人才培养基地[黔省专合字(2012)94]; 贵州省科技支撑计划项目[黔科合 SY 字(2015)3047]

** 通信作者 E-mail: sunchengyi2014@163.com

网络出版时间: 2019-08-27 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190827.1841.001.html>

AS1 in human normal pancreatic ductal epithelial cells and pancreatic cancer cells was detected by qPCR assay; The pancreatic cancer cell line PANC-1 was stably transfected with lentiviral vector and the effect of ITG β 2-AS1 on proliferation of pancreatic cancer cells was detected by CCK-8 and colony formation assays; The effect of ITG β 2-AS1 on invasion and migration of pancreatic cancer cells was detected by wound healing and Transwell assays; The expression of ITG β 2 after interfering with ITG β 2-AS1 was detected by qPCR and Western blot assays. **Results:** The expression of ITG β 2-AS1 in pancreatic cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues, and the expression of ITG β 2-AS1 in pancreatic cancer cell lines was significantly higher than that in human normal pancreatic ductal epithelial cells ($P < 0.05$). After interfering with ITG β 2-AS1, the proliferation, migration and invasion ability of pancreatic cancer cells decreased significantly ($P < 0.05$) and the expression level of ITG β 2 decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Long non-coding RNA ITG β 2-AS1 is highly expressed in pancreatic cancer, interfering its expression may inhibit the proliferation, invasion and migration of pancreatic cancer cells and inhibit the transcription and translation process of ITG β 2.

[**Key words**] long non-coding RNA; ITG β 2; pancreatic carcinoma; proliferation; invasion; migration

胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 是全球癌症相关死亡率最高的第四大疾病^[1-2], 尽管现代医学技术取得了显著的进步, 但 PC 病人的生存率仍然较低, 5 年总生存率仅为 7%, 平均生存时间 < 9 个月^[2-4]。早期诊断 PC、采取恰当的手术方式和化疗, 是治疗 PC 的有效方法^[5-6]; 但由于 PC 早期缺乏明确诊断的分子标志物, 因此大部分 PC 患者在明确诊断时已经失去了手术切除机会, 治疗预后不良。因此, 研究 PC 细胞的增殖、侵袭及迁移的分子机制, 对治疗 PC 及改善其预后具有重要的意义。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一类不编码蛋白质的 RNA, 主要参与细胞内转录激活、转录后调控蛋白功能等生物过程^[7-8]。研究表明, LncRNA 能通过表观遗传修饰、RNA 降解及翻译后修饰等方式激活促癌基因或沉默抑癌基因, 参与肿瘤的发生和转移等过程^[9-11]。整合素蛋白家族 (integrin family, ITG) 是广泛分布于细胞表面的四类细胞黏附分子之一, 是由 α 及 β 两个亚基组成的异源二聚体跨膜蛋白整合素家族, 可以改变肿瘤的增殖、侵袭及迁移等多种生物学功能^[12-14]; 整合素 β 2 (ITG β 2) 主要在各种白细胞的表面表达, 并能够和肿瘤细胞表面的黏附分子结合, 从而赋予肿瘤细胞向远处转移的能力^[15-17]。LncRNA ITG β 2-AS1 起源于 ITG β 2 启动子, LncRNA ITG β 2-AS1 通过上调 ITG β 2 的表达从而促进乳腺癌的侵袭和迁移^[18]。但是, LncRNA ITG β 2-AS1 是否参与 PC 的发生及发展尚待进一步研究, 本项研究主要从增殖、侵袭及迁移等方面研究 LncRNA ITG β 2-AS1 在 PC 中所起到的作用和分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

实验所用细胞株为中山大学肿瘤防治中心惠赠, 胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶 (TRYPSIN)、DMEM 及 RPMI-1640 培养基购自美国 gibco 公司, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒购自 Beyotime 公司, Transwell 侵袭小室购自美国 Corning 公司, Matrigel 购自美国 BD 公司, RNA 提取试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司, ITG β 2-AS1-sh 购自 RIBOBIO 公司, 逆转录试剂盒及 SYBR Premix ExTaq 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 利用 cBioPortal 网站在线分析癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库分析 179 例 PC 癌组织及 171 例癌旁组织 ITG β 2-AS1 的表达情况。

1.2.2 细胞培养 人正常胰腺导管上皮细胞株 HPDE 和人 PC 细胞株 AsPC-1、CFPAC-1、PANC-1、MIA PaCa-2、Capan-2、BxPC-3、Hs766T 及 SW1990 分别使用含 10% FBS 的 DMEM 及 RPMI-1640 培养基培养于 37 °C、含 5% CO₂ 的恒温恒湿培养箱中。

1.2.3 ITG β 2-AS1 mRNA 表达 选择处于对数生长长期的各组细胞株, 提取其总 RNA, 分别测量 A₂₆₀/A₂₈₀ 时的吸光度, 选取吸光度值在 1.8 ~ 2.0 的样品进行实验。依照逆转录试剂盒的说明, 分别将样品逆转录为 cDNA, 再选择 GAPDH 作为内参, 使用 SYBR Premix ExTaq 试剂盒进行 qPCR 实验。

1.2.4 细胞增殖 根据 mRNA 表达的结果, 选取表达升高倍数最大的 PANC-1 细胞作为细胞功能学实验所用细胞株, 利用慢病毒载体稳定转染, 构

建 ITGβ2-AS1 干扰阴性对照组 (Negative Control 组) 及 ITGβ2-AS1 干扰组 (ITGβ2-AS1-sh 组)。分别取对数生长期的两组细胞消化并计数,按照 3×10^3 /孔的数量接种于 96 孔板中,设 6、24、48 及 72 h 时间点,在每个对应的时间点再分别设 5 个复孔,每孔均加入 CCK-8 试剂 10 μL,于避光条件下置 37 °C 恒温恒湿细胞培养箱孵育 2 h 后取出,轻微震荡摇匀后,置酶标仪于 450 nm 波长处测定 OD 值。

1.2.5 平板克隆实验 分别取 1.2.4 项下对数生长期的两组细胞消化并计数,于 6 孔板中种植 1×10^3 个细胞,置 37 °C 恒温恒湿细胞培养箱中培养 10 ~ 14 d 后,用 4% 多聚甲醛固定 20 ~ 30 min、0.25% 结晶紫染液染色 20 ~ 30 min,于流水中冲洗数遍后置烘箱中烘干,拍照记录。

1.2.6 细胞划痕实验 分别取 1.2.4 项下对数生长期的两组细胞消化并计数,于 6 孔板中种植 5×10^5 个细胞,待其均匀铺开成单层并长至 90% 时,用 200 μL 枪头置各孔上方的直尺垂直均匀下划,用 PBS 清洗干净后、加入不含 FBS 的培养基,分别于 0 及 48 h 置显微镜下拍照记录。

1.2.7 细胞侵袭及迁移实验 分别取 1.2.4 项下处于对数生长期的两组细胞,用无血清培养基饥饿处理 24 h 后消化并计数,在上室种植含 2×10^5 个细胞的无血清培养基细胞重悬液 200 μL (种植前上室将 Matrigel 与无血清培养基按照 1:8 的比例铺

上稀释过的 Matrigel 60 μL),下室加入 700 μL 完全培养基,置 37 °C 恒温恒湿细胞培养箱中培养 24 ~ 30 h 后取出,用 4% 多聚甲醛固定 20 ~ 30 min、0.25% 结晶紫染液染色 20 ~ 30 min,用棉签清洗上室、烘箱烘干,置显微镜下拍照记录 (迁移实验不加 Matrigel,其余步骤同上)。

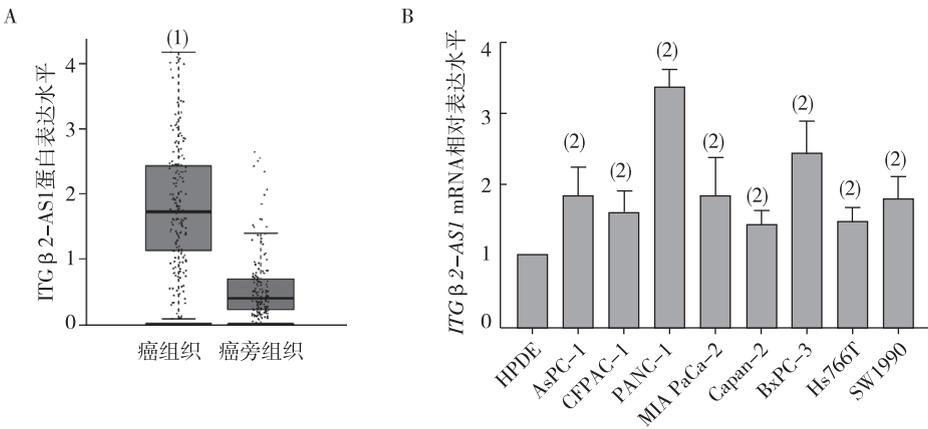
1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 22.0 统计软件处理,计数资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ITGβ2-AS1 表达

分析 TCGA 数据库结果如图 1A 所示,ITGβ2-AS1 在 PC 组织中的表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$);如图 1B 的 qPCR 实验结果所示,ITGβ2-AS1 在 8 株人 PC 细胞中的表达显著高于人正常胰腺导管上皮细胞 HPDE,其中在 PANC-1 细胞株中表达升高的倍数最大,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。



(¹) 与癌旁组织比较, $P < 0.05$; (²) 与 HPDE 细胞比较, $P < 0.05$ 。

图 1 ITGβ2-AS1 在 PC 组织及细胞中的表达

Fig. 1 Expression of ITGβ2-AS1 in pancreatic cancer tissues and cells

2.2 ITGβ2-AS1 对 PC 细胞增殖能力的影响

CCK-8 实验结果显示,在 PANC-1 细胞培养 48、72 h 时,ITGβ2-AS1-sh 组与 Negative Control 组比较,450 nm 波长处的 OD 值显著下降 (见图 2A);平板克隆实验结果显示,Negative Control 组中细胞集落形成数量为 (308.3 ± 12.7) 个,ITGβ2-AS1-sh

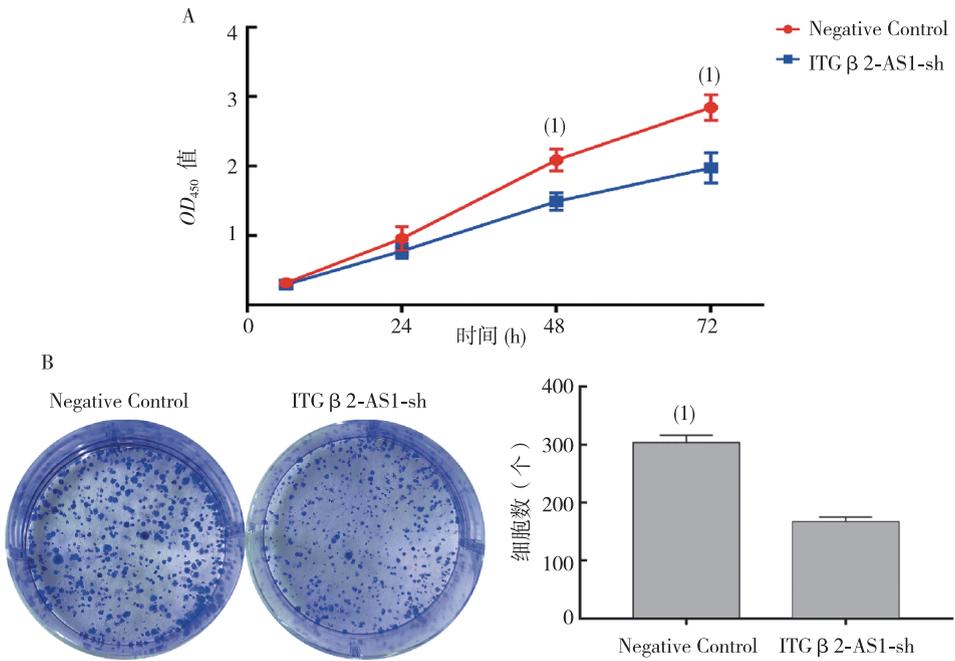
组为 (165 ± 9.4) 个 (见图 2B);结果显示干扰 ITGβ2-AS1 后,PC 细胞的增殖能力显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 ITGβ2-AS1 对 PC 细胞迁移及侵袭能力的影响

细胞划痕实验结果显示,在相同时间点,

ITGβ2-AS1-sh 组与 Negative Control 组比较,PC 细胞的迁移距离变短(见图 3A);Transwell 实验结果显示,Negative Control 组中 PC 细胞的数目为迁移(627 ± 15)个、侵袭(428 ± 32)个,ITGβ2-AS1-sh 组

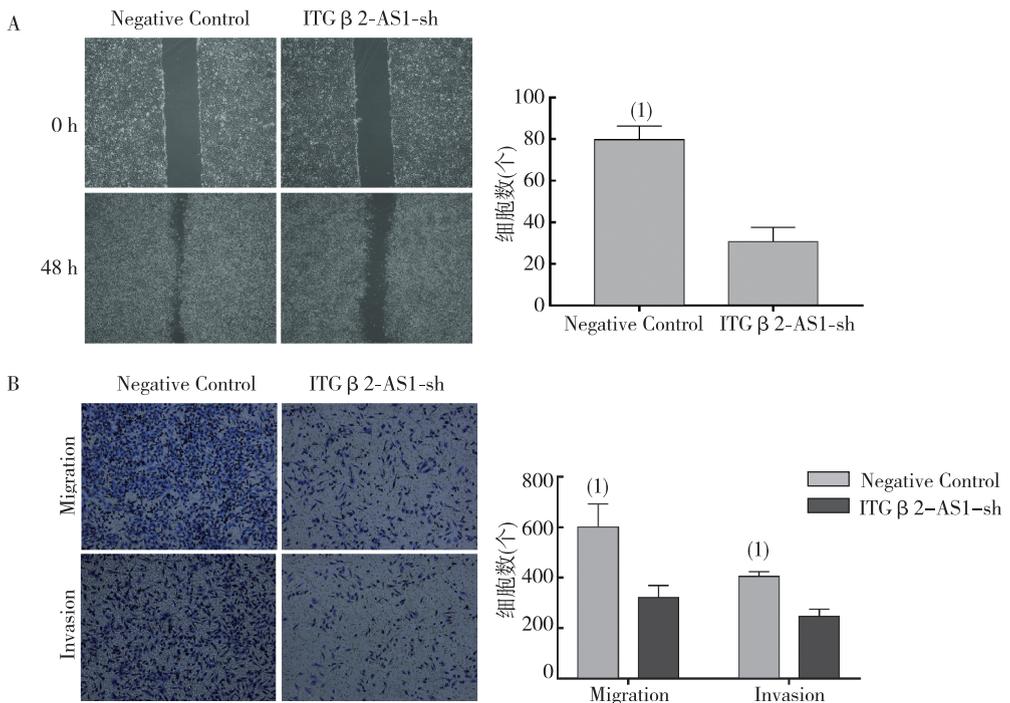
为迁移(312 ± 26)个、侵袭(239 ± 21)个(见图 3B);结果显示,干扰 ITGβ2-AS1 后,PC 细胞的迁移及侵袭能力显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:⁽¹⁾与 ITGβ2-AS1-sh 组比较, $P < 0.05$ 。

图2 ITGβ2-AS1 对 PC 细胞增殖能力的影响

Fig. 2 Effect of ITGβ2-AS1 on proliferation of pancreatic cancer cells



注:⁽¹⁾与 ITGβ2-AS1 组比较, $P < 0.05$ 。

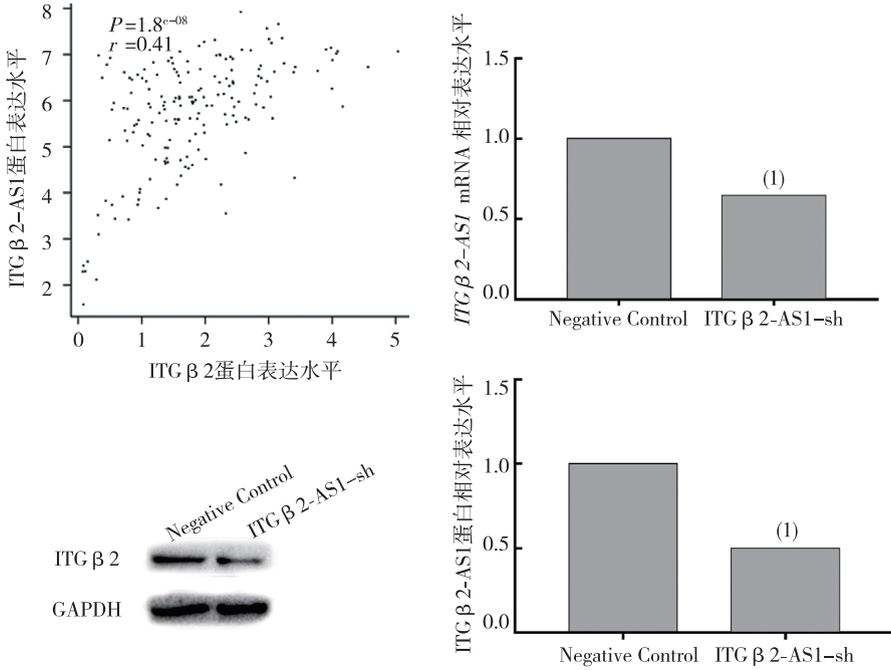
图3 ITGβ2-AS1 对 PC 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig. 3 Effect of ITGβ2-AS1 on migration and invasion of pancreatic cancer cells

2.4 ITGβ2-AS1 对 PC 细胞 ITGβ2 表达水平的影响

ITGβ2-AS1 与 ITGβ2 的相关性回归分析结果显示, ITGβ2-AS1 与 ITGβ2 的表达呈正相关 ($P < 0.05, r = 0.41$)。qPCR 和 Western blot 实验

结果显示, 干扰 ITGβ2-AS1 后, ITGβ2 在 mRNA 和蛋白水平上的表达均显著下降, 提示 ITGβ2-AS1 与 ITGβ2 存在共表达关系, 干扰 ITGβ2-AS1 后 ITGβ2 的表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。



注: ①与 Negative Control 组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 ITGβ2-AS1 对 PC 细胞 ITGβ2 表达水平的影响

Fig. 4 Effect of ITGβ2-AS1 on the expression of ITGβ2 in pancreatic cancer cells

3 讨论

目前, 越来越多的研究表明 LncRNA 在包括 PC 在内的多种肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的作用^[19-22]。已有研究报道 LncRNA ITGβ2-AS1 在乳腺癌组织中的表达与癌旁组织相比明显上调, 预示着临床上的不良预后^[18]。肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移等恶性生物学行为特性是罹患肿瘤的病人治疗困难以及预后不良的最主要原因。因此, 本课题组围绕 LncRNA ITGβ2-AS1 在 PC 的病理生理过程中的作用展开研究。TCGA 数据库分析结果显示, ITGβ2-AS1 在 PC 组织中的表达与癌旁组织相比明显上升。本研究进一步通过 qPCR 实验发现, ITGβ2-AS1 在人 PC 细胞中的表达与人正常胰腺导管上皮细胞相比显著上调。因此, 本研究推测 ITGβ2-AS1 可能与 PC 的恶性生物学行为密切相关。

有研究报道, ITGβ2-AS1 可以通过上调 EMT 相关蛋白 ITGβ2 的表达从而促进乳腺癌细胞的侵袭和迁移^[18]。因此, 本研究推测可以通过干扰 ITGβ2-AS1 从而抑制 PC 细胞的侵袭及迁移。本研究进一步通过一系列相关的细胞功能学实验深入研究, CCK-8、平板克隆、细胞划痕及 Transwell 实验结果提示, 干扰 ITGβ2-AS1 后, PC 细胞的增殖、迁移及侵袭能力显著下降。qPCR 及 Western blot 实验结果提示, 干扰 ITGβ2-AS1 后 ITGβ2 的表达下降。推测 ITGβ2-AS1 可能具有调控 PC 细胞增殖、侵袭和迁移的作用。

综上所述, 本项研究在体外初步验证了在干扰 LncRNA ITGβ2-AS1 后, PC 细胞的增殖、侵袭及迁移能力受到抑制, 有望为寻求治疗 PC 的新型分子靶点提供思路。然而, 其具体的作用途径及分子生物学机制尚未明确, 还需要进一步的探索及研究予以阐明。

4 参考文献

- [1] YU C, CHEN S, GUO Y, et al. Oncogenic TRIM31 confers gemcitabine resistance in pancreatic cancer via activating the NF-kappaB signaling pathway[J]. *Theranostics*, 2018, 8(12):3224-3236.
- [2] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):359-386.
- [3] ZHANG Q, CHEN S, ZENG L, et al. New developments in the early diagnosis of pancreatic cancer [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 11(2):149-156.
- [4] ILMER M, BOILES A R, REGEL I, et al. RSPO2 enhances canonical wnt signaling to confer stemness-associated traits to susceptible pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(9):1883-1896.
- [5] DEPLANQUE G, DEMARTINES N. Pancreatic cancer: are more chemotherapy and surgery needed [J]. *Lancet*, 2017, 389(10073):985-986.
- [6] VAN ROESSEL S, MACKAY T M, TOL J, et al. Impact of expanding indications on surgical and oncological outcome in 1434 consecutive pancreatoduodenectomies [J]. *HPB (Oxford)*, 2019, 21(7):865-875.
- [7] LI Y, CHEN H, PAN T, et al. LncRNA ontology: inferring lncRNA functions based on chromatin states and expression patterns [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(37):39793-39805.
- [8] IGUCHI T, UCHI R, NAMBARA S, et al. A long noncoding RNA, lncRNA-ATB, is involved in the progression and prognosis of colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(3):1385-1388.
- [9] MALAKAR P, STEIN I, SARAGOVI A, et al. Long Noncoding RNA MALAT1 regulates cancer glucose metabolism by enhancing mTOR-mediated translation of TCF7L2 [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(10):2480-2493.
- [10] ZHENG Z, CHEN M, XING P, et al. Increased expression of exosomal AGAP2-AS1 (AGAP2 antisense RNA 1) in breast cancer cells inhibits trastuzumab-induced cell cytotoxicity [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:2211-2220.
- [11] CHENG N, WU J, YIN M, et al. LncRNA CASC11 promotes cancer cell proliferation in hepatocellular carcinoma by inhibiting microRNA-188-5p [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(4):BSR20190251.
- [12] DESGROSELLIER J S, CHERESH D A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(1):9-22.
- [13] ZHANG L, GULSES A, PURCZ N, et al. A comparative assessment of the effects of integrin inhibitor cilengitide on primary culture of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and HNSCC cell lines [J]. *Clin Transl Oncol*, 2019, 21(8):1052-1060.
- [14] ADORNO-CRUZ V, LIU H. Regulation and functions of integrin alpha2 in cell adhesion and disease [J]. *Genes Dis*, 2019, 6(1):16-24.
- [15] Bauer T J, Pratt S M, Palena C M, et al. Feline leukocyte adhesion (CD18) deficiency caused by a deletion in the integrin beta2 (ITGB2) gene [J]. *Vet Clin Pathol*, 2017, 46(3):391-400.
- [16] LIU H, DAI X, CAO X, et al. PRDM4 mediates YAP-induced cell invasion by activating leukocyte-specific integrin beta2 expression [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(6):201745180.
- [17] TIAO G, IMPROGO M R, TAUSCH E, et al. Analysis of ITGB2 rare germ line variants in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2017, 130(22):2443-2444.
- [18] LIU M, GOU L, XIA J, et al. LncRNA ITGB2-AS1 could promote the migration and invasion of breast cancer cell through up-regulating ITGB2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7):19071866.
- [19] DENG S J, CHEN H Y, ZENG Z, et al. Nutrient stress - dysregulated antisense lncRNA GLS-AS impairs GLS-mediated metabolism and represses pancreatic cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(7):1398-1412.
- [20] CHEN S, CHEN J Z, ZHANG J Q, et al. Silencing of long noncoding RNA LINC00958 prevents tumor initiation of pancreatic cancer by acting as a sponge of microRNA-330-5p to down-regulate PAX8 [J]. *Cancer Lett*, 2019, 446:49-61.
- [21] TUNG M C, WEN Y C, WANG S S, et al. Impact of Long Non-Coding RNA HOTAIR genetic variants on the susceptibility and clinicopathologic characteristics of patients with urothelial cell carcinoma [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(3):jcm8030282.
- [22] ZHENG X, LIU M, SONG Y, et al. Long Noncoding RNA-ATB impairs the function of tumor suppressor miR-126-mediated signals in endometrial cancer for tumor growth and metastasis [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2019, 34(1):47-55.

(2019-04-27 收稿, 2019-08-03 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 周凌