

. 实验研究 .

lncRNA ZNF674-AS1 过表达对胶质瘤 U87 细胞增殖、侵袭和迁移的影响

丁 萌 王红娟 周 洁 高 强

【摘要】目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)ZNF674-AS1 过表达对胶质细胞瘤增殖、侵袭、迁移的影响。方法 体外培养正常星形胶质细胞(HA1800)和胶质瘤细胞(A172、U251、U87、U373),RT-PCR 检测 lncRNA ZNF674-AS1 表达水平。将 ZNF674-AS1 mimics 转染 U87 细胞上调 ZNF674-AS1 表达,以转染阴性对照序列为对照,CCK8 法检测细胞增殖能力,Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移能力。Starbase 软件预测 lncRNA ZNF674-AS1 靶基因并应用双荧光素酶报告基因实验验证。结果 与正常星形胶质细胞(HA1800)比较,胶质瘤细胞(A172、U251、U87、U373)lncRNA ZNF674-AS1 的表达水平均明显降低( $P<0.05$ ),其中 U87 细胞表达水平最低。上调 U87 细胞 lncRNA ZNF674-AS1 表达,明显抑制 U87 细胞增殖、侵袭、迁移能力( $P<0.05$ )。Starbase 软件预测显示 lncRNA ZNF674-AS1 与性别决定区 Y 框蛋白 9(SOX9)基因有结合位点,双荧光素酶报告基因实验结果显示,SOX9 基因是 lncRNA ZNF674-AS1 靶基因。上调 U87 细胞 lncRNA ZNF674-AS1 表达的同时沉默 SOX9 基因表达,明显增强 U87 细胞增殖、侵袭和迁移能力( $P<0.05$ )。结论 胶质瘤 lncRNA ZNF674-AS1 呈低表达,可能通过靶向下调 SOX9 基因表达,促进胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移。

【关键词】胶质瘤;长链非编码 RNA;RNAZNF674-AS1;细胞增殖;细胞侵袭;细胞迁移

【文章编号】1009-153X(2022)10-0837-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

Effects of over-expression of lncRNA ZNF674-AS1 on proliferation, invasion and migration of U87 glioma cells

DING Meng, WANG Hong-juan, Zhou Jie, GAO Qiang. Department of Neurosurgery, Qingdao Central Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266042, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of over-expression of lncRNA ZNF674-AS1 on proliferation, invasion and migration of U87 glioma cells. Methods The expression levels of lncRNA ZNF674-AS1 were detected by RT-PCR in normal astrocytes (HA1800) and glioma cells (A172, U251, U87, U373). ZNF674-AS1 mimics were transfected into U87 cells to up-regulate expression of lncRNA ZNF674-AS1, with negative sequence as control. Cell proliferation was detected by CCK8 assay, and cell invasion and migration were detected by Transwell assay. lncRNA ZNF674-AS1 target genes were predicted by Starbase software and verified by dual luciferase reporter gene assay. Results Compared with normal astrocytes (HA1800), the expression levels of lncRNA ZNF674-AS1 in glioma cells (A172, U251, U87, and U373) were significantly decreased ( $P<0.05$ ), and the expression level of lncRNA ZNF674-AS1 in U87 cells was the lowest. Over-expression of lncRNA ZNF674-AS1 significantly inhibited the proliferation, invasion and migration of U87 cells ( $P<0.05$ ). Starbase software predicted that lncRNA ZNF674-AS1 had a binding site with the sex determining region Y-box protein 9 (SOX9) gene, and the double luciferase reporter gene experiment showed that SOX9 gene was the target gene of lncRNA ZNF674-AS1. Over-expression of lncRNA ZNF674-AS1 combined with silence expression of SOX9 significantly enhanced the proliferation, invasion and migration of U87 cells ( $P<0.05$ ). Conclusions The expression of lncRNA ZNF674-AS1 is down-regulated in glioma, which may promote the proliferation, invasion and migration of glioma cells by down-regulating expression of SOX9 gene.

【Key words】Glioma; long non-coding RNA; ZNF674-AS1; Cell proliferation; Cell invasion; Cell migration; SOX9

胶质瘤是颅内常见恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,常规采用显微手术切除肿瘤联合术后放疗等综合治疗,但是治疗效果仍不理想。目前,胶质瘤的病因、发病机制尚不

明确。近年来,长链非编码 RNA(long chain noncoding RNA,lncRNA)在胶质瘤发病机制中的作用逐渐受到重视<sup>[2,3]</sup>。lncRNA ZNF674-AS1 是近年来发现的 lncRNA,在非小细胞肺癌<sup>[4]</sup>、甲状腺癌<sup>[5]</sup>和宫颈癌<sup>[6]</sup>中作为抑癌基因发挥作用。有研究发现,lncRNA ZNF674-AS1 在脑胶质瘤组织中低表达,并且与病人预后有关<sup>[7]</sup>,但其作用机制尚不清楚。本研究分析 lncRNA ZNF674-AS1 对胶质瘤细胞增殖、侵

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.10.012  
作者单位:266042 山东青岛,青岛大学附属青岛市中心医院神经外科(丁 萌、王红娟、周 洁、高 强)  
通讯作者:高 强,E-mail:gaoqiang0139@sina.com

袭和迁移的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞与试剂** 正常星形胶质细胞(HA1800)和胶质瘤细胞(A172、U251、U87、U373)购于中科院上海细胞库;DMEM 培养基和胎牛血清购于浙江天杭生物科技股份有限公司;Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 试剂购于美国 Sigma 公司;ZNF674-AS1 mimics、ZNF674-AS1 inhibitor、SOX9 siRNA 均由上海 Gene Pharma 公司合成并提供;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;反转录试剂盒及 2×SYBR Green PCR Mastermix 试剂盒购于美国 Sigma 公司;CCK8 细胞检测试剂盒及 Transwell 小室购于上海语纯生物科技有限公司。

**1.2 细胞培养** 正常星形胶质细胞(HA1800)和胶质瘤细胞(A172、U251、U87、U373)置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,每两天换液一次,每三天传代一次。

**1.3 RT-PCR 检测 lncRNA ZNF674-AS1 表达水平** 收集 A172、U251、U87、U373、HA1800 细胞,加入 TRIzol 试剂提取总 RNA,通过反转录获取 cDNA,随后用荧光定量试剂盒进行检测,操作步骤按照试剂盒说明书进行,用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 lncRNA ZNF674-AS1 相对表达量。引物序列:lncRNA ZNF674-AS1 上游 5'-GGCGATCATACTGGGAGATG-3',下游 5'-TGTGATTCAAGTTGGGGTCA-3';内参 U6 上游 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3',下游 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。

**1.4 细胞转染和分组** 将胶质瘤 U87 细胞接种于 6 孔板,密度为  $5 \times 10^5$  个/孔。待细胞融合度达 80% 时,按照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 试剂说明书转染阴性对照序列和 ZNF674-AS1 mimics(浓度为 100 nmol/L),设置为 CON 组、ZNF674-AS1 过表达组。

**1.5 细胞增殖能力检测** 用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性。将转染不同质粒的胶质瘤 U87 细胞培养 24 h,每个培养孔添加 10  $\mu$ L CCK-8 试剂。用酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度值。

**1.6 细胞侵袭和迁移能力检测** 应用 Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移。迁移实验:在 Transwell 迁移板上室加入  $5 \times 10^4$  个细胞,下室中加入 600  $\mu$ L 完全培养基,培养 24 h 后,甲醇固定膜底细胞并进行 0.1% 结晶紫染色 20 min,光学显微镜观察并计数。侵袭实验:使用预先加入 Matrigel 胶的小室,上室中加入  $5 \times 10^4$  个细胞,培养 48 h,其余步骤同迁移实验。

**1.7 lncRNA ZNF674-AS1 对 SOX9 调控作用的验证** 检索 TargetScan 数据库发现 lncRNA ZNF674-AS1 与性别决定区 Y 框蛋白 9(sex-determining region Y boxprotein 9,SOX9)基因有互补结合位点。双荧光素酶报告实验确定二者的靶向关系。构建 SOX9 基因野生型 3'-UTR 荧光素酶报告基因质粒 plncRNA-Wt、突变型质粒 plncRNA-Mut。将 plncRNA-Wt、plncRNA-Mut 与 ZNF674-AS1 mimics 和对照质粒 plncRNA-Reporter 共转染 U87 细胞,转染 24 h 后加入 100  $\mu$ L PLB 裂解液。参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。为进一步验证 lncRNA ZNF674-AS1 对 SOX9 基因的调控作用,将阴性对照序列(NC 组)、ZNF674-AS1 mimics(ZNF674 组)和 ZNF674-AS1 inhibitor(ZNF674-AS1 inhibitor 组)分别转染至 U87 细胞,检测 SOX9 mRNA 水平。

**1.8 lncRNA ZNF674-AS1 通过 SOX9 基因对胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移的影响** 为验证 lncRNA ZNF674-AS1 通过 SOX9 基因对胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移的作用,对 U87 细胞分别转染阴性对照(CON 组)、ZNF674-AS1 mimics(ZNF674-AS1 过表达组)、ZNF674-AS1 mimics + SOX9 沉默质粒(ZNF674-AS1 过表达 + SOX9 沉默组)。随后用 CCK-8 法检测细胞增殖、Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移。

**1.9 统计学方法** 应用 SPSS 20.0 软件处理;计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 胶质瘤细胞 lncRNA ZNF674-AS1 的表达** 与正常星形胶质细胞(HA1800)比较,胶质瘤细胞(A172、U251、U87、U373)lncRNA ZNF674-AS1 的表达水平均明显降低( $P < 0.05$ ,图 1);四种胶质瘤细胞中,U87 细胞表达水平最低。

**2.2 lncRNA ZNF674-AS1 对胶质瘤细胞增殖、侵袭、迁移的影响** 上调 U87 细胞 lncRNA ZNF674-AS1 表达,明显抑制 U87 细胞增殖、侵袭、迁移( $P < 0.05$ ;图 2)。

**2.3 lncRNA ZNF674-AS1 对 SOX9 基因的调控作用** Starbase 软件预测显示 lncRNA ZNF674-AS1 与 SOX9 基因有结合位点(图 3A)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,上调 lncRNA ZNF674-AS1 表达,明显抑制 plncRNA-Wt 质粒荧光素酶活性( $P < 0.05$ ;图 3B);沉默 lncRNA ZNF674-AS1 表达,则明显增强其

活性( $P<0.05$ ;图 3B)。但是,上调或沉默 lncRNA ZNF674-AS1 表达并不影响 plncRNA-Mut 质粒荧光素酶活性( $P>0.05$ ;图 3B)。上调 U87 细胞 lncRNA ZNF674-AS1 表达,明显降低 U87 细胞 SOX9 mRNA 表达水平( $P<0.05$ ;图 3C);沉默 U87 细胞 lncRNA ZNF674-AS1 表达,则明显升高 U87 细胞 SOX9 mRNA 表达水平( $P<0.05$ ;图 3C)。

2.4 lncRNA ZNF674-AS1 靶向调控 SOX9 对胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移的影响 上调 U87 细胞 lncRNA ZNF674-AS1 表达,明显抑制 U87 细胞增殖、侵袭和迁移( $P<0.05$ ,图 4);上调 lncRNA ZNF674-AS1 表达的同时沉默 SOX9 基因表达,明显增强 U87 细胞增殖、侵袭和迁移( $P<0.05$ ,图 4)。

3 讨论

lncRNA 是一类长度超过 200 nt 的非编码 RNA,具有转录后调控功能<sup>[8,9]</sup>。研究表明,lncRNA 可能是胶质瘤的分子生物学标志物,在胶质瘤发生、发展中

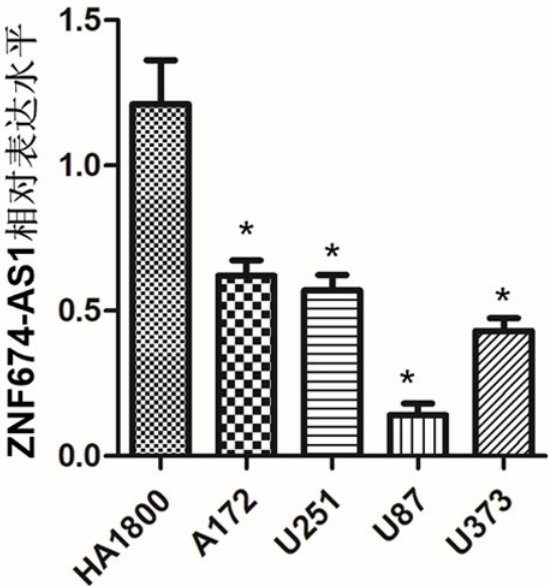


图1 正常星形胶质细胞(HA1800)和胶质瘤细胞(A172、U251、U87、U373)lncRNA ZNF674-AS1 的表达水平与 HA1800 组相应值比,\*  $P<0.05$

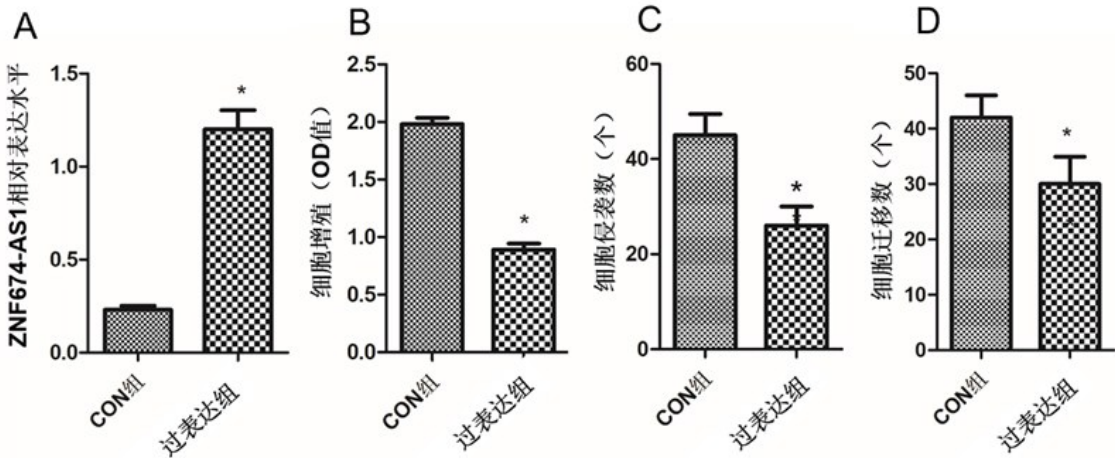


图2 lncRNA ZNF674-AS1 过表达对 U87 细胞增殖、侵袭、迁移的影响与 CON 组相应值比,\*  $P<0.05$

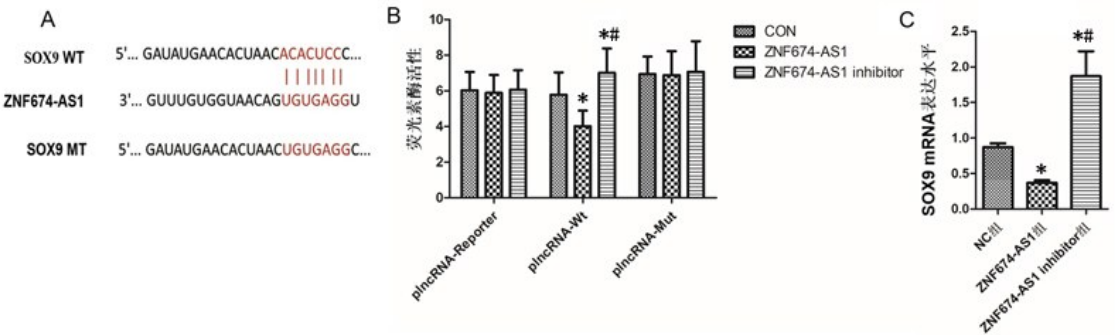


图3 lncRNA ZNF674-AS1 靶基因分析

A. Starbase 软件预测显示 lncRNA ZNF674-AS1 与 SOX9 有结合位点;B. 双荧光素酶报告基因实验检测荧光素酶活性;C. RT-PCR 检测 SOX9 mRNA 表达水平;与 CON 组比较,\*  $P<0.05$



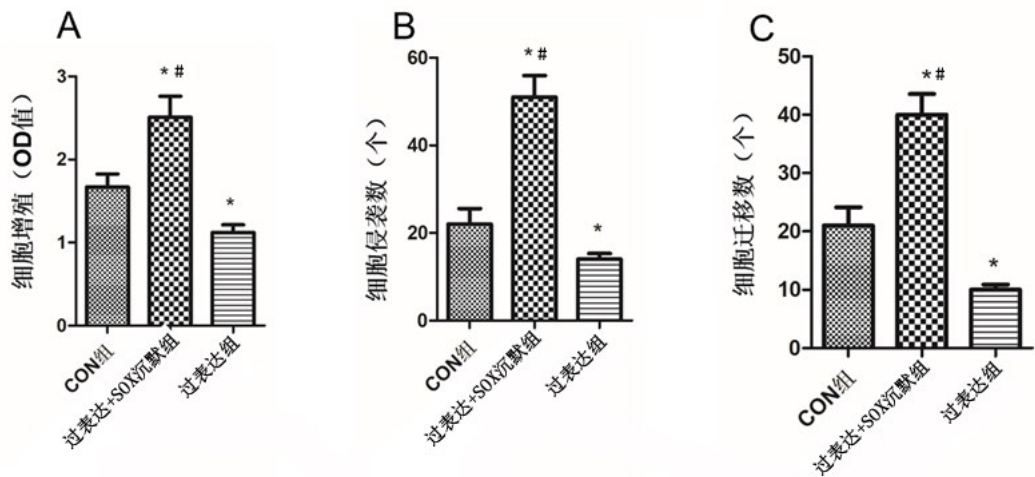


图4 lncRNA ZNF674-AS1 过表达靶向调控SOX9对胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移的影响  
与CON组比较,\*  $P<0.05$ ;与过表达组比较,#  $P<0.05$

起到重要作用,并且对胶质瘤诊断、治疗和预后评估有重要价值<sup>[10-12]</sup>。lncRNA ZNF674-AS1 位于染色体 Xp11.23,在非小细胞肺癌<sup>[4]</sup>、甲状腺癌<sup>[5]</sup>、宫颈癌<sup>[6]</sup>和肝细胞癌<sup>[13]</sup>中低表达,可能作为抑癌基因发挥作用。Luan 等<sup>[7]</sup>发现 lncRNA ZNF674-AS1 在胶质瘤中低表达,但是其生物学机制尚不清楚。

本研究发现,与正常星形胶质细胞(HA1800)比较,胶质瘤细胞(A172、U251、U87、U373) lncRNA ZNF674-AS1 的表达水平明显降低。为了进一步分析 lncRNA ZNF674-AS1 的生物学机制,我们应用 U87 细胞,转染不同质粒进行上调或沉默 lncRNA ZNF674-AS1 表达,结果显示,上调 lncRNA ZNF674-AS1,明显抑制 U87 细胞增殖、侵袭、迁移。说明 lncRNA ZNF674-AS1 在胶质瘤中可能作为抑癌基因发挥生物学作用。SOX9 基因与肿瘤关系密切,其高表达可以诱导胶质瘤细胞增殖,下调该基因表达会诱导胶质瘤细胞凋亡,并抑制 S 期细胞生长<sup>[14,15]</sup>。我们用 Starbase 软件预测显示 lncRNA ZNF674-AS1 与 SOX9 基因有结合位点;双荧光素酶报告实验证实 SOX9 是 lncRNA ZNF674-AS1 对 SOX9 的靶基因。

总之,胶质瘤 lncRNA ZNF674-AS1 呈低表达,可能通过靶向下调 SOX9 基因表达,促进胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移。

【参考文献】

[1] Cao M, Li H, Sun D, *et al.* Cancer burden of major cancers in China: a need for sustainable actions [J]. Cancer Commun (Lond), 2020, 40(5): 205-210.

[2] Chae Y, Roh J, Kim W. The roles played by long non-coding RNAs in glioma resistance [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6834.

[3] He X, Qi Y, Zhang X, *et al.* Current landscape of tumor-derived exosomal ncRNAs in glioma progression, detection, and drug resistance [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(12): 1145.

[4] Liu Y, Huang R, Xie D, *et al.* ZNF674-AS1 antagonizes miR-423-3p to induce G0/G1 cell cycle arrest in non-small cell lung cancer cells [J]. Cell Mol Biol Lett, 2021, 26(1): 6.

[5] Le F, Li HM, Lv QL, *et al.* lncRNA ZNF674-AS1 inhibits the migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of thyroid cancer cells by modulating the miR-181a/SOCS4 axis [J]. Mol Cell Endocrinol, 2022, 544: 111551.

[6] 曾友玲,曾洁,张清,等. lncRNA ZNF674-AS1 通过 miR-510-5p/REPS2 轴调控宫颈癌细胞 HCC94 的增殖和迁移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28: 1168-1173.

[7] Luan F, Chen W, Chen M, *et al.* An autophagy-related long non-coding RNA signature for glioma [J]. FEBS Open Bio, 2019, 9(4): 653-667.

[8] Zhao N, Zhang J, Zhao Q, *et al.* Mechanisms of long non-coding RNAs in biological characteristics and aerobic glycolysis of glioma [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 11179.

[9] Ali T, Grote P. Beyond the RNA-dependent function of lncRNA genes [J]. Elife, 2020, 9: e60583.

[10] 张少君. 长链非编码 RNA 与胶质瘤发生、发展的研究进展[J]. 江苏医药, 2022, 48(1): 93-97.

tion and apoptosis of gastric cancer cells through the Akt-mTOR pathway [J]. FEBS Open Bio, 2020, 10(8): 1542-1549.

[9] Kaistha BP, Honstein T, Müller V, *et al.* Key role of dual specificity kinase TTK in proliferation and survival of pancreatic cancer cells [J]. Br J Cancer, 2014, 111(9): 1780-1787.

[10] Chandler BC, Moubadder L, Ritter CL, *et al.* TTK inhibition radiosensitizes basal-like breast cancer through impaired homologous recombination [J]. J Clin Invest, 2020, 130(2): 958-973.

[11] Zhang H, Yao W, Zhang M, *et al.* TTK inhibitor promotes radiosensitivity of liver cancer cells through p21 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 550: 84-91.

[12] Chen S, Wang J, Wang L, *et al.* Silencing TTK expression inhibits the proliferation and progression of prostate cancer [J]. Exp Cell Res, 2019, 385(1): 111669.

[13] Zhang N, Wei P, Gong A, *et al.* FoxM1 promotes  $\beta$ -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis [J]. Cancer Cell, 2011, 20(4): 427-442.

[14] Wang J, Yang T, Xu G, *et al.* Cyclin-dependent kinase 2 promotes tumor proliferation and induces radio resistance in glioblastoma [J]. Transl Oncol, 2016, 9(6): 548-556.

[15] Wang Q, Hu B, Hu X, *et al.* Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment [J]. Cancer Cell, 2017, 32(1): 42-56.

[16] Payne AW, Pant DK, Pan TC, *et al.* Ceramide kinase promotes tumor cell survival and mammary tumor recurrence [J]. Cancer Res, 2014, 74(21): 6352-6363.

[17] Liang XD, Dai YC, Li ZY, *et al.* Expression and function analysis of mitotic checkpoint genes identifies TTK as a potential therapeutic target for human hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e97739.

[18] Pachis ST, Kops GJPL. Leader of the SAC: molecular mechanisms of Mps1/TTK regulation in mitosis [J]. Open Biol, 2018, 8(8): 180109.

[19] Karoulia Z, Gavathiotis E, Poulikakos PI. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(11): 676-691.

[20] Markham A, Keam SJ. Selumetinib: first approval [J]. Drugs, 2020, 80(9): 931-937.

[21] Stratford JK, Yan F, Hill RA, *et al.* Genetic and pharmacological inhibition of TTK impairs pancreatic cancer cell line growth by inducing lethal chromosomal instability [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0174863.

[22] Uitdehaag JCM, de Man J, Willemssen-Seegers N, *et al.* Target residence time-guided optimization on TTK kinase results in inhibitors with potent anti-proliferative activity [J]. J Mol Biol, 2017, 429(14): 2211-2230.

[23] Schulze VK, Klar U, Kosemund D, *et al.* Treating cancer by spindle assembly checkpoint abrogation: discovery of two clinical candidates, BAY 1161909 and BAY 1217389, targeting MPS1 kinase [J]. J Med Chem, 2020, 63(15): 8025-8042.

[24] Chen S, Wang Y, Ni C, *et al.* HLF/miR-132/TTK axis regulates cell proliferation, metastasis and radiosensitivity of glioma cells [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 898-904.

[25] Wang J, Xie Y, Bai X, *et al.* Targeting dual specificity protein kinase TTK attenuates tumorigenesis of glioblastoma [J]. Oncotarget, 2018, 9(3): 3081-3088.

(2022-03-20 收稿, 2022-07-19 修回)

(上接第 840 页)

[11] Momtazmanesh S, Rezaei N. Long non-coding RNAs in diagnosis, treatment, prognosis, and progression of glioma: a state-of-the-art review [J]. Front Oncol, 2021, 11: 712786.

[12] Chen S, Deng X, Sheng H, *et al.* Noncoding RNAs in pediatric brain tumors: molecular functions and pathological implications [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 26: 417-431.

[13] Zhang L, He T, Yan Y, *et al.* Expression and clinical significance of the novel long noncoding RNA ZNF674-AS1 in human hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 3608914.

[14] 游伊梦, 刘彦权, 沈建箴. SOX9 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(2): 111-116.

[15] Sun Y, Jing Y, Zhang Y. Serum lncRNA-ANRIL and SOX9 expression levels in glioma patients and their relationship with poor prognosis [J]. World J Surg Oncol, 2021, 19(1): 287.

(2022-07-27 收稿, 2022-08-26 修回)