

CRNDE 过表达促进人肝癌细胞系 HepG2 增殖和迁移

黄海良^{1*}, 丁伟伟², 李冬雪³

(1. 安徽医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 合肥 230032; 2. 安徽医科大学医院 内科, 安徽 合肥 230032;
3. 安徽省立医院 脑外科, 安徽 合肥 230036)

摘要:目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)结直肠差异性表达基因(CRNDE)对 HepG2 细胞增殖和迁移能力的影响及作用机制。**方法** 构建 CRNDE 过表达质粒,进行慢病毒包装后感染 HepG2 细胞。实验分别设置阴性对照组(LV5/NC)和 CRNDE 过表达组(LV5/CRNDE)。应用 2.5 μg/mL 嘌呤霉素干预 4~5 周,筛选出 CRNDE 过表达 HepG2 细胞系;CCK8 和细胞划痕实验检测细胞的增殖及迁移能力变化;real-time PCR 和 Western blot 检测两组细胞 E-cadherin、N-cadherin、Bax 和 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达变化。**结果** 与 LV5/NC 组相比,LV5/CRNDE 组 CRNDE 表达显著升高($P<0.01$),且 LV5/CRNDE 组细胞的增殖和迁移能力均显著提高($P<0.01$);同时,LV5/CRNDE 组细胞 E-cadherin 和 Bax 表达均明显降低($P<0.01$),而 N-cadherin 和 Bcl-2 表达则明显升高($P<0.01$)。**结论** CRNDE 可通过促进 N-cadherin 和 Bcl-2 表达,抑制 E-cadherin 和 Bax 表达,进而增强 HepG2 细胞的增殖和迁移能力。

关键词: CRNDE;肝癌细胞;HepG2;增殖;迁移

中图分类号:R735.7 文献标志码:A

Over-expression of CRNDE promotes proliferation and migration in human hepatoma cell line HepG2

HUANG Hai-liang^{1*}, DING Wei-wei², LI Dong-xue³

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032; 2. Department of Internal Medicine, Anhui Medical University Hospital, Hefei 230032; 3. Department of Brain Surgery, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230036, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanisms of long-chain non-coding RNA CRNDE on the proliferation and migration of HepG2 cells. **Methods** The CRNDE over-expression vector was constructed and packed into lentivirus. Then, HepG2 cells was infected by the lentivirus containing LV5/NC and LV5/CRNDE vectors. After treatment with 2.5 μg/mL puromycin for 4-5 weeks, real-time PCR was used to detect the expression level of CRNDE in the two groups. CCK8 and cell scratch assay was used to detect the changes of proliferation and migration ability of each group. Meanwhile, real-time PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of E-cadherin, N-cadherin, Bax and Bcl-2 in each group. **Results** Compared with LV5/NC group, the expression of CRNDE in LV5/CRNDE group significantly increased($P<0.01$). The proliferation and migration of LV5/CRNDE group cells were also significantly increased ($P<0.01$, $P<0.01$). At the same time, the expression of E-cadherin and Bax in LV5/CRNDE group significantly decreased($P<0.01$, $P<0.01$), while the

expression of N-cadherin and Bcl-2 significantly increased($P<0.01$, $P<0.01$). **Conclusions** CRNDE may stimulate proliferation and migration of HepG2 cells by promoting the expression of N-cadherin/Bcl-2 and inhibiting the expression of E-cadherin and Bax.

Key words: CRNDE; hepatocellular carcinoma; HepG2; proliferation; migration

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是肝癌最常见的临床类型,约占肝癌的90%,其具有转移性早、转移范围广和侵袭性强等特点^[1-2]。早期手术联合药物治疗是主要的临床治疗手段。然而,多种未知因素导致了HCC临床预后差、复发性高^[3]。因此,深入探索HCC的转移分子机制对控制HCC复发、转移及临床治疗均具有重要作用。结直肠差异性表达基因(colorectal neoplasia differentially expressed, CRNDE)作为长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)家族中的一员,在调控肿瘤的发生发展中扮演着重要角色^[4-6]。因此,本实验通过研究CRNDE对HepG2细胞增殖和迁移能力的影响及作用机制,以期降低HCC转移、复发及靶向药物治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM细胞培养基(Hyclone公司);胎牛血清(Gibco公司);RNA提取试剂盒、反转录试剂盒和real-time PCR试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];real-time PCR引物(Invitrogen公司);GAPDH、Bax、Bcl-2、E-cadherin和N-cadherin抗体(Santa Cruz公司);RIPA(强)蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒和CCK8细胞增殖检测试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);ECL检测试剂盒、PVDF膜、彩虹预染蛋白Marker(Thermo Fisher公司);CRNDE过表达及阴性对照慢病毒(上海吉玛制药技术有限公司);人肝癌细胞系HepG2(中国科学院上海细胞库)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及CRNDE过表达细胞系的建立:复苏后的HepG2细胞于37℃,5%CO₂恒温细胞培养箱中培养,隔天换液、观察细胞状态,待细胞铺满培养瓶时进行传代。按1×10⁶个/mL的标准将细胞接种于6孔培养板,待细胞汇合度为70%~80%时进行慢病毒感染。实验设置阴性对照组(LV5/NC)

和CRNDE过表达组(LV5/CRNDE),参照吉玛基因慢病毒感染实验指南进行操作,感染6h后按1:4进行细胞传代,同时将细胞培养基更换为含2.5 μg/mL嘌呤霉素的培养基作用4~5周,筛选出CRNDE过表达HepG2细胞系。

1.2.2 CCK8实验检测细胞增殖能力:取对数增殖期的细胞,0.25%胰蛋白酶消化后进行细胞计数,将两组细胞分别按2×10³个/孔接种于96孔细胞培养板,参照CCK8细胞增殖检测试剂盒说明书分别检测0、24、48和72h细胞A_{450nm}值。以LV5/NC组为参照,计算LV5/CRNDE组细胞增殖能力。

1.2.3 细胞划痕实验检测细胞迁移能力:以1×10⁶个/孔将3组细胞分别接种于12孔细胞培养板,细胞贴壁增殖后更换培养基,观察细胞状态、汇合度,待细胞汇合度为60%~70%时进行细胞划痕实验。应用直径1.0 μm的划痕器垂直于细胞培养板在每孔划出3条平行线,DMEM培养基洗去划落细胞,倒置显微镜下观察、拍照,即为0h细胞划痕宽度。然后继续培养48h进行拍照,即为48h细胞划痕宽度。应用Image Pro Plus 6.0软件测量每孔多个点划痕间距,计算细胞迁移率,即细胞迁移率=(划痕宽度0h-划痕宽度24h/48h)/划痕宽度0h。

1.2.4 Real-time PCR检测mRNA相对表达量:参照细胞总RNA提取试剂盒说明书提取总RNA。以总RNA为模板,参照反转录试剂盒说明书进行反转录操作。以上述产物为模板,使用ABI 7500型real-time PCR仪,按下述设置反应程序:95℃、5s,60℃、34s,40个循环。应用SYBR Green法检测各基因Ct值。引物序列见表1。以GAPDH作为内参,以LV5/NC组为参照,采用2^{-ΔΔCt}法分析各基因的相对表达量,并进行统计分析。

1.2.5 Western blot检测蛋白表达水平:应用RIPA(强)细胞裂解液进行冰上匀浆操作,提取组织总蛋白,BCA法定量后,按50 μg/孔的量加样、电泳。湿法转膜后,应用浓度为5%脱脂奶粉室温封闭1.5h, TBST洗膜3min。参考抗体说明书进行抗体稀释,

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers for Real-time PCR

gene name	primers sequence(5'-3')
GAPDH	F:GCCGCATCTTCTTTTGCGTC
	R:TACGACCAAATCCGTTGACTCC
CRNDE	F:CGATCGCGCTATTGTCATGG
	R:TCCGCC TCGCTTAGACATTG
E-cadherin	F:TCGCTTACACCATCTCAGC
	R:GGAACTCTCTCGGTCCAGC
N-cadherin	F:AACAGCAACGACGGTTAGT
	R:CAGACACGGTTGCAGTTGAC
Bax	F:CTGGACCCGGTGCCTCAGGA
	R:TGGTGCACAGGGCCTTGAGC
Bcl-2	F:GGATAACGGAGGCTGGGATGCCT
	R:CAAGCTCCCACCAGGGCCAAA

4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。相应的 IgG 二抗室温孵育 1.5 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; ECL 发光、显影、曝光。应用 Quantity One 吸光度分析软件检测各蛋白条带吸光度值, 以 GAPDH 为内参, 各蛋白的相对表达量 = 目的蛋白吸光度值 / GAPDH 吸光度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS19.0 进行统计分析, 数据结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *F* 检验和 *t* 检验。每组实验均重复 3 次。

2 结果

2.1 CRNDE 过表达细胞系的建立

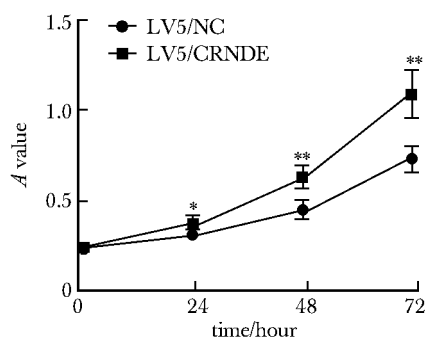
经过 4~5 周嘌呤霉素筛选后, 成功建立 CRNDE 过表达 HepG2 细胞系。Real-time PCR 检测表明, LV5/CRNDE 组 CRNDE 的表达为 (8.665 ± 0.929), 显著高于 LV5/NC 组的 (1.127 ± 0.151) ($P < 0.01$)。

2.2 CRNDE 过表达对 HepG2 细胞增殖能力的影响

与 LV5/NC 组相比, LV5/CRNDE 组 24、48 和 72 h 细胞增殖能力均显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$) (图 1)。

2.3 CRNDE 过表达对 HepG2 细胞迁移能力的影响

与 LV5/NC 组相比, LV5/CRNDE 组细胞迁移能力明显增强 ($P < 0.01$) (图 2)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with LV5/NC group

图 1 CRNDE 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

Fig 1 Effect of CRNDE on the proliferation of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.4 CRNDE 过表达对 E-cadherin、N-cadherin、Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响

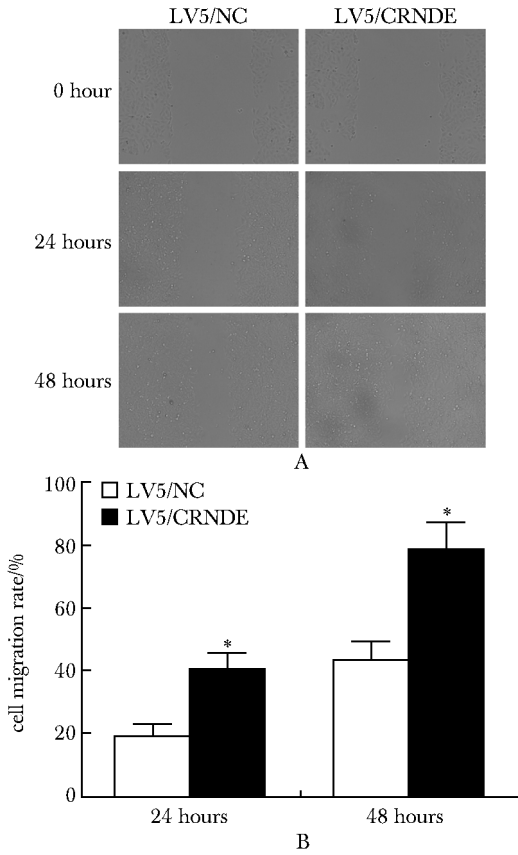
与 LV5/NC 组相比, LV5/CRNDE 组细胞中 E-cadherin、Bax mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$), 而 N-cadherin、Bcl-2 mRNA 表达则显著升高 ($P < 0.01$) (图 3)。

2.5 CRNDE 过表达对 E-cadherin、N-cadherin、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

与 LV5/NC 组相比, LV5/CRNDE 组 E-cadherin、Bax 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$), N-cadherin、Bcl-2 蛋白表达则明显升高 ($P < 0.01$) (图 4)。

3 讨论

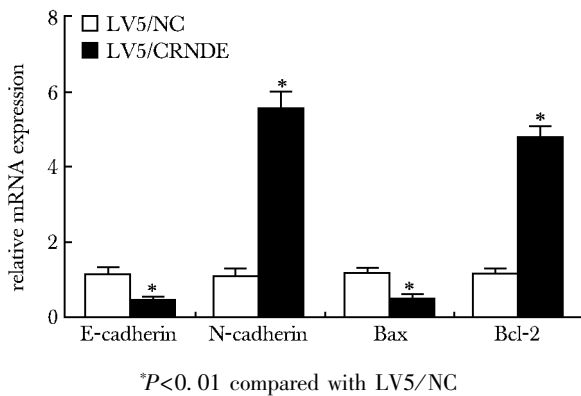
CRNDE 作为长链非编码 RNA 家族中重要的一员, 最早在结直肠癌中被发现, 并被认为是结直肠癌早期检测中有潜力的组织和血浆生物学标志物^[7]。目前研究证实, CRNDE 可调控胶质瘤、乳腺癌和肝癌等肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移, 并具有作为肿瘤检测标志物的潜力^[8-10]。B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 是反映细胞增殖和 (或) 凋亡的经典指标, 其中 Bcl-2 抑制细胞凋亡, 而 Bax 则可拮抗 Bcl-2 的生物学功能, 进而促进细胞凋亡, 二者的平衡失常是导致肿瘤发生发展的重要因素^[11-12]。本研究发现 CRNDE 可促进 HepG2 细胞 Bcl-2 表达, 同时抑制 Bax 表达, 表明 CRNDE 可通过抑制细胞凋亡进而促进 HepG2 细胞增殖, 为深入研究 CRNDE 调控 HepG2 增殖的分子机制奠定了基础。



A, B. cell scratch assays detect the changes of migration capacity in LV5/NC and LV5/CRNDE groups ($\times 100$); * $P < 0.01$ compared with LV5/NC group

图2 CRNDE对HepG2细胞迁移能力的影响

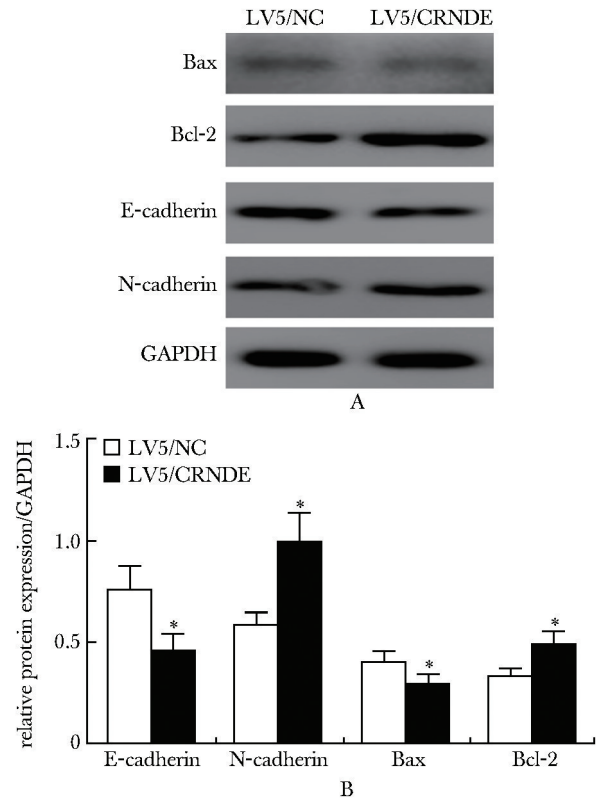
Fig 2 Effect of CRNDE on migration of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



* $P < 0.01$ compared with LV5/NC

图3 CRNDE过表达对E-cadherin、N-cadherin、Bax和Bcl-2表达的影响

Fig 3 Influence of CRNDE on the mRNA expression of E-cadherin, N-cadherin, Bax and Bcl-2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A, B. Western blot detects the changes of N-cadherin, N-cadherin, Bax and Bcl-2; * $P < 0.01$ compared with LV5/NC group

图4 CRNDE过表达对E-cadherin、N-cadherin、Bax和Bcl-2蛋白表达的影响

Fig 4 Influence of CRNDE over-expression on the protein expression of E-cadherin, N-cadherin, Bax and Bcl-2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

同时,上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是决定肿瘤细胞侵袭和迁移能力的重要因素,其中上皮标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的减少和间质标志物 N-钙黏蛋白(N-cadherin)的增加又是检测 EMT 的重要指标,其可通过减弱肿瘤细胞间的黏附能力,增加肿瘤细胞远处转移和形成转移灶的能力^[13-14]。同样,本研究发现 CRNDE 可通过抑制 E-cadherin 的表达及促进 N-cadherin 的表达进而促进 HepG2 细胞 EMT 的发生发展,增强其迁移和侵袭能力。

然而,CRNDE 是如何靶向调控下游基因以及通过哪些信号通路促进 HepG2 细胞增殖和迁移等仍需要深入研究。

参考文献:

- [1] Bosch FX, Ribes J, Diaz M, *et al.* Primary liver cancer: worldwide incidence and trends [J]. *Gastroenterology*, 2004,127:S5-S16.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017,67:7-30.
- [3] Villanueva A, Hernandez-Gea V, Llovet JM. Medical therapies for hepatocellular carcinoma: a critical view of the evidence[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10:34-42.
- [4] Dong R, Liu XQ, Zhang BB, *et al.* Long non-coding RNA-CRNDE: a novel regulator of tumor growth and angiogenesis in hepatoblastoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 42087-42097.
- [5] Xia XL, Xue D, Xiang TH, *et al.* Overexpression of long non coding RNA CRNDE facilitates epithelial mesenchymal transition and correlates with poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15:4105-4112.
- [6] Zhu L, Liu Y, Chen Q, *et al.* Long-noncoding RNA colorectal neoplasia differentially expressed gene as a potential target to upregulate the expression of IRX5 by miR-136-5P to promote oncogenic properties in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018,50:2229-2248.
- [7] Graham LD, Pedersen SK, Brown GS, *et al.* Colorectal neoplasia differentially expressed (CRNDE), a novel gene with elevated expression in colorectal adenomas and adenocarcinomas[J]. *Genes Cancer*, 2011,2:829-840.
- [8] Li DX, Fei XR, Dong YF, *et al.* The long non-coding RNA CRNDE acts as a ceRNA and promotes glioma malignancy by preventing miR-136-5p-mediated downregulation of Bcl-2 and Wnt2 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 88163-88178.
- [9] Huan J, Xing L, Lin Q, *et al.* Long noncoding RNA CRNDE activates Wnt/ β -catenin signaling pathway through acting as a molecular sponge of microRNA-136 in human breast cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9: 1977-1989.
- [10] Dai MY, Chen SY, Wei XM, *et al.* Diagnosis, prognosis and bioinformatics analysis of lncRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017,8:95799-95809.
- [11] Wan L, Zhang D, Zhang J, *et al.* TT-1, an analog of melittin, triggers apoptosis in human thyroid cancer TT cells via regulating caspase, Bcl-2 and Bax [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15:1271-1278.
- [12] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2003, 8590-8607.
- [13] 洪坚善, 彭浩, 段小娴. E-cadherin 的表达与肝细胞癌侵袭和转移的关系 [J]. *基础医学与临床*, 2005, 25: 1139-1142.
- [14] Wellner U, Schubert J, Burk UC, *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 1487-1495.