

长链非编码 RNA 00152 对胰腺癌细胞增殖的影响*

何美玲^{1**}, 杨喆¹, 戴研平¹, 雷珊¹, 高晓勤^{2***}

(1. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 遵义医药高等专科学校, 贵州 遵义 563006)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码 RNA Linc00152 对人胰腺癌细胞增殖能力的影响。**方法:** 胰腺癌细胞株 MIA PaCa-2 和 SW1990 分为阴性对照组 (NC 组) 和 Linc00152 干扰组 (Si-Linc00152 组), 分别转染阴性对照 (NC) 及 Si-Linc00152 序列; 细胞转染 48 h 后, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 检测转染效率, CCK-8 和平板克隆实验检测胰腺癌细胞的增殖能力, 流式细胞术检测各组胰腺癌细胞的细胞周期, Western blot 实验检测各组胰腺癌细胞 cyclinD1 和 CDK4 蛋白表达水平。**结果:** 利用 siRNA 构建干扰模型 48 h, Si-Linc00152 组的 Linc00152 表达水平较 NC 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); CCK-8 实验结果显示, Si-Linc00152 组细胞增殖较 NC 组显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 平板克隆结果显示, Si-Linc00152 组集落形成数目明显少于 NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 流式细胞术结果显示干扰 Linc00152 后, 细胞周期中的 G1 期百分比上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Western blot 实验结果显示干扰 Linc00152 后, cyclinD1 及 CDK4 蛋白表达水平均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论:** 下调 Linc00152 可抑制胰腺癌细胞株 MIA PaCa-2 和 SW1990 的增殖, 其机制可能与阻滞细胞周期、干扰 cyclinD1 及 CDK4 蛋白表达有关。

[关键词] 胰腺肿瘤; 长链非编码 RNA; 细胞增殖; 转染; 细胞周期蛋白

[中图分类号] R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)12-1419-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.12.010

Effect of Long Non-coding RNA Linc00152 on
Proliferation of Pancreatic Cancer

HE Meiling¹, YANG Zhe¹, DAI Yanping¹, LEI Shan¹, GAO Xiaolin²

(1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563006, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of long-chain non-coding RNA Linc00152 on the proliferation of human pancreatic cancer cells. **Methods:** Pancreatic cancer cell lines MIA paca-2 and SW1990 were transfected with negative control (NC) and si-linc00152 sequence respectively. Transfection efficiency was measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), the proliferation of pancreatic cancer cells was detected by CCK-8 and colony formation assay, the cell cycle of MIA PaCa-2 cells and SW1990 cells were detected by flow cytometry. Western blot assay was performed to detect the expression levels of CyclinD1 and CDK4 proteins in pancreatic cancer cells. **Results:** After knockdown of Linc00152, the expression of Linc00152 in Si-Linc00152 group was significantly lower than that in NC group ($P < 0.01$). CCK-8 showed that the cell proliferation of Si-Linc00152 group was significantly lower than that of NC group ($P < 0.01$). Colony formation assay showed that the number of colonies formed in the Si-Linc00152 group was significantly lower than that in the NC group ($P < 0.01$). Flow cytometry results showed that the percentage of G1

*[基金项目] 贵州省科学技术基金[黔科合人才团队(2014)4005]

** 贵州医科大学 2016 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: gxq550301@sina.com

网络出版时间: 2019-12-12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191212.2002.010.html>

phase in the cell cycle increased after interference with Linc00152 ($P < 0.01$). Western blot results showed that the protein expression levels of cyclinD1 and CDK4 were significantly decreased after interference with Linc00152 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Down-regulation of Linc00152 inhibits the proliferation of pancreatic cancer cell lines MIA PaCa-2 and SW1990, which may be related to the inhibition of cell cycle and interference of cyclinD1 and CDK4 protein expressions.

[**Key words**] pancreatic neoplasms; carcinoma; long noncoding RNA; cell proliferation; transfection; cyclin

胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 是人类消化道的恶性肿瘤之一,其病情进展迅速易发生早期转移和产生化学抗性,通常患者确诊时已为晚期^[1-2]。对 PC 治疗有手术切除、化学疗法和放射疗法等多种手段,但患者 5 年生存率仍低于 5%^[2-3]。因此,详细了解 PC 发病的分子机制,对寻找新的 PC 生物标志物和治疗策略的发展具有重要的意义。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的不编码蛋白质的 RNA,在多种细胞病理生理过程中起着至关重要的作用,如增殖、凋亡、去分化、周期阻滞、侵袭和迁移等^[4-5]。lncRNA 异常表达的现象在各种肿瘤中均有发现,提示 lncRNA 可能是潜在的致癌或抑癌的 RNA^[6-9]。Linc00152 是一种定位于 2 号染色体 (2p11.2) 的 lncRNA^[10],研究表明其在多种类型的癌症中参与肿瘤发生和转移^[11-14],本课题组前期研究发现 Linc00152 在胰腺癌组织和细胞系中均高表达,影响胰腺癌患者的生存预后,但 Linc00152 在胰腺癌中的相关功能及影响尚不清楚。本研究通过干扰胰腺癌细胞株 MIA PaCa-2 和 SW1990 中 Linc00152 的表达,研究 Linc00152 对胰腺癌细胞增殖能力的影响,为寻找胰腺癌潜在的治疗靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

胰腺癌细胞株 MIA PaCa-2 和 SW1990 购自美国 ATCC 细胞库,胎牛血清 (FBS)、转染用 OPTI-MEM 培养基购自美国 Gibco 公司,RT 试剂盒、PCR 相关 SYBRP、逆转录试剂盒购自鼎国生物有限公司,CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所,细胞周期试剂盒购自美国 Thermo 公司,兔抗人单克隆抗体细胞周期蛋白 D1 (cyclinD1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4) 以及鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体均购自武汉赛威尔生物技术有限公司,Lipo-

fectamine 2000 和相关转染试剂盒购自 Invitrogen 公司,Linc00152 的下调 siRNA 序列 TAGGCGAT-ACGATGCTTTA-3'、阴性对照 (NC) 序列 TA-ATCGCTACGATGCACTA-3' 及 RT-qPCR 相关的 Linc00152 和 GAPDH 上游、下游引物均由上海生工生物技术有限公司设计合成,Linc00152 上游引物 5'-AAAATCACGACTCAGCCCCC-3'、下游引物 5'-AATGGGAAACCGACCAGACC-3',GAPDH 上游引物 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'、下游引物 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 人胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 和 SW1990 分别培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,均放置于在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养;根据 Lipofectamine 2000 操作说明转染 NC 及 Si-Linc00152 序列,实验分为阴性对照组 (NC 组) 和 Linc00152 干扰组 (Si-Linc00152 组),细胞转染 48 h 后,进行后续实验。

1.2.2 实时荧光聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 验证 Linc00152 的干扰效率 收集各组转染 48 h 后的细胞,在 TRIzol 试剂,离心、萃取,加异丙醇沉淀,75% 乙醇洗涤,DEPC 水溶解,测 RNA 纯度和浓度。取总 RNA 1 000 ng 配制 RT 反应液,Takara 逆转录试剂盒进行逆转录反应。按说明书配好 PCR 反应液后,瞬时离心,上实时荧光定量 PCR 仪扩增 Linc00152 以及内参基因 GAPDH,通过 2^{-ΔΔCT} 法计算 Linc00152 的相对表达量。

1.2.3 CCK-8 实验检测细胞增殖 转染 48 h 后,胰酶消化各组细胞株,终止消化并重悬细胞,以每孔 1 × 10³ 个细胞,接种到 96 孔培养板中;于 6、24、48、72 和 96 h 时,将 CCK-8 的溶液加入每个孔中,在 37 °C 下孵育 2 h;取出 96 孔培养板上酶标仪,在 450 nm 处检测 CCK-8 的吸光度,根据吸光度描绘曲线。

1.2.4 平板克隆细胞集落形成实验 转染 48 h 后,胰酶消化各组对数生长期的细胞株,用含 10%

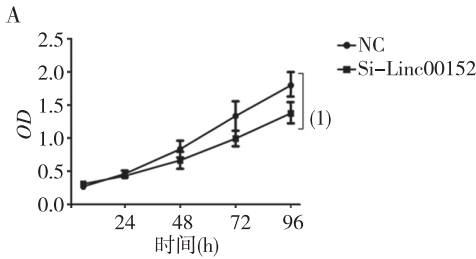
胎牛血清的完全培养基重悬,分别接种到 6 cm 培养皿中,调整密度为每皿 1 200 个。然后在 5% CO₂ 培养箱中于 37 ℃ 温育 8 d,弃去培养基,PBS 洗涤 2 次后,用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后,倒掉甲醛,加入结晶紫染液染色 30 min,倒掉结晶紫液,纯水清洗、拍照,并计数染色的集落形成数目。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期 分别将转染 48 h 后的各组细胞株接种于 6 孔板培养 72 h,胰酶消化,调整细胞密度 1×10^7 个/L,70% 乙醇-20 ℃ 固定过夜后,离心弃上清,加 PBS 洗净重悬,加入 RNA 酶、碘化丙啶在 37 ℃ 下避光放置 30 min,最后上流式细胞仪检测细胞周期。用 CellQuest 软件、ModFit 软件分析实验结果,统计学方法分析各组细胞周期的分布。

1.2.6 Western blot 检测细胞周期相关蛋白 cyclinD1 及 CDK4 表达 取出转染 48 h 后的各组 PC 细胞株,加 RIPA 蛋白裂解液,低温离心,提取总蛋白,加入 BCA 显色剂,制作标准曲线。蛋白变性 10 min,按配方配制 SDS-PAGE 胶,电泳,转 PVDF 膜,室温封闭 2 h,加一抗 4 ℃ 孵育过夜;次日加二抗于摇床上室温孵育 2 h。上曝光机,加 ECL 化学发光混合液,曝光显影,Image J 软件用于分析蛋白质条带的灰度值,统计图分析蛋白表达量。

1.3 统计学处理

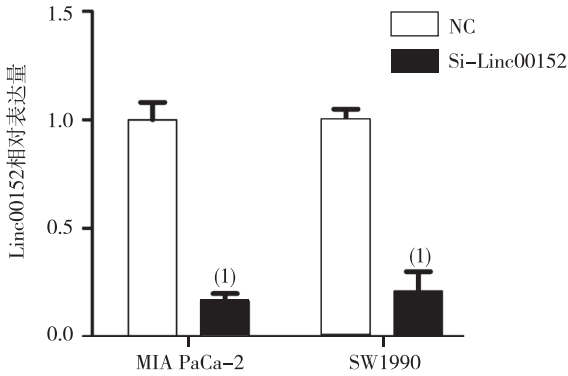
数据用 SPSS 17.0 统计软件处理,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。



2 结果

2.1 转染效率及干扰效率

利用 siRNA 构建干扰模型 48 h,与 NC 组比较, Si-Linc00152 组的 Linc00152 表达水平明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 1。

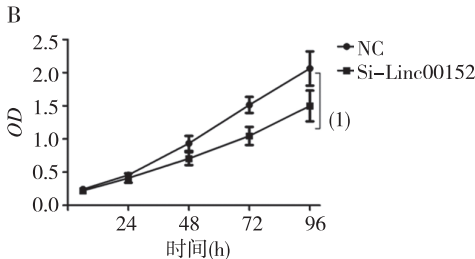


注: ⁽¹⁾ 与 NC 组比较, $P < 0.01$ 。

图 1 转染后胰腺癌细胞 Linc00152 相对表达量
Fig.1 The relative expression of Linc00152 after transfection

2.2 干扰 Linc00152 后胰腺癌细胞增殖能力受到抑制

通过转染 Si-Linc00152 干扰 Linc00152 的表达,结果显示,在 72 和 96 h 两个时间节点, Si-Linc00152 组较 NC 组的增殖能力显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 2。



注: A 为 MIA PaCa-2, B 为 SW1990; ⁽¹⁾ 与 NC 组比较, $P < 0.01$ 。

图 2 干扰 Linc00152 表达对胰腺癌细胞增殖能力的影响 (CCK8 法)

Fig.2 Effect of knockdown Linc00152 on the cell proliferation of pancreatic cancer cells by CCK8 assay

2.3 干扰 Linc00152 后胰腺癌细胞克隆形成能力受到抑制

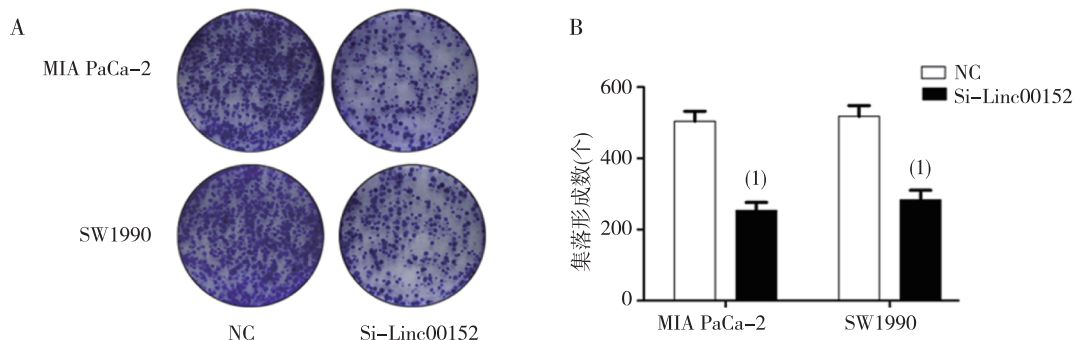
收集经转染 48 h 后的各组胰腺癌细胞,细胞在培养皿中培养 8 d 后,NC 组 MIA PaCa-2 集落形成的数量为 (548.3 ± 11.6) 个、Si-Linc00152 组为

(245.0 ± 9.8) 个,NC 组 SW1990 集落形成的数量为 (562.3 ± 14.1) 个、Si-Linc00152 组为 (306.0 ± 8.4) 个, Si-Linc00152 组均较 NC 组的细胞集落形成数目明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 3。

2.4 干扰 Linc00152 可以阻滞胰腺癌细胞周期于 G0/G1 期

与 NC 组比较, Si-Linc00152 组在细胞周期中

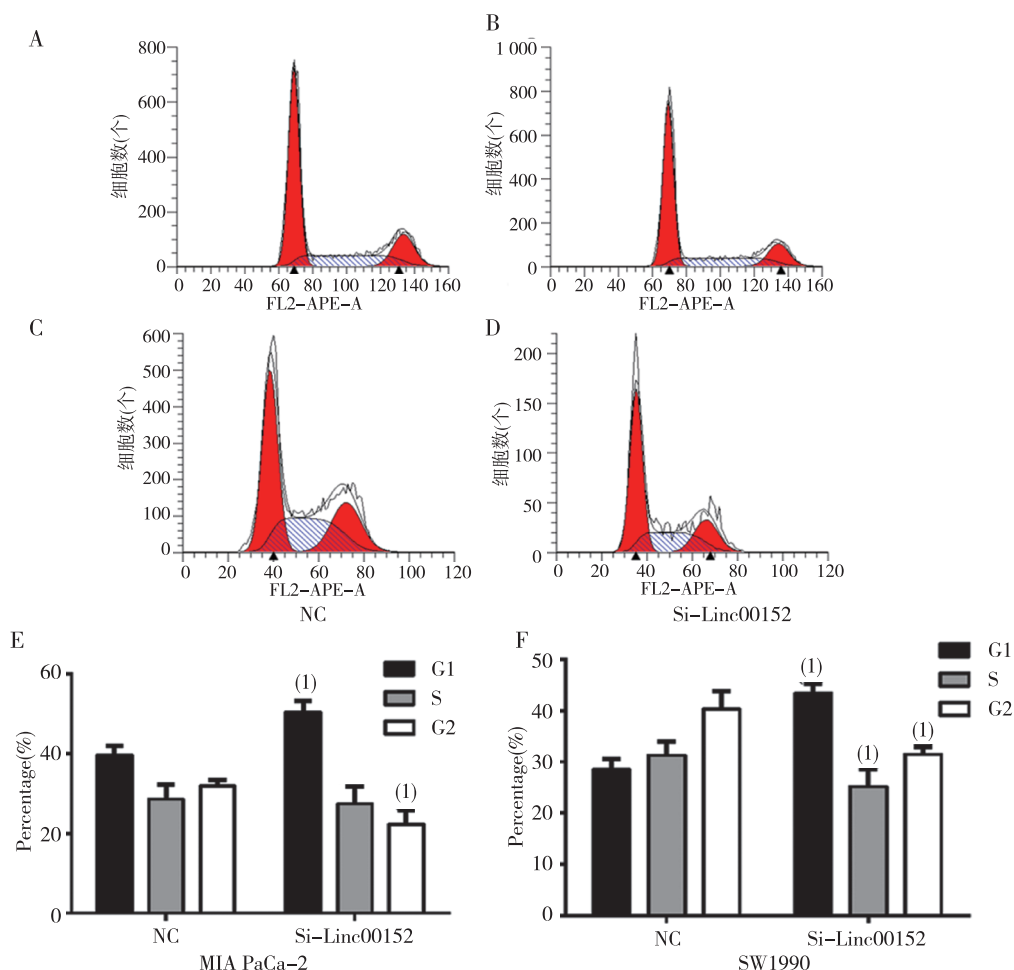
的 G1 期细胞所占百分比上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 4。提示干扰 Linc00152 可诱导胰腺癌细胞在 G0/G1 期细胞周期阻滞。



注: A 为平板克隆实验, B 为细胞集落形成数; ⁽¹⁾ 与 NC 组比较, $P < 0.01$ 。

图 3 干扰 Linc00152 表达对胰腺癌细胞增殖的影响(克隆形成实验)

Fig. 3 Effect of knockdown Linc00152 on the cell proliferation of pancreatic cancer cells by colony formation assay



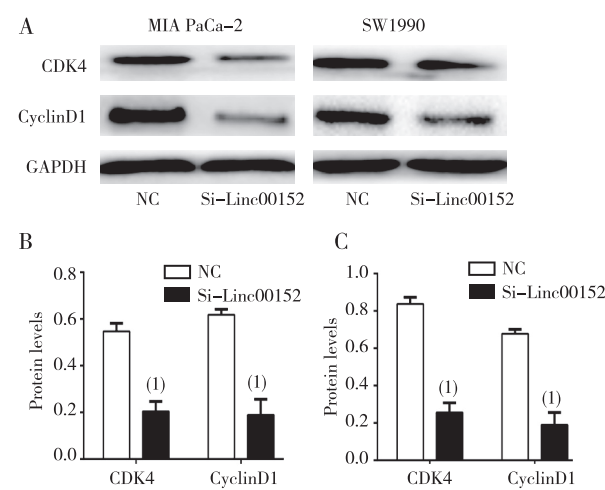
注: A ~ D 为流式细胞图, E、F 为直条图, A、B、E 为 MIA PaCa-2, C、D、F 为 SW1990, A、C 为 NC 组, B、D 为 Si-Linc00152 组; ⁽¹⁾ 与 NC 组比较, $P < 0.01$ 。

图 4 干扰 Linc00152 表达后对细胞周期的影响(流式细胞术)

Fig. 4 Effect of knockdown Linc00152 on cell cycle of pancreatic cancer cells by FCM

2.5 干扰 Linc00152 表达后 cyclinD1 和 CDK4 蛋白表达

Western blot 检测转染 48 h 时 MIA PaCa-2 和 SW1990 细胞蛋白表达水平变化,实验显示,与 NC 组比较,Si-Linc00152 组的细胞周期相关蛋白 cyclinD1 及 CDK4 的表达均减少,差异有统计学意义 ($P<0.01$),见图 5。提示干扰 Linc00152 抑制了胰腺癌细胞株的增殖能力,诱导细胞在细胞周期 G0/G1 期停滞,可能与细胞周期相关蛋白 cyclinD1 及 CDK4 的表达减少有关。



注:A 为 Western blot 结果,B、C 分别为 MIA PaCa-2、SW1990 条图;⁽¹⁾与 NC 组比较, $P<0.01$ 。

图 5 干扰 Linc00152 表达后对胰腺癌细胞中 CyclinD1 及 CDK4 蛋白表达的影响

Fig.5 The expression of CyclinD1and CDK4 proteins after knocking down Linc00152

3 讨论

LncRNA 已成为基因表达的关键调节因子,并在各种癌症的发生和进展中发挥关键作用^[15]。Linc00152(长基因间非编码 RNA 152),是一类与癌症相关的 828 bp 的 lncRNA,定位于 2 号染色体短臂(2p11.2)^[16]。有研究表明,Linc00152 的高表达与肿瘤进展、淋巴结侵袭和 TNM 分期进展呈正相关^[17],并且在体外和体内促进肿瘤进展^[18]。尽管 Linc00152 逐步被证实为多种人类恶性肿瘤形成的重要的基因表达调控器,但是其与胰腺癌的关系却尚不清楚。在本实验室前期研究中,发现在 Linc00152 胰腺癌细胞株和组织中均高表达,且与生存预后密切相关。本研究,CCK8 实验结果显

示干扰 Linc00152 表达后胰腺癌细胞的增殖能力明显降低;平板克隆实验结果表明,沉默 Linc00152 后胰腺癌细胞克隆数目显著降低;结果表明干扰 Linc00152 的表达可抑制 MIA PaCa-2 和 S1990 细胞的增殖能力。细胞周期主要由细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)驱动,CDK 通过在不同细胞周期阶段与细胞周期蛋白(cyclin)结合形成特异性复合物而被激活,并促进细胞通过 G1/S 期调控点进入 S 期进行 DNA 复制,因此促进细胞增殖,异常调节的 CDK 会诱导细胞不定期增殖^[19]。流式细胞术实验表明,沉默 Linc00152 的表达后 G1 期 MIA PaCa-2 和 S1990 细胞增多,发生细胞周期阻滞;沉默 Linc00152 后 cyclinD1 和 CDK4 的表达下调,而 cyclinD1 和 CDK4 是细胞周期 G1 向 S 期转换的调节剂,因此干扰 Linc00152 能延长 G1 期的持续时间,阻碍 G0/G1 到 S 期的转变,导致细胞在细胞周期 G0/G1 期停滞,抑制了细胞的增殖。

综上所述,本研究证实干扰 Linc00152 在体外能抑制胰腺癌细胞株的增殖,显示了 Linc00152 在胰腺癌发生发展过程中的调控作用,为胰腺癌的分子靶向治疗提供了思路和依据。目前对 Linc00152 的机制研究仍然不完整,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。

4 参考文献

- [1] SIGGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistic [J]. CA Cancer J Clin, 2017,67(1):7-30.
- [2] WU A A, JAFFEE E, LEE V. Current status of immunotherapies for treating pancreatic cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2019,21(7):60.
- [3] KIM S H, LEE S O. Developing consilience medicine: positron emission tomography scan and transcriptomics in pancreatic cancer [J]. Gut and Liver, 2019,13(3):225-226.
- [4] DENG S J, CHEN H Y, ZENG Z. Nutrient stress-dysregulated antisense lncrna gls-as impairs gls-mediated metabolism and represses pancreatic cancer progression [J]. Cancer Resl, 2019,79(7):1398-1412.
- [5] LIAN Y, XIAO C, YAN C, et al. Knockdown of pseudogene derived from lncRNA DUXAP10 inhibits cell proliferation, migration, invasion, and promotes apoptosis in pancreatic cancer [J]. J Cell Biochem, 2018,119(4):3671-3682.
- [6] ZHOU M, DIAO Z, YUE X, et al. Construction and a-

- analysis of dysregulated lncRNA-associated ceRNA network identified novel lncRNA biomarkers for early diagnosis of human pancreatic cancer[J]. *Oncotarget*, 2016,7(35): 56383–56394.
- [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] DIANATPOUR A, GHAFOURI F S. Long non coding RNA expression intersecting cancer and spermatogenesis: a systematic review[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(10):2601–2610.
- [9] SONG S, YU W, LIN S, et al. LncRNA ADPGK-AS1 promotes pancreatic cancer progression through activating ZEB1-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Biol Ther*, 2018,19(7): 573–583.
- [10] YU Y, YANG J, LI Q. LINC00152: a pivotal oncogenic long non-coding RNA in human cancers[J]. *Cell Prolif*, 2017,50(4):e12349.
- [11] ZHANG P P, WANG Y Q, WENG W W, et al. Linc00152 promotes cancer cell proliferation and invasion and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma[J]. *J Cancer*, 2017,8(11):2042–2050.
- [12] SHEN X, ZHONG J, YU P, et al. YY1-regulated LINC00152 promotes triple negative breast cancer progression by affecting on stability of PTEN protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(2): 448–454.
- [13] CAI J, ZHANG J, WU P, et al. Blocking LINC00152 suppresses glioblastoma malignancy by impairing mesenchymal phenotype through the miR-612/AKT2/NF-kappaB pathway [J]. *J Neurooncol*, 2018, 140(2): 225–236.
- [14] MA P, WANG H, SUN J, et al. LINC00152 promotes cell cycle progression in hepatocellular carcinoma via miR-193a/b-3p/CCND1 axis[J]. *Cell Cycle*, 2018,17(8):974–984.
- [15] 刘娟娟,周春欢,夏英,等. LncRNA-GHET1 过表达胃癌细胞株的构建与验证[J]. *贵州医科大学学报*, 2018,43(12):1365–1369
- [16] WANG H, CHEN W, YANG P et al. Knockdown of linc00152 inhibits the progression of gastric cancer by regulating microRNA-193b-3p/ETS1 axis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2019,20(4):461–473.
- [17] CAI Q, WANG Z Q, WANG S H, 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*, 2016,8:4068–4081.
- [18] 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, 24:2064–2077.
- [19] GUBERN A, JOAQUIN M, MARQUES M, et al. The n-terminal phosphorylation of rb by p38 bypasses its inactivation by cdks and prevents proliferation in cancer cells [J]. *Mol Cell*, 2016,46(1):25–36.

(2019-10-10 收稿,2019-11-21 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 冉海勇