

. 实验研究 .

长链非编码 RNA PVT1 对人脑胶质瘤 U251 细胞增殖能力的影响

谈胤求 陈谦学 张红波 吴 鹏 李云涛 王栋良 袁凡恩

【摘要】目的 探讨长链非编码 RNA PVT1(lncRNA-PVT1)对人脑胶质瘤 U251 细胞增殖能力的影响。**方法** 体外培养胶质瘤细胞系 U251 细胞,分别转染 PVT1 siRNA(PVT1 组)和 negative control siRNA(对照组)。PCR 法检测 lncRNA-PVT1 及 C-MYC mRNA 表达水平,CCK-8 法检测细胞增殖能力,Western blot 检测 C-MYC 蛋白表达水平。**结果** PVT1 组 lncRNA-PVT1 mRNA 表达水平(0.27 ± 0.08)较对照组(1.0 ± 0.30)明显降低($P<0.05$);PVT1 组 C-MYC mRNA 表达水平(0.87 ± 0.19)与对照组(1.0 ± 0.15)无明显差异($P>0.05$)。转染 siRNA 后 1、2、3 d,PVT1 组 U251 细胞活力较对照组均明显降低($P<0.05$)。PVT1 组 C-MYC 蛋白表达水平(0.29 ± 0.12)较对照组(0.85 ± 0.27)明显降低($P<0.05$)。**结论** 降低 lncRNA-PVT1 表达水平能够抑制 U251 细胞增殖,其机制可能与 lncRNA-PVT1 够影响 C-MYC 蛋白的表达水平有关。

【关键词】 胶质瘤;U251 细胞;细胞增殖;长链非编码 RNA;PVT1 基因;小干扰 RNA 技术

【文章编号】 1009-153X(2016)10-0608-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.41; Q 786

Effect of lncRNA-PVT1 on proliferation of glioma U251 cells

TAN Yin-qiu, CHEN Qian-xue, ZHANG Hong-bo, WU Peng, LI Yun-tao, WANG Dong-liang, YUAN Fan-en, Department of Neurosurgery, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To explore the effect of long non-coding RNA PVT1 (lncRNA-PVT1) on the proliferation of glioma U251 cells. **Methods** The cultured glioma U251 cells were divided into 2 groups, i.e. experimental group in which PVT1 small interfere RNA (SiRNA) were tansfected into U251 cells and control group, in which negative control SiRNA was transfected into U251 cells. The expressions of lncRNA-PVT1 and C-MYC mRNA were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) in both the groups, in which the expressions of C-MYC protein were detected by Western blot. The proliferation of the U251 cells was determined by Cell Counting Kit-8 (CCK8) assay in two groups. **Results** The expression of lncRNA-PVT1 mRNA (0.27 ± 0.08) was significantly lower in the experimental group than that (1.0 ± 0.30) in the control group ($P<0.05$), but there is no significant difference in the expression of C-MYC mRNA between the two groups ($P>0.05$). The expression of C-MYC protein was significantly higher in control group than that in the experimental group ($P<0.05$). The cells viability was significantly lower in the experimental group than that in the control group 1, 2 and 3 days after the transfection ($P<0.05$). **Conclusions** Down-regulating the expression of lncRNA-PVT1 can decrease the expression of C-MYC protein in U251 cells and inhibit the proliferation of U251 cells.

【Key words】 U251 cells; Glioma; lncRNA-PVT1; Expression; Proliferation

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类转录副本长度超过 200 个核苷酸,且不编码蛋白质的 RNA^[1]。在很多肿瘤发病过程中,lncRNA 都扮演着重要角色^[2]。lncRNA-PVT1 在胃癌、肝癌、肺癌、前列腺癌中异常升高^[3-6]。本研究利用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术降低胶质瘤 U251 细胞 lncRNA-PVT1 表达水平,观察 lncRNA-PVT1 对 U251 细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 C-MYC、GAPDH 及羊抗小鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司。PCR 引物由武汉巴菲尔生物技术公司合成,引物序列见表 1。DMEM 培养基及胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物材料公司。Trizol Reagent 及 RevertAid First strand cDNA Synthesis kit 购自美国 Thermo Fisher 公司。Hiperfect Transfection Reagent 购自德国 Qiagen 公司。SYBR®Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus) 购自日本 Takara 公司。lncRNA-PVT1 siRNA 及 NC siRNA 购自广州锐博生物科技有限公司。CCK-8 试剂盒购自合肥 biosharp 生物科技公司。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.10.013

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科(谈胤求、陈谦学、张红波、吴 鹏、李云涛、王栋良、袁凡恩)

通讯作者:陈谦学,E-mail:chenqx666@sohu.com

表 1 引物序列表

基因名称	序列(5'→3')
GAPDH	上游引物:AGATCCACAACGGATACATT
	下游引物:TCCCTCAAGATTGTCAGCAA
lncRNA-PVT1	上游引物:CTTTCAGCACTCTGGACGGACTT
	下游引物:AAACAGGGCAGGATCTATGGCA
C-MYC	上游引物:TGGACTTCGGTGCTTACCTG
	下游引物:GGAGGCTATTCTGCCCATT

1.2 细胞培养 U251 细胞(引自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所)培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中。每 3 d 以含 EDTA 的 0.25%胰酶消化,1:3 传代。

1.3 细胞转染 转染前 1 d,将对数生长期 U251 细胞种植于 6 孔板中,每孔 5×10^5 个。次日细胞融合率达 60%时进行转染。根据转染 siRNA 分为对照组和 PVT1 组。对照组转染 negative control siRNA, PVT1 组转染 PVT1 siRNA。转染步骤按照 Hiperfect Transfection Reagent 的说明书进行。所有寡聚核苷酸的终质量浓度均为 50 nmol/L。

1.4 PCR 检测 lncRNA-PVT1 和 C-MYC mRNA 6 孔板每孔细胞加入 1 ml Trizol,然后加入 200 μ l 氯仿,剧烈震荡,室温静置 5 min,12 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,吸取上清;加入等体积异丙醇,混匀后室温静置 10 min。12 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清,加 75%乙醇洗涤沉淀,7 500 g、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,重复一遍,吸干乙醇,加入适量无酶水溶解 RNA 沉淀。核酸分析仪测 260 nm 与 280 nm 光密度比值(1.8-2.0),计算 RNA 浓度。取 1 μ g RNA,根据 RevertAid First strand cDNA Synthesis kit 说明书反转录合成 cDNA。然后,加入 lncRNA-PVT1、C-MYC 及 GAPDH 引物,在 Prism7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司)上进行扩增。上述实验重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 lncRNA-PVT1 和 C-MYC 的相对表达量。

1.5 细胞增殖检测 将转染 siRNA 后 U251 细胞消化重悬,细胞计数,以每孔 3×10^3 个细胞种植于 96 孔板。第 0、1、2、3 d 加入 10%的 CCK-8,避光孵育 2 h 后全自动酶标仪检测其 450 nm 的吸光度值。上述实验重复 3 次。

1.6 Western blot 法检测 C-MYC 蛋白表达 转染后 48 h,用细胞裂解液 RIPA 常规提取蛋白,BCA 法测定蛋白含量。取 20 μ g 总蛋白用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,再转至 PVDF 膜。用含 5%脱脂牛奶封闭 1 h,加一抗孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜。1 \times TBST 洗膜 3 次,羊

抗小鼠二抗孵育 1 h,用 Odyssey 系统显影。上述实验重复 3 次。

1.7 统计学方法 应用 SPSS 20.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析及 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA-PVT1 对 U251 细胞 lncRNA-PVT1 和 C-MYC mRNA 表达的影响 PVT1 组 lncRNA-PVT1 mRNA 表达水平(0.27 ± 0.08)较对照组(1.0 ± 0.30)明显降低($P<0.05$),满足后续实验要求。PVT1 组 C-MYC mRNA 表达水平(0.87 ± 0.19)与对照组(1.0 ± 0.15)无明显差异($P>0.05$)。

2.2 lncRNA-PVT1 对 U251 细胞增殖能力的影响 转染 PVT1 siRNA 后 1、2、3 d, PVT1 组 U251 细胞活力较对照组均明显降低($P<0.05$),见图 1。

2.3 lncRNA-PVT1 对 U251 细胞 C-MYC 蛋白表达的影响 PTV1 组 C-MYC 蛋白表达水平(0.29 ± 0.12)较对照组(0.85 ± 0.27)明显降低($P<0.05$),见图 2。

3 讨论

lncRNA-PVT1 是非编码基因 PVT1 的转录产物, PVT1 基因位于人类基因的 8q24, 紧邻癌基因 MYC^[7]。但是, PVT1 基因不编码蛋白, 所以长久以来

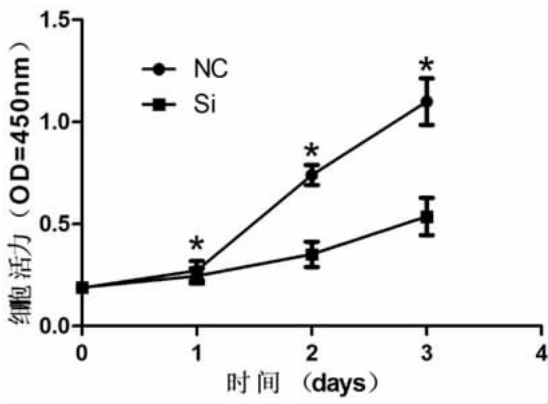


图 1 lncRNA-PVT1 对 U251 细胞细胞活力的影响
与 NC 组相应值比, * $P<0.05$; Si 组: PTV1 组; NC 组: 对照组

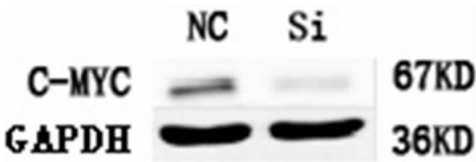


图 2 lncRNA-PVT1 对 U251 细胞 C-MYC 蛋白表达的影响
Si 组: PTV1 组; NC 组: 对照组

对其作用都缺乏研究。随着长链非编码 RNA 的研究不断发展,过去被称作“基因荒漠”的 PVT1 基因在肿瘤疾病中的作用逐渐被发现。在许多肿瘤中都存在着 PVT1 基因和 MYC 基因拷贝数共同增加的情况,因此 PVT1 与 MYC 的关系成为了研究重点。Tseng 等^[8]研究发现在小鼠乳腺癌中,单独改变 PVT1 或 MYC RNA 水平并不会引起另一方的改变,但是 PVT1 的降低会导致 MYC 蛋白的减少。C-MYC 作为研究最广泛的癌基因,在胶质瘤中同样存在拷贝数增加的情况^[9],Odia 等^[10]研究发现 C-MYC 在胶质瘤中表达升高。提示 C-MYC 在胶质瘤疾病中发挥着重要作用。

本研究通过小 RNA 干扰技术降低 U251 细胞 lncRNA-PVT1 的表达水平,而 lncRNA-PVT1 表达水平的降低并没有影响 C-MYC mRNA 的表达水平,但是却降低 C-MYC 蛋白的表达水平;而且降低 U251 细胞中 lncRNA-PVT1 的表达水平,抑制细胞增殖能力,并且随着时间的推移,抑制作用越来越明显。可见, lncRNA-PVT1 能够通过改变 C-MYC 蛋白的表达水平来影响细胞增殖。lncRNA-PVT1 并不影响 C-MYC mRNA 的表达水平,而是影响 C-MYC 蛋白的表达水平,因此可以推断 lncRNA-PVT1 的作用发生在 C-MYC 基因转录后,随着 lncRNA-PVT1 的降低, C-MYC mRNA 转录成 C-MYC 蛋白发生改变,使得 C-MYC 蛋白减少,进而影响了细胞周期,抑制细胞的增殖能力,随着作用时间的延长, C-MYC 蛋白减少的越多,对细胞增殖的抑制越明显。而这种影响是发生在翻译阶段还是之后的蛋白修饰阶段仍然未知。Yeh 等^[11]的研究发现 C-MYC 蛋白能通过磷酸化而降解。lncRNA-PVT1 是否影响 C-MYC 蛋白的磷酸化尚无研究, lncRNA-PVT1 是否通过稳定 C-MYC 蛋白的磷酸化来减少 C-MYC 蛋白的降解仍需进一步研究。

综上所述,在 U251 细胞中 lncRNA-PVT1 能够通过改变 C-MYC 蛋白的表达来影响胶质瘤 U251 细胞增殖,其对 C-MYC 蛋白表达的影响主要发生在转录后水平。

【参考文献】

- [1] Derrien T, Johnson R, Bussotti G, *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression [J]. *Genome Res*, 2012, 22(9): 1775–1789.
- [2] Niland CN, Merry CR, Khalil AM. Emerging roles for long non-coding RNAs in cancer and neurological disorders [J]. *Front Genet*, 2012, 3: 25.
- [3] Meyer KB, Maia AT, O'Reilly M, *et al.* A functional variant at a prostate cancer predisposition locus at 8q24 is associated with PVT1 expression [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(7): e1002165.
- [4] Yang YR, Zang SZ, Zhong CL, *et al.* Increased expression of the lncRNA PVT1 promotes tumorigenesis in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 6929–6935.
- [5] Wang F, Yuan JH, Wang SB, *et al.* Oncofetal long non-coding RNA PVT1 promotes proliferation and stem cell-like property of hepatocellular carcinoma cells by stabilizing NOP2 [J]. *Hepatology*, 2014, 60(4): 1278–1290.
- [6] Zhang XW, Bu P, Liu L, *et al.* Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 462(3): 227–232.
- [7] Colombo T, Farina L, Macino G, *et al.* PVT1: a rising star among oncogenic long noncoding RNAs [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 304208.
- [8] Tseng YY, Moriarity BS, Gong W, *et al.* PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase [J]. *Nature*, 2014, 512(7512): 82–86.
- [9] Faria MH, Goncalves BP, Do PR, *et al.* Expression of Ki-67, topoisomerase IIalpha and c-MYC in astrocytic tumors: correlation with the histopathological grade and proliferative status [J]. *Neuropathology*, 2006, 26(6): 519–527.
- [10] Odia Y, Orr BA, Bell WR, *et al.* cMYC expression in infiltrating gliomas: associations with IDH1 mutations, clinicopathologic features and outcome [J]. *J Neurooncol*, 2013, 115(2): 249–259.
- [11] Yeh E, Cunningham M, Arnold H, *et al.* A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(4): 308–318.