

· 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, 采用四甲基噻唑蓝(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显示提示 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, 甲状腺乳头状瘤^[5]、视网膜母细胞瘤^[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-TRAmx 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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 采用四甲基噻唑蓝(MTT)方法进行细胞增殖分析, 步骤如下: 铺 96 孔板, 每孔细胞 1×10^3 , 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 1×10^5 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。

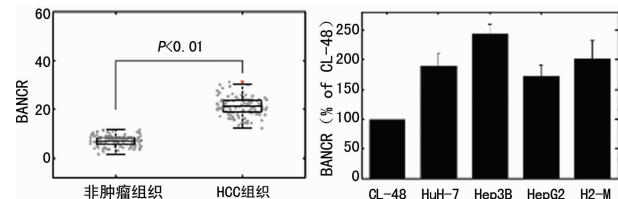
1.2.5 Western blot 分析 采用含蛋白酶的 RIPA 溶液裂解细胞, 并抑制内源性磷酸酶活性, 采用 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳后转印蛋白至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 常规封闭后, 孵育一抗(Cell signal, 美国), 之后采用 H 辣根过氧化酶(HRP)标记的二抗进行孵育, 加入电化学发光(ECL) Plus 进行发光, GAPDH 作为内参蛋白。

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 $\alpha=0.05$, 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 表达与 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	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)	
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)	
TNM分期				0.002
I~II	51	34(66.7)	17(33.3)	
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)	

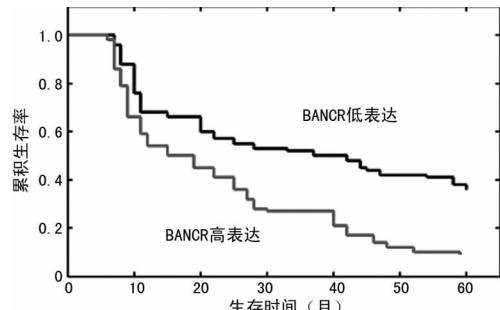


图2 HCC患者BANCR表达的Kaplan-Meier分析

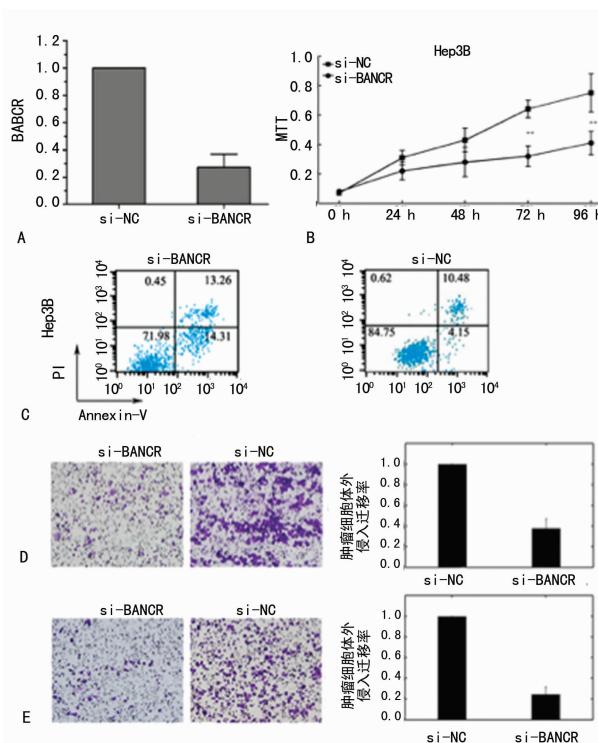
表2 HCC患者总生存期相关因素的变量分析

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

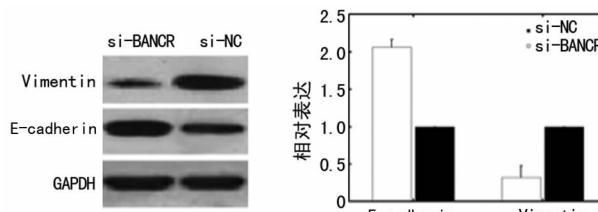


图4 Western blot方法检测波形蛋白和E-cadherin表达情况

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),进而抑制细胞增生、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。

据报道 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^[5]。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.