



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.014
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.014
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(1):90-96.

· 基础研究 ·

长链非编码 RNA MALAT1 在肝癌中表达及功能研究

姚凯, 张光军, 黄忠明, 姚国相

(上海交通大学附属第六人民医院南院 普通外科, 上海 201499)

摘要

目的: 探讨长片段非编码 RNA (lncRNA) MALAT1 在肝癌中的表达及其功能。

方法: 用 qRT-PCR 方法检测 80 例肝癌患者手术切除的癌组织及其癌旁组织, 以及不同肝癌细胞系 (HepG2、Hep3B、HCCLM3、HuH7) 与正常肝细胞系 (L02) 中 MALAT1 的表达。分别用 MTT 试验、划痕试验、流式细胞术检测肝癌细胞 (HepG2、HuH7) 转染 MALAT1 siRNA 后增殖、迁移、凋亡的变化。

结果: 80 例配对标本中, 72 例 (90%) 肝癌组织 MALAT1 表达较其癌旁组织明显上调, MALAT1 在不同肝癌细胞系中的表达水平均不同程度明显高于正常肝细胞系 (均 $P < 0.05$); HepG2、HuH7 转染 MALAT1 siRNA 后, 增殖率均呈时间依赖性降低、划痕愈合能力均明显减弱 (均 $P < 0.05$), 细胞凋亡率分别为 17.0%、16.41%, 而各自的对照组分别为 8.89%、6.56%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: MALAT1 在肝癌中的表达上调, 且可能与肝癌的恶性生物学行为密切相关, 对其作用机制的进一步研究, 有望为肝癌的治疗找到新的靶点。

关键词

癌, 肝细胞; RNA, 未翻译; RNA, 小分子干扰
中图分类号: R735.7

Long non-coding RNA MALAT1 expression in hepatocellular carcinoma and its action

YAO Kai, ZHANG Guangjun, HUANG Zhongming, YAO Guoxiang

(Department of General Surgery, the South Section of Shanghai 6th People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201499, China)

Abstract

Objective: To investigate the long non-coding RNA (lncRNA) MALAT1 expression in hepatocellular carcinoma (HCC) and its function.

Methods: The MALAT1 expressions in 80 surgical specimens consisting of tumor and adjacent normal tissue as well as in different HCC cells lines (HepG2, Hep3B, HCCLM3, and HuH7) and normal hepatic cell line (L02) were determined by qRT-PCR method. The changes in proliferation, migration and apoptosis in HCC cells (HepG2 and HuH7) after MALAT1 siRNA transfection were examined by MTT assay, wound healing assay and flow cytometry, respectively.

Results: In 72 of the 80 paired samples (90%), the MALAT1 expression in HCC tissue was significantly up-regulated compared with its adjacent normal tissue, and the MALAT1 expression level in each examined HCC

收稿日期: 2015-05-26; 修订日期: 2015-12-18。

作者简介: 姚凯, 上海交通大学附属第六人民医院南院主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤学方面的研究。

通信作者: 姚国相, Email: guoxyao@yahoo.cn

cell line was significantly higher to varying degrees than that in normal hepatic cell line (all $P < 0.05$). In HepG2 and HuH7 cells after MALAT1 siRNA transfection, the proliferation rate was significantly decreased in a time-dependent manner, wound healing ability was significantly weakened (all $P < 0.05$), the apoptosis rate was 17.0% and 16.41%, which in their corresponding group was 8.89% and 6.56% respectively, and the difference had statistical significance (both $P < 0.05$).

Conclusion: MALAT1 expression is up-regulated in HCC, which may be closely associated with the malignant behaviors of HCC, and further investigation of its action mechanism may probably uncover a potential new therapeutic target for HCC.

Key words Carcinoma, Hepatocellular; RNA, Untranslated; RNA, Small Interfering

CLC number: R735.7

肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,排在肿瘤导致死亡的第3位^[1]。目前临床上还没有一种灵敏性和特异性较好的肿瘤标志物可用于肝癌的诊断及术后监测^[2],为此,有必要进一步研究肝癌发生、发展的分子机制,并探究能对肝癌进行早期诊治的肿瘤标志物。研究发现,长片段非编码RNA (lncRNA) 可参与X染色体沉默,基因组印记以及染色质修饰,转录激活,转录干扰,核内运输等生命活动中多种重要的调控过程^[3-4]。但是,到目前为止,绝大部分的lncRNA的功能尚不完全清楚,其参与调控的分子生物学机制仍不明确^[5]。目前国内外学者发现多种lncRNA在肿瘤中异常表达,如H19高表达于卵巢癌、膀胱癌,并发现其具有原癌活性^[6]; PlncRNA-1在食管癌高表达,可促进食管癌细胞的增殖^[7]; CCAT2特异性表达于肺腺癌,并增强肺腺癌细胞的侵蚀能力^[8]。

肺腺癌转移相关转录子1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 是lncRNA家族的重要成员之一,最早于2003年由Ji等^[9]在非小细胞肺癌中发现。迄今为止, MALAT1已被证明与多种人类肿瘤的发生发展密切相关^[10-12]。本研究从NCBI芯片数据库(GEO DataSets)中肝癌表达谱芯片挑选出MALAT1为主要研究对象,通过qRT-PCR验证MALAT1在肝癌和相应癌旁组织以及肝癌细胞系的表达,进而采用干扰技术,探究MALAT1在肝癌细胞中的功能,为研究肝癌发生发展的分子生物学机制奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 标本及临床资料收集

本实验所用临床标本为2008年1月—2013年12月于上海交通大学附属第六人民医院南院手术收集的80例肝癌及其相应的癌旁组织。所用标本均经过上海交通大学附属第六人民医院南院医学伦理委员会批准,并获得手术患者同意。每例标本包括手术切除的肝癌组织及配对的癌旁组织,所有的标本均经当地医院的病理科验证,均有完整的临床病理资料。其中男50例,女30例;平均年龄55(20~65)岁。

1.2 实验主要试剂和仪器

总RNA提取试剂TRIZol (Invitrogen, 美国)、反转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, 日本), SYBR premix Ex Taq™ II PCR Kit (Takara, Japan), AnnexinV FITC凋亡检测试剂盒 (Invitrogen, USA), PCR扩增引物由Invitrogen广州公司合成, MALAT1 siRNA (5'-UGA UGC GAG UUG UUC UCC GUC UAU A-3') 购自上海Genechem公司。普通PCR仪 (BIO-RAD, USA), NanoDrop 2000c紫外分光光度计 (ThermoScientific, 美国), LightCycler480荧光定量PCR仪 (Roche, 德国)等。

1.3 总RNA的提取及cDNA合成

选取-80℃冰箱保存的80例配对肝癌及癌旁组织,以及培养好的肝癌(HepG2、Hep3B、HCCLM3、HuH7)及正常肝细胞系(L02),按照RNA提取试剂TRIZol说明书,提取实验标本中

的总RNA, 测好浓度后, 所提取总RNA放置 -80°C 冰箱保存。按照PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser kit说明书, 取 $1\ \mu\text{g}$ 提取好的总RNA加入反应体系中, 在普通PCR仪上进行逆转录过程。实验逆转录反应条件: 42°C 2 min, 42°C 15 min, 85°C 5 s, 4°C forever。合成的cDNA置于 -80°C 冰箱保存备用。

1.4 qRT-PCR 检测

按照SYBR premix Ex Taq™ II PCR Kit试剂盒说明书, 以cDNA为模版在LightCycler480II荧光定量 PCR 仪上进行RT-qPCR反应。实验反应体系为: 模版cDNA $1\ \mu\text{L}$, SYBR premix Ex Taq™ II PCR Mix $10\ \mu\text{L}$, 正、反向引物 ($20\ \mu\text{mol}$) 共 $1.6\ \mu\text{L}$, MALAT1上游引物为5'-TCA TAC CTA ACC AGG CAT AAC A-3', 下游引物为5'-CTA AGC GAA TGG CTT TGT CTC C-3'; 以GAPDH为内参, GAPDH上游引物为5'-ACA GTC AGC CGC ATC TTC T-3', 下游引物为5'-ACT CCG ACC TTC ACC TTC C-3', 加RNase-free water $7.4\ \mu\text{L}$ 至总体积 $20\ \mu\text{L}$ 。反应条件为: 95°C 30 s, 随后 95°C 5 s, 60°C 30 s, 72°C 15 s, 共40个循环。以内参GAPDH作为标准化对照, 采用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 分析方法计算qPCR仪所得数据, $\Delta\text{CT}=\text{CT}_{\text{MALAT1}}-\text{CT}_{\text{GAPDH}}$, $\Delta\Delta\text{CT}=\Delta\text{CT}_{\text{HCC}}-\Delta\text{CT}_{\text{Normal}}$ 。通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法^[13]计算肝癌中MALAT1表达量与癌旁表达量的倍数关系, 以及肝癌细胞系表达量相与正常肝细胞系表达量的倍数关系。

1.5 细胞增殖试验 (MTT)

将培养好的肝癌细胞 (HepG2, HuH7) 使用96孔板进行铺板, 每孔细胞数达 2×10^4 , 之后进行细胞转染, 所培养细胞每孔连续4 d每天加入 $16\ \mu\text{L}$ MTT ($5\ \text{g/L}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 与细胞共孵育4 h弃去上清, 最后以 $150\ \mu\text{L}$ 二甲亚砜溶解, 测 $450\ \text{nm}$ 波长时的吸光度, 各组求均值做生长曲线。

1.6 细胞划痕实验

将培养好的细胞 (HepG2、HuH7) 消化后, 在6孔板中加入细胞悬液, 当细胞完全贴壁后, 用消毒过的 $20\ \mu\text{L}$ 枪头均匀划出4条横线, 进而以PBS洗细胞3次, 去除杂质及被划掉的细胞。实验分为2组: 对照组加入无血清培养基; MALAT1 siRNA组加入含 $10\ \mu\text{L}$ siRNA的无血清培养基。处理后的细

胞放入培养箱正常培养。之后, 在不同时间点进行拍照, 观察和测定划痕闭合宽度。

1.7 细胞凋亡检测

6孔板内每孔培养 4×10^5 细胞 (HepG2、HuH7), 实验分为阴性对照组和MALAT1 siRNA组。流式细胞仪检测转染细胞48 h后的凋亡率, 使用碘化丙啶与AnnexinV FITC双染色法评估细胞凋亡率, 其中AnnexinV FITC染色阳性的细胞, 而碘化丙啶阴性的细胞代表凋亡细胞, 分析计算凋亡细胞比率。

1.8 统计学处理

所有的实验至少重复3次, 实验中各项指标的数据都采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用SPSS 16.0进行统计分析。MTT试验结果采用ANOVA检验, 其余试结果均采用两组样本的独立 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MALAT1 在肝癌及癌旁组织的表达情况

通过 ΔCT 方法计算肝癌组织中MALAT1的表达量相对于癌旁组织并作图 (图1), 肝癌组织中MALAT1表达量明显高于配对的癌旁组织 ($P < 0.05$)。其中72例 (90%) 肝癌组织MALAT1的表达量较配对的癌旁组织上调。

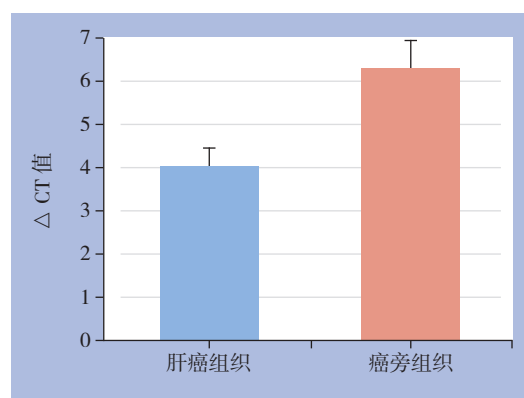


图 1 MALAT1 在肝癌及癌旁组织的表达

Figure 1 MALAT1 expression in HCC and adjacent non-cancerous tissues

2.2 MALAT1 在肝癌细胞系的表达情况

通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算MALAT1表达量在肝癌细胞系

相对正常肝细胞系倍数并作图(图2), MALAT1 在不同肝癌细胞系中的表达均不同程度明显高于正常肝细胞系(均 $P < 0.05$)。

2.3 MALAT1 对肝癌细胞增殖的影响

细胞增殖曲线显示, MALAT1 siRNA转染组肝癌细胞增殖速度相对阴性对照组明显下降(图3), MALAT1 siRNA转染组细胞转染后0、24、48、72 h, HepG2细胞生长抑制率分别为0%、15%、27% 和35%, HuH7细胞生长抑制率分别为0%、13%、21%和32%, 以转染后72 h最高。

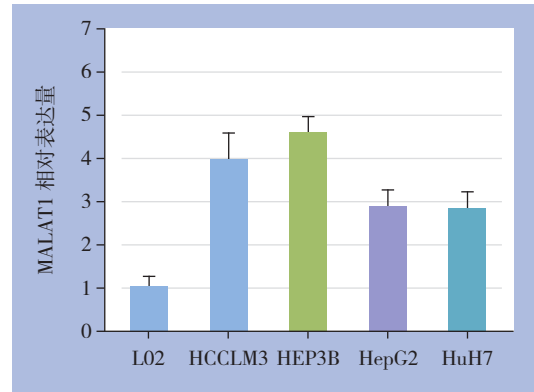


图2 MALAT1 在肝癌细胞系与正常肝细胞系中的表达
Figure 2 MALAT1 expressions in different HCC cell lines and normal hepatic cell line

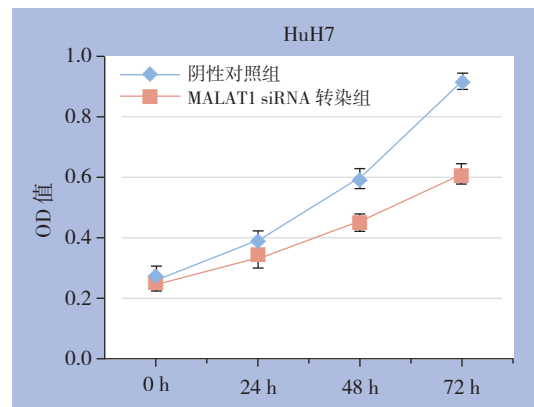
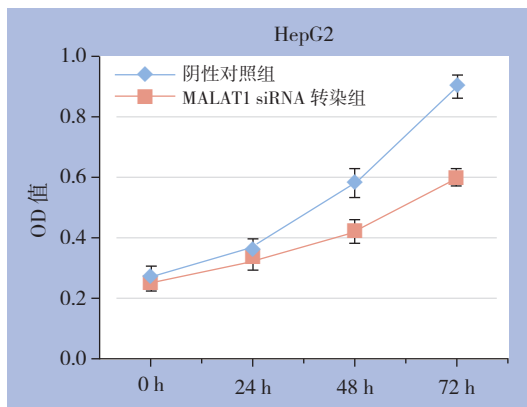


图3 MALAT1 对肝癌细胞增殖的影响
Figure 3 Effect of MALAT1 on the proliferation of HCC cells

2.4 MALAT1 对肝癌细胞迁移的影响

细胞铺板后, 采用细胞划痕实验检测MALAT1 siRNA组与阴性对照组细胞迁移率。细胞划痕后使用无血清培养基进行培养, 以排除细胞增殖对实验结果的影响。结果见图4。24 h后, 实验对照组HepG2细胞划痕闭合约53%, MALAT1 siRNA组HepG2细胞划痕闭合约25%; 实验对照组HuH7细胞划痕闭合约70%, MALAT1 siRNA组HuH7细胞划痕闭合约30%; MALAT1 siRNA组与阴性对照组

比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 MALAT1 对肝癌细胞凋亡的影响

为了验证MALAT1对肝癌细胞凋亡的影响, 实验使用碘化丙啶和Annexin V FITC双染色法检测细胞凋亡率, 如图5, 结果显示转染MALAT1 siRNA的细胞凋亡率(HepG2 17.0%; HuH7 16.41%), 相对于阴性对照组肝癌细胞(HepG2 8.89%; HuH7 6.56%)均明显增加(均 $P < 0.05$)。

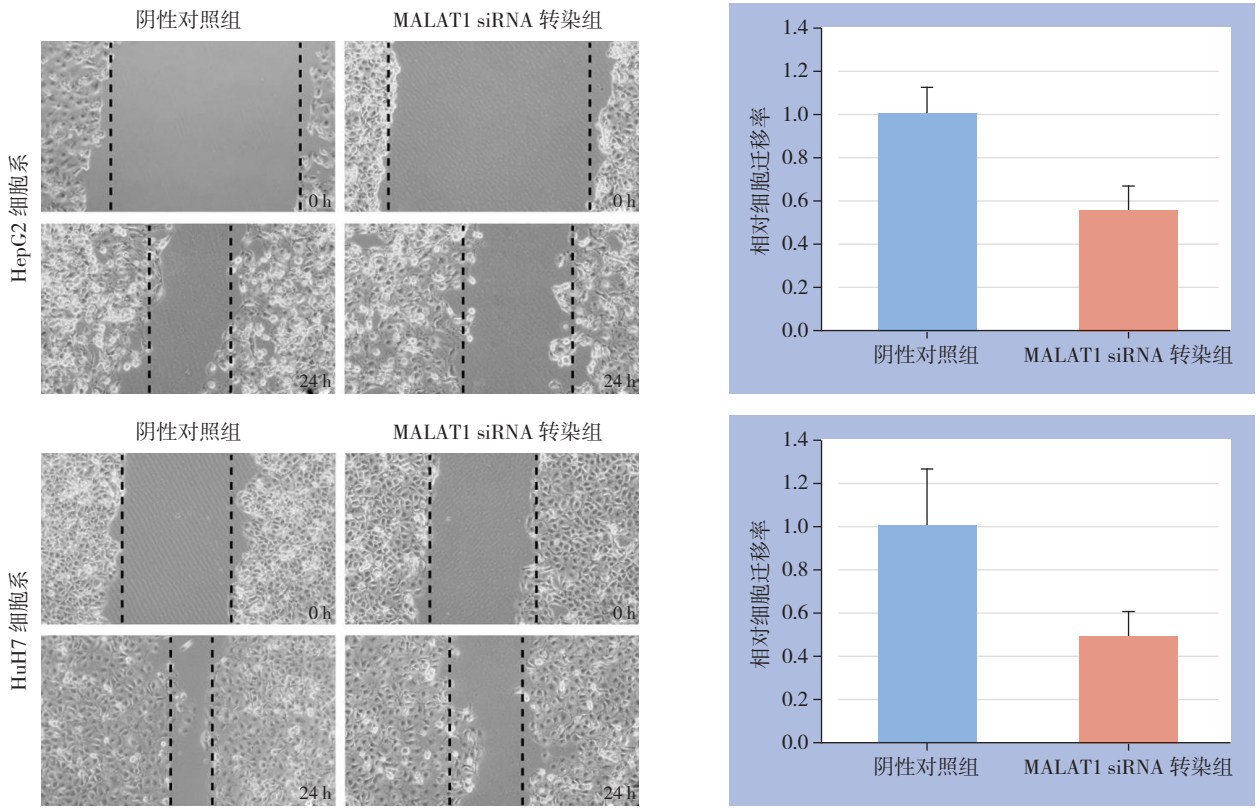


图 4 MALAT1 对肝癌细胞迁移的影响
 Figure 4 Effect of MALAT1 on the migration of HCC cells

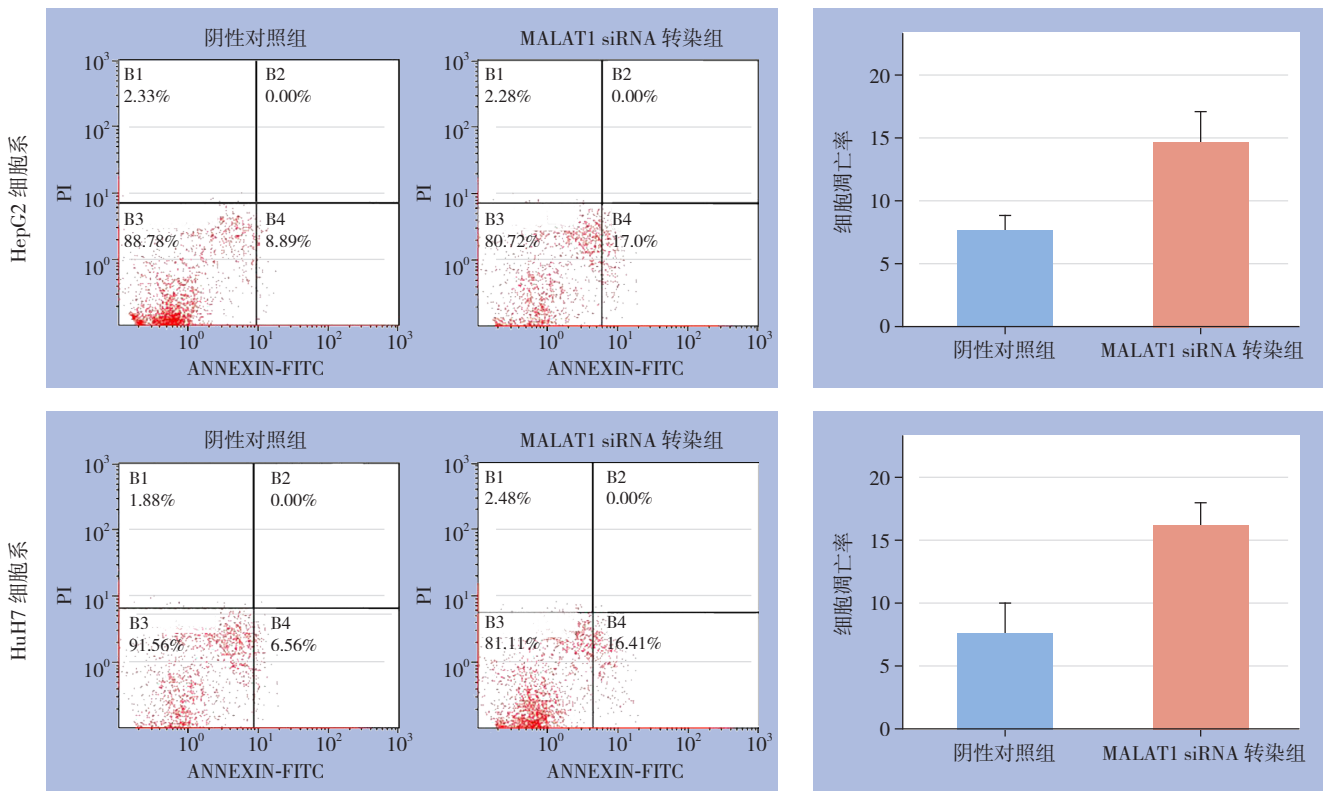


图 5 MALAT1 对肝癌细胞凋亡的影响
 Figure 5 The effect of MALAT1 on the apoptosis in HCC

3 讨论

肝癌是肝实质最常见的恶性肿瘤,目前肝癌的发病机制仍不完全清楚,因其缺乏早期的临床表现,故早期诊断非常困难,然而发生远处转移的晚期肝癌患者往往预后不良。尽管目前临床上已经发现许多生物标志物与肝癌的诊断、治疗及预后密切相关,但这些肿瘤标志物距离实际临床应用仍需要更加深入的研究。因此,寻找新的提高肝癌早期诊断和判断预后的肿瘤生物标志物及进一步深入研究其在肝癌发生发展中的分子机制具有重要意义。lncRNA是一类不具有编码蛋白质功能但具有调控功能的RNA分子,它们在各种生物体生命活动中发挥着极其重要的调控作用,大部分lncRNA分子可以通过参与编码蛋白基因mRNA水平的稳定及翻译水平的调节、参与一部分蛋白质的运输、参与转录后RNA的加工和修饰、调节染色体的结构等机制,参与调控各种生物体的胚胎形成、组织和器官分化等各项基本的生命活动^[14-15]。通过对lncRNA进行研究,对揭示基因表达调控机制、提高人类疾病防治能力及探索生物进化规律都有重要意义^[16-17]。lncRNA在各种疾病中的作用越来越突出,已成为继microRNA之后又一研究热点。目前国内外学者发现多种lncRNA在肿瘤中异常表达,并参与调控肿瘤发生发展^[18-22]。

近来研究发现,抑制MALAT1在肾癌细胞的表达可以有效地降低细胞活力,并增加细胞凋亡的敏感性^[23]。沉默MALAT1在人属宫颈癌细胞的表达可抑制细胞的增殖并显著降低其侵袭能力^[24]。小鼠体内成瘤试验发现沉默MALAT1后肿瘤的体积及重量均降低;而激活MALAT1则可增加肿瘤体积^[25]。本实验组通过从NCBI芯片数据库(GEO DataSets)中肝癌表达谱芯片挑选出差异表达的LncRNA,对肝癌和相应癌旁组织以及肝癌与正常肝细胞系中差异表达的MALAT1进行qRT-PCR验证和比较,发现MALAT1在肝癌组织及细胞系中呈现明显高表达。进一步实验发现,沉默MALAT1可显著抑制肝癌细胞的增殖、迁移并增加肝癌细胞的凋亡。实验结果与上述报道结果一致,提示MALAT1可能作为癌基因参与肝癌的发生和发展。

然而,在肝癌细胞的增殖和迁移过程中,往往存在多种基因网络或信号通路的共同参与。因

此为进一步明确MALAT1的应用价值,仍需要对肝癌中的相关基因调控网络进行深入研究。综上所述,本研究观察到MALAT1在肝癌高表达,提示其在肝癌发生和发展过程中可能具有重要作用,进一步研究发现MALAT1具有促进肝癌细胞的增殖及迁移能力。MALAT1将来有望成为肝癌基因治疗方向的一个有效靶点。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer Statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, et al. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2003, 22(33):5093-5107.
- [3] Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(6):354-361.
- [4] Shi X, Sun M, Liu H, et al. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases[J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2):159-166.
- [5] Serviss JT, Johnsson P, Grandér D. AAn emerging role for long non-coding RNAs in cancer metastasis[J]. *Front Genet*, 2014, 5:234. doi: 10.3389/fgene.2014.00234.
- [6] Atala A. Re: Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression[J]. *J Urol*, 2013, 190(6): 2306.
- [7] Wang CM, Wu QQ, Li SQ, et al. Upregulation of the long non-coding RNA Plncrna-1 promotes esophageal squamous carcinoma cell proliferation and correlates with advanced clinical stage[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(3):591-597.
- [8] Qiu M, Xu Y, Yang X, et al. CCAT2 is a lung adenocarcinoma-specific long non-coding RNA and promotes invasion of non-small cell lung cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6):5375-5380.
- [9] Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(39):8031-8041.
- [10] Cai X, Liu Y, Yang W, et al. Long noncoding RNA MALAT1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma[J]. *J Orthop Res*, 2015, doi: 10.1002/jor.23105. [Epub ahead of print]
- [11] Jin C, Yan B, Lu Q, et al. The role of MALAT1/miR-1/slug axis on radioresistance in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, [Epub ahead of print]
- [12] Yoshimoto R, Mayeda A, Yoshida M, et al. MALAT1 long non-coding RNA in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(1):192-199.
- [13] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the

- comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6):1101-1108.
- [14] Tomaru Y, Hayashizaki Y. Cancer research with non-Coding RNA[J]. Cancer Sci, 2006, 97(12):1285-1290.
- [15] Costa FF. Non-coding RNAs: lost in translation?[J]. Gene, 2007, 386(1/2):1-10.
- [16] Yin B, Zeng Y, Wang X, et al. Expression and clinical significance of cancer-testis genes in clear cell renal cell carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(7): 4112-4119.
- [17] Mathieu EL, Belhocine M, Dao LT, et al. Functions of lncrna in development and diseases[J]. Med Sci (Paris), 2014, 30(8/9):790-796.
- [18] Malek E, Jagannathan S, Driscoll JJ. Correlation of long non-coding RNA expression with metastasis, drug resistance and clinical outcome in cancer [J]. Oncotarget, 2014, 5(18):8027-8038.
- [19] Cao S, Liu W, Li F, et al. Decreased expression of lncRNA GAS5 predicts a poor prognosis in cervical cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10):6776-6783.
- [20] 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.
- [21] Li LJ, Zhu JL, Bao WS, et al. Long noncoding RNA GHET1 promotes the development of bladder cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10):7196-7205.
- [22] Kim HJ, Lee DW, Yim GW, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression[J]. Int J Oncol, 2015, 46(2):521-530.
- [23] Hirata H, Hinoda Y, Shahryari V, et al. Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Aggressive Renal Cell Carcinoma through Ezh2 and Interacts with miR-205[J]. Cancer Res, 2015, 75(7):1322-1331.
- [24] Yang L, Bai HS, Deng Y, et al. High MALAT1 expression predicts a poor prognosis of cervical cancer and promotes cancer cell growth and invasion[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(17):3187-3193.
- [25] Lopez-Ayllon BD, Moncho-Amor V, Abarrategi A, et al. Cancer stem cells and cisplatin-resistant cells isolated from non-small-lung cancer cell lines constitute related cell populations[J]. Cancer Med, 2014, 3(5):1099-1111.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 姚凯, 张光军, 黄忠明, 等. 长链非编码RNA MALAT1在肝癌中表达及功能研究[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(1):90-96. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.014

Cite this article as: YAO K, ZHAGN GJ, HUANG ZM, et al. Long non-coding RNA MALAT1 expression in hepatocellular carcinoma and its action[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(1):90-96. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.014