

长链非编码 RNA LYPLAL1-AS1 对神经胶质瘤细胞侵袭和迁移能力影响的研究

姚琼 吴国飘 叶红于 庄才翔 林一均 邹诣 郑炎焱

【摘要】目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA) LYPLAL1-AS1 影响神经胶质瘤细胞侵袭和迁移能力的影响。**方法** 选取正常星形胶质细胞、神经胶质瘤细胞 U87 和 U251 这 3 组和 LYPLAL1-AS1-OE U87 细胞、OEC U87 细胞、LYPLAL1-AS1-OE U251 细胞和 OEC U251 细胞这 4 组行培养、消化和传代,通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR),对 LYPLAL1-AS1 的表达水平进行检测。利用 Transwell 侵袭和迁移实验观测 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、OEC U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组和 OEC U251 组这 4 组细胞侵袭和迁移能力。对 4 组裸鼠原位接种 4 组细胞(LYPLAL1-AS1-OE U87 组、OEC U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组和 OEC U251 组),分别于第 14 天和第 28 天观测裸鼠颅内肿瘤生长情况、检测相对荧光强度。**结果** U87 组和 U251 组 LYPLAL1-AS1 表达水平均低于正常星形胶质细胞组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。LYPLAL1-AS1-OE U87 组和 LYPLAL1-AS1-OE U251 组侵袭、迁移的细胞数量均少于 OEC U87 组和 OEC U251 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。第 28 天 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组裸鼠颅内肿瘤细胞相对荧光强度均低于 OEC U87 组、OEC U251 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。**结论** LYPLAL1-AS1 在神经胶质瘤细胞中呈低表达,可抑制神经胶质瘤细胞的侵袭和迁移并抑制裸鼠颅内肿瘤的生长,可能是神经胶质瘤防治的潜在靶点。

【关键词】 lncRNA LYPLAL1-AS1 侵袭 迁移 神经胶质瘤

Effect of lncRNA LYPLAL1-AS1 on migration and invasion of glioma cells

YAO Qiong, WU Guopiao, YE Hongyu, ZHUANG Caixiang, LIN Yijun, ZOU Yi, ZHENG Yanyan

Authors' address: Department of Neurology, Wenzhou Third Clinical Institute Affiliated to Wenzhou Medical University (Wenzhou People's Hospital), Wenzhou 325000, China

Corresponding author: ZHENG Yanyan, E-mail: yying33171@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA) LYPLAL1-AS1 on migration and invasion of glioma cells. **Methods** Three groups named normal astrocytes, glioma cells U87 and U251, and four groups named LYPLAL1-AS1-OE U87 cells, OEC U87 cells, LYPLAL1-AS1-OE U251 cells and OEC U251 cells were selected for culture, digestion and passage. The expression level of LYPLAL1-AS1 was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The cells' invasion and migration ability of LYPLAL1-AS1-OE U87 group, OEC U87 group, LYPLAL1-AS1-OE U251 group and OEC U251 group were observed by Transwell assay. Four groups of nude mice (LYPLAL1-AS1-OE U87 group, OEC U87 group, LYPLAL1-AS1-OE U251 group and OEC U251 group) were inoculated orthotopically. Intracranial tumor growth and relative fluorescence intensity were observed on the 14th day and 28th day, respectively. **Results** The expression of LYPLAL1-AS1 was lower in glioma U87 and U251 cells than that in normal astrocytes. the differences were statistically significant ($P < 0.01$). The number of invasion and migration cells in LYPLAL1-AS1-OE U87 and LYPLAL1-AS1-OE U251 groups were less than those in OEC U87 and OEC U251 groups, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). On day 28, the

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2022.44.18.2021-1064

基金项目:温州市基础性科研项目(Y2020219)

作者单位:325000 温州医科大学温州市第三临床学院(温州市人民医院)神经内科

通信作者:郑炎焱, E-mail: yying33171@163.com

relative fluorescence intensity of intracranial tumor cells in LYPLAL1-AS1-OE U87 and LYPLAL1-AS1-OE U251 groups was lower than that in OEC U87 and OEC U251 groups, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** LYPLAL1-AS1 has low expression in glioma cells, which can inhibit the invasion and metastasis of glioma cells and inhibit the growth of intracranial tumors in nude mice. It may be a potential target for the prevention and treatment of glioma.

【Key words】 LncRNA LYPLAL1-AS1 Invasion Migration Glioma

神经胶质瘤是中枢神经系统常见的原发性肿瘤。高级别神经胶质瘤细胞生长迅速、预后差,多数患者在确诊后 1~2 年内死亡^[1]。在诸多肿瘤细胞侵袭和迁移的相关调控分子中,长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是近年来受到人们关注的热点^[2]。对神经胶质瘤组织进行微阵列芯片测序分析发现,在神经胶质瘤组织中 lncRNA LYPLAL1-AS1 表达水平明显低于瘤旁组织,但其生物学功能和作用机制仍不明确。本研究探讨 lncRNA LYPLAL1-AS1 对神经胶质瘤细胞侵袭和迁移能力的影响,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料及分组 正常星形胶质细胞、神经胶质瘤细胞 U87、U251 均购自中国典型培养物保藏中心。携带荧光标记的 LYPLAL1-AS1 高表达慢病毒转染 U87 细胞 (LYPLAL1-AS1-OE U87) 及 U251 细胞 (LYPLAL1-AS1-OE U251)、阴性对照 U87 细胞 (OEC U87) 和 U251 细胞 (OEC U251) 均购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司 (批号: bio-105821、bio-73585、bio-53915、bio-72947)。RPMI1640 细胞培养基和血清购自美国 Gibco 公司 (批号: PM150110)。Trizol 试剂购自美国 ThermoFisher 公司 (批号: 15596026)。Takara 逆转录试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (批号: D6110A)。SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自凯杰生物工程 (深圳) 有限公司 (批号: 218073)。Matrigel 基质胶和 Transwell 小室购自美国 Corning 公司 (批号: Matrigel 354234)。引物、LYPLAL1-AS1 全长及突变序列购自广州 RiboBio 公司 (批号: SIGS0015358)。胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司 (批号: MFCD00145904)。

1.2 实验动物及分组 购自上海斯莱克实验动物有限公司的雄性裸鼠, 24 只, 体重 (25.68 ± 1.36) g, 分为 4 组: LYPLAL1-AS1-OE U87 组、OEC U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组和 OEC U251 组。每组 6 只。饲养于 SPF 级动物房, 动物房温度 (22 ± 2) °C, 湿度 50%~70%, 每日白天和黑夜各 12 h, 提供足够的饲料和水。本研究

经医院伦理委员会批准[伦审(2020)第(271)号]。

1.3 细胞培养、消化和传代 将正常星形胶质细胞、神经胶质瘤细胞 U87 和 U251 分别设为正常星形胶质细胞组、U87 组和 U251 组, 在 37 °C、5%CO₂ 的条件下, 使用含 10%FBS 的 RPMI1640 细胞培养基进行培养, 待细胞生长至融合度 70% 左右, 使用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。另将 LYPLAL1-AS1-OE U87、OEC U87、LYPLAL1-AS1-OE U251、OEC U251 细胞设为 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、OEC U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组和 OEC U251 组进行细胞培养、消化和传代, 留作备用。

1.4 LYPLAL1-AS1 表达水平的检测 根据说明书步骤, 利用 TRIzol 试剂从 3 组细胞中分离总 RNA。使用 Takara 的逆转录试剂盒将 RNA 逆转录合成 cDNA, 利用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR), 检测 LYPLAL1-AS1 表达水平。LYPLAL1-AS1 引物序列为: 5'-CTCAC-CAGCTGTGGCCTTTTA-3' 和 5'-CTGCTCCCCCTTTG CATGT-3'; 内参基因 β -actin 引物序列为: 5'-ACC-GAGCGCGCTACAG-3' 和 5'-CTTAATGTCACGCAC-GATTTCC-3'。LYPLAL1-AS1 的相对表达水平 = LYPLAL1-AS1 基因的表达水平 / 内参基因的表达水平。采用上述同样方法检测 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、OEC U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组和 OEC U251 组 4 组细胞中 LYPLAL1-AS1 表达水平。

1.5 细胞侵袭和迁移数量的检测 采用 Transwell 小室法。细胞培养消化后重悬, 计数水平为 2×10^5 个/ml。将 Matrigel 基质胶与无血清培养基按照 1:8 比例混合均匀, 加入 Transwell 小室, 在底部凝固后形成 Matrigel 凝胶层。小室下孔加入 15% FBS RPMI1640 细胞培养基, 小室中加入 200 μ l 无血清的细胞悬液, 设 3 个复孔, 48 h 后采用 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色, 每孔计算 5 个视野中的侵袭细胞数。然后行迁移实验, 实验步骤与侵袭实验基本相同。观测 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、OEC U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组和 OEC U251 组细胞侵袭和迁移数量。

1.6 4组裸鼠颅内肿瘤细胞相对荧光强度检测 将 LYPLAL1-AS1-OE U87、OEC U87、LYPLAL1-AS1-OE U251 和 OEC U251 这 4 组细胞,以 PBS 清洗重悬为 2×10^7 个/ml,接种于 4 组裸鼠。裸鼠麻醉后,将细胞注射至相应组别裸鼠颅内顶枕区,分别于第 14 天和第 28 天采用美国 Perkin Elmer 动物活体成像系统拍摄裸鼠颅内肿瘤生长情况、检测相对荧光强度。

1.7 两组裸鼠颅内肿瘤组织免疫组化的检测 第 40 天取 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、OEC U87 组各 2 只裸鼠,过量吸入乙醚处死,取脑组织于 4% 多聚甲醛固定、脱水、包埋并切片,采用 GFAP 抗体对肿瘤组织进行免疫组化染色,显微镜下放大 100 倍和 400 倍成像,观察肿瘤细胞聚集、组织坏死或血管浸润等情况。

1.8 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间比较采用两独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常星形胶质细胞组、U87 组和 U251 组细胞 LYPLAL1-AS1 表达水平比较 qRT-PCR 结果显示,U87 组和 U251 组 LYPLAL1-AS1 表达水平均低于正常星形胶质细胞组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图 1。

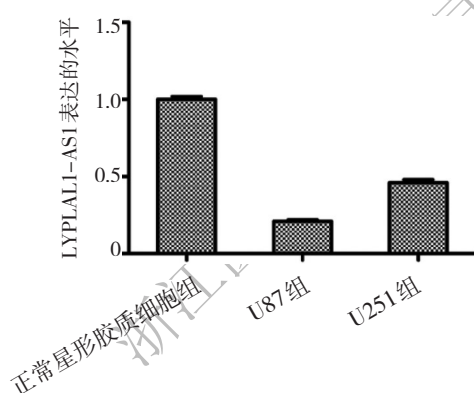


图 1 正常星形胶质细胞组、U87 组和 U251 组中 LYPLAL1-AS1 表达水平的比较

2.2 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、OEC U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组和 OEC U251 组 LYPLAL1-AS1 表达水平比较 qRT-PCR 结果显示,LYPLAL1-AS1-OE U87 组和 LYPLAL1-AS1-OE U251 组 LYPLAL1-AS1 表达水平均高于 OEC U87 组和 OEC U251 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图 2。

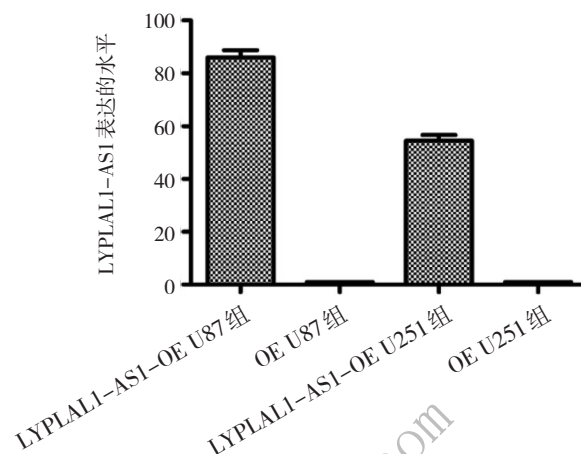


图 2 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、OEC U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组和 OEC U251 组 LYPLAL1-AS1 表达水平比较

2.3 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、OEC U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组和 OEC U251 组细胞侵袭和迁移数量的检测 LYPLAL1-AS1-OE U87 组和 LYPLAL1-AS1-OE U251 组侵袭细胞数量均少于 OEC U87 组和 OEC U251 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。LYPLAL1-AS1-OE U87 组和 LYPLAL1-AS1-OE U251 组细胞迁移细胞数量亦少于 OEC U87 组和 OEC U251 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),见表 1。

表 1 4 组细胞侵袭和迁移数量的比较

组别	侵袭细胞数量 (个/视野)	迁移细胞数量 (个/视野)
LYPLAL1-AS1-OE U87 组	64.00 ± 3.61*	80.00 ± 5.00*
OEC U87 组	402.30 ± 2.52	371.30 ± 3.22
LYPLAL1-AS1-OE U251 组	102.70 ± 2.52 [△]	115.30 ± 5.51 [△]
OEC U251 组	392.00 ± 2.65	380.30 ± 4.51

注:与 OEC U87 组比较,* $P < 0.01$;与 OEC U251 组比较,[△] $P < 0.01$

2.4 4组裸鼠颅内肿瘤细胞相对荧光强度的检测 第 14 天 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组裸鼠颅内肿瘤细胞相对荧光强度与 OEC U87 组、OEC U251 组比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。第 28 天 LYPLAL1-AS1-OE U87 组、LYPLAL1-AS1-OE U251 组裸鼠颅内肿瘤细胞相对荧光强度均低于 OEC U87 组、OEC U251 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图 3。

2.5 两组裸鼠颅内肿瘤组织免疫组化的检测 免疫组化染色显示,OEC U87 组脑组织肿瘤细胞呈长梭形

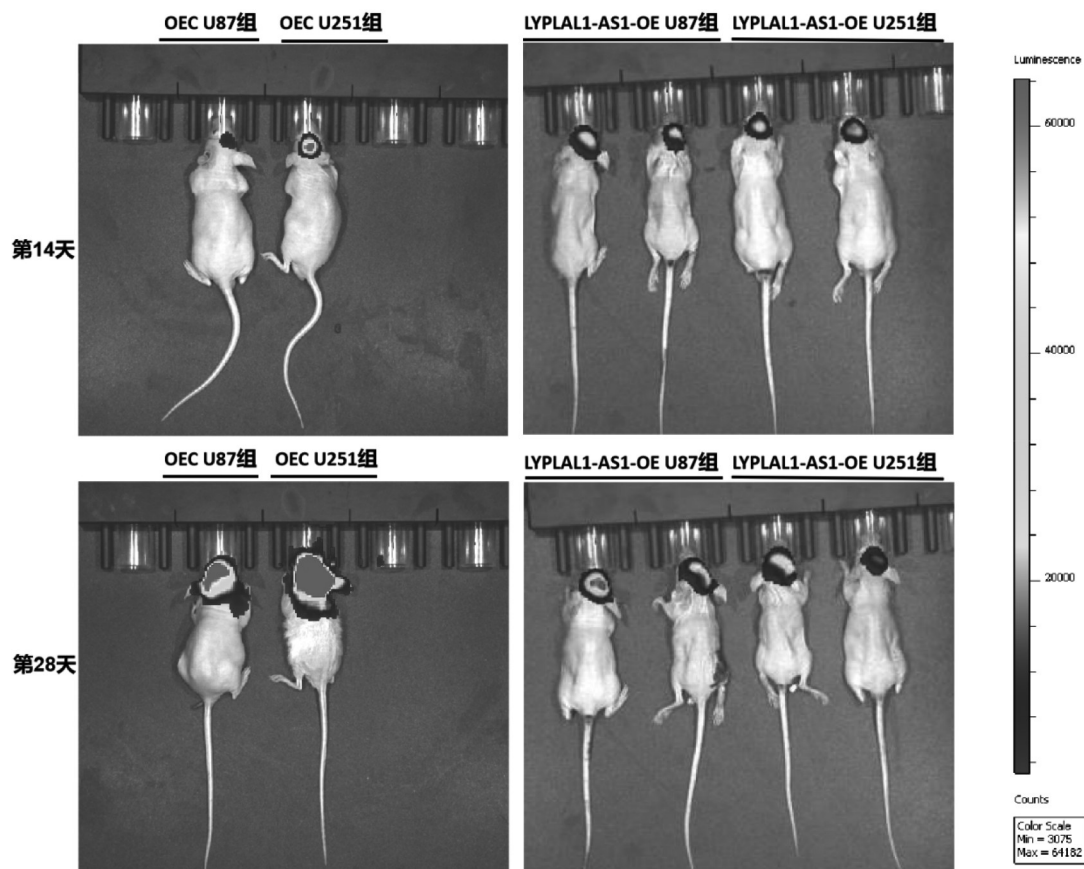


图3 4组裸鼠颅内肿瘤细胞相对荧光强度的检测

或星形,组织内多出现坏死,肿瘤细胞常聚集,生长呈束装或小团块状,且围绕小血管呈局灶性浸润生长,生长活跃。LYPLAL1-AS1-OE U87组肿瘤细胞呈长梭形或圆形,虽能见到细胞聚集,但多数细胞分布均匀,组织坏死程度和浸润性较低,见图4。

3 讨论

近年来关于lncRNA的研究进展迅猛,虽然已证实lncRNA如Linc00475、lncRNA-THOR、lncRNA-EGFR-AS1等的表达异常与神经胶质瘤进展高度相关^[3-5],但绝大部分lncRNA功能仍有待研究。新近对神经胶质

瘤组织的微阵列测序数据表明,神经胶质瘤组织LYPLAL1-AS1表达水平明显低于癌旁组织,而胰腺导管腺癌组织研究也发现,胰腺导管腺癌细胞的LYPLAL1-AS1表达水平明显低于癌旁组织,提示LYPLAL1-AS1可能是重要的抑癌基因^[6]。

本研究分析神经胶质瘤细胞LYPLAL1-AS1表达水平和生物学功能。结果证实,神经胶质瘤细胞中LYPLAL1-AS1呈低表达,可显著抑制神经胶质瘤细胞侵袭和迁移,裸鼠原位接种实验也证实LYPLAL1-AS1可抑制神经胶质瘤的生长。

虽然明确了LYPLAL1-AS1在神经胶质瘤的生物

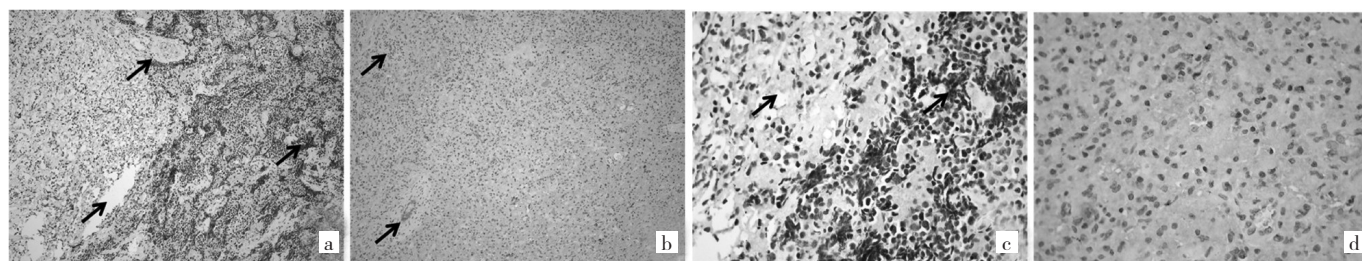


图4 OEC U87组和LYPLAL1-AS1-OE U87组颅内肿瘤细胞的免疫组化染色图(a:OEC U87组,×100;b:LYPLAL1-AS1-OE U87组,×100;c:OEC U87组,×400;d:LYPLAL1-AS1-OE U87组,×400;箭头所示为肿瘤细胞聚集、组织坏死或血管浸润等现象)

学功能,但其机制尚不清楚。在 lncRNA 调控肿瘤发生和发展中,由 lncRNA、miRNA、mRNA 以及假基因等构成的调控网络即“竞争性内源 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA)”是最为经典的致癌或抑癌调控机制之一^[2]。ceRNA 精确转录调控目的基因的表达依赖于 lncRNA-miRNAs-mRNA 三者之间的互作实现^[7]。miRNA 可通过互补序列结合在 mRNA 的 3'-UTR,进而负向调控下游基因。本研究通过生物信息学预测方法,筛选到 Lnc-LYPLAL1-AS1 的一个潜在结合靶点 miRNA217(miR-217)。有研究表明,miR-217 的表达水平在多种肿瘤细胞系和肿瘤组织中均显著上调,且具有致癌作用。miR-217 是参与包括淋巴瘤、骨肉瘤、胃癌、结直肠癌、乳腺癌等肿瘤发生、发展的致癌分子^[8]。体外实验揭示,miR-217 上调表达将显著增强癌细胞侵袭、迁移和增殖能力^[9-10]。本研究的结果也证实,miR-217 在神经胶质瘤组织中和神经胶质瘤细胞高表达。据此本实验推测 LYPLAL1-AS1 在神经胶质瘤中的低表达,上调其表达水平将抑制神经胶质瘤细胞的侵袭和迁移现象,而这一调控作用可能是和 miR-217 有关。

酪氨酸 3/色氨酸 5-单加氧酶激活蛋白 γ (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma polypeptide, YWHAG) 则是 miR-217 下游调控靶点之一,其具有抑制神经胶质瘤细胞生存、增殖、迁移、侵袭和有丝分裂的功能,上调细胞 miR-217 水平可靶向降低 YWHAG 水平从而促进神经胶质瘤侵袭和迁移的进展^[8,11]。YWHAG 通过与含有磷酸丝氨酸的蛋白质结合而介导信号转导,在包括细胞存活和凋亡,蛋白质运输,以及细胞周期调节等细胞进程中发挥关键调控作用。已有研究表明,在神经胶质瘤细胞中,高表达 YWHAG 可诱导细胞凋亡并抑制细胞生长^[11-12]。已有研究阐明,在 U87 神经胶质瘤细胞中 miR-217 靶向结合 YWHAG mRNA,可抑制 YWHAG 的表达,同时逆转 YWHAG 对 U87 细胞的抑制作用,促进 U87 细胞迁移、侵袭和增殖。基于已证实的 miR-217 与 YWHAG 的靶向结合特性,本实验下一步计划首先利用荧光素酶报告基因实验验证 LYPLAL1-AS1 与 miR-217 是否结合,以及探索 LYPLAL1-AS1/miR-217/YWHAG 三者之间的关系。

综上所述,Lnc-LYPLAL1-AS1 在神经胶质瘤的进展中发挥重要的抑癌作用,其作用机制可能是通过靶向调控 miR-217/YWHAG 表达,实现抑癌的功能。靶

向调控 Lnc-LYPLAL1-AS1 的表达可能为神经胶质瘤的防治提供新的策略。

4 参考文献

- [1] Coleman C, Stoller S, Grotzer M, et al. Pediatric hemispheric high-grade glioma:targeting the future[J]. Cancer Metastasis Rev, 2020, 39(1):245-260. DOI:10.1007/s10555-020-09850-5.
- [2] Panni S, Lovering RC, Porras P, et al. Non-coding RNA regulatory networks[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2020, 1863(6):194417. DOI:10.1016/j.bbaggm.2019.194417.
- [3] Yu M, Yi B, Zhou W, et al. Linc00475 promotes the progression of glioma by regulating the miR-141-3p/YAP1 axis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(1):463-472. DOI:10.1111/jcmm.16100.
- [4] Xue J, Zhong S, Sun BM, et al. Lnc-THOR silencing inhibits human glioma cell survival by activating MAGEA6-AMPK signaling[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11):866. DOI:10.1038/s41419-019-2093-0.
- [5] Dong ZQ, Guo ZY, Xie J. The lncRNA EGFR-AS1 is linked to migration, invasion and apoptosis in glioma cells by targeting miR-133b/RACK1[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118:1092. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109292.
- [6] Hao S, Yao L, Huang J, et al. Genome-wide analysis identified a number of dysregulated long noncoding RNA(lncRNA)in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Technol Cancer Res Treat, 2018, 17:1533034617748429.92. DOI:10.1177/1533034617748429.
- [7] Lou W, Ding B, Fu P. Pseudogene-Derived lncRNAs and their miRNA sponging mechanism in human cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8:85. DOI:10.3389/fcell.2020.00085.
- [8] Zhou S, Zhu C, Pang Q, et al. MicroRNA-217: a regulator of human cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133:110943. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110943.
- [9] Zheng J, Liu X, Xue Y, et al. TTBK2 circular RNA promotes glioma malignancy by regulating miR-217/HNF1beta/Derlin-1 pathway[J]. J Hematol Oncol, 2017, 10(1):52. DOI:10.1186/s13045-017-0422-2.
- [10] Majumdar A, Ahmad F, Sheikh T, et al. miR-217-casein kinase-2 cross talk regulates ERK activation in ganglioglioma [J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(11):1215-1226. DOI:10.1007/s00109-017-1571-z
- [11] Wang H, Zhi H, Ma D, et al. MiR-217 promoted the proliferation and invasion of glioblastoma by repressing YWHAG[J]. Cytokine, 2017, 92:93-102. DOI:10.1016/j.cyto.2016.12.013.
- [12] Lee YS, Lee JK, Bae Y, et al. Suppression of 14-3-3 γ -mediated surface expression of ANO1 inhibits cancer progression of glioblastoma cells[J]. Sci Rep, 2016, 6:26413. DOI:10.1038/srep26413.

(收稿日期:2021-04-02)

(本文编辑:杨丽)