

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.04.004
文章编号: 1005-8982(2019)04-0018-05

临床研究·论著

LncRNA H19 在食管癌组织中的表达 及其与细胞转移的关系

朱坤¹, 徐楠楠², 韩振东¹, 白学义¹

(1. 齐齐哈尔医学院附属第三医院 心胸外科, 黑龙江 齐齐哈尔 161000; 2. 齐齐哈尔市
第一医院 检验科, 黑龙江 齐齐哈尔 161005)

摘要: **目的** 探究长链非编码 RNA H19 (LncRNA H19) 在食管癌组织中表达的临床意义及其对食管癌细胞 TE1 体外转移能力的影响。**方法** 选取 2015 年 6 月—2017 年 3 月齐齐哈尔医学院附属第三医院心胸外科收治的 72 例食管癌患者的肿瘤组织及相应癌旁组织, 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测组织中 LncRNA H19 的表达情况, 分析患者肿瘤组织中 LncRNA H19 与性别、年龄、肿瘤组织分化程度及 TNM 分期的关系。实验组和对照组分别转染表达 LncRNA H19 的慢病毒载体及空白载体于食管癌细胞 TE1 中, 采用 Transwell 侵袭及迁移模型检测两组细胞的转移能力, Western blotting 检测两组细胞基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 及基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的表达。**结果** 食管癌组织中 LncRNA H19 的表达高于癌旁组织 ($P < 0.05$); 不同 TNM 分期、淋巴结转移率及组织分化程度患者的 LncRNA H19 表达水平有差异 ($P < 0.05$)。实验组 LncRNA H19 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$); 实验组侵袭及迁移细胞数高于对照组 ($P < 0.05$); 实验组 MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达水平高于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** LncRNA H19 在食管癌组织中高表达, 且可通过上调 MMP 的表达促进食管癌细胞的转移。

关键词: 食管肿瘤; 长链非编码 RNA H19/RNA, 长链非编码; 肿瘤转移; 基质金属蛋白酶类

中图分类号: R735.1; R363

文献标识码: A

Clinical significance of LncRNA H19 in esophageal cancer and its relationship with cell metastasis

Kun Zhu¹, Nan-nan Xu², Zhen-dong Han¹, Xue-yi Bai¹

(1. Department of Cardio-Thoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161000, China; 2. the First Hospital of Qiqihar City, Qiqihar, Heilongjiang Province 161005, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical significance of expression of long non-coding RNA H19 (LncRNA H19) in esophageal carcinoma and its effect on the metastasis ability of human esophageal cancer cell line TE1 in vitro. **Methods** Totally 72 cases of esophageal carcinoma and the corresponding adjacent tissues were collected from department of cardio-thoracic surgery in our hospital from June 2015 to March 2017. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of LncRNA H19 in tissues, and analyze the relationship between the expression and gender, age, tumor differentiation, TNM stages. Lentivirus transfected the vector expressing LncRNA H19 and empty vector into human esophageal cancer cell line TE1, as the test group and control group. Transwell invasion and migration assay were used to detect the invasion and migration ability of both group cells. Western Bolt assay was used to detect the expression of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase -9 (MMP-9). **Results** The expression of LncRNA H19 in esophageal carcinoma was significantly higher than that in adjacent tissue, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Patients with high expression of LncRNA H19 in esophageal cancer tissue compared to those with low expression had lower

收稿日期: 2018-08-11

degree of tissue differentiation and higher lymph node metastasis rate, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression of LncRNA H19 in test group was significantly higher than that in control group cells, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The numbers of invasive and migrating cells in test group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expressions of MMP-2 and MMP-9 protein in test group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** LncRNA H19 is highly expressed in esophageal cancer tissues, and can promote the metastasis of esophageal cancer cells by up-regulating the expression of MMP.

Keywords: esophageal neoplasms; H19 long non-coding RNA/RNA, long noncoding; neoplasm metastasis; matrix metalloproteinases

食管癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一, 2015年我国食管癌新发47.79万例, 死亡37.50万例, 分别居全部恶性肿瘤的第3和4位, 严重威胁人们的生命健康^[1]。食管癌早期症状隐匿、进展迅速且侵袭性强, 多数患者确诊时已处于晚期, 导致患者总体生存率仅为20%左右^[2]。因此, 明确影响食管癌发生、发展的确切机制对食管癌的早期诊断及靶向药物开发具有重要意义。近年来发现长链非编码RNA H19 (LncRNA H19) 参与多种恶性肿瘤的进展^[3]。本研究通过体外实验探究 LncRNA H19 在食管癌中的表达情况及其与食管癌转移的关系, 为寻找食管癌临床诊治的新靶标提供线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年6月—2017年3月齐齐哈尔医学院附属第三医院心胸外科收治的72例食管癌患者的肿瘤组织及相应癌旁组织(距离原发灶 >5 cm), 取材后用液氮保存并标记。患者均为初发食管癌, 术前未行放化疗、免疫治疗等抗肿瘤治疗。其中, 男性41例, 女性31例; 年龄33~75岁, 平均 (54.9 ± 13.1) 岁; 高、中分化48例, 低分化24例; TNM分期I期13例, II期36例, III期23例; 淋巴结转移43例, 无淋巴结转移29例。本研究中患者均签署知情同意书。

1.2 人食管癌细胞 TE1 的培养及细胞系构建

人食管癌细胞 TE1 (美国 ATCC 公司) 用 RPMI-1640 (美国 Gibco 公司) +10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司) 培养。人肾上皮细胞系 HEK293T (美国 ATCC 公司) 是一种工具细胞, 使用 DMEM (美国 Gibco 公司) +10% FBS 培养, 于 ACB-6A1 超净工作台 (新加坡 Esco 公司) 中严格无菌操作, 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 常规 3111 生化培养箱 (美国 Thermo 公司) 中培养。TE1 细胞在其中进行慢病毒的包装后收集病毒悬液。利用脂质

体 Lipofectamine 2000 (美国 Thermo 公司) 转染表达 LncRNA H19 的慢病毒载体及空白载体 (上海吉凯基因化学技术有限公司) 人食管癌细胞 TE1 中^[4]。收集含 LncRNA H19 慢病毒载体和空白载体的病毒悬液。实验组采用 RPMI-1640+10% FBS 与含 LncRNA H19 慢病毒载体的悬液 1:1 混合培养 3 d; 对照组采用 RPMI-1640+10% FBS 与含空白载体的悬液 1:1 混合培养 3 d, 期间加入 2 μl 聚凝胺 (美国 Sigma 公司), 1 μg/ml 嘌呤霉素筛选细胞 (美国 Sigma 公司) 至细胞稳定生长。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应

从液氮中取出组织标本, 取适量组织进行研磨, 1 ml RNAiso Plus (日本 TaKaRa 公司) 重悬组织; 收集两组 6 cm 培养皿中融合度 $>80\%$ 的对数生长期细胞, 同样 1 ml RNAiso Plus 重悬细胞。将准备好的组织或细胞样本用 Trizol 法抽提总 RNA, 用逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 将 2 μg RNA 逆转录为相应的 cDNA, 稀释引物至 100 nmol/ml, LncRNA H19 正向引物: 5' -GGCAAGAAGCGGGTCTGT-3'; 反向引物: 5' -GTGCAGCATATTCATTTCCAAG-3'; β-actin 正向引物: 5' -CCTGGCACCCAGCACAAAT-3'; 反向引物: 5' -GCTGATCCACATCTGCT-3'。与 Sybr Green 荧光染料 (日本 TaKaRa 公司) 配置, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 系统 (Applied Biosystems 7500) 进行荧光定量分析, β-actin 作为内参基因, 用 2^{-ΔΔC_t} 法计算各个样本 LncRNA H19 的相对表达量, 设置 3 个重复孔, 计算其均数和标准差。

1.4 Transwell 侵袭及迁移模型

将 50 μg/ml 基质胶 (美国 Corning 公司) 与 RPMI-1640 培养基 1:8 混合, 均匀平铺至 Transwell 小室 (美国 Corning 公司), 于生化培养箱中孵育 4 h, 用 RPMI-1640 培养基重悬两组细胞, 细胞计数仪 (美国 Bio-Rad 公司) 检测细胞悬液浓度, 调整细胞浓度

至 1×10^6 个/ml, 取 $100 \mu\text{l}$ 加至铺基质胶的 Transwell 小室中央, 同样加入 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液于未铺基质胶的 Transwell 小室, 分别作为 Transwell 侵袭及迁移模型。将两组细胞于生化培养箱中培养 24 h, 棉球拭去上室面细胞, PBS 洗小室 3 次, 10% 甲醇固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 30 min, DM1000 光学显微镜 (200 倍, 德国 Leica 公司) 下细胞计数, 取 5 个随机视野, 计算其均值和标准差。

1.5 Western blotting 检测

收集两组 6 cm 培养皿中融合度 >80% 的对数生长期细胞, 1 ml 细胞裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司) +1 mmol 蛋白酶抑制剂 (美国 Amresco 公司) 重悬细胞, 冰上裂解细胞 1 h, 4°C 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司), 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 BCA 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 检测总蛋白浓度。取 $40 \mu\text{g}$ 上样量行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 100 V 稳压转膜, 1 : 1 000 β -肌动蛋白 (SAB3500350, 美国 Sigma 公司)、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) (M6184, 美国 Sigma 公司) 及基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) (M5177, 美国 Sigma 公司) 抗体室温孵育相应目的条带 2 h, PBS 洗膜 3 次, 1 : 1 000 羊抗兔 IgG 抗体 (R1131, 美国 Sigma 公司) 孵育 1 h, PBS 洗膜 3 次。采用 ECL 发光液 (美国 Millipore 公司) 孵育条带 30 s, 化学发光成像系统 (Invitrogen E-Gel Imager, 美国 Thermo 公司) 曝光目的条带并扫描条带灰度值。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计数资料以率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验; 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数和四分位数间距 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 比较用 t 检验或秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌组织及癌旁组织中 LncRNA H19 的比较

qRT-PCR 结果显示, 实验组组织中 LncRNA H19 表达水平为 0.214 (0.282, 0.132), 对照组组织中为 0.103 (0.139, 0.055), 经秩和检验, 差异有统计学意义 ($Z = 1.375, P = 0.000$), 实验组高于对照组。见图 1。

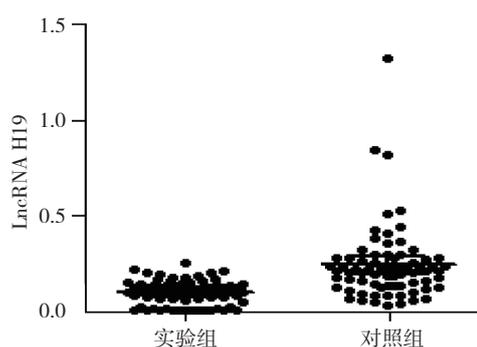


图 1 食管癌组织及癌旁组织中 LncRNA H19 的比较

2.2 食管癌组织中 LncRNA H19 表达水平与患者临床病理特征的关系

不同 TNM 分期、淋巴结转移率及组织分化程度患者的 LncRNA H19 高表达率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而不同的年龄、性别、肿瘤大小比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 两组 LncRNA H19 蛋白表达水平比较

实验组 LncRNA H19 蛋白表达水平为 $(0.835 \pm$

表 1 不同影响因素患者的 LncRNA H19 高表达率比较

因素	例数	高表达例数	高表达率/%	χ^2 值	P 值
年龄					
>50 岁	39	18	46.2	0.039	0.844
≤ 50 岁	33	16	48.5		
性别					
男	41	19	46.3	0.030	0.863
女	31	15	48.4		
TNM 分期					
I、II 期	49	19	38.7	4.391	0.036
III 期	23	15	65.2		
肿瘤大小					
>3 cm	44	23	50.0	1.158	0.282
≤ 3 cm	28	11	39.3		
淋巴结转移					
有	51	29	56.9	6.512	0.011
无	21	5	23.8		
分化程度					
高、中分化	48	18	37.5	5.461	0.019
低分化	24	16	66.7		

0.117), 对照组为 (0.336 ± 0.089) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.277, P=0.004$)。见图 2。

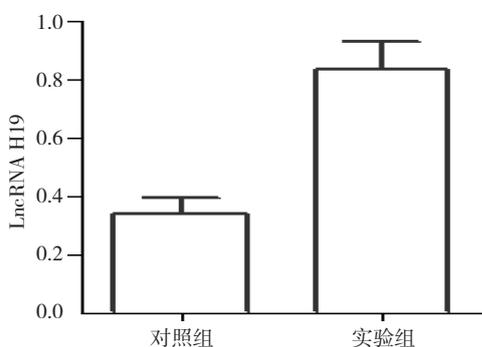


图 2 两组 LncRNA H19 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.4 两组细胞侵袭及迁移能力比较

Transwell 侵袭模型显示, 实验组细胞侵袭细胞数 (59.28 ± 9.57) 个, 对照组 (37.44 ± 6.26) 个, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=4.271, P=0.003$)。实验组细胞迁移细胞数 (143.10 ± 17.92) 个, 对照组 (68.16 ± 10.35) 个, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=8.097, P=0.000$)。见图 3。

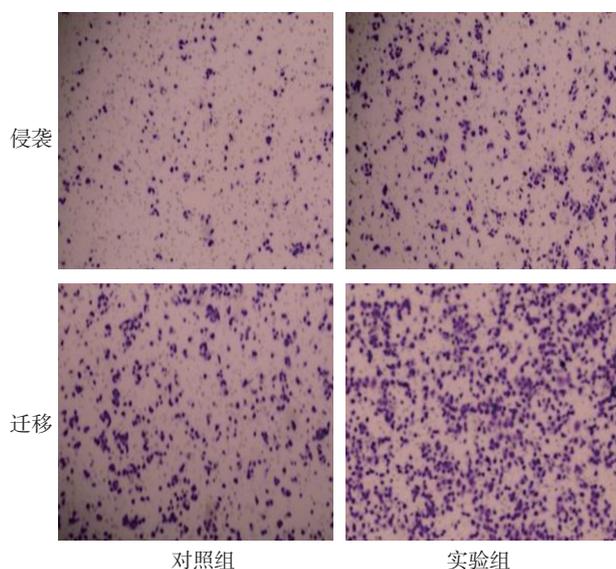


图 3 两组细胞侵袭及迁移能力比较 ($\times 200$)

2.5 两组 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平比较

Western blotting 结果显示, 实验组 MMP-2 相对表达量为 (0.383 ± 0.049) , 对照组为 (0.147 ± 0.030) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.433, P=0.001$); 实验组 MMP-9 相对表达量为 (0.724 ± 0.095) , 对照组为 (0.408 ± 0.063) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=4.801, P=0.003$)。见图 4。

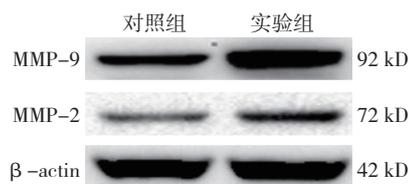


图 4 两组 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达

3 讨论

LncRNA 是一类转录长度 <200 bp 的非编码 RNA, 可通过多种表观遗传机制调控基因的表达, 在机体内发挥重要的生物学作用。LncRNA H19 作为 LncRNA 中的一员, 参与哺乳动物早期胚胎发育, 并在组织器官成熟后表达下调。近年有研究显示, 其在多种恶性肿瘤中表达重新上调, 且参与恶性肿瘤的发生、发展, 包括非小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌及结直肠癌等: ① LncRNA H19 高表达于非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), 其表达与患者预后总生存时间呈负相关, 另外 LncRNA H19 可促进 NSCLC 细胞 c-Myc 的表达, 进而介导细胞的恶性增殖^[5-6]。② LncRNA H19 在乳腺癌组织中高表达, 其可通过下调 E3 泛素连接酶家族 c-Cbl 和 Cbl-b 的表达, 抑制表皮生长因子受体泛素化过程, 促进其稳定性, 介导乳腺癌细胞增殖及侵袭能力^[7]。③ LncRNA H19 高表达于胃癌组织, 且可促进胃癌细胞体内外的增殖转移能力, 胃癌患者组织及血浆中 LncRNA H19 的高表达均可提示患者预后不良^[8-9]。④ LncRNA H19 还可通过介导结直肠癌细胞上皮间充质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT), 促进肿瘤组织体内外生长, 同时 LncRNA H19 还可作为结直肠癌进展及患者不良预后的标志物^[10-11]。⑤ LncRNA H19 还可通过激活 Wnt/ β -连环蛋白信号通路, 下调 E-钙黏蛋白的表达, 进而增强膀胱癌细胞增殖及侵袭能力^[12]。上述研究均提示 LncRNA H19 可作为原癌基因发挥作用, 但其在食管癌中表达的临床意义及对食管癌细胞转移能力的影响尚不明确。

本研究显示 LncRNA H19 在食管癌组织中高表达, 提示 LncRNA H19 可能参与食管癌的发生、发展, 同时 LncRNA H19 的表达与患者组织分化、TNM 分期及淋巴结转移密切相关, 高表达 LncRNA H19 的患者倾向于较低的组织分化程度, 提示 LncRNA H19 对食管癌恶性转化可能存在促进作用, 较高的 TNM 分期及淋巴结转移率表明 LncRNA H19 可能促进食管癌

细胞的局部淋巴结转移。为进一步明确 LncRNA H19 对食管癌细胞转移能力的影响,笔者在 TE1 细胞中外源性上调 LncRNA H19 的表达,发现细胞侵袭及迁移能力均增强。MMP-2、MMP-9 为金属基质蛋白酶家族成员,两者可相互作用,共同促进细胞外基质的降解,且可通过促进细胞 EMT 的发生,介导细胞活性的增强。有研究显示,MMP-2 及 MMP-9 在多种恶性肿瘤中高表达,在介导肿瘤细胞的侵袭、迁移的过程中发挥重要作用^[14-15]。笔者对 LncRNA H19 促食管癌细胞转移的相关机制进行探究,发现上调 LncRNA H19 后,MMP-2、MMP-9 表达升高,提示 LncRNA H19 可通过促进 MMP-2、MMP-9 的表达,介导细胞外基质模型基底膜的降解,进而导致细胞侵袭能力增强,促进细胞活性,增强细胞迁移能力。

综上所述,本研究明确 LncRNA H19 在食管癌组织中的高表达水平及其对食管癌细胞转移的促进作用,但 LncRNA H19 与食管癌体内外增殖的关系尚不清楚。笔者拟在接下来的研究中扩大临床标本数量,并通过体外实验明确其与食管癌体内外生长的关系,为 LncRNA H19 的食管癌诊断试剂盒及靶向药物研发提供新依据。

参 考 文 献:

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA-Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] 谭晓. 血清标志物在食管鳞癌早期诊断中的应用研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016: 3.
- [3] RAVEH E, MATOUK I J, GILON M, et al. The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis-a proposed unifying theory[J]. Mol Cancer, 2015, 14(1): 184.
- [4] 刘永敏, 段萍, 鄢文海, 等. 过表达 microRNA-29a 上调锌脂蛋白 91 对大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞凋亡的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(11): 18-23.
- [5] ZHANG E, LI W, YIN D, et al. c-Myc-regulated long non-coding RNA H19 indicates a poor prognosis and affects cell proliferation in non-small-cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 4007-4015.
- [6] CUI J, MO J, LUO M, et al. c-Myc-activated long non-coding RNA H19 downregulates miR-107 and promotes cell cycle progression of non-small cell lung cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 12400-12409.
- [7] VENNIN C, SPRUYT N, DAHMANI F, et al. H19 non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b[J]. Oncotarget, 2015, 6(30): 29209-29223.
- [8] LI H, YU B, LI J, et al. Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer[J]. Oncotarget, 2014, 5(8): 2318-2329.
- [9] ZHOU X, YIN C, DANG Y, et al. Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer[J]. Sci Rep, 2015, 5(1): 11516.
- [10] LIANG W C, FU W M, WONG C W, et al. The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(26): 22513-22525.
- [11] HAN D, GAO X, WANG M, et al. Long noncoding RNA H19 indicates a poor prognosis of colorectal cancer and promotes tumor growth by recruiting and binding to eIF4A3[J]. Oncotarget, 2016, 7(16): 22159-22173.
- [12] LUO M, LI Z, WANG W, et al. Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression[J]. Cancer Letters, 2013, 333(2): 213-221.
- [13] LIU Y, SUN X, FENG J, et al. MT2-MMP induces proteolysis and leads to EMT in carcinomas[J]. Oncotarget, 2016, 7(30): 48193-48205.
- [14] BAUVOIS B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1825(1): 29-36.
- [15] GUAN X, WANG X, LUO H, et al. Matrix metalloproteinase 1, 3, and 9 polymorphisms and esophageal squamous cell carcinoma risk[J]. Med Sci Monit, 2014, 20(20): 2269-2274.

(李科 编辑)