

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.23.001
网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201111.0943.002.html(2020-11-11)

长链非编码 DSCAM-AS1 在宫颈癌细胞侵袭和转移中的机制研究^{*}

魏 晶,高玉华[△],李 卓,贾海清,张 新
(中国医科大学肿瘤医院/辽宁省肿瘤医院妇科,沈阳 110042)

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 DSCAM-AS1(lncRNA DSCAM-AS1)对宫颈癌(CC)侵袭、转移能力的影响,并探讨其机制。**方法** 采用实时荧光聚合酶链反应法(RT-PCR)检测人正常宫颈上皮细胞和人 CC 细胞株中 lncRNA DSCAM-AS1 和 ELAVL1 的表达情况;在 CC 细胞中抑制 lncRNA DSCAM-AS1 表达后,RT-PCR 检测 lncRNA DSCAM-AS1 的表达变化;在 CC 细胞中敲降 lncRNA DSCAM-AS1 后,再过表达 ELAVL1,应用 Transwell 和划痕实验检测 CC 细胞侵袭、转移能力的改变。**结果** 与人正常宫颈上皮细胞相比,CC 细胞中 lncRNA DSCAM-AS1 和 ELAVL1 的表达水平均明显升高($P<0.05$);抑制 lncRNA DSCAM-AS1 表达后,CC 细胞中 ELAVL1 表达下调;CC 细胞中敲降 lncRNA DSCAM-AS1 后,细胞侵袭、转移能力明显减弱($P<0.05$),而再过表达 ELAVL1 后侵袭、转移能力部分恢复($P<0.05$)。**结论** lncRNA DSCAM-AS1 可通过调控 ELAVL1 的表达促进 CC 细胞的侵袭、转移。

[关键词] 宫颈肿瘤;RNA,长链非编;肿瘤浸润;肿瘤转移
[中图法分类号] R73-37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)23-3865-06

Mechanism research of long non-coding DSCAM-AS1 on invasion and metastasis of cervical cancer^{*}

WEI Jing,GAO Yuhua[△],LI Zhuo,JIA Haiqing,ZHANG Xin
(Department of Gynecology,China Medical University/Liaoning
Cancer Hospital,Shenyang,Liaoning 110042,China)

[Abstract] **Objective** To research the effect and mechanism of long non-coding DSCAM-AS1 (lncRNA DSCAM-AS1) in invasive and metastasis of cervical cancer (CC). **Methods** The expressions of lncRNA DSCAM-AS1 and ELAVL1 in normal cervical epithelial cells and CC cells were detected by real-time fluorescent polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of lncRNA DSCAM-AS1 in CC cells were examined by RT-PCR after lncRNA DSCAM-AS1 knockdown. The abilities of invasive and metastasis in CC cells were examined by Scrape and Transwell assay after lncRNA DSCAM-AS1 knockdown and ELAVL1 overexpression. **Results** The expression levels of lncRNA DSCAM-AS1 and ELAVL1 in CC cells were significantly increased as compared with those in normal cervical epithelial cells ($P<0.05$). Transfection with siRNA of lncRNA DSCAM-AS1 down-regulated the ELAVL1 expression in CC cells ($P<0.05$). In CC cells, the abilities of invasive and metastasis were significantly reduced after lncRNA DSCAM-AS1 knockdown ($P<0.05$), and then reversed after ELAVL1 overexpression ($P<0.05$). **Conclusion** lncRNA DSCAM-AS1 can promote the invasion and metastasis of CC cells by up-regulating the expression of ELAVL1.

[Key words] uterine cervical neoplasms;RNA,long noncoding;neoplasm invasiveness;neoplasm metastasis

在亚洲,宫颈癌(cervical cancer,CC)是仅次于乳腺癌的女性最致命的恶性肿瘤^[1]。据统计,2012 年

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81972791)。 作者简介:魏晶(1984—),主治医师,博士,主要从事妇科肿瘤分子机制研究。 [△] 通信作者,E-mail:gaoyuhua@cancerhosp-ln-cmu.org。

CC 约有 527 600 例新确诊病例, 当年死亡 265 700 例^[2]。低收入和中等收入国家的女性具有更高的患病率^[2-3]。持续高危人乳头瘤病毒(human papilloma-virus, HPV)感染是 CC 的一个主要致病因素, 约超过 95% 的 CC 患者 HPV 阳性^[4]。从 HPV 感染、宫颈上皮内瘤变、原位癌到浸润癌远处转移, CC 发病过程复杂, 伴多步骤、多基因表达调控异常。而这一过程往往涉及多种编码和非编码基因的表达失调^[5-7]。虽然综合治疗提高了 CC 的临床治疗效果, 但晚期 CC 的预后仍有待提高。因此, 更好地了解 CC 侵袭、转移的分子机制将为 CC 患者提供更有效的治疗。

长链非编码 RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)是一类长度超过 200 个核苷酸的转录产物, 其特征是通过表观遗传、转录和转录后的调节发挥作用, 诱导肿瘤的发生、发展^[8-9]。ZHANG 等^[10]研究发现, MALAT1 在肾癌中的过表达与肿瘤进展和预后不良密切相关; LI 等^[11]发现 lncRNA HOTTIP 通过作用于 Wnt/ β -catenin 通路, 诱导骨肉瘤细胞的化疗耐药; HE 等^[12]发现 lncRNA ABHD11-AS1 通过竞争性内源性 RNA 机制调控 Wnt11 表达, 促进结直肠癌进展。但是目前, lncRNAs 在 CC 中的作用及其机制尚不清楚。

本研究发现长链非编码 DSCAM-AS1 (lncRNA DSCAM-AS1) 在 CC 细胞中过表达, 探讨其在 CC 细胞侵袭、转移中的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及细胞株

CC 细胞系(SiHa、HeLa、CaSki、C-33A)和正常宫颈细胞株 Ect1/E6E7 均取自辽宁省肿瘤医院中心实验室。lncRNA DSCAM-AS1 基因敲降的 siRNA 慢病毒和对照病毒及 ELAVL1 过表达质粒(上海吉凯基因化学技术有限公司)。PCR 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司], SYRB Green 染料及逆转录试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 定量引物(上海吉凯基因化学技术有限公司)。Transwell 小室(美国 Corning 公司), 稀释基质胶(美国 BD 公司), Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司), 实时定量荧光 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

于 DMEM 培养基中添加 1% 青霉素、链霉素双抗体和 10% 胎牛血清, 常规置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中, 每隔 2~3 d 传代 1 次, 直到细胞达到对数生长期。

1.2.2 实时荧光聚合酶链反应法(RT-PCR)

RT-PCR 检测 lncRNA DSCAM-AS1 在细胞及组织中的表达, 采用 TRIzol 法提取病理标本和细胞中的总 RNA, 检测 RNA 的纯度及浓度。逆转录和 PCR 反应均严格按照 TAKARA 公司说明书进行, 以 U6 作为内参进行相对定量, 每组设 3 个复孔, 在实时定量荧光 PCR 仪上进行检测。lncRNA DSCAM-AS1 的上游引物序列为 5'- ACCACAACAACAA-CAACAG-3', 下游引物序列为 5'- ATGATGAGAC-CAGAACTTCC-3'; ELAVL1 的上游引物序列为 5'- TGAATGAGAAGTGAGAAGGT-3', 下游引物序列为 5'- TGTTGAAGCGGTTGAGAA-3'; U6 的上游引物序列为 5'-TTATGGGTCCTAGCCTGAC-3', 下游引物序列为 5'-CACTATTGCGGGCTGC-3'。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算两者的相对表达量, $\Delta C_t = C_{t\text{lncRNA DSCAM-AS1}} - C_{t\text{U6}}$ 。

1.2.3 细胞转染

依据基因转染操作手册, 采用 Lipofectamine 2000 将过表达和沉默载体转染进入细胞。转染 48 h 后, 观察细胞生长情况, 收集细胞用于进一步研究。

1.2.4 Transwell 实验

37 °C 无菌条件下, 50 μg ECM 胶加入 8 μm 孔径的 Transwell 小室, 放置 6 h 进行包被; ECM 胶充分凝固后, 于上室加入培养基(不含抗生素及血清), 接种细胞 2×10^5 /孔, 于下室加入含 10% 血清的培养基(无抗生素); 培养 24 h 后取出小室, 无菌棉签擦拭去除上室内的细胞, 1% 结晶紫染液对小室多孔膜下表面的细胞染色, 分别拍照, 计数。紫色染色的细胞穿膜越多, 代表侵袭能力越强。

1.2.5 划痕实验

细胞接种于 6 孔板, 垂直于孔板采用 100 μL 枪头制作细胞划痕, 确保各个划痕宽度基本一致。去除培养液, PBS 冲洗孔板, 去除细胞碎片。加入培养基(不含血清), 拍照记录。培养板置入培养箱 24 h 后, 再分别拍照记录, 计算划痕愈合程度百分比。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素 ANOVA 和独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA DSCAM-AS1 和 ELAVL1 在不同细胞中的表达

RT-PCR 结果显示, lncRNA DSCAM-AS1 在 CC 细胞系 SiHa、HeLa、CaSki、C-33A 的表达水平分别为 2.52 ± 0.21 、 2.40 ± 0.24 、 3.00 ± 0.31 、 2.44 ± 0.30 , 较正常宫颈细胞株 Ect1/E6E7 中的 lncRNA

DSCAM-AS1 的表达水平(1.00 ± 0.15)明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。应用 starbase 3.0(<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 数据库对 lncRNA DSCAM-AS1 的靶基因进行预测,发现 lncRNA DSCAM-AS1 可能同 ELAVL1 存在调控关系,于是检测了 ELAVL1 的表达情况。ELAVL1 在 SiHa、HeLa、CaSki、C-33A 中的表达水平分别为 2.58 ± 0.28 、 2.76 ± 0.38 、 3.41 ± 0.39 、 3.10 ± 0.30 ,高于在 Ect1/E6E7 中的表达水平(1.00 ± 0.20),差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

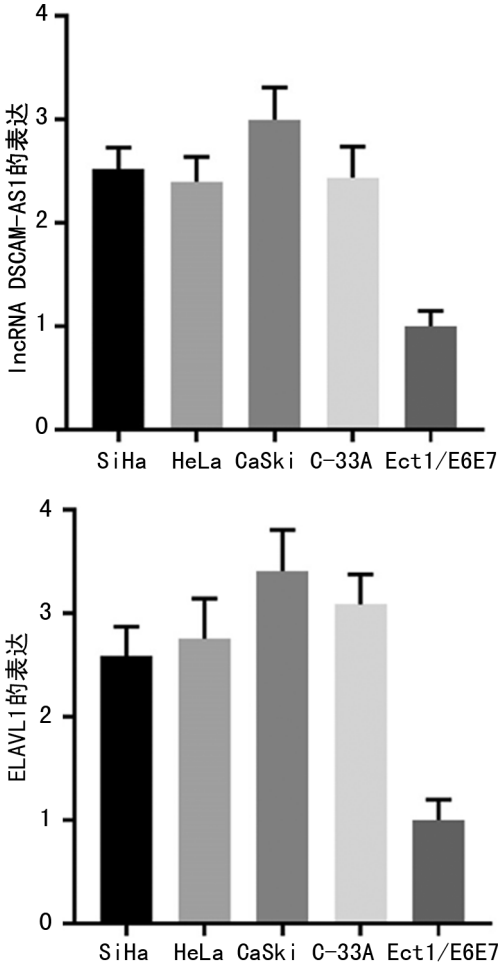


图 1 lncRNA DSCAM-AS1 和 ELAVL1 在不同细胞中的表达情况

2.2 下调 lncRNA DSCAM-AS1 对 ELAVL1 表达的影响

将 lncRNA DSCAM-AS1 的两条 siRNA 分别转染进入 CC 细胞系,RT-PCR 显示 SiHa 和 CaSki 中 lncRNA DSCAM-AS1 表达水平均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。在 CC 细胞系中沉默 lncRNA DSCAM-AS1 后,ELAVL1 的表达量也随之下降低($P<0.05$)。其中第一条序列 (si-lncRNA DSCAM-AS1 #1) 具有更好的沉默效能,用于后续表型实验,见图 2。

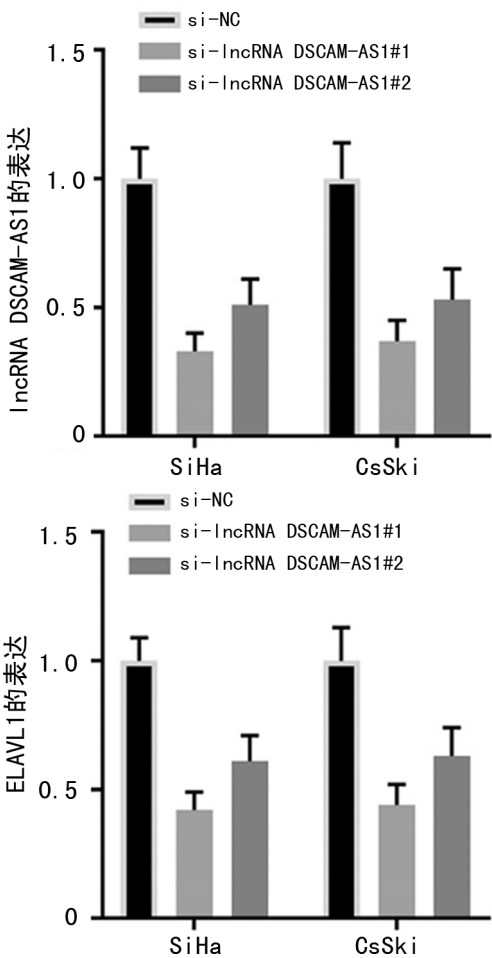


图 2 CC 细胞转染 si-lncRNA DSCAM-AS1 后 lncRNA DSCAM-AS1 和 ELAVL1 表达情况

2.3 lncRNA DSCAM-AS1 和 ELAVL1 对 CC 细胞侵袭、转移能力的影响

在 Transwell 实验中,将 si-lncRNA DSCAM-AS1 #1 序列转染 SiHa 细胞后,细胞侵袭数量由 (161 ± 16) 个降至 (92 ± 8) 个。在此基础上过表达 ELAVL1,被抑制细胞的侵袭能力部分恢复,侵袭细胞数量为 (138 ± 11) 个 ($P<0.05$)。同样将 si-lncRNA DSCAM-AS1 #1 序列转染 CaSki 细胞后也得到了相似的结果:si-lncRNA DSCAM-AS1 #1 可以抑制细胞的侵袭能力,而 ELAVL1 可以将其部分恢复 ($P<0.05$),见图 3。将 si-lncRNA DSCAM-AS1 #1 序列转染入 SiHa 细胞,细胞运动距离由 (11.07 ± 0.39) μm 降至 (6.34 ± 0.20) μm ,残余划痕由 52.8% 变为 72.6%。在此基础上过表达 ELAVL1,被抑制的细胞运动能力部分恢复,细胞运动距离为 (9.15 ± 0.22) μm ,残余划痕为 61.3% ($P<0.05$)。同样将 si-lncRNA DSCAM-AS1 #1 序列转染 CaSki 细胞后也得到了相似的结果:si-lncRNA DSCAM-AS1 #1 可以抑制细胞的运动能力,而 ELAVL1 可以将其部分恢复 ($P<0.05$),见图 4。

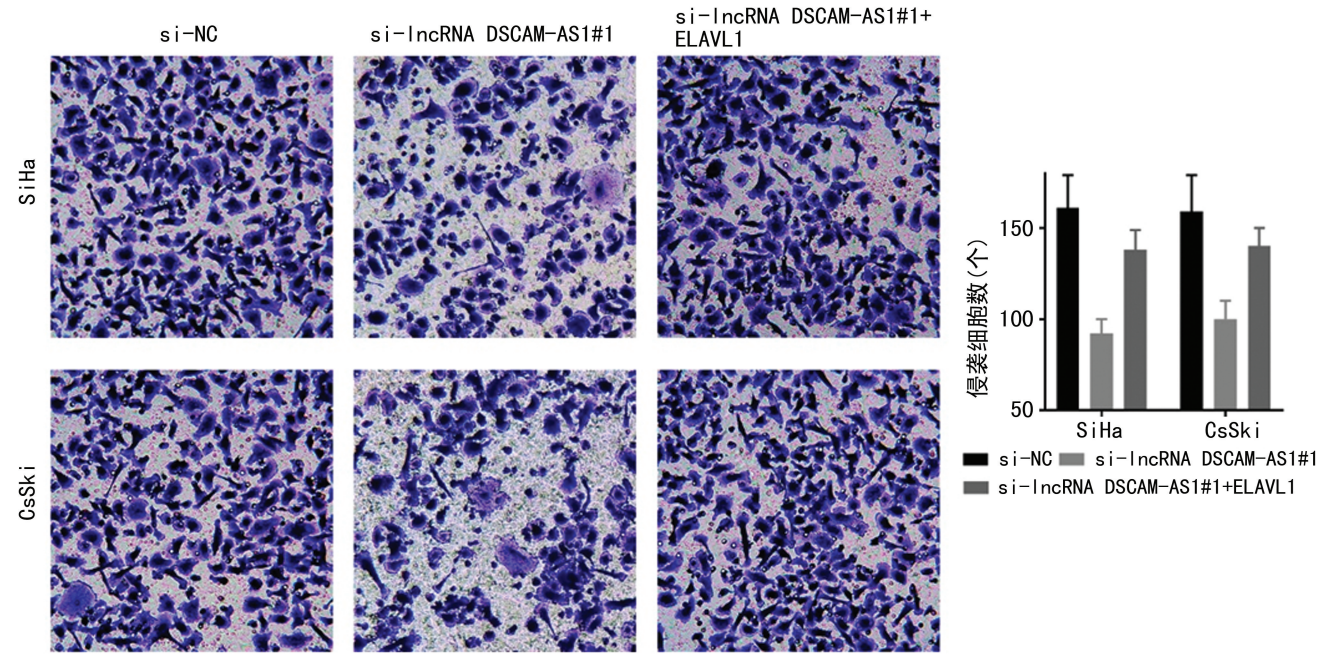


图 3 Transwell 实验 (×20)

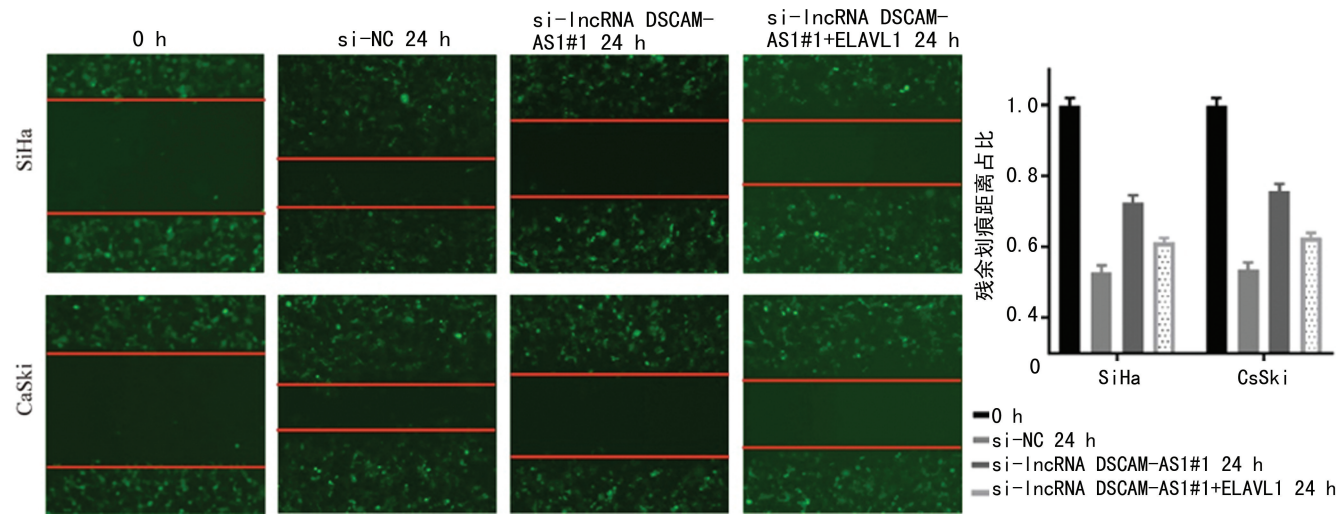


图 4 划痕实验 (×20)

3 讨 论

虽然相关研究在不断深入,但 CC 发病过程中的分子调控机制仍是一大挑战。肿瘤的侵袭、转移过程十分复杂:肿瘤细胞从原发灶脱离,提高脉管系统的渗透性而进入血管或淋巴管,形成循环肿瘤细胞,经由循环系统播散到远处,从血管中溢出形成预转移小巢,在合适条件下最终形成远处转移灶。转移是造成癌症患者死亡的最主要原因^[13]。

随着高通量测序技术准确性的不断提高,曾经作为转录“暗物质”的 lncRNAs 在生物领域的重要性越来越受到科研工作者的重视。大量致力于 lncRNAs 如何参与调控肿瘤发生、发展的研究已成为热点。相关研究认为 lncRNAs 具有促进 CC 生长的作用,如: lncRNA SOX21-AS1 通过吸附 miRNA-7 靶向调控

VDAC1 来促进 CC 的生长^[14]; lncRNA SBF2-AS1 通过 miR-361-5p/FOXO1 轴参与 CC 的发展^[14]; lncRNA CASC15 在 CC 组织中过表达提示预后不良^[15]。

lncRNA DSCAM-AS1 在肿瘤中的致癌作用首先由 NIKNAFS 等^[16]发现并报道:在乳腺癌中 lncRNA DSCAM-AS1 是雌激素受体相关 lncRNAs,它与 hnRNPL 相互作用参与乳腺癌的发生、发展,介导他莫昔芬治疗耐药。之后,有研究分别通过生物信息学分析及实验验证也补充证明了 lncRNA DSCAM-AS1 在乳腺癌中表达异常,能够促进其异常增殖和逃避凋亡^[17],并通过参与细胞周期调控,影响乳腺癌患者的预后^[18]。LIAO 等^[19]对 lncRNA DSCAM-AS1 在非小细胞肺癌中的致癌作用进行了报道, lncRNA

DSCAM-AS1 通过上调 BCL11A 表达,促进其侵袭、转移。lncRNA DSCAM-AS1 也可以通过内源性竞争 RNA 机制参与在黑色素瘤、肝癌和结肠癌的发生、发展^[20-22]。而 LI 等^[23]的研究结果提示 lncRNA DSCAM-AS1 可通过上调 SOX4 参与卵巢癌的侵袭、转移。lncRNA DSCAM-AS1 在宫颈癌中的生物学作用,由 LIANG 等^[24]在 2020 年报道:CC 细胞中 lncRNA DSCAM-AS1 的表达明显上调,抑制 lncRNA DSCAM-AS1 的表达可以阻止细胞的生长、侵袭和迁移,提示 lncRNA DSCAM-AS1 对 CC 的发展具有促进作用。结合上述研究,不难发现 lncRNA DSCAM-AS1 在多种恶性肿瘤中发挥促癌作用,但是其在乳腺癌、卵巢癌和宫颈癌这三大女性恶性肿瘤中均呈过表达,其重要的临床意义需引起高度重视。

本研究发现,lncRNA DSCAM-AS1 在 CC 细胞中过表达。通过生物信息系预测,发现 lncRNA DSCAM-AS1 可与 ELAVL1 存在互作。ELAVL1 也被称为 HuR,在多种恶性肿瘤发生、发展过程中与 lncRNAs 存在相互作用。lncRNA B4GALT1-AS1 通过与 ELAVL1 相互作用,诱导 YAP 转录活性,调控 Hippo 通路的激活,促进骨肉瘤细胞的干细胞分化和迁移^[25];lncRNA EGFR-AS1 通过招募 ELAVL1 介导 EGFR mRNA 的稳定性,促进肾癌细胞的生长和转移^[26]。但是,ELAVL1 结合 lncRNA DSCAM-AS1 是否影响 CC 的发展尚不清楚。本研究显示,ELAVL1 在 CC 细胞中的表达受 lncRNA DSCAM-AS1 影响:抑制 lncRNA DSCAM-AS1 的表达后,ELAVL1 的表达也随之下降,提示 lncRNA DSCAM-AS1 可能在转录水平对 ELAVL1 的表达产生影响。随后的表型实验发现,抑制 lncRNA DSCAM-AS1 表达后,CC 细胞的侵袭、转移能力明显下调;而再过表达 ELAVL1,CC 细胞的侵袭、转移能力得到恢复。这说明 lncRNA DSCAM-AS1 对 CC 细胞侵袭、转移的促进作用是通过 ELAVL1 实现的。

综上所述,lncRNA DSCAM-AS1 在 CC 细胞中过表达,促进 CC 细胞的侵袭、转移。其机制上可能是 lncRNA DSCAM-AS1 通过促进 ELAVL1 的表达实现的。但其具体分子结合位点及转录调控机制,仍需在后续研究中进一步探讨。

参考文献

[1] VACCARELLA S, LAVERSANNE M, FERLAY J, et al. Cervical cancer in Africa, Latin America and the Caribbean and Asia: regional in-

equalities and changing trends[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(10):1997-2001.

- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1):7-34.
- [3] GINSBURG O, BRAY F, COLEMAN M P, et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health[J]. *Lancet*, 2017, 389(10171):847-860.
- [4] WALBOOMERS J M, JACOBS M V, MANOS M M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. *J Pathol*, 1999, 189(1):12-19.
- [5] CHEN X, QU J. Long non-coding RNA MEG3 suppresses survival, migration, and invasion of cervical cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:4999-5007.
- [6] QIAN L, XU F, WANG X, et al. LncRNA expression profile of DeltaNp63alpha in cervical squamous cancers and its suppressive effects on LIF expression[J]. *Cytokine*, 2017, 96: 114-122.
- [7] SHANG A, ZHOU C, BIAN G, et al. miR-381-3p restrains cervical cancer progression by downregulating FGF7 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(1):778-789.
- [8] MORRIS K V, MATTICK J S. The rise of regulatory RNA[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(6):423-437.
- [9] FATICA A, BOZZONI I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(1):7-21.
- [10] ZHANG H M, YANG F Q, CHEN S J, et al. Upregulation of long non-coding RNA MALAT1 correlates with tumor progression and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4):2947-2955.
- [11] LI Z, ZHAO L, WANG Q. Overexpression of long non-coding RNA HOTTIP increases chemoresistance of osteosarcoma cell by activating the Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(5):2385-2393.
- [12] HE D, YUE Z, LIU L, et al. Long noncoding RNA ABHD11-AS1 promote cells proliferation and invasion of colorectal cancer via regulating

- the miR-1254-WNT11 pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):12070-12079.
- [13] MCALLISTER S S, WEINBERG R A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(8):717-727.
- [14] ZHANG X Y, ZHAO X L, YAN L, et al. Long noncoding RNA SOX21-AS1 promotes cervical cancer progression by competitively sponging miR-7/VDAC1 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10):17494-17504.
- [15] SHAN S, LI H F, YANG X Y, et al. Higher lncRNA CASC15 expression predicts poor prognosis and associates with tumor growth in cervical cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(2):507-512.
- [16] NIKNAFS Y S, HAN S M, MA T, et al. The lncRNA landscape of breast cancer reveals a role for DSCAM-AS1 in breast cancer progression[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:12791.
- [17] XU S, KONG D, CHEN Q, et al. Oncogenic long noncoding RNA landscape in breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):129.
- [18] SUN W, LI A Q, ZHOU P, et al. DSCAM-AS1 regulates the G1/S cell cycle transition and is an Independent prognostic factor of poor survival in luminal breast cancer patients treated with endocrine therapy[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(12):6137-6146.
- [19] LIAO J, XIE N. Long noncoding RNA DSCAM-AS1 functions as an oncogene in non-small cell lung cancer by targeting BCL11A [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3):1087-1092.
- [20] HUANG Y L, XU Q, WANG X. Long noncoding RNA DSCAM-AS1 is associated with poor clinical prognosis and contributes to melanoma development by sponging miR-136[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7):2888-2897.
- [21] JI D, HU G, ZHANG X, et al. Long non-coding RNA DSCAM-AS1 accelerates the progression of hepatocellular carcinoma via sponging miR-338-3p[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7):4290-4302.
- [22] LIU F, JIA J, SUN L, et al. lncRNA DSCAM-AS1 downregulates miR-216b to promote the migration and invasion of colorectal adenocarcinoma cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:6789-6795.
- [23] LI Y, HAO J, JIANG Y M, et al. Long non-coding RNA DSCAM-AS1 indicates a poor prognosis and modulates cell proliferation, migration and invasion in ovarian cancer via up-regulating SOX4[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10):4143-4148.
- [24] LIANG J, ZHANG S, WANG W, et al. Long non-coding RNA DSCAM-AS1 contributes to the tumorigenesis of cervical cancer by targeting miR-877-5p/ATXN7L3 axis [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(1):BSR20192061.
- [25] LI Z, WANG Y, HU R, et al. lncRNA B4GALT1-AS1 recruits HuR to promote osteosarcoma cells stemness and migration via enhancing YAP transcriptional activity[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(6):e12504.
- [26] WANG A, BAO Y, WU Z, et al. Long noncoding RNA EGFR-AS1 promotes cell growth and metastasis via affecting HuR mediated mRNA stability of EGFR in renal cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3):154.

(收稿日期:2020-03-18 修回日期:2020-08-16)