

下调 lncRNA RHPN1-AS1 抑制人膀胱癌细胞系 T24 增殖和迁移

白冰, 张海芳*, 杨庆良, 秦悦, 周晨龙, 宋歌, 王颖

(安阳市人民医院 泌尿外科, 河南 安阳 455000)

摘要:目的 探讨干扰 lncRNA RHPN1-AS1 对膀胱癌细胞系 T24 生物学行为的影响及作用机制。方法 用 RT-qPCR 检测膀胱癌组织与癌旁组织中 RHPN1-AS1、miR-149-3p 的表达;分别将 si-NC、si-RHPN1-AS1、si-RHPN1-AS1 与 anti-miR-NC、si-RHPN1-AS1 与 miR-149-3p inhibitor 转染至 T24 细胞;用 RT-qPCR 检测细胞中 RHPN1-AS1、miR-149-3p 的表达水平;MTT 法、平板集落形成实验、划痕实验、流式细胞测量术分别检测细胞增殖、迁移能力及细胞凋亡率;双荧光素酶报告基因实验检测 RHPN1-AS1 与 miR-149-3p 的靶向关系;Western blot 检测 B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白(Bax)及 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白表达。结果 膀胱癌组织中 RHPN1-AS1 的表达水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$), miR-149-3p 的表达水平低于癌旁组织 ($P < 0.05$);与 si-NC 组比较,转染 si-RHPN1-AS1 可明显降低细胞增殖能力、划痕愈合率及 Bcl-2 蛋白水平 ($P < 0.05$),减少集落形成数 ($P < 0.05$),提高凋亡率及 Bax 蛋白水平 ($P < 0.05$);miR-149-3p 是 RHPN1-AS1 的靶基因;与 si-RHPN1-AS1 + anti-miR-NC 组比较,转染 si-RHPN1-AS1 与 miR-149-3p inhibitor 可明显提高细胞增殖能力、划痕愈合率及 Bcl-2 蛋白水平 ($P < 0.05$),增加集落形成数 ($P < 0.05$),降低凋亡率及 Bax 蛋白水平 ($P < 0.05$)。结论 干扰 RHPN1-AS1 表达可通过上调 miR-149-3p 从而抑制膀胱癌细胞增殖、迁移及促进细胞凋亡。

关键词: lncRNA RHPN1-AS1; miR-149-3p; 膀胱癌; 增殖; 迁移

中图分类号: R737.1 文献标志码: A

Down-regulation of lncRNA RHPN1-AS1 inhibits proliferation and migration of human bladder cancer cell line T24

BAI Bing, ZHANG Hai-fang*, YANG Qing-liang, QIN Yue, ZHOU Chen-long, SONG Ge, WANG Ying

(Department of Urology, Anyang People's Hospital, Anyang 455000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of interfering with lncRNA RHPN1-AS1 on the biological behavior of bladder cancer cell T24 and its mechanism. **Methods** RT-qPCR method was used to detect the expression of RHPN1-AS1 and miR-149-3p by bladder cancer tissues and adjacent tissues. si-NC, si-RHPN1-AS1, si-RHPN1-AS1, anti-miR-NC, si-RHPN1-AS1 and miR-149-3p inhibitor were transfected into bladder cancer cell T24. The expression of RHPN1-AS1 and miR-149-3p in T24 cells were examined by RT-qPCR. MTT, plate colony formation experiment, scratch experiment, flow cytometry were used to detect cell proliferation, migration ability and cell apoptosis rate respectively. The dual luciferase reporter experiment was used to detect the targeting relationship between RHPN1-AS1 and miR-149-3p. Bax and Bcl-2 protein expression was assessed using Western blot. **Results**

收稿日期: 2020-10-12 修回日期: 2021-01-22

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20191265)

* 通信作者 (corresponding author): 398713172@qq.com

Compared with adjacent tissues, the expression of RHPN1-AS1 in bladder cancer tissue was increased ($P < 0.05$) and the expression of miR-149-3p was decreased ($P < 0.05$). Compared with the si-NC group, transfection of si-RHPN1-AS1 significantly reduced cell proliferation, scratch healing rate and the protein level of Bcl-2 ($P < 0.05$), reduced the number of clones ($P < 0.05$) and increased apoptosis rate and the protein level of Bax ($P < 0.05$). Compared with the si-RHPN1-AS1+anti-miR-NC group, transfection of si-RHPN1-AS1 and miR-149-3p inhibitor significantly increased cell proliferation, scratch healing rate and the protein level of Bcl-2 ($P < 0.05$) increased the number of clones formed ($P < 0.05$), reduced the apoptosis rate and the protein level of Bax ($P < 0.05$). **Conclusions** Interfering with the expression of RHPN1-AS1 may inhibit the proliferation and migration of bladder cancer cells and may promote cell apoptosis by up-regulating miR-149-3p.

Key words: lncRNA RHPN1-AS1; miR-149-3p; bladder cancer; proliferation; migration

膀胱癌是临床常见的一种恶性肿瘤,目前发病机制尚未阐明,由于缺乏早期诊断的有效指标导致大部分患者确诊时已处于膀胱癌进展期甚至晚期。因而,探究膀胱癌发病机制有助于提高膀胱癌早期诊断效率及改善患者预后^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病理标本:收集 2017 年 12 月至 2019 年 10 月于安阳市人民医院接受手术切除的 27 例膀胱癌患者(男 17 例,女 10 例,年龄范围 56~70 岁,平均年龄(60±10)岁的膀胱癌组织与癌旁组织。该研究获得经安阳市人民医院伦理委员会批准,所有患者均同意使用其组织标本,并签署同意书。

1.1.2 细胞与主要试剂:人膀胱癌细胞系 T24(南京科佰生物科技有限公司);反转录试剂盒和 SYBR Green 试剂盒(北京天根生化科技有限公司);Lipofectamine2000 和 Trizol(Thermo Fisher Scientific 公司);si-NC、si-RHPN1-AS1、miR-NC、miR-149-3p mimics、anti-miR-NC 和 miR-149-3p inhibitor(广州锐博生物科技有限公司);MTT 试剂(北京索莱宝科技有限公司);兔抗人 Bax 和 Bcl-2 单克隆抗体(CST 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验的分组:取对数期 T24 细胞(1×10^4 个/孔)接种 96 孔板,采用不含血清的培养液稀释 Lipofectamine2000,同时采用与不含血清的培养液稀释待转染寡核苷酸。将上述稀释液混合,室温孵育 20 min,随后将 Lipofectamine2000 与寡核苷酸复合物加入到 T24 细胞中,根据转染寡核苷酸不同分为

si-RHPN1-AS1 组、si-NC 组、si-RHPN1-AS1 + anti-miR-NC 组、si-RHPN1-AS1+miR-149-3p inhibitor 组。

1.2.2 RT-qPCR 检测 RHPN1-AS1、miR-149-3p 的表达水平:用 Trizol 法组织各组 T24 细胞总 RNA。按照 SYBR Green 试剂盒配置 RT-qPCR 反应体系及设置相应反应程序,扩增反转录合成的 cDNA 以检测 RHPN1-AS1(内参 *GAPDH*)、miR-149-3p(内参 *U6*)相对表达量。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖:将各组 T24 细胞以 1×10^4 个/孔接种 96 孔板培养 24 h,替换为含 20 μ L MTT 和 90 μ L DMEM 室温孵育 4 h,每孔加入 150 μ L DMSO 室温孵育 1 h,检测各组细胞吸光度值(A 值)。

1.2.4 平板集落形成实验:将 T24 细胞接种于细胞培养皿(60 mm),每个培养皿中接种 200 个细胞后放入培养箱孵育 14 d,当出现细胞集落时弃去培养液,分别用多聚甲醛、0.1% 结晶紫对细胞集落进行固定和染色。计数集落形成数。

1.2.5 划痕实验检测细胞增殖能力:将 T24 细胞(1.5×10^5 个/mL)接种于 6 孔板(100 μ L/孔),在 6 孔板底部沿着水平方向画直线,放入培养箱继续孵育 48 h 后在每孔中央画直线,使用 PBS 洗涤后,观察划痕处细胞生长状况,计算划痕愈合率。

1.2.6 流式细胞测量术检测细胞凋亡率:用 500 μ L 结合缓冲液重悬 T24 细胞,依次加入 5 μ L annexin V-FITC、5 μ L PI 进行双染色。流式细胞仪检测各组 T24 细胞凋亡率。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测:将含有 miR-149-3p 结合位点的 RHPN1-AS1 片段克隆至 pmirGLO 得到野生型载体 wt-RHPN1-AS1,用基因定点突变技

术突变 miR-149-3p 结合位点,将 RHPN1-AS1 突变片段克隆至 pmirGLO 得到突变型载体 mut-RHPN1-AS1,在 T24 细胞中共转染 miR-NC 与 wt-RHPN1-AS1、miR-149-3p mimics 与 wt-RHPN1-AS1、miR-NC 与 mut-RHPN1-AS1、miR-149-3p mimics 与 mut-RHPN1-AS1,并测定转染 48 h 各组细胞荧光素酶活性。

1.2.8 Western blot 检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达:T24 细胞中加入 500 μ L RIPA 提取细胞总蛋白。用 SDS-PAGE 分离 40 μ g 蛋白样品,转膜后,进行膜的封闭。用 1:1 000 稀释度的一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育膜 24 h,洗膜后加入 1:2 000 稀释度的二抗在室温孵育 1 h。显色后,用 ImageJ 软件分析各条带吸光度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS21.0 统计学软件分析数据,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示且均符合正态分布,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 RHPN1-AS1 和 miR-149-3p 在膀胱癌中的表达

膀胱癌组织中 RHPN1-AS1 的表达水平高于癌

旁组织($P<0.05$),miR-149-3p 的表达水平低于癌旁组织($P<0.05$)(表 1)。

表 1 RHPN1-AS1 和 miR-149-3p 的表达

Table 1 Expression of RHPN1-AS1 and miR-149-3p ($\bar{x}\pm s, n=27$)

group	RHPN1-AS1	miR-149-3p
paracancerous tissue	0.97 \pm 0.12	1.03 \pm 0.12
bladder cancer tissue	4.17 \pm 0.31*	0.25 \pm 0.03*

* $P<0.05$ compared with paracancerous tissue.

2.2 干扰 RHPN1-AS1 对 T24 增殖、迁移的影响

与 si-NC 组比较,si-RHPN1-AS1 组 A 值降低($P<0.05$),集落形成数减少($P<0.05$),划痕愈合率降低($P<0.05$)(表 2)。

2.3 干扰 RHPN1-AS1 对 T24 凋亡的影响

与 si-NC 组比较,si-RHPN1-AS1 组 Bcl-2 蛋白水平降低($P<0.05$),Bax 蛋白水平、凋亡率升高($P<0.05$)(图 1,表 3)。

2.4 RHPN1-AS1 和 miR-149-3p 靶向关系的验证

LncBase v.2 预测显示 RHPN1-AS1 含有 miR-149-3p 的互补序列(图 2)。转染 miR-149-3p 可降低 wt-RHPN1-AS1 的荧光素酶活性($P<0.05$)(表 4)。

表 2 干扰 RHPN1-AS1 对 T24 增殖、迁移的影响

Table 2 Effects of RHPN1-AS1 interference on T24 proliferation and migration ($\bar{x}\pm s, n=3$)

group	RHPN1-AS1	miR-149-3p	A value	clone formation number	wound healing rate/%
si-NC	0.99 \pm 0.05	0.96 \pm 0.04	1.15 \pm 0.08	129 \pm 5	66.31 \pm 1.79
si-RHPN1-AS1	0.14 \pm 0.01*	4.41 \pm 0.10*	0.52 \pm 0.03*	56 \pm 2*	32.45 \pm 0.96*

* $P<0.05$ compared with si-NC group.

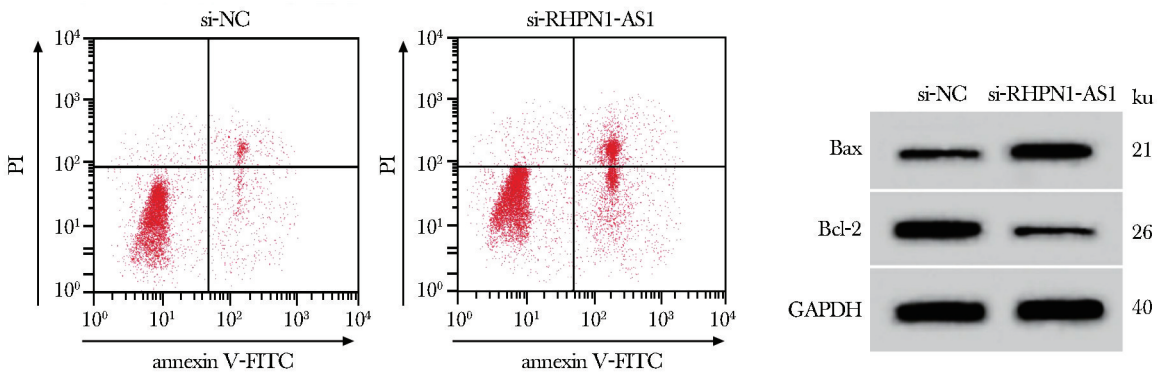


图 1 干扰 RHPN1-AS1 对 T24 凋亡及凋亡蛋白表达的影响

Fig 1 Effect of RHPN1-AS1 on T24 apoptosis and expression of apoptotic protein

表 3 干扰 RHPN1-AS1 对 T24 凋亡的影响

Table 3 Effect of RHPN1-AS1 interference on T24 apoptosis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

group	apoptosis rate/%	Bax	Bcl-2
si-NC	8.05±0.28	0.23±0.02	0.81±0.07
si-RHPN1-AS1	25.70±0.86*	0.64±0.05*	0.18±0.01*

* $P < 0.05$ compared with si-NC group.

wt-RHPN1-AS1	5'	CUUUGAGGGUCAUAAGACUUC	CCCCUCCCU
miR-149-3p	3'	CGUG--UCGGGGCAGGGAGGGA	
mut-RHPN1-AS1	5'	CUUUGAGGGUCAUAAGACUUC	AGAAAGAC

图 2 RHPN1-AS1 靶向 miR-149-3p

Fig 2 RHPN1-AS1 targets miR-149-3p

表 4 双荧光素酶报告基因实验

Table 4 Study of double luciferase reporter gene ($\bar{x} \pm s, n=3$)

group	wt-RHPN1-AS1	mut-RHPN1-AS1
miR-NC	0.96±0.05	0.98±0.05
miR-149-3p	0.24±0.02*	0.99±0.04

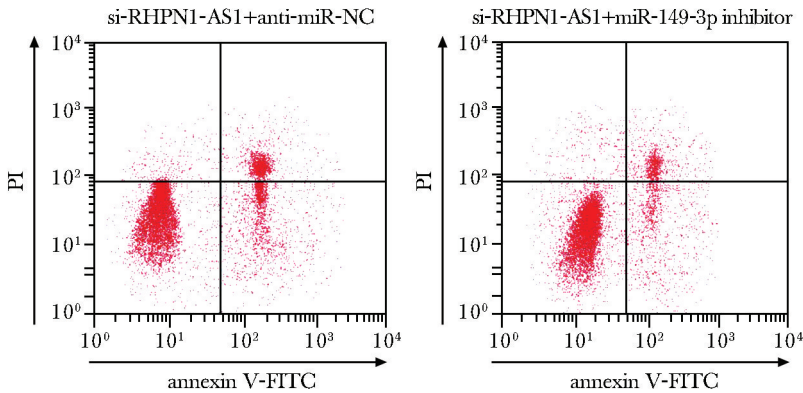
* $P < 0.05$ compared with miR-NC group.

图 3 抑制 miR-149-3p 对干扰 RHPN1-AS1 作用的 T24 凋亡及凋亡蛋白表达的影响

Fig 3 Effect of miR-149-3p inhibition on T24 apoptosis and expression of apoptotic protein interfering with RHPN1-AS1

表 5 抑制 miR-149-3p 对干扰 RHPN1-AS1 作用的 T24 增殖、凋亡、迁移的影响

Table 5 Effect of miR-149-3p inhibition on T24 proliferation, apoptosis and migration interfered by RHPN1-AS1 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

group	A value	clone formation number	wound healing rate/%	apoptosis rate/%	Bax	Bcl-2
si-RHPN1-AS1+anti-miR-NC	0.52±0.03	56±2	32.34±0.90	25.64±0.90	0.65±0.04	0.17±0.01
si-RHPN1-AS1+miR-149-3p inhibitor	0.99±0.06*	117±4*	56.46±1.69*	12.81±0.58*	0.33±0.02*	0.62±0.04*

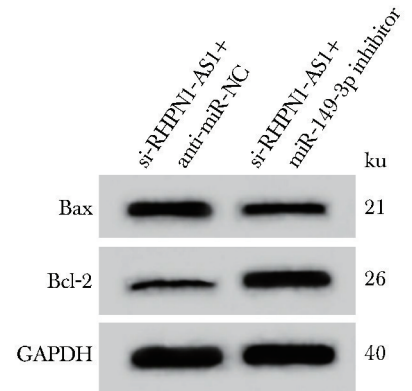
* $P < 0.05$ compared with si-RHPN1-AS1+anti-miR-NC group.

2.5 抑制 miR-149-3p 对干扰 RHPN1-AS1 作用的 T24 增殖凋亡迁移的影响

与 si-RHPN1-AS1+anti-miR-NC 组比较, si-RHPN1-AS1+miR-149-3p inhibitor 组 Bcl-2 蛋白水平、A 值、划痕愈合率、克隆形成数升高 ($P < 0.05$), Bax 蛋白水平、凋亡率降低 ($P < 0.05$) (图 3, 表 5)。

3 讨论

长链非编码 RNA (lncRNA) 可作为微小 RNA (miRNA) 的竞争性内源 RNA 分子, miRNA 可靶向调控下游靶 mRNA 而调控膀胱癌细胞增殖、凋亡等生物学过程^[2]。lncRNA GClnc1 通过激活 MYC 促进膀胱癌细胞增殖和侵袭^[3]。lncRNA UCA1 通过 miR-195 / ARL2 信号通路促进膀胱癌发展进程^[4]。lncRNA RHPN1-AS1 通过调节 miR-299-3p / FGF2 轴促进宫颈癌细胞的增殖、侵袭和及迁移^[5]。但 RHPN1-AS1 在膀胱癌中的表达及其可能作用机制尚未阐明。靶基因预测显示微小 RNA-149-3p (miR-149-3p) 与 RHPN1-AS1 存在结合位点, lncRNA LINC00665 通过调节 miR-149-3p/RNF2 轴促进胃癌



发生及发展^[6]。但 RHPN1-AS1 与 miR-149-3p 在膀胱癌中的调控作用未见报道。因此,本研究通过探讨 RHPN1-AS1 对膀胱癌细胞 T24 恶性潜能的影响以及 miR-149-3p 的调控作用,旨在为膀胱癌分子治疗提供潜在靶点。

RHPN1-AS1 通过抑制 miR-1299 促进卵巢癌的生长和侵袭^[7]。RHPN1-AS1 通过靶向 miR-7-5p/OGT 轴促进结直肠癌的进展^[8]。本研究检测到 RHPN1-AS1 在膀胱癌组织中水平升高,干扰 RHPN1-AS1 可明显降低细胞活力,减少集落形成数,并可降低划痕愈合率,提示干扰 RHPN1-AS1 可抑制膀胱癌细胞增殖及迁移。Bcl-2/Bax 比值升高可抑制细胞凋亡^[9]。本研究中干扰 RHPN1-AS1 表达显著促进 Bax 表达,抑制 Bcl-2 表达,并可提高膀胱癌细胞凋亡率。

本研究通过双荧光素酶报告实验证实 RHPN1-

AS1 可作为 miR-149-3p 竞争性内源 RNA 分子。lncRNA HOXA11-AS 通过靶向 miR-149-3p 促进结直肠癌转移^[10]。miR-149-3p 在结直肠癌中表达水平降低,并可参与结直肠癌发生及发展过程^[11-12]。本研究检测到 miR-149-3p 在膀胱癌组织中水平降低,si-RHPN1-AS1 与 miR-149-3p inhibitor 共同处理后可明显提高膀胱癌细胞活力,增加克隆形成数,并可促进细胞迁移及降低细胞凋亡率。

综上所述,膀胱癌中 RHPN1-AS1 表达升高,miR-149-3p 表达降低,干扰 RHPN1-AS1 可上调 miR-149-3p 表达进而增加膀胱癌细胞凋亡并抑制其增殖和迁移,这可为进一步阐释膀胱癌发病机制奠定实验基础,还可能作为膀胱癌分子治疗的潜在靶点。但膀胱癌发生过程中 RHPN1-AS1/miR-149-3p 如何调控下游基因表达,及其如何调控相关信号通路仍需进一步探究。

参考文献:

- [1] 黄一珂,刁思军,梁平,等. 靶向沉默膀胱癌 T24 细胞系 VEGF 对树突状细胞分化成熟及免疫功能的影响[J]. 基础医学与临床, 2018, 38: 57-62.
- [2] Luo H, Xu C, Le W, *et al.* lncRNA CASC11 promotes cancer cell proliferation in bladder cancer through miRNA-150[J]. J Cell Biochem, 2019, 120: 13487-13493.
- [3] Zhuang C, Ma Q, Zhuang C, *et al.* lncRNA GClnc1 promotes proliferation and invasion of bladder cancer through activation of MYC[J]. FASEB J, 2019, 33: 11045-11059.
- [4] Li HJ, Sun XM, Li ZK, *et al.* lncRNA UCA1 promotes mitochondrial function of bladder cancer via the miR-195/ARL2 signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43: 2548-2561.
- [5] Duan H, Li X, Chen Y, *et al.* lncRNA RHPN1-AS1 promoted cell proliferation, invasion and migration in cervical cancer via the modulation of miR-299-3p/FGF2 axis [J]. Life Sci, 2019, 239: 116856-116866.
- [6] Qi H, Xiao Z, Wang Y. Long non-coding RNA LINC00665 gastric cancer tumorigenesis by regulation miR-149-3p/RNF2 axis [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 6981-6990.
- [7] Zhao L, Liu T, Zhang X, *et al.* lncRNA RHPN1-AS1 promotes ovarian cancer growth and invasiveness through inhibiting miR-1299 [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 5337-5344.
- [8] Zheng W, Li H, Zhang H, *et al.* Long noncoding RNA RHPN1-AS1 promotes colorectal cancer progression via targeting miR-7-5p/OGT axis [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 54-64.
- [9] Liu G, Zhao X, Zhou J, *et al.* Long non-coding RNA MEG3 suppresses the development of bladder urothelial carcinoma by regulating miR-96 and TPM1 [J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19: 1039-1056.
- [10] Chen D, Zhang M, Ruan J, *et al.* The long non-coding RNA HOXA11-AS promotes epithelial mesenchymal transition by sponging miR-149-3p in Colorectal Cancer [J]. J Cancer, 2020, 11: 6050-6058.
- [11] Liang Y, Hou L, Li L, *et al.* Dichloroacetate restores colorectal cancer chemosensitivity through the p53/miR-149-3p/PDK2-mediated glucose metabolic pathway [J]. Oncogene, 2020, 39: 469-485.
- [12] Liu Y, Yang C, Zhao Y, *et al.* Overexpressed methyltransferase-like 1 (METTL1) increased chemosensitivity of colon cancer cells to cisplatin by regulating miR-149-3p/S100A4/p53 axis [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11: 12328-12344.