

. 实验研究 .

lncRNA LINC00689 靶向调控 miRNA-634 促进胶质瘤 U251 细胞增殖、侵袭和迁移

李 鑫 刘振杰 梁 良 胡耀文 武力伟 解 靖 董海青

【摘要】目的 探讨长链基因间非蛋白编码 RNA689(LINC00689)对胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移的影响。**方法** RT-PCR 实验检测正常胶质细胞 HEB、胶质瘤细胞系 A172、U251、U87、SHG-4 中 LINC00689 和 miRNA-634 的表达。将 si-NC、si-LINC00689、miRNA-634 mimics、miRNA-NC、si-LINC00689+anti-miRNA-NC、si-LINC00689+anti-miRNA-634 质粒转染至 U251 细胞中;CCK-8 实验检测细胞增殖、Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移。**结果** 与正常胶质细胞 HEB 比较,胶质瘤细胞系 A172、U251、U87 和 SHG-4 的 LINC00689 表达水平较高,而 miRNA-634 表达水平较低($P<0.05$)。与 si-NC 组比较,si-LINC00689 组 LINC00689 表达水平、细胞增殖活力、侵袭和迁移细胞数明显降低($P<0.05$)。与 miRNA-NC 组比较,miRNA-634 mimics 组 miRNA-634 表达水平明显增高($P<0.05$),细胞增殖活力、侵袭和迁移细胞数明显降低($P<0.05$)。与 si-LINC00689+anti-miRNA-NC 组比较,si-LINC00689+anti-miRNA-634 组细胞增殖活力、侵袭和迁移细胞数明显增高($P<0.05$)。**结论** LINC00689 可以促进胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移,其机制可能与靶向调控 miRNA-634 有关。

【关键词】 长链基因间非蛋白编码 RNA689;微小 RNA-634;胶质瘤

【文章编号】 1009-153X(2020)12-0851-03

【文献标志码】 A

【中国图书资料分类号】 R 739.41; Q 786

LncRNA LINC00689 targeting miRNA-634 promotes proliferation, invasion and migration of glioma U251 cells

LI Xin, LIU Zhen-jie, LIANG Liang, HU Yao-wen, WU Li-wei, JIE Jing, DONG Hai-qing. Department of Neurosurgery, Baoding First Central Hospital, Baoding 071000, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of long intergenic non-protein coding RNA 689 (LINC00689) on the proliferation, invasion and migration of glioma U251 cells. **Methods** RT-PCR was used to detect the expression of LINC00689 and miRNA-634 in normal glioma HEB cells, and glioma cell lines A172, U251, U87 and SHG-4. The si-NC, si-LINC00689, miRNA-634 mimics, miRNA-NC, si-LINC00689 + anti-miRNA-NC, si-LINC00689 + anti-miRNA-634 plasmids were transfected into U251 cells, respectively. CCK-8 test was used to detect the cell proliferation. Transwell test was used to detect the cell invasion and migration. **Results** Compared with HEB normal glial cells, the expression levels of LINC00689 in glioma cell lines A172, U251, U87 and SHG-4 were significantly increased ($P<0.05$), while the expression levels of miRNA-634 were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the expression level of LINC00689, and the abilities of cell proliferation activity, invasion and migration were significantly decreased in si-LINC00689 group ($P<0.05$). Compared with the miRNA-NC group, the expression level of miRNA-634 significantly increased and the abilities of cell proliferation activity, invasion and migration were significantly decreased in the miRNA-634 mimics group ($P<0.05$). Compared with the si-LINC00689 + anti-miRNA-NC group, the abilities of cell proliferation activity, invasion and migration were significantly increased in si-LINC00689 + anti-miRNA-634 group ($P<0.05$). **Conclusion** LINC00689 can promote the proliferation, invasion and migration of glioma U251 cells, which may be related to the targeted regulation of miRNA-634.

【Key words】 Glioma; Long intergenic non-protein coding RNA 689; MicroRNA-634; LINC00689; miRNA-634

胶质瘤是颅内常见肿瘤,尽管胶质瘤的诊断和治疗技术在过去几十年里有了很大发展,但是临床预后仍不理想,中位生存期仅约 14 个月^[1]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA,在染色质修饰、转录

调节和转录后调节等方面发挥作用,与肿瘤的发生、发展密切相关^[2]。lncRNA 与微小 RNA(micro RNA, miRNA)的相互作用在癌症发生、发展过程中具有重要作用。miRNA-634 在胶质瘤组织中呈低表达,与胶质瘤细胞的增殖、侵袭、迁移和化疗敏感性密切相关^[3]。长链基因间非蛋白编码 RNA689(long intergenic non-protein coding RNA 689, LINC00689)是新发现的一种 lncRNA。本文探讨 LINC00689 对胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和转染 将正常胶质细胞 HEB、胶质瘤细胞系 A172、U251、U87 和 SHG-4(中科院上海细胞库)接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基(北京百奥莱博科技有限公司)中培养。当细胞融合度达 80%~90%时进行传代,取对数生长期细胞进行后续实验。将阴性对照质粒(si-NC 组)、LINC00689 沉默质粒(si-LINC00689 组)、miRNA-634 模拟物(miRNA-634 模拟物组)、miRNA-634 阴性对照质粒(miRNA-NC 组)、LINC00689 沉默质粒和 miRNA 对照质粒(si-LINC00689 + anti-miRNA-NC 组)、LINC00689 沉默质粒和抗 miRNA-634 质粒(si-LINC00689+anti-miRNA-634 组)按照 Lipofecta mi-neTM 2000(美国 Sigma 公司)说明书转染至 U251 细胞中,转染 48 h 后进行 PCR 检测。所有质粒购自上海吉凯基因科技有限公司。

1.2 RT-PCR 检测 RNA 水平 用 TRIzol 法提取总 RNA,通过反转录获得 cDNA,反应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 15s。引物序列:LINC00689 上游 5'-AAGAAGGTG AACGCTGGAGA-3', 下游 5'-CTGGGAAGTGTAACGGCAAT-3';miRNA-634 上游 5'-TGCGGTCCAGCATCAGTGAT-3', 下游 5'-CCAGTG-CAGGGTCCGAGGT-3';内参 GAPDH 上游 5'-AGC-CACATCGCTCAGACAC-3', 下游 5'-GCCCAATAC-GACCAAATC C-3'。以 cDNA 为模板进行 PCR(美国 Sigma 公司),反应体系为 10 μl SYBR、1 μl cDNA、1 μl 引物和 8 μl 7 μl H₂O;反应条件为 95 °C 10 min、95 °C 30s、60 °C 15s、72 °C 20 s(40 个循环),72 °C 10 min。用 2^{-ΔΔCt}法计算相对表达量。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖活力 用 CCK-8 试剂盒(美国 Sigma 公司)检测细胞增殖活力。取对数生长期 U251 细胞,以 1×10⁴个/孔密度接种于 96 孔板。待细胞贴壁后,培养 24、48、72 h 时加入 10 μl CCK-8 溶液。用酶标仪检测 450 nm 光密度值(optical density, OD),反映细胞增殖能力。实验重复 4 次。

1.4 Transwell 实验检测细胞侵袭与迁移能力 取对数生长期 U251 细胞,在 Transwell 迁移板(美国 Sigma 公司)下室每孔中加入 600 μl 培养基。转染后以 5×10⁴个细胞/孔的密度将细胞铺于 Transwell 迁移板上室中,温室培养 24 h。弃去上室培养基,用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,随后用 4%多聚甲醛固定 30 min,结晶紫染色 15 min。用棉签拭去上室上层粘附的细胞,进行拍照和计数。对于侵袭试验,首先在 Transwell

迁移板上室铺基质胶,每孔接种 1×10⁵个细胞,侵袭 48 h 后进行分析,步骤同迁移实验^[4]。实验重复 4 次。

1.5 双荧光素酶实验检测报告基因 严格按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国 Sigma 公司)进行操作。psiCHECK2 载体以萤火虫荧光素酶活性为内参,psiCHECK2-LINC00689-3' UTR WT 和 psiCHECK2-LINC00689-3' UTR MUT 的表达为对照。转染 24 h 后,检测荧光强度。以海参荧光素酶的发光强度和萤火虫荧光素酶发光强度的比值反映 LINC00689 和 miRNA-634 的结合力。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件分析;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 *t* 检验、单因素方差分析和重复测量资料方差分析;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LINC00689 和 miRNA-634 在胶质瘤细胞中的表达 与正常胶质细胞 HEB 比较,胶质瘤细胞 A172、U251、U87 和 SHG-4 的 LINC00689 表达水平明显增高(*P*<0.05),而 miRNA-634 表达水平明显降低(*P*<0.05)。见图 1。

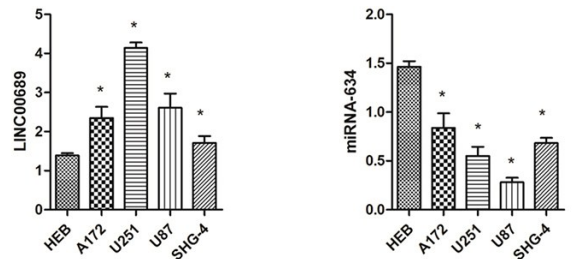


图 1 胶质瘤细胞 LINC00689 和 miRNA-634 的表达变化与 HEB 细胞比较,**P*<0.05;HEB. 正常胶质细胞;A172、U251、U87、SHG-4. 胶质瘤细胞系

2.2 抑制 LINC00689 对 U251 细胞增殖、侵袭和迁移的影响 与 si-NC 组比较,si-LINC00689 组 LINC00689 表达水平、细胞增殖活力、侵袭和迁移细胞数均明显降低(*P*<0.05;图 2)。

2.3 过表达 miRNA-634 对 U251 细胞增殖、侵袭和迁移的影响 与 miRNA-NC 组比较,miRNA-634 模拟物组 miRNA-634 表达水平明显增高(*P*<0.05),细胞增殖活力、侵袭和迁移细胞数均明显降低(*P*<0.05)。见图 3。

2.4 LINC00689 靶向调控 miRNA-634 Starbase 软件预测显示 miRNA-634 可能是 LINC00689 的靶基因(图 4)。双荧光素酶活性实验检测结果显示,与 miRNA-NC 组相比,miRNA-634 组 WT-LINC00689 细胞荧光素酶活性明显降低(*P*<0.05),而 miRNA-634

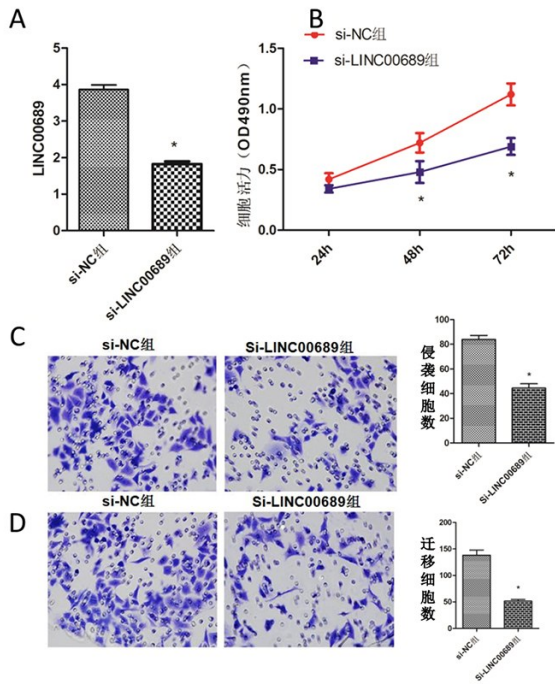


图2 抑制LINC00689对U251细胞增殖、侵袭、迁移的影响

A. RT-PCR检测转染质粒后U251细胞LINC00689的表达; B. CCK-8法检测细胞增殖活力; C. Transwell法检测细胞侵袭($\times 400$); D. Transwell法检测细胞迁移($\times 400$);与si-NC组比较, $* P < 0.05$

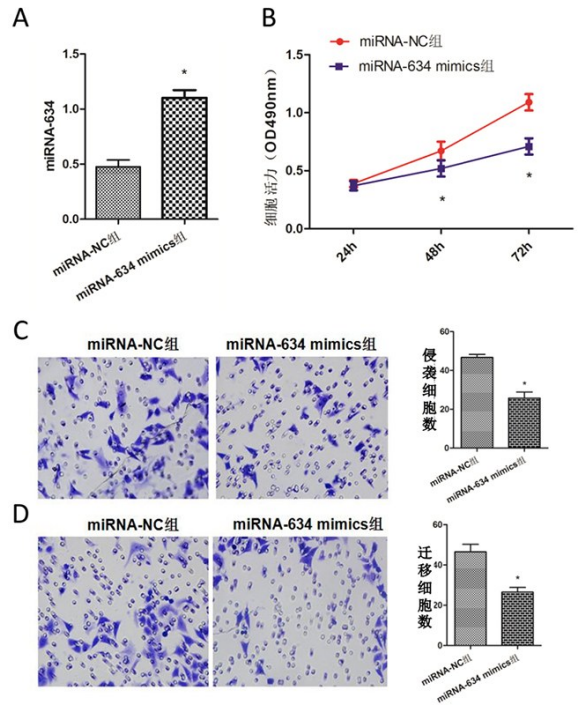


图3 过表达miRNA-634对U251细胞增殖、侵袭、迁移的影响

A. RT-PCR检测转染质粒后U251细胞miRNA-634的表达; B. CCK-8法检测细胞增殖活力; C. Transwell法检测细胞侵袭($\times 400$); D. Transwell法检测细胞迁移($\times 400$);与miRNA-NC组比较, $* P < 0.05$

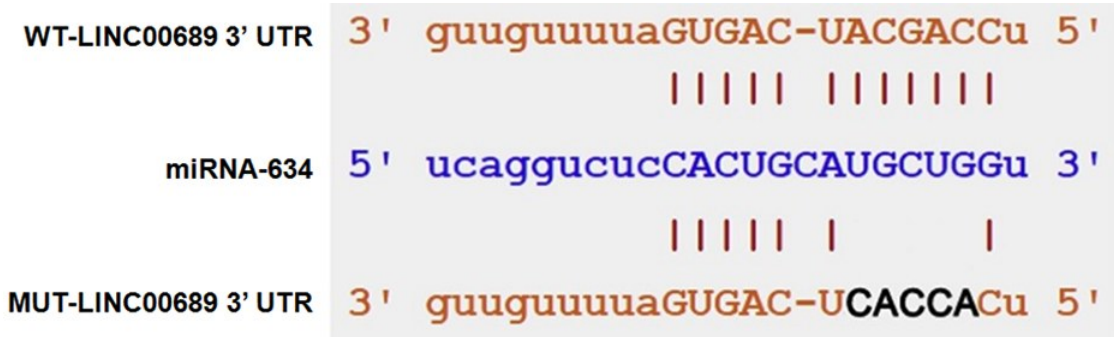


图4 Starbase软件预测LINC0068的3' UTR中含有与miRNA-634互补的核苷酸序列

组和miRNA-NC组细胞荧光素活性无统计学差异($P > 0.05$)。与pcDNA组比较,pcDNA-LINC00689组miRNA-634水平明显降低($P < 0.05$)。与si-NC组比较,si-LINC00689组miRNA-634水平明显升高($P < 0.05$)。以上结果表明,miRNA-634是LINC00689的靶基因。

2.5 抑制miRNA-634和抑制LINC0068对U251细胞增殖、侵袭和迁移的影响 与si-LINC00689+anti-miRNA-NC组比较,si-LINC00689+anti-miRNA-634组细胞增殖活力、侵袭和迁移细胞数均明显增高($P <$

0.05 ;图5)。

3 讨论

胶质瘤的预后较差,术后易复发,寻找潜在的胶质瘤生物学标志物具有重要意义^[1]。lncRNA在胶质瘤的发生、发展中起到重要作用^[5]。本研究发现与正常胶质细胞HEB比较,胶质瘤细胞A172、U251、U87和SHG-4的LINC00689表达水平明显增高。

LINC00689在肿瘤中的作用机制比较复杂,尚未阐明。Liu等^[6]发现,LINC00689在U251、U87细胞

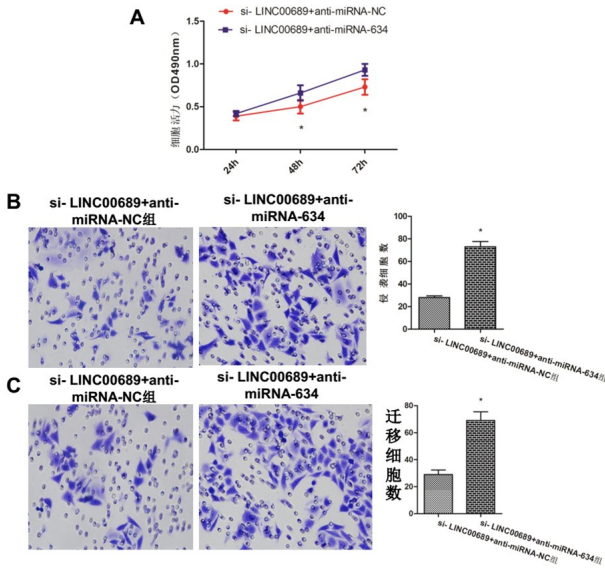


图 5 抑制 miRNA-634 和抑制 LINC00689 对 U251 细胞增殖、侵袭和迁移的影响

A. CCK-8 法检测细胞增殖活力; B. Transwell 法检测细胞侵袭($\times 400$); C. Transwell 法检测细胞迁移($\times 400$); 与 si-LINC00689+anti-miRNA-NC 组比较, * $P < 0.05$

中呈高表达, 并且 LINC00689 可通过调控 miRNA-338-3p/PKM2 轴促进胶质瘤细胞侵袭。Du 等^[7]发现 LINC00689 可以通过 miR-31-5-p/YAP/ β -catenin 轴促进结肠癌细胞的增殖和迁移, 并且与化疗耐药密切相关。本研究结果显示, 抑制 LINC00689 可以抑制 U251 细胞的增殖、侵袭和迁移。以上说明 LINC00689 在胶质瘤中可能起到促癌基因作用。

本研究发现 miRNA-634 在胶质瘤细胞系中呈低表达, 与既往报道一致^[8,9]。本研究发现, 过表达 miRNA-634 能够抑制 U251 细胞增殖、侵袭和迁移, 可能是通过调控 STAT3 基因^[10]、PI3K/Akt 信号通路^[11]等。

lncRNA 可作为一种竞争性内源性 RNA 与 miRNA 相互作用, 参与靶基因的表达调控; 反之, miRNA 可通过 RNA 诱导沉默复合物调控 lncRNA 发挥生物学功能。我们首先用 Starbase 软件预测到 miRNA-634 可能是 LINC00689 的靶基因, 随后用双荧光素酶活性检测实验进行证实; 与 si-LINC00689+anti-miRNA-NC 组比较, si-LINC00689+anti-miRNA-634 组细胞增殖活力、侵袭和迁移细胞数明显增高。这说明 LINC00689 靶向负调控 miRNA-634 可以逆转抑制 LINC00689 对胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移。

综上所述, LINC00689 可以促进胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移, 其机制可能与靶向调控 miRNA-634 有关。

【参考文献】

- [1] Ho VK, Reijneveld JC, Enting RH, *et al.* Changing incidence and improved survival of gliomas [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(13): 2309-2318.
- [2] Jiang MC, Ni JJ, Cui WY, *et al.* Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(7): 1354-1366.
- [3] Tan Z, Zhao J, Jiang Y. MiR-634 sensitizes glioma cells to temozolomide by targeting CYR61 through Raf- ERK signaling pathway [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(3): 913-921.
- [4] 王垒垒, 赵 恺, 朱 蒙, 等. 敲低皮层肌动蛋白的表达下降胶质瘤细胞迁移和侵袭能力[J]. *中华神经医学杂志*, 2014, 13(4): 325-329.
- [5] 王秀华, 陈 庚, 黄 琪, 等. LncRNA 在胶质瘤中的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2019, 23(9): 1647-1649.
- [6] Liu X, Zhu Q, Guo Y, *et al.* LncRNA LINC00689 promotes the growth, metastasis and glycolysis of glioma cells by targeting miR-338-3p/PKM2 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 1-9.
- [7] Du YL, Liang Y, Shi GQ, *et al.* LINC00689 participates in proliferation, chemoresistance and metastasis via miR-31-5p/YAP/ β -catenin axis in colorectal cancer [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 395(1): 112176.
- [8] 刘 露, 杨福兵, 朱明建, 等. LncRNA CASC2 靶向 miR-634 表达抑制神经胶质瘤细胞的生物学行为 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(16): 1976-1980.
- [9] López-Ochoa S, Ramírez-García M, Castro-Sierra E. Analysis of chromosome 17 miRNAs and their importance in medulloblastomas [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 5: 1-8.
- [10] Yang B, Kuai F, Chen Z, *et al.* miR-634 Decreases the radioresistance of human breast cancer cells by targeting STAT3 [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, 35(3): 241-248.
- [11] Chang Y, Huang W, Sun Q, *et al.* MicroRNA-634 alters nerve apoptosis via the PI3K/Akt pathway in cerebral infarction [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 2145-2154.

(2020-05-26 收稿, 2020-10-08 修回)