

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.02.002

长链非编码 RNA BANCR 在肝细胞癌组织中表达上调及其对患者疾病预后价值探讨

赵 冀¹,周 超²,李宏敏³,杨洪吉¹

(四川省人民医院:1.器官移植中心;2.消化内科;3.肿瘤科,成都 610000)

[摘要] 目的 探讨 BRAF 激活的长链非编码 RNA(BANCR)在肝细胞癌(HCC)组织中表达上调及其对患者疾病预后价值。方法 采用实时定量 PCR 检测 HCC 组织和细胞系中 BANCR 表达情况,分析 BANCR 表达水平与患者临床病理学特征关系,采用四甲基嘧啶蓝(MTT)、流式分析和肿瘤细胞体外侵入迁移分析探讨 BANCR 在 HCC 细胞中的生物学功能。结果 与临近非肿瘤组织相比,HCC 组织标本中 BANCR 表达水平明显上调($P<0.01$),且 HCC 细胞系中 BANCR 表达水平也明显上调($P<0.05$)。临床病理学特征分析结果提示 BANCR 表达升高与较高的肿瘤分级、肿瘤直径、静脉侵入及较高的 TNM 分期密切相关($P<0.05$)。BANCR 过表达 HCC 患者总生存期明显短于低表达患者($P<0.01$)。多重变量 Cox 回归分析提示 BANCR 表达($RR=4.245,P=0.015$)、肿瘤直径($RR=2.655,P=0.039$)、静脉侵入($RR=3.278,P=0.022$)和 TNM 分期($RR=6.379,P=0.006$)是 HCC 患者总生存期独立预后因素。此外,Hep3B 细胞中 BANCR 表达下调能明显抑制细胞侵入和转移,同时导致波形蛋白下调和 E-钙黏蛋白上调。结论 本研究结果表明 BANCR 可能参与 HCC 的发生和发展过程,可以作为 HCC 患者疾病预后标志物和临床治疗靶标。

[关键词] RNA;肝肿瘤;癌,肝细胞;长链非编码 RNA,BANCR;预后

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)02-0148-04

Expression up-regulation of lncRNA BANCR in hepatocellular carcinoma tissue and its prognostic value on patients' disease

Zhao Ji¹, Zhou Chao², Li Hongmin³, Yang Hongji¹

(1. Organ Transplantation Center; 2. Department of Gastroenterology; 3. Department of Oncology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression up-regulation of BRAF activated lncRNA(BANCR) in hepatocellular carcinoma(HCC) tissue and its prognostic value on patients' disease. **Methods** The quantitative real-time PCR(qRT-PCR) was used to detect BANCR expression in HCC tissues and cell lines. The association between BANCR expression level and clinicopathological features was also analyzed. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), flow cytometry, and transwell invasion and migration assays were used to investigate the biological function of BANCR in the HCC cells. **Results** Compared with adjacent noncancerous tissues, BANCR expression was remarkably increased in HCC tissue sample ($P<0.01$), moreover BANCR expression in HCC cell lines was also significantly up-regulated ($P<0.05$). The clinicopathologic features analysis revealed that the BANCR expression increase was closely correlated with higher tumor grade, tumor size, venous infiltration and higher TNM staging($P<0.05$). The total survival period in HCC patients with BANCR overexpression was significantly shorter than that in the patients with BANCR low expression ($P<0.01$). The multi-variate Cox regression analysis indicated that the BANCR expression($RR=4.245,P=0.015$), tumor diameter($RR=2.655,P=0.039$), venous invasion($RR=3.278,P=0.022$) and TNM staging($RR=6.379,P=0.006$) were the independent prognostic factor of the total survival period in the HCC patients. Moreover, BANCR expression down-regulation in Hep3B cells could significantly inhibit the cellular invasion and transfer, meanwhile led to vimentin down-regulation and E-cadherin up-regulation. **Conclusion** This research results suggest that BANCR may contribute to HCC initiation and development process and would be used as a marker of the prognosis in HCC patients as well as a therapeutic target.

[Key words] RNA;liver neoplasms;hepatocellular carcinoma;long non-coding RNA,BANCR;prognosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)在全球常见肿瘤中排第5,其发病率呈逐年上升趋势,在中国也是如此^[1]。尽管临床和实验肿瘤学不断取得进展,但由于患者大多在肿瘤晚期确诊,缺乏有效治疗和介入方法,因此临床长期预后较差。早期研究揭示了多种与 HCC 相关的调节基因和信号通路^[2-3],然而 HCC 发生和发展潜在的高度复杂的分子机制目前仍所知甚少。因此,临床急需一种 HCC 早期诊断,有效治疗和预后的分子标志物。BRAF 激活的非编码 RNA(BAN-

CR)为 693 bp 的长链非编码 RNA(lncRNA),由 Flockhart 等^[4]在黑色素瘤细胞中发现。随后,甲状腺乳头状癌^[5]、视网膜母细胞癌^[6]、肺癌^[7-8]、胃癌和结直肠癌^[9]中均发现 lncRNA BANCR 表达异常。上述肿瘤中 BANCR 均参与肿瘤细胞增殖、迁移和侵入,然而其在 HCC 中表达的研究较少。本研究检测 BANCR 在 HCC 组织和细胞系中的表达,同时分析其表达与 HCC 患者临床病理学特征的关系,此外,本研究还初步探讨了 BANCR 对 HCC 细胞的调节作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HCC 组织和相应临近非肿瘤组织均采集于 2009~2011 年本院治疗的 109 例 HCC 患者,均在术中采集并置于液氮中保存。所有患者均为原发病例,患者临床病理学特征从病历中获取,入组前均未接受任何治疗,并将所取组织分为 HCC 组织组和非肿瘤组织组。本研究通过本院伦理委员会审批。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与 RNA 干扰 HCC 细胞系(HuH-7, Hep3B, HepG2 和 H2-M)及健康人肝细胞 CL-48 均购自 ATCC(美国),采用高糖(4.5 g/L)DMEM 培养基,培养条件为 5% CO₂ 37 ℃。青、链霉素终浓度为 100 U/mL,此外还添加 10%胎牛血清。lncRNA BANCR 干扰 RNA(si-BANCR)和对照干扰 RNA(siRNA)均购自 Sigma-Aldrich 公司,采用 Lipofectamine 2000 进行转染,48 h 收集细胞。

1.2.2 RNA 提取和实时定量 PCR 检测 组织 miRNA 采用 mirVana miRNA 提取试剂盒(AB 公司,美国)提取,通过 SPEC-TRAmix 微孔板紫外分光光度计(Molecular devices corp,美国)测定微 RNA(miRNA)浓度,参考文献[6]合成 BANCR 和内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)扩增引物。通过 2^{-ΔΔCt} 方法,根据内参含量计算 miRNA-21 的相对表达水平。

1.2.3 细胞增殖、凋亡分析 采用四甲基唑啉蓝(MTT)方法进行细胞增殖分析,步骤如下:铺 96 孔板,每孔细胞 1×10³,连续培养。两组都加入 20 μL MTT(5 mg/mL),孵育 4 h 后移去上清液,DMSO 每孔 150 μL,测定光密度(OD)490 nm 值。转染 48 h 后,收集细胞,预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤、重旋后,采用碘化丙啶(10 μg/mL)和钙磷脂结合蛋白 V(50 μg/mL)处理细胞,黑暗环境下室温孵育 15 min 后,进行流式分析。

1.2.4 细胞侵入和转移分析 采用 6 孔 transwell 小室(直径 8 μm)进行肿瘤细胞的侵入和转移分析,进行转移分析时,将转染后的 1×10⁵ 的 HCC 细胞加入不含血清培养基的上室中,下室为含 20%胎牛血清的全培养基,刺激细胞转移,孵育 48 h,取出下室置于 95%的乙醇中,固定 10 min,0.1%的结晶紫染色 20 min,显微计数。进行肿瘤细胞侵入分析时,上室中加入 5 mg/mL 的基质胶,其他步骤与转移分析相同。

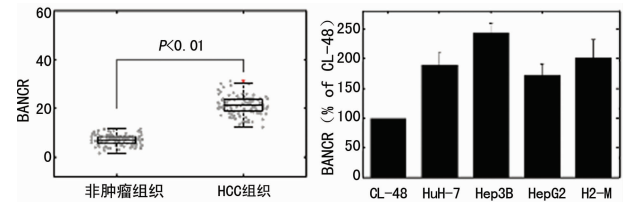
1.2.5 Western blot 分析 采用含蛋白酶的 RIPA 溶液裂解细胞,并抑制内源性磷酸酶活性,采用 10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳后转印蛋白至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,常规封闭后,孵育一抗(Cell signal,美国),之后采用 H 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗进行孵育,加入电化学发光(ECL)Plus 进行发光, GAPDH 作为内参蛋白。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件处理,BANCR 表达水平与其他因素的相关性采用卡方检验和 Fisher's 精准检验或独立 t 检验。采用 Kaplan-Meier 方法计算患者生存期,根据术后随访结果计算患者总生存期。组间生存期比较则采用秩和检验,对于单一变量检测影响 HCC 患者总生存期的显著性因素进行多重变量分析,检验水准 α=0.05,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCC 组织和细胞系中 BANCR 表达检测 采用实时定量 PCR 检测 HCC 组织和细胞系中 BANCR 表达水平。与临近非肿瘤组织相比,HCC 组织中 BANCR 表达显著上调(P<0.01),且 4 株 HCC 细胞系中 BANCR 表达也显著上调(P<

0.05),见图 1。其中 Hep3B 细胞系中 BANCR 表达升高水平高于其他 3 株细胞,因此选择其进行后续体外实验。



A:HCC 组织和临近非肿瘤组织 BANCR 表达检测;B:4 株 HCC 细胞系中 BANCR 表达检测。

图 1 HCC 组织和细胞系中 BANCR 表达实时定量 PCR 检测

2.2 BANCR 表达与 HCC 患者临床病理学特征关系分析 本研究进一步探讨 BANCR 表达与 HCC 患者临床病理学特征关系,根据 109 例患者 HCC 组织标本 BANCR 表达检测的平均值将其分成低表达组(55 例)和高表达组(54 例)。结果表明 BANCR 表达与较高肿瘤分级(P=0.007)、较大肿瘤直径(P=0.003)、静脉侵入(P=0.001)和较高的 TNM 分期(P=0.002)密切相关,而与患者的年龄、性别、肝硬化、血清 AFP 水平和实体瘤数量无关,见表 1。

2.3 BANCR 表达与 HCC 患者疾病预后 为探讨 BANCR 表达升高对 HCC 患者总生存期预后的价值,本研究采用 Kaplan-Meier 方法和秩和检验进行统计分析,结果提示 BANCR 过表达 HCC 患者总生存期显著短于低表达患者(P<0.01),见图 2。此外,仅在较小肿瘤直径(P=0.025)、分化良好肿瘤(P=0.037)、静脉侵入阴性(P=0.008)和 TNM 早期(P<0.01)患者中观察到生存效益,见表 2。多重变量 Cox 回归分析提示 BANCR 表达(RR=4.245, P=0.015)、肿瘤直径(RR=2.655, P=0.039)、静脉侵入(RR=3.278, P=0.022)和 TNM 分期(RR=6.379, P=0.006)是 HCC 患者总生存期独立预后因素。

表 1 BANCR 表达与 HCC 患者临床病理学特征关系分析

病理学特征	n	BANCR 表达[n(%)]		P
		低表达(n=55)	高表达(n=54)	
性别				0.666
男性	80	39(48.8)	41(51.3)	
女性	29	16(55.2)	13(44.8)	
年龄(岁)				0.845
<60	53	29(54.7)	24(45.3)	
≥60	56	26(46.4)	30(53.6)	
肿瘤直径(cm)				0.003
≤5	66	41(62.1)	25(37.9)	
>5	43	14(32.6)	29(67.4)	
实体瘤数量				0.160
单个	72	40(55.6)	32(44.4)	
多个	37	15(40.5)	22(59.5)	
血清 AFP(ug/L)				0.178
<400	48	28(58.3)	20(41.7)	
≥400	61	27(44.3)	34(55.7)	
肝硬化				0.683

续表 1 BANCR 表达与 HCC 患者临床病理学特征关系分析

病理学特征	n	BANCR 表达[n(%)]		P
		低表达(n=55)	高表达(n=54)	
否	35	19(54.3)	16(45.7)	0.001
是	74	36(48.6)	38(51.4)	
静脉侵入				0.001
是	39	11(28.2)	28(71.8)	
否	70	44(62.9)	26(37.1)	0.002
TNM 分期				
I ~ II	51	34(66.7)	17(33.3)	0.007
III	58	21(36.2)	37(63.8)	
肿瘤分级				0.007
G ₁	34	24(70.6)	10(29.4)	
G ₂ + G ₃	75	31(41.3)	44(58.7)	

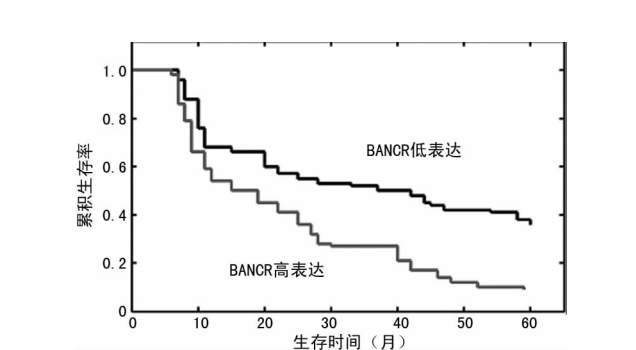


图 2 HCC 患者 BANCR 表达的 Kaplan-Meier 分析

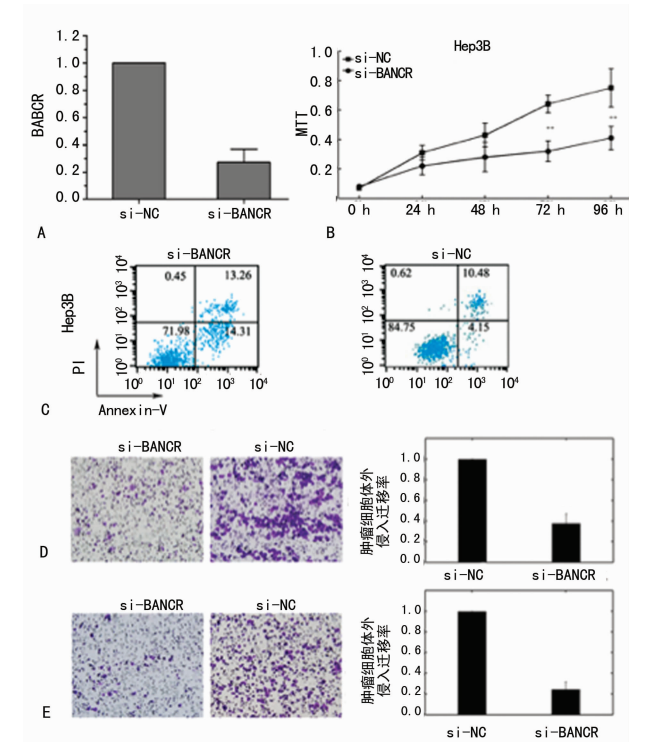
表 2 HCC 患者总生存期相关因素的变量分析

相关因素	单一变量分析		多重变量分析	
	RR	P	RR	P
性别	0.721	0.455	—	—
年龄	0.785	0.323	—	—
肿瘤直径	3.252	0.025	2.655	0.039
实体瘤数量	0.868	0.156	—	—
血清 AFP	0.816	0.194	—	—
肝硬化	0.904	0.092	—	—
肿瘤分级	2.387	0.037	0.795	0.146
TNM 分期	6.225	<0.01	6.379	0.006
静脉侵入	5.153	0.008	3.278	0.022
BANCR 表达	5.983	<0.01	4.245	0.015

—:无数据。

2.4 BANCR 表达下调对 Hep3B 细胞生物学行为影响 本研究进一步探讨 BANCR 表达下调对 Hep3B 细胞生物学行为影响,采用 si-BANCR 转染 Hep3B 细胞。与对照组(Si-NC)相比,BANCR 表达下调能显著抑制 Hep3B 细胞增殖,并能促进细胞凋亡。此外,Hep3B 细胞的侵入和转移能力也显著下降,见图 3。

2.5 BANCR 介导的 EMT 表型分析 Western blot 提示 BANCR 下调导致波形蛋白(Vimentin)表达下调和 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达上调,见图 4。



A: BANCR 表达水平实时定量 PCR 检测;B: Hep3B 细胞 MTT 分析;C: Hep3B 细胞流式分析;D、E: Hep3B 细胞肿瘤细胞体外侵入迁移分析。

图 3 BANCR 表达下调对 Hep3B 细胞生物学行为影响分析

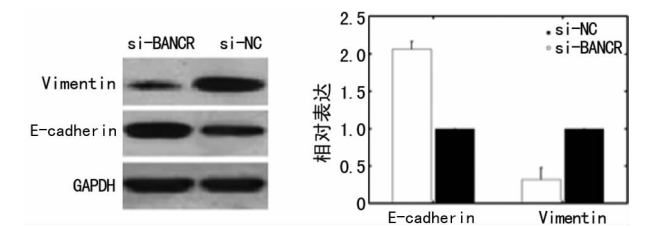


图 4 Western blot 方法检测波形蛋白和 E-cadherin 表达情况

3 讨论

对调节 HCC 形成和发展的新型分子进行鉴定有利于疾病的预防,并对其诊断和治疗具有重要意义,lncRNAs 与肿瘤之间的关系成为当前肿瘤研究的热点领域,目前研究报道了几种 HCC 组织中表达异常的 lncRNAs,例如 HCC 细胞系中 lncRNA AOC4P 过表达可以通过抑制内皮细胞间质化(EMT),进而抑制细胞增殖、迁移和侵入^[10-11]。lncRNA UCA1 在 HCC 组织中表达异常升高,且与患者 TNM 分期、转移和术后生存期密切相关^[12],体内/体外敲除 UCA1 后 HCC 细胞生长均受到抑制。血清 lncRNA-AF085935 可以用于鉴别诊断非乙型肝炎病毒(HBV)感染的 HCC 患者和 HBV 感染的 HCC 患者^[13]。负荷 HCC 肿瘤小鼠注射 lncRNA PTENP1 表达质粒后能有效控制肿瘤生长,抑制瘤内细胞增殖、引发凋亡、自噬和抑制肿瘤的血管生成^[14]。上述研究表明 lncRNAs 在 HCC 的发生和发展中发挥重要作用,且具备较好的临床运用潜力。

本研究中结果表明 HCC 组织和细胞系中 BANCR 表达明显升高,提示 BANCR 过表达与 HCC 的发生密切相关。其次,BANCR 表达增加与患者 HCC 的侵袭性临床病理学特征相关。下调 BANCR 在 Hep3B 细胞中表达水平能降低细胞增

生,促进细胞凋亡和减弱细胞侵袭和转移。这些发现提示 BANCR 可能参与 HCC 发展,可能作为肿瘤治疗的靶分子。最后,本研究发现 BANCR 高表达的 HCC 患者的总生存期显著短于低表达患者。多重变量 Cox 回归分析表明,BANCR 过表达是 HCC 患者疾病预后不良的独立因素。

研究报道表明 BANCR 是多种人类肿瘤的癌基因,BANCR 在人类恶性黑色素瘤组织中表达增加与肿瘤晚期相关,且敲除 BANCR 可以通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径抑制黑色素瘤细胞增殖和迁移^[4,15]。在结直肠癌中 BANCR 过表达与患者肿瘤分期和淋巴结转移密切相关,且可以通过 EMT 机制促进肿瘤细胞转移。与临床非肿瘤组织相比,胃癌组织中 BANCR 表达显著升高,且 BANCR 表达水平与胃癌患者临床分期、肿瘤深度、淋巴结转移、远处转移和预后不良呈正相关^[9]。体外研究表明,BANCR 可以调节视网膜母细胞瘤细胞增殖、迁移和侵入,且 BANCR 过表达与肿瘤直径、脉络膜侵入和视神经侵入密切相关^[6]。

EMT 是原位肿瘤细胞获得迁移能力的关键步骤^[16],Vimentin 上调和 E-cadherin 下调与 HCC 发展相关^[17-18],越来越多研究证实 lncRNAs,包括 BANCR,可能参与 EMT 途径的调节^[10,11,19,20]。本研究中 BANCR 表达下调后导致 Vimentin 下调和 E-cadherin 上调,提示 BANCR 可能参与 HCC 的 EMT 调节,进而为 BANCR 相关的细胞高转移倾向提供了合理的解释。

总之,本研究证实 HCC 组织和细胞系中 BANCR 表达上调,且其过表达与肿瘤发展和预后不良密切相关,调控 HCC 细胞系中 BANCR 表达会影响细胞的生物学特性。上述结果提示 BANCR 可能是参与 HCC 发生和发展的癌基因,可以作为 HCC 预后的新型标志物和潜在的治疗靶分子。

参考文献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Cartularo L, Laulicht F, Sun H, et al. Gene expression and pathway analysis of human hepatocellular carcinoma cells treated with Cadmium[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 288(3): 399-408.
- [3] Li QF, Li QY, Gao AR, et al. Correlation between promoter methylation in the GSTP1 gene and hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 6762-6772.
- [4] Flockhart RJ, Webster DE, Qu K, et al. BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCR to regulate melanoma cell migration[J]. *Genome Res*, 2012, 22(6): 1006-1014.
- [5] Wang Y, Guo Q, Zhao Y, et al. BRAF-activated long non-coding RNA contributes to cell proliferation and activates autophagy in papillary thyroid carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(5): 1947-1952.
- [6] Su S, Gao J, Wang T, et al. Long non-coding RNA BANCR regulates growth and metastasis and is associated with poor prognosis in retinoblastoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(9): 7205-7211.
- [7] Sun M, Liu XH, Wang KM, et al. Downregulation of BRAF activated non-coding RNA is associated with poor prognosis for non-small cell lung cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition[J]. *Mol Cancer*, 2014(13): 68.
- [8] Jiang W, Zhang D, Xu B, et al. Long non-coding RNA BANCR promotes proliferation and migration of lung carcinoma via MAPK pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015(69): 90-95.
- [9] Li L, Zhang L, Zhang Y, et al. Increased expression of LncRNA BANCR is associated with clinical progression and poor prognosis in gastric cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015(72): 109-112.
- [10] Guo Q, Zhao Y, Chen J, et al. BRAF-activated long non-coding RNA contributes to colorectal cancer migration by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2): 869-875.
- [11] Wang TH, Lin YS, Chen Y, et al. Long non-coding RNA AOC4P suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by enhancing vimentin degradation and inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23342-23357.
- [12] Wang F, Ying HQ, He BS, et al. Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of hepatocellular carcinoma through inhibition of miR-216b and activation of FGFR1/ERK signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 7899-7917.
- [13] Lu J, Xie F, Geng L, et al. Investigation of serum lncRNA-uc003wbd and lncRNA-AF085935 expression profile in patients with hepatocellular carcinoma and HBV [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3231-3236.
- [14] Chen CL, Tseng YW, Wu JC, et al. Suppression of hepatocellular carcinoma by baculovirus-mediated expression of long non-coding RNA PTENP1 and microRNA regulation[J]. *Biomaterials*, 2015(44): 71-81.
- [15] Li R, Zhang L, Jia L, et al. Long non-coding RNA BANCR promotes proliferation in malignant melanoma by regulating MAPK pathway activation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100893.
- [16] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-Mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- [17] Chen J, Zhao J, Ma R, et al. Prognostic significance of E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103952.
- [18] Hu L, Lau SH, Tzang CH, et al. Association of vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis [J]. *Oncogene*, 2004, 23(1): 298-302.
- [19] Wu ZH, Wang XL, Tang HM, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is a powerful predictor of metastasis and poor prognosis and is associated with epithelial-mesenchymal transition in colon cancer[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(1): 395-402.
- [20] Zhou X, Liu S, Cai G, et al. Long non coding RNAMAL-AT1 promotes tumor growth and metastasis by inducing epithelial mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2015: 15972.