

肺腺癌细胞中长链非编码 RNA-ARAP1-AS1 表达模式及其生物学特征

刘欣¹, 张欢欢², 关平¹, 邓瑾²

(1. 广州市胸科医院检验科, 广州 510095; 2. 广州医科大学附属肿瘤医院放疗科, 广州 510095)

摘要: 目的 该文拟初步探讨长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) ARAP1 反义 RNA (ARAP1 antisense RNA 1, ARAP1-AS1) 在肺腺癌中的作用。方法 通过 GEPIA 数据库预测和分析 ARAP1-AS1 在肺腺癌组织中的表达模式; qRT-PCR 检测 ARAP1-AS1 在肺腺癌组织及细胞中的表达情况; 生物信息学预测结合实验验证 ARAP1-AS1 编码蛋白的能力及其细胞定位。此外, 在 A549 细胞中过表达 ARAP1-AS1 及在 H1975 细胞中干扰 ARAP1-AS1 的表达, MTS 实验、细胞平板克隆实验检测 ARAP1-AS1 对细胞的增殖能力的影响。结果 GEPIA 数据库提示 ARAP1-AS1 在肺腺癌组织中的表达量显著高于其在正常组织的表达量。qRT-PCR 结果显示 ARAP1-AS1 在肺腺癌细胞中的表达量远高于其在正常肺上皮细胞中的表达量, 其在 A549 和 H1975 细胞中的表达量分别是其在 BEAS-2B 细胞中的 1.6 倍和 3.26 倍, 差异有统计学意义 ($t=6.798, 11.38$, 均 $P < 0.05$)。在 23 对肺腺癌组织与配对癌旁组织中进行 qRT-PCR 验证, 结果发现 ARAP1-AS1 在 83.3% (15/18) 肺腺癌组织中显著高表达, 差异有统计学意义 ($t=2.641, P < 0.05$)。其次, 生物信息学预测 ARAP1-AS1 无蛋白编码能力。在线网站 lncLocator 及核酸分离实验证实 ARAP1-AS1 定位于细胞质。最后, 在 A549 细胞中过表达 ARAP1-AS1 可显著增加细胞的增殖能力, 差异有统计学意义 ($t=2.632, P < 0.05$); 而在 H1975 细胞中敲低 ARAP1-AS1 其细胞增殖能力降低, 差异有统计学意义 ($t=2.621, P < 0.05$)。在 A549 细胞中过表达 ARAP1-AS1 细胞平板克隆形成能力显著增加, 反之亦然, 差异有统计学意义 ($t=30.39, 6.596$, 均 $P < 0.05$)。结论 ARAP1-AS1 在肺腺癌中高表达且定位于细胞质, 并促进肺腺癌细胞的增殖。

关键词: ARAP1 反义 RNA 1; 长非编码 RNAs; 肺腺癌; 增殖

中图分类号: R734.2; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 03-038-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.03.009

Expression Pattern and Biological Characteristics of ARAP1-AS1 in Lung Adenocarcinoma Cells

LIU Xin¹, ZHANG Huan-huan², GUAN Ping¹, DENG Jin²

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, China; 2. Department of Radiation, Affiliated Cancer Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China)

Abstract: Objective To explore the role of long non-coding RNA (lncRNA) ARAP1 antisense RNA 1 (ARAP1-AS1) in lung adenocarcinoma. **Methods** The expression pattern of ARAP1-AS1 in lung adenocarcinoma tissues were predicted and analyzed by the GEPIA database. qRT-PCR was used to detect the expression of ARAP1-AS1 in 23 pair of lung adenocarcinoma tissues and lung adenocarcinoma cells. Bioinformatics analysis combining with experiments determined the encoding ability and cellular localization of ARAP1-AS1. In addition, ARAP1-AS1 was overexpressed in A549 cells and knocked-down in H1975 cells. MTS assays and colony-forming assays were carried out to measure the effect of ARAP1-AS1 on cell proliferation. **Results** The GEPIA database suggested that the expression of ARAP1-AS1 in lung adenocarcinoma tissues was significantly higher than that in normal tissues. qRT-PCR assays showed that the expression level of ARAP1-AS1 in lung adenocarcinoma cells was much higher than that in normal lung epithelial cells, and its expression level in A549 and H1975 cells was 1.6 and 3.26 folds than that in BEAS-2B cells, the difference were statistically significant ($t=6.798$ and $t=11.38$, all $P < 0.05$). In 23 pairs of lung adenocarcinoma tissues and paired adjacent tissues, it was found that ARAP1-AS1 was significantly expressed in 83.3% (15/18) of lung adenocarcinoma tissues, with statistically significant difference ($t=2.641, P < 0.05$). Furthermore, it was predicted that ARAP1-AS1 had no protein coding ability. The online website lncLocator and nucleic acid isolation experiments confirmed that

作者简介: 刘欣 (1985-), 男, 大学本科, 副主任技师, 研究方向: 临床检验, E-mail: xin0079@foxmail.com。

通讯作者: 邓瑾 (1976-), 女, 硕士, 主任医师, 研究方向: 肿瘤学放射治疗, E-mail: prettyeye@126.com。

ARAP1-AS1 was located in the cytoplasm. Finally, overexpression of ARAP1-AS1 in A549 cell could significantly increase the proliferation ability of A549 cells, the difference was statistically significant ($t=2.632, P < 0.05$). While knocking down ARAP1-AS1 in H1975 cells reduced its proliferation ability, with statistically significant difference ($t=2.621, P < 0.05$). Restored ARAP1-AS1 could obviously increase the colony-forming ability, while knocked-down ARAP1-AS1 did the opposite, with statistically significant difference ($t=30.39, 6.596$, all $P < 0.05$). **Conclusion** ARAP1-AS1 is highly expressed in lung adenocarcinoma and localizes in the cytoplasm, and promotes the proliferation of lung adenocarcinoma cells.

Keywords: ARAP1 antisense 1 (ARAP1-AS1); long non-coding RNAs (lncRNAs); lung adenocarcinoma; proliferation

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤,其发病率及死亡率在各类恶性肿瘤中居于首位^[1]。肺腺癌是具有腺样分化或黏液分泌的恶性上皮肿瘤,是肺癌中最常见的病理类型。相关研究指出,肺腺癌患者接受治疗后仍有相当部分发生转移,且患者5年生存率较低^[2-3]。目前,肺腺癌发生发展的机制尚未完全阐明。

长链非编码RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一类长度大于200nt的非编码RNA。lncRNA主要在表观遗传、转录及转录后等层面调控基因表达,从而在体内发挥广泛且复杂的生物学作用^[4-5]。部分lncRNAs (HOTAIR, H19, ANRIL, MALAT1, MEG3 和 GAS5 等) 在肺腺癌中的作用已被揭示,但仍有更多的未知lncRNAs及其作用机制有待进一步的研究^[5-10]。

LncRNA ARAP1-AS1 转录本 ID 是 ENST00000542022.1, 位于11号染色体,其转录本全长388 nt,由2个外显子组成。本研究通过探究 ARAP1-AS1 在肺腺癌中的表达及其相关生物学特征,初步探讨其在肺腺癌中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2017年5月~2018年9月广州医科大学附属肿瘤医院23对肺腺癌及癌旁正常组织标本。人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 和人肺腺癌细胞株 A549, H1299, H1975 和 HCC827 均由课题组自主保存。

1.2 仪器与试剂 PCR 扩增仪购自美国 Bio-RAD 公司。Lipofectamine 2000 试剂盒及 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。cDNA First Strand Reversing kit 及 qRT-PCR SYBR Master Mix 试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司。多功能酶标仪购自美国 BioTEK 公司。10g/dl 胎牛血清的 1640 购自美国 Gibco 公司。PARIS™ Kit 试剂盒购自 thermofisher 公司。6孔板、96孔板购自美国 Corning 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞及培养: 将人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 和人肺腺癌细胞株 A549, H1299, H1975 和 HCC827 接种于含 10g/dl 胎牛血清的 1640 培养液中,在 37℃, 5ml/dl CO₂ 培养箱中培养。待细胞融合度达到 80% 以上,用于后续实验。

1.3.2 qRT-PCR: 用 Trizol 提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA。按说明书配置的反应体系及运行条件。根据 2^{-ΔΔCt} 值计算相对表达量。其引物序列设计: GAPDH: 5'-ATTCCATGGCACCCTCAAGGCTGA-3', 5'-ATTCCATGGCACCCTCAAGGCTGA-3'; ARAP1-AS1: 5'-GCACCCGCTTTCTGCTGTT-3', 5'-TCCTTGTGGGGCTGGAGAGAT-3', 均由天一辉远公司合成。

1.3.3 亚细胞定位实验: 收集目标细胞并用 PBS 洗涤,加入裂解液 Cell Fractionation Buffer, 离心收集上清至新的 EP 管,此为细胞质组分;给上述沉淀中加入 Cell Disruption Buffer, 离心收集上清至新的 EP 管,此为细胞核组分。分别提取细胞质/核的 RNAs, 逆转录成 cDNA, qRT-PCR 检测 ARAP1-AS1 在各细胞组分中的表达。

1.3.4 MTS 细胞增殖实验: 将细胞以 1 000 个细胞/孔的密度接种 96 孔板,待贴壁后 0, 1, 2, 3, 4, 5 和 6 天,每孔加入 20 μl MTS, 3h 后使用多功能酶标仪在 490 nm 处测绝对吸光值,计算各孔细胞的增殖活力。

1.3.5 平板克隆实验: 用胰酶消化处于增殖期的细胞,离心后重悬,作梯度倍数稀释,每组细胞分别以每孔 100, 200 个细胞的梯度分别均匀接种于六孔板中。置培养箱中培养 2~3 周,待细胞形成克隆,染色,拍照。

1.4 统计学分析 所有的实验重复 3 次以确保结果的可靠性。所有的数据均采用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。SPSS 19.0 软件包用于统计分析,两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ARAP1-AS1 在肺腺癌中高表达 见图 1A 所示,在线数据库 GEPIA 分析 ARAP1-AS1 在 483 例肺腺癌组织和 347 例正常组织中的表达量。结果发现,ARAP1-AS1 在肺腺癌组织中的表达量显著高于癌旁组织。qRT-PCR 结果显示:与正常肺上皮细胞相比,ARAP1-AS1 在肺腺癌细胞中普遍高表达,其在 A549 和 H1975 细胞中的表达量分别是其在 BEAS-2B 细胞中的 1.6 倍和 3.26 倍 (见图 1B),差异有统计学意义 ($t=6.798, 11.38$, 均

$P < 0.05$)。在 23 对肺腺癌组织及配对癌旁组织中进行 qPCR 验证, 结果发现 ARAP1-AS1 在 78%

(18/23) 肺腺癌组织中显著高表达, 差异有统计学意义 ($t=2.641$, $P < 0.05$), 见图 1C。

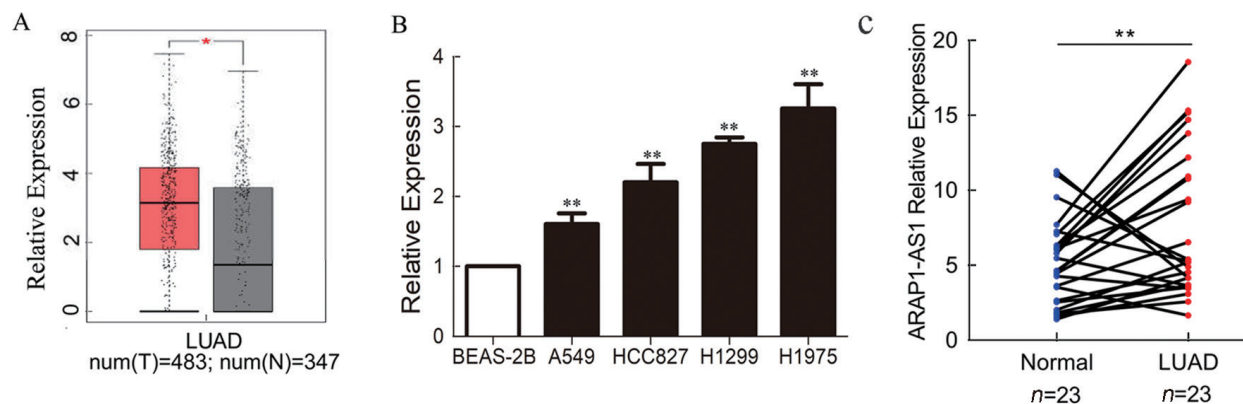


图 1 ARAP1-AS1 在肺腺癌中的表达模式 (** $P < 0.05$)

2.2 ARAP1-AS1 的生物学特征 见图 2A 所示, 生物信息学网站 CPC 预测 ARAP1-AS1 的编码蛋白评分为 -1.02743 , 而 CPAT 预测 ARAP1-AS1 的编码可能性为 0.0434 , 均说明 ARAP1-AS1 不编码蛋白质。在线网站 lncLocator 预测 ARAP1-

AS1 可能定位于细胞质中, 见图 2B。采用胞质核酸分离法提取细胞核与细胞质, qRT-PCR 结果证实 ARAP1-AS1 在 H1975 细胞质的表达量与在细胞核的表达量分别是 0.743 和 0.248 倍, 提示 ARAP1-AS1 主要定位于细胞质中, 见图 2C。

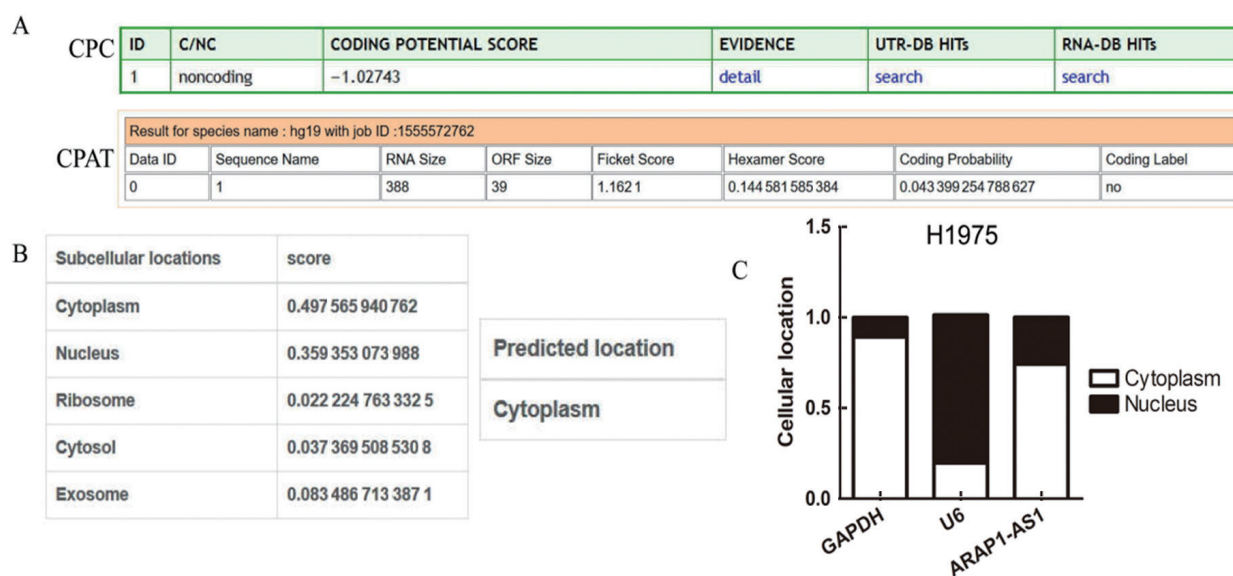
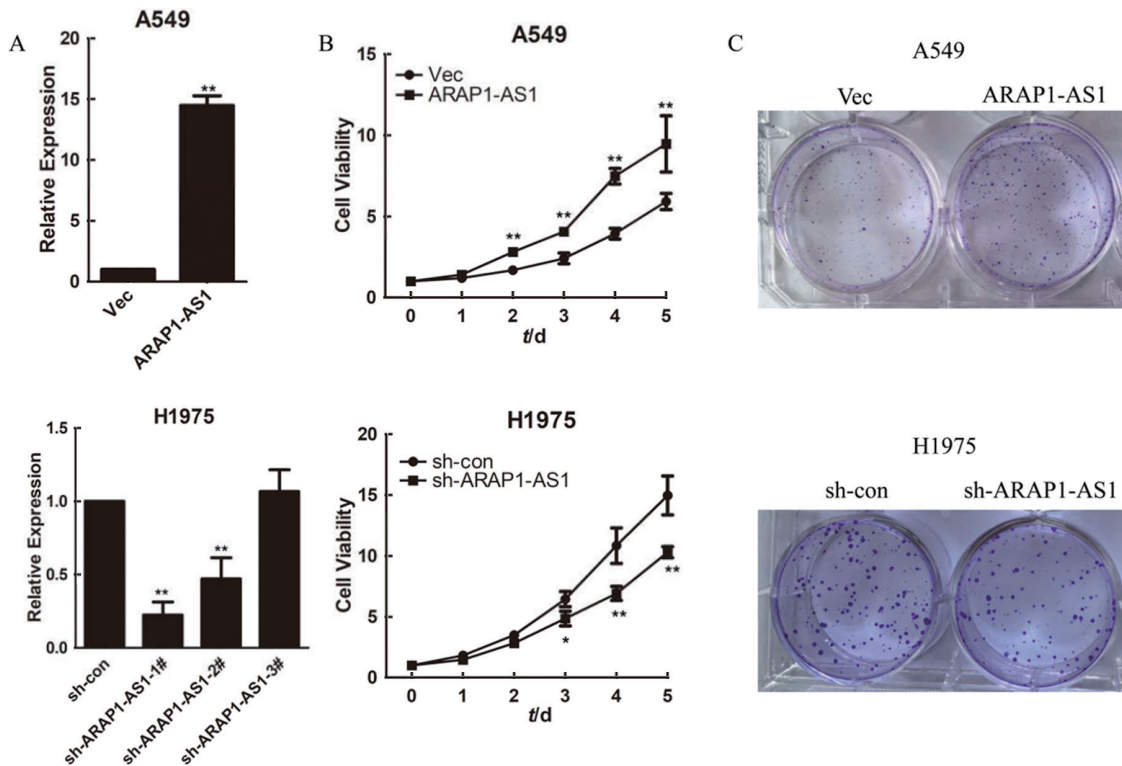


图 2 ARAP1-AS1 的生物学特性

2.3 ARAP1-AS1 促进肺腺癌细胞增殖 将过表达的 ARAP1-AS1 质粒和对照载体分别转染到 A549 细胞中, qRT-PCR 检测发现转染该过表达质粒后, ARAP1-AS1 在过表达组的表达量是对照组的 14.36 倍, 差异有统计学意义 ($t=23.23$, $P < 0.05$), 提示过表达模型建立成功。将靶向 ARAP1-AS1 的 sh-RNAs 转染 H1975 细胞, qRT-PCR 法检测 ARAP1-AS1 的表达量, sh-1 # 干扰片段沉默效果最好, 差异有统计学意义 ($t=12.73$, $P < 0.05$), 用于后续研究 (图 3A)。如图 3B 所示, ARAP1-AS1 可显著促进肺腺癌细胞 A549 的增殖能力, 差

异有统计学意义 ($t=2.632$, $P < 0.05$)。同样, 在 H1975 细胞中, 敲低 ARAP1-AS1 后发现, 该细胞的增殖能力明显较对照组降低, 差异有统计学意义 ($t=2.621$, $P < 0.05$)。图 3C 为平板克隆实验检测 ARAP1-AS1 对肺癌细胞增殖能力的影响, 在 A549 细胞中过表达 ARAP1-AS1 细胞平板克隆形成能力显著增加, 差异有统计学意义 ($t=30.39$, $P < 0.05$); 在 H1975 细胞中, 敲低 ARAP1-AS1 细胞平板克隆形成能力明显降低, 差异有统计学意义 ($t=6.596$, $P < 0.05$)。

图3 ARAP1-AS1 促进肺腺癌细胞的增殖 (** $P < 0.05$)

3 讨论

越来越多的研究表明, lncRNA 正在成为肿瘤发生和侵袭性进展的关键调控因子, 被广泛报道参与肿瘤细胞生长、转移和耐药^[11]。lncRNA 可以通过多种机制参与疾病的发生、发展, 它可以通过 ceRNA 活性发挥 miRNA 海绵作用调控关键通路上的基因表达, 也可以直接调控邻近的编码基因发挥生物学作用。比如 lncRNA PVT1 作为 miR-199a-5p 的 ceRNA 而促进非小细胞肺癌中 HIF-1 α 的表达^[12-13]。而 lnc-EPIC1 可能通过靶向 MYC 促进肺癌细胞生长^[14]。lncRNA TUG1 在甲状腺癌组织及细胞中高表达, 促进甲状腺癌细胞增殖和迁移, 可能通过促进 EMT 的形成进而促进甲状腺癌细胞的生物学行为^[15]。

相关文献报道 ARAP1-AS1 参与胃癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、膀胱癌等恶性肿瘤的发生发展, 并可能参与糖尿病和糖尿病肾病的发病机制。ARAP1-AS1 在宫颈癌组织、细胞系和血清中显著上调, 被认为是一种有效的诊断和预后的宫颈癌的生物标志物, 且过表达 ARAP1-AS1 促进了宫颈癌细胞的生长和扩散, c-Myc 通过直接与位于 ARAP1-AS1 启动子上的 E-box motif 结合, 能够转录激活 ARAP1-AS1^[16]。研究发现, ARAP1-AS1 在乳腺癌组织高表达, 它的下调可抑制乳腺癌细胞的增殖, 增强细胞凋亡, 阻断细胞迁移, 通过调节 miR-2110/HDAC2/PLIN1 信号, 在乳腺癌的发展

中起到肿瘤启动子的作用^[17]。TENG 等^[18]认为, ARAP1-AS1 通过作为 ceRNA 调控 miR-4735-3p/NOTCH2 轴在膀胱癌中的表达。相关研究表明, 大部分 lncRNA 定位于细胞核中, 但仍有部分位于细胞质中的 lncRNA 发挥着重要功能, 且 lncRNA 独特的亚细胞定位模式是 lncRNA 作用机制多样性的前提^[19]。

与此相一致的是, 本文通过 GEPIA 数据库统计分析发现, ARAP1-AS1 在肺腺癌组织中高表达, 并与 23 对肺癌组织及癌旁组织进行验证的结果相符。生物信息学预测结合亚细胞定位实验探索其生物学特征, 结果证实 ARAP1-AS1 无蛋白编码能力且主要定位于细胞质。在肺腺癌细胞中过表达 ARAP1-AS1 将促进该细胞增殖及平板克隆形成能力, 反之亦然。但 ARAP1-AS1 促进肺腺癌细胞增殖的具体机制仍尚未明确, 后续将进一步深入研究。

参考文献:

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
 - [2] 彭 瑛, 邓正华, 温先勇. 国内 13 种血清肿瘤标志物对肺癌诊断价值的 Meta 分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(1): 96-100.
- PENG Ying, DENG Zhenghua, WEN Xianrong. Diagnostic value of thirteen types of serum tumor markers for lung cancer in China: A meta-analysis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(1): 96-100.

- [3] PENG Wanxin, KOIRALA P, MO Yinyuan. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J]. *Oncogene*. 2017,36(41):5661-5667.
- [4] DENISENKO T V, BUDKEVICH IN, ZHIVOTOVSKY B. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2018,9(2):117.
- [5] FENG Changjiang, ZHAO Yi, LI Yunjing, et al. LncRNA MALAT1 promotes lung cancer proliferation and gefitinib resistance by acting as a mir-200a sponge[J]. *Arch Bronconeumol*, 2019,55(12):627-633.
- [6] WANG Cong, LI Ying, LI Yongwen, et al. HOTAIR lncRNA SNPs rs920778 and rs1899663 are associated with smoking, male gender, and squamous cell carcinoma in a Chinese lung cancer population[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018,39(11):1797-1803.
- [7] LEI Yi, GUO Wang, CHEN Bowang, et al. Tumor released lncRNA H19 promotes gefitinib resistance via packaging into exosomes in non small cell lung cancer[J]. *Oncol Rep*, 2018,40(6):3438-3446.
- [8] CHEN Ying, LI C, PAN Y, et al. The emerging role and promise of long noncoding RNAs in lung cancer treatment[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016,38(6):2194-2206.
- [9] JIANG Lin, LI Zheng, WANG Ranran. Long non coding RNAs in lung cancer: Regulation patterns, biologic function and diagnosis implications (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2019,55(3):585-596.
- [10] ZHANG Chong, HAO Yajing, WANG Yanxiao, et al. TGF- β /SMAD4-regulated lncRNA-LINP1 inhibits epithelial-mesenchymal transition in lung cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2018,14(12):1715-1723.
- [11] 张振, 李芬. ceRNA 与肿瘤 [J]. 现代检验医学杂志, 2016,31(4):128-130.
ZHANG Zhen, LI Fen, ceRNA and Tumor [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016,31(4):128-130.
- [12] WANG Chunhong, HAN Chunfang, ZHANG Yibo, et al. LncRNA PVT1 regulate expression of HIF1 α via functioning as ceRNA for miR 199a 5p in non small cell lung cancer under hypoxia[J]. *Mol Med Rep*, 2018,17(1):1105-1110.
- [13] ZHANG Bing, LU Huiyu, LU Yuxin, et al. Long non-coding RNA EPIC1 promotes human lung cancer cell growth[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503 (3):1342-1348.
- [14] ZHANG Yao, WU Dan, WANG Dian. Long non-coding RNA ARAP1-AS1 promotes tumorigenesis and metastasis through facilitating proto-oncogene c-Myc translation via dissociating PSF/PTB dimer in cervical cancer[J]. *Cancer Med*, 2020,9(5):1855-1866.
- [15] 赵芳芳, 郭红, 陈嘉. LncRNA TUG1 在甲状腺癌组织中的表达及其对细胞增殖和迁移的影响 [J]. 现代检验医学杂志, 2020,35(6):42-47.
ZHAO Fangfang, GUO Hong, CHEN Jia. Expression of lncRNA TUG1 in thyroid carcinoma tissues and its effect on cell proliferation and migration[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020,35(6):42-47.
- [16] LU Chong, WANG Xiuhua, ZHAO Xiangwang, et al. Long non-coding RNA ARAP1-AS1 accelerates cell proliferation and migration in breast cancer through miR-2110/HDAC2/PLIN1 axis[J]. *Biosci Rep*, 2020,40(4):BSR20191764.
- [18] TENG Jingfei, AI Xing, JIA Zhuomin, et al. Long non-coding RNA ARAP1-AS1 promotes the progression of bladder cancer by regulating miR-4735-3p/NOTCH2 axis[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019,20(4):552-561.
- [19] BERGMANN J H, SPECTOR D L. Long non-coding RNAs: modulators of nuclear structure and function[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 26:10-18.

收稿日期: 2020-05-28

修回日期: 2021-02-22

(上接第37页)

- [10] HUANG Xiao, QIN Xianhui, YANG Wenbin, et al. MTHFR gene and serum folate interaction on serum homocysteine lowering: prospect for precision folic acid treatment[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2018, 38(3): 679-685.
- [11] 王勉勉, 李喜梅, 唐少华. MTHFR 基因多态性与自然流产的关系 [J]. 中国妇幼保健, 2017,32(1):92-94.
WANG Mianmian, LI Ximei, TANG Shaohua. Relationship between MTHFR gene polymorphism and spontaneous abortion [J]. *Maternal & Child Health Care of China*, 2017, 32 (1): 92-94.
- [12] 徐佳佳, 梁玲芝, 陈贤君, 等. MTHFR 基因多态性与先兆流产和复发性流产的关系 [J]. 中国妇幼保健, 2019,34(6):1326-1328.
XU Jiajia, LIANG Lingzhi, CHEN Xianjun, et al. Relationships between MTHFR gene polymorphism and threatened abortion, recurrent spontaneous abortion [J]. *Maternal & Child Health Care of China*, 2019, 34 (6): 1326-1328.
- [13] RENNERT G, RENNERT H S, PINCHEV M, et al. Hormonal and reproductive factors and reduction in the risk of colorectal cancer[J]. *European Journal of Cancer Prevention*, 2020, 29(3): 229-237.
- [14] JUNG Y W, AHN E H, KIM J O, et al. Association of genetic polymorphisms in VEGF -460, -7 and -583 and hematocrit level with the development of idiopathic recurrent pregnancy loss and a meta-analysis[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2018, 20(9) : e3048.
- [15] 王燕, 林娜, 陈雪美, 等. 反复自然流产患者淋巴细胞主动免疫的治疗效果及其与 HLA 相关性研究 [J]. 海南医学, 2018,29(1):59-61.
WANG Yan, LIN Na, CHEN Xuemei, et al. Therapeutic effect of lymphocyte active immunotherapy in recurrent spontaneous abortion patients and its correlation with human lymphocyte antigen[J]. *Hainan Medical Journal*, 2018, 29 (1): 59-61.

收稿日期: 2021-01-22

修回日期: 2021-03-11