

LncRNA CTD-3252C9.4 抑制人胰腺癌 Panc-1 细胞 体外侵袭迁移的机制

尹馨, 史婉月, 潘怡, 金亮*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 研究长链非编码 RNA(lncRNA)CTD-3252C9.4 对人胰腺癌细胞 Panc-1 体外迁移和侵袭的抑制作用及其机制。采用培养胰腺癌微球体的三维半固体体系中的表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)刺激培养 Panc-1 细胞;采用 RT-qPCR 检测 lncRNA CTD-3252C9.4 在 Panc-1 中的表达量和载体转染效率;采用划痕-愈合法和 Transwell 小室法检测 lncRNA CTD-3252C9.4 及其靶基因骨形态发生蛋白 7(bone morphogenetic protein 7, BMP7)对 Panc-1 细胞侵袭和迁移能力的影响;采用 Western blot 验证靶基因 BMP7 和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白表达量的变化。结果表明:EGF 能显著抑制 Panc-1 中 lncRNA CTD-3252C9.4 的表达,且该 lncRNA 能够通过抑制促癌基因 BMP7 的转录影响细胞侵袭和迁移能力,并且抑制肿瘤的 EMT 过程。

关键词 lncRNA; BMP7; 胰腺癌; 侵袭转移; 上皮间质转化

中图分类号 R735 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2019)02-0230-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190215

引用本文 尹馨, 史婉月, 潘怡, 等. lncRNA CTD-3252C9.4 抑制人胰腺癌 Panc-1 细胞体外侵袭迁移的机制[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(2): 230–237.

Cite this article as: YIN Xin, SHI Wanyue, PAN Yi, et al. Mechanism of lncRNA CTD-3252C9.4 on invasion and migration of pancreatic cancer Panc-1 cells *in vitro*[J]. *J China Pharm Univ*, 2019, 50(2): 230–237.

Mechanism of lncRNA CTD-3252C9.4 on invasion and migration of pancreatic cancer Panc-1 cells *in vitro*

YIN Xin, SHI Wanyue, PAN Yi, JIN Liang*

School of Life Sciences and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The aim of this study is to investigate the inhibitory effect of long non-coding RNA(lncRNA) CTD-3252C9.4 on migration and invasion of human pancreatic cancer cell Panc-1 *in vitro* and its mechanism. Panc-1 cells were stimulated by epidermal growth factor (EGF) in three-dimensional semi-solid system of cultured pancreatic cancer spheres. RT-qPCR was used to detect the transfection efficiency of lncRNA CTD-3252C9.4. The effects of lncRNA CTD-3252C9.4 and bone morphogenetic protein 7 (BMP7) on the invasion and migration of Panc-1 cells were detected by scratch healing method and Transwell chamber method. The changes of target gene BMP7 and epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins were verified by Western blot. EGF could significantly inhibit the expression of lncRNA CTD-3252C9.4 in Panc-1 cells. The lncRNA can affect cells invasion and migration by inhibiting the transcription of the oncogene BMP7, then inhibit the process of EMT of tumors.

Key words lncRNA; bone morphogenetic protein 7; pancreatic cancer; invasion and metastasis; epithelial-mesenchymal transition

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81570696, No. 81702941)

收稿日期 2019-01-23 *通信作者 Tel:025-83271152 E-mail:ljstemcell@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81570696, No. 81702941)

胰腺癌是一种常见的消化道肿瘤,由于缺乏早期症状和筛查手段,大多数患者在诊断出胰腺癌时已经处于晚期^[1],胰腺癌患者的预后和临床治疗结果极差。尽管包括临床手术、化疗和放疗在内的治疗手段有了长足发展,但胰腺癌患者的 5 年总生存率仍然非常低(<5%),造成胰腺癌具有死亡率高、生存期较短、预后效果极差的特征^[2]。胰腺癌是一种极具侵袭性的实体瘤,常发生局部浸润和早期转移^[3],而分子生物学的快速发展为胰腺癌的诊治提供了新的研究方向。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类超过 200 个核苷酸的转录物,不具有编码蛋白质的功能^[4]。LncRNA 可以通过空间结构影响功能基因发挥作用,也可以在转录前、转录过程中和转录后发挥调控功能,主要包括顺式调节相邻基因的变化和反式调节远端基因的表达^[5]。许多研究已经阐释了 lncRNA 在胰腺癌发生发展过程中对肿瘤侵袭、迁移和增殖能力起到关键的调控作用,如 lncRNA HOTAIR 通过抑制胰腺癌中原癌基因的活力发挥抑癌功能,lncRNA HOT-TIP 被证明能抑制胰腺癌侵袭迁移,lncRNA UCA1 通过调控 miR-96/FOXO3 轴发挥抑制胰腺癌细胞增殖和转移的能力等^[6-8]。

在实验室前期研究中,本课题组建立并优化一种新型的三维半固体培养体系,能够在体外成功诱导和培养胰腺癌干细胞样微球体,该方法能有效的富集得到 CD44⁺ CD24⁺ ESA⁺ 阳性的 Panc-1 球体细胞,它比普通胰腺癌细胞具有更高的恶性程度。表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 是三维半固体培养体系的重要成分之一,它是一个含 53 个氨基酸的单链多肽,有研究发现 EGF 在胰腺癌等肿瘤的肿瘤微环境中高表达,且在肿瘤的侵袭转移过程中发挥了重要作用^[9-10]。本研究对微球体细胞进行高通量测序,以考察可能具有调控干细胞特性的分子。其中, lncRNA CTD-3252C9.4 是测序后发现在胰腺癌干细胞中显著下调的 lncRNA 之一,它也被称作 LOC284454、ENST00000587762,它在胰腺癌中还未曾报道,因此本文将对 lncRNA CTD-3252C9.4 在胰腺癌中的表达和功能进行研究,并探讨其可能的作用机制,为胰腺癌的进一步研究和治疗提供参考依据。

1 材 料

1.1 试 剂

DMEM 高糖培养基、DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (FBS)、B27、N2 (美国 Gibco 公司); Lipofectamine™ 2000、Trizol 试剂、ITS (美国 Invitrogen 公司); EGF、碱性成纤维细胞生长因子 (basic-fibroblast growth factor, b-FGF) (美国 PeproTech 公司); 苄基磺酰氟 (PMSF)、RIPA 裂解溶液、BCA 蛋白质定量试剂盒、胰蛋白酶 (上海碧云天生物公司); 兔抗人骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein 7, BMP7) 多克隆抗体 (美国 Abcam 公司), 兔抗人 E-cadherin 单克隆抗体、兔抗人 Twist 多克隆抗体、兔抗人 Slug 单克隆抗体 (美国 CST 公司); GAPDH 单克隆抗体 (美国 Santa 公司); LncRNA Smart Silencer (广州锐博生物科技公司); All-in-one 逆转录试剂盒、实时荧光定量 RT-qPCR 试剂盒 (镇江爱必梦生物公司)。

1.2 仪 器

实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Roche 公司); 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); 酶标仪 (美国 Biotek 公司); 显微图象采集系统 (日本 Olympus 公司); Western blot 电泳转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细 胞

人胰腺癌细胞系 Panc-1、MIApaca-2、Bxpc-3 和正常胰腺细胞系 HPDE, 购自上海生命科学院细胞所。

2 方 法

2.1 细胞培养

胰腺癌细胞 Panc-1 于含 10% FBS 和 1% 青霉素链霉素溶液的 DMEM 高糖完全培养基中贴壁生长, 常规培养于 37 °C、5% CO₂/95% 空气的细胞培养箱中, 当细胞密度为 80% ~ 90% 时, 用 PBS 清洗一遍, 再用胰酶细胞消化液进行消化 1 min, 按照 1:2 比例传代。在 6 孔板中加入细胞悬液, 每孔 2×10^5 个的细胞, 继续培养用于后续实验。

2.2 三维半固体培养 Panc-1 成球细胞

配制三维半固体培养体系: DMEM/F12 培养基 26 mL 中加入血清 260 μ L 并添加 2% B27, 1% ITS, 1% N₂, 0.1% 20 μ g/mL EGF 溶液, 0.1% 20 μ g/mL b-FGF 溶液和 0.1% 青霉素链霉素溶液, 加入 Panc-1 细胞悬液, 之后再加入 3.3% 甲基纤维素

溶液 6 mL 加入并摇晃混匀,将细胞与黏稠的半固体培养基按每孔 1 mL 的量加入到 24 孔低黏附板中培养。培养 11 d 后可见较大球形细胞微球体,将微球体细胞收集于离心管中,以备后续实验。

2.3 EGF 刺激胰腺癌细胞实验

待 6 孔板中细胞密度长到 70% 汇合度时,将完全培养基换成不含双抗和血清的培养基,“饥饿”24 h 后,分别使用含有 EGF 或不含 EGF 的培养成分刺激胰腺癌细胞,培养 48 h 后,收集细胞备用。

2.4 RNA 的提取和 RT-qPCR 实验

用 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA 进行反转录,得到 cDNA,然后检测其中 lncRNA CTD-3252C9.4 的 mRNA 水平的表达,RT-qPCR 反应数据以循环阈值(Ct)记录,实验结果利用 $\Delta\Delta Ct$ 法进行计算,用 GAPDH 作为内参对照(lncRNA CTD-3252C9.4 和 GAPDH 引物序列见表 1)。

Table 1 Primers used for qRT-PCR of lncRNA CTD-3252C9.4 and GAPDH genes

Primer	Sequence (5' to 3')
LncRNA CTD-3252C9.4-F	GAGGAGGCACACTGAAGTCC
LncRNA CTD-3252C9.4-R	CCAAGCTTCTGTCCACGACT
GAPDH-F	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT
GAPDH-R	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT

2.5 质粒构建和细胞转染

LncRNA CTD-3252C9.4 全长 1774 bp,定位于细胞核。构建过表达载体时,使用 PCR 将 lncRNA CTD-3252C9.4 片段克隆进以 *Xho* I 和 *Bam* H I 为酶切位点的 pcDNA3.1(+)真核生物表达质粒(PCR 引物见表 2),命名 pcDNA-CTD-3252C9.4,其空载对照命名 pcDNA-control。使用小干扰 RNA(lncRNA Smart Silencer)敲降 lncRNA CTD-3252C9.4 的表达,命名 si-CTD-3252C9.4,其对照命名 si-control,使用 ddH₂O 溶解小干扰 RNA 干粉至终浓度为 20 μ mol/L 的工作液。取“2.1”项中所述培养于 6 孔板的细胞,根据 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书操作转染,在无血清培养 6 h 后将上清液换为 DMEM 培养液,继续培养用于后续实验。

Table 2 Primers used for PCR of lncRNA CTD-3252C9.4

Primer	Sequence (5' to 3')
LncRNA CTD-3252C9.4-F	CGCGGATCCGGGTCAAGCCCCCTTGGA
LncRNA CTD-3252C9.4-R	CCGCTCGAGTGAAGTCAGGGCAACTTT-TATTTAC

2.6 划痕-愈合实验

将种植于 6 孔板中的细胞转染 24 h 后,细胞

长满单细胞层。使用 10 μ L 枪头在细胞层中垂直作十字划痕处理,分别于 0, 48 h 时在显微镜下观察划痕位置细胞迁移情况并拍照,每组设置 3 个平行复孔,并按照以公式(1)计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率}(\%) = \frac{0 \text{ h 划痕宽度} - 48 \text{ h 划痕宽度}}{0 \text{ h 划痕宽度}} \quad (1)$$

2.7 Transwell 小室法实验

转染细胞 24 h 后,消化并离心,用无血清的 DMEM 培养基吹打混匀,细胞计数后,调整细胞的浓度为每毫升 5×10^5 个细胞,在 Transwell 小室的下室加入含 5% FBS 的 DMEM 培养基 800 μ L,在上室加入混匀的细胞悬液 200 μ L。侵袭实验中,在实验前 4 h 在冰上操作加入 Matrigel 胶稀释液,每孔 50 μ L,并于 37 $^{\circ}$ C 培养箱静置备用。细胞在培养箱培养 48 h 后,用 PBS 小心清洗,在 4% 多聚甲醛固定 30 min 后,用 0.1% 结晶紫染色 30 min,将小室在 PBS 中清洗后,用棉签小心擦去膜上层细胞,用显微镜观察并拍照,随机选取 3 个视野计算细胞穿膜数。

2.8 Western blot 检测

细胞转染 48 h 后,使用 RIPA(加 1% PMSF)裂解液收取细胞蛋白,加入变性上样缓冲液,于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。按照每孔蛋白上样量 30 μ g,使用浓度为 10% 的 SDS-PAGE 分离不同的蛋白质,再使用半干转法转印将蛋白转至 PVDF 膜上,使用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h;TBST 清洗 3 次后,再按照条带加入 1:1 000 稀释的兔抗人 BMP7 抗体、E-cadherin 抗体、Twist 抗体、Slug 抗体及 GAPDH 抗体,4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,次日吸出抗体,以 TBST 洗涤 3 次,加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000)室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,使用 ECL 显色系统定影显色,以 GAPDH 作为内参对照,实验重复 3 次。

2.9 统计学方法

实验数据使用 SPSS v17.0 统计软件进行统计分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 5 统计软件进行数据统计及图像处理。两组间的比较用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 LncRNA CTD-3252C9.4 在胰腺癌细胞中低表达
根据测序结果,发现在胰腺癌干细胞中存在

35 个显著变化的 lncRNA, 其中 lncRNA CTD-3252C9.4 显著降低至 40%^[11]。为了验证该结果, 本研究使用三维半固体培养体系进行 Panc-1 干样细胞微球体的培养, 并提取 RNA 进行 RT-qPCR 检测, 结果如图 1-A 所示, 与普通 Panc-1 细胞相比, lncRNA CTD-3252C9.4 在 Panc-1 成球细胞中的表达降低至 11%, 具有显著差异。此外, 本研究检测了 lncRNA CTD-3252C9.4 在 3 种不同的胰腺癌细胞系中的表达量高低, 根据恶性程度的强度大小依次为 Panc-1, MIApaca-2 和 Bxpc-3, RT-qPCR 的结果显示(图 1-B), 以正常胰腺细胞 HPDE 为对照, lncRNA CTD-3252C9.4 在恶性程度最高的 Panc-1 中其表达量最低, 其表达量与细胞系恶性程度成负相关。因此结果提示, lncRNA CTD-3252C9.4 可能参与胰腺癌的发展过程, 本研究选择 Panc-1 细胞系进行后续实验研究。

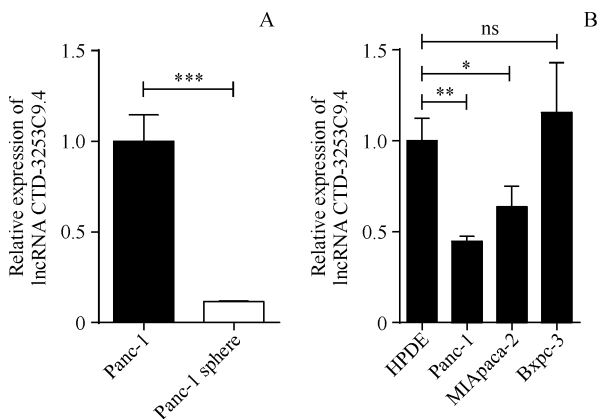


Figure 1 Relative expression of lncRNA CTD-3252C9.4 in Panc-1 sphere (A) and three different pancreatic cancer cell lines (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$

3.2 EGF 能特异调控 lncRNA CTD-3252C9.4 在 Panc-1 细胞中表达下调

在胰腺癌干细胞微球体培养中, 本研究添加了多种成分对 Panc-1 细胞进行干性诱导和维持。有文献指出, 表皮生长因子 EGF 对胰腺癌的生长浸润功能具有重要作用^[12], 因此猜想是否培养体系中的 EGF 能够调控 lncRNA CTD-3252C9.4 的表达。本研究设置了使用普通 DMEM 培养的阴性对照组、含全部刺激成分的阳性对照组、仅不含 EGF 的 EGF(-) 组和仅含 0.1% EGF 的 EGF(+) 组, 将各成分加入到 Panc-1 细胞中进行培养 48 h 后, 通过 RT-qPCR 检测 lncRNA CTD-3252C9.4 的

mRNA 水平。结果显示, 比于阴性对照, 阳性对照组中 lncRNA CTD-3252C9.4 的表达量相组发生显著下调, EGF(-) 组的表达量没有发生改变, 而 EGF(+) 组的 lncRNA CTD-3252C9.4 发生显著下调。

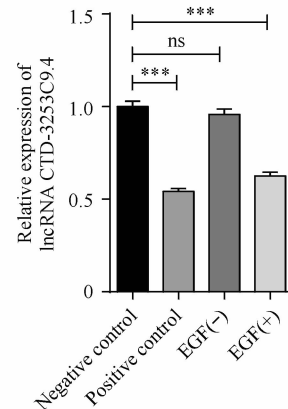


Figure 2 Changes of lncRNA CTD-3252C9.4 after epidermal growth factor (EGF) stimulation ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

*** $P < 0.001$

3.3 lncRNA CTD-3252C9.4 抑制 Panc-1 细胞侵袭和迁移

首先构建过表达和敲降载体, 并检验其转染表达量分别为过表达上调约 400 倍、敲降下调至 43%, 具有显著性差异(图 3-A)。划痕-愈合实验证明, 与对照组相比, 在 Panc-1 细胞中过表达 lncRNA CTD-3252C9.4 后, 细胞划痕的间隙变化水平显著降低, 相反, 敲降之后细胞划痕间隙变化水平显著增高(图 3-B)。此外, Transwell 小室结果显示, 过表达 lncRNA-CTD-3252C9.4 的细胞侵袭和迁移数量显著减少, 而敲降 lncRNA CTD-3252C9.4 后, 侵袭和迁移数量显著增高(图 3-C), 表明该 lncRNA 具有抑制胰腺癌细胞侵袭和转移的能力。

3.4 预测靶基因 BMP7 及验证

高通量测序结果显示 lncRNA CTD-3252C9.4 有 4 个潜在的靶点, 且预测它们均为 lncRNA CTD-3252C9.4 的反式调控基因, 分别是 AP1S3、PQLC2、ZBED1 和 BMP7(图 4-A)。因此, 本研究检测了过表达 lncRNA CTD-3252C9.4 后, Panc-1 细胞中 4 个靶基因的 mRNA 表达量, 结果如图 4-B 所示, AP1S3、PQLC2、ZBED1 的 mRNA 水平未发生显著变化, 而 BMP7 的含量显著降低。通过分别过表达和敲降 lncRNA CTD-3252C9.4 的表达, 证明 lncRNA CTD-3252C9.4 对 BMP7 的 mRNA 水平(图 4-C)和蛋白水平(图 4-D)均发挥负向调控的作用,

说明 BMP7 是 lncRNA CTD-3252C9.4 的靶基因。此外,本研究通过 GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 分析发现(图 4-E), BMP7 在胰腺癌组织中高表达,表示其可能具有促癌功能。

gepia. cancer-pku. cn) 分析发现(图 4-E), BMP7 在胰腺癌组织中高表达,表示其可能具有促癌功能。

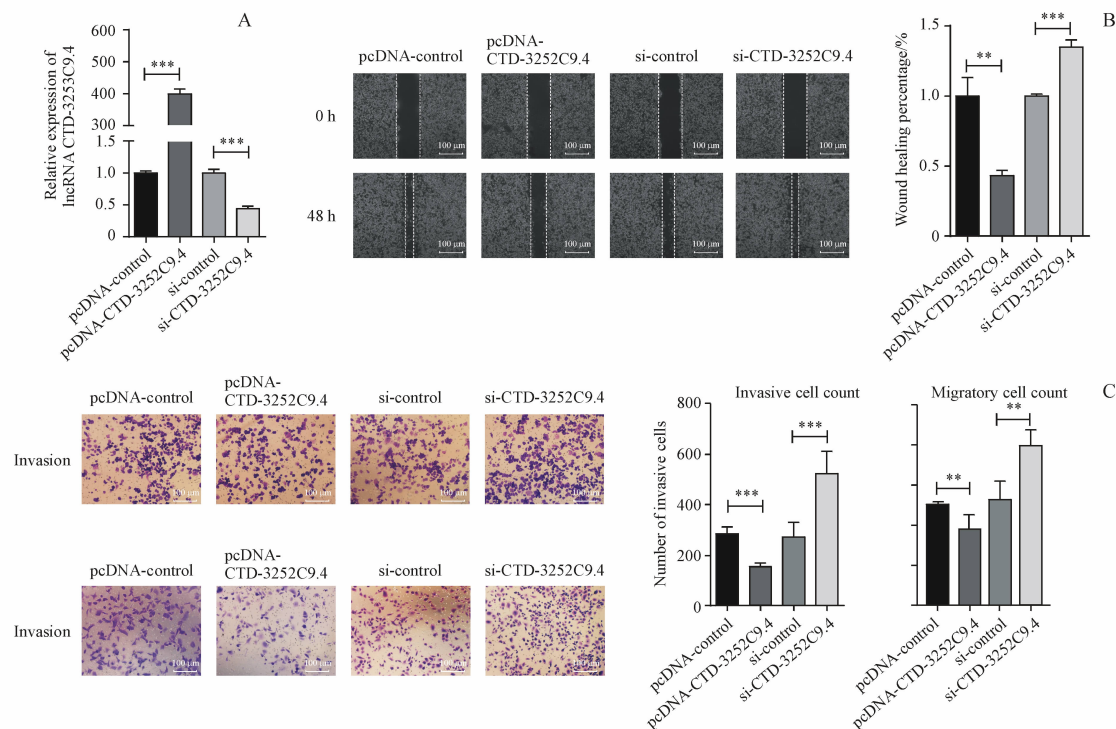


Figure 3 (A) Overexpressed and knockdown efficiency of CTD-3252C9.4 was evaluated in Panc-1 ($\bar{x} \pm s, n=3$). Effects of scratch healing (B) and invasion and migration (C) after overexpressing and knocking-down of lncRNA CTD-3252C9.4 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$

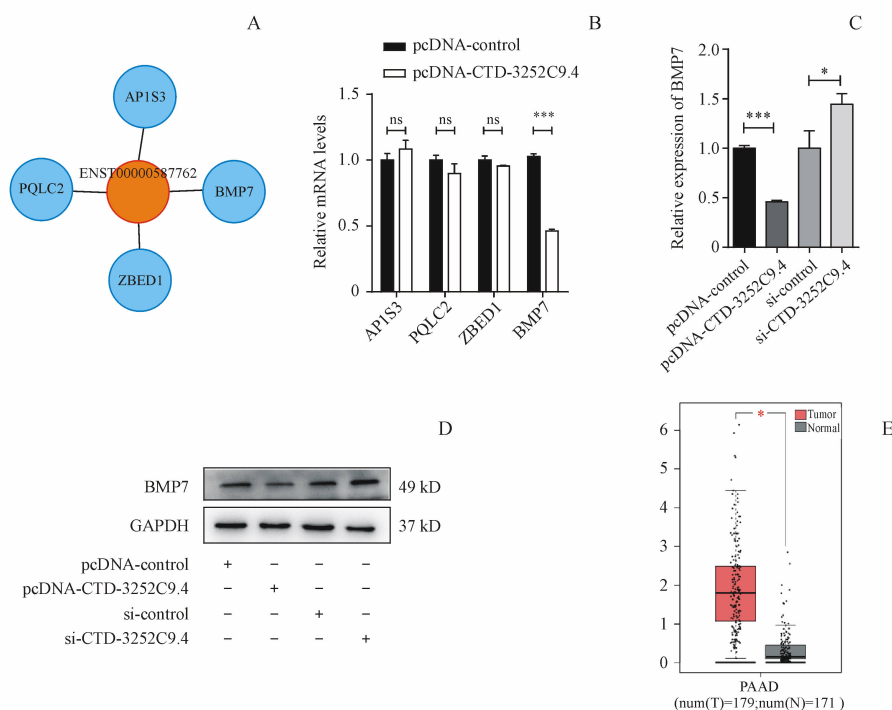


Figure 4 (A) Sequencing results predicted 4 targets for lncRNA CTD-3252C9.4. (B) After overexpressing lncRNA CTD-3252C9.4, the mRNA levels of 4 predictive targets ($\bar{x} \pm s, n=3$); Overexpression and knockdown of lncRNA CTD-3252C9.4 resulted in changes in BMP7 mRNA levels (C) and protein levels (D) ($\bar{x} \pm s, n=3$); (E) Expression of BMP7 in pancreatic cancers according to GEPIA

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

3.5 LncRNA CTD-3252C9.4 影响 BMP7 调控的上皮间充质转化过程

骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetix protein 7, BMP7) 具有促进肿瘤细胞侵袭迁移能力的作用,并能够调控转录因子 Twist 和 Slug 的表达,从而影响上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的过程^[13]。本研究构建了 BMP7 的过表达和敲降载体 (方法同 2.5), 将其转染至 Panc-1 细胞中, 验证其能否影响细胞的转移能力, 且能否通过影响 lncRNA CTD-3252C9.4 将其功能回复。结果如图 5-A 所示, 划痕-愈合实验证明过表达 BMP7 后细胞迁移的比例增加, 且能够反转由于过表达 lncRNA CTD-3252C9.4 后造成的细胞转移能力降低的效果。此外, 敲降实验及其回复实验也显

示证明了以上结果。随后, 本研究利用 Western blot 法检测了转染 BMP7 和 lncRNA CTD-3252C9.4 后, Panc-1 细胞中上皮标志物 E-cadherin 和间质标志物 Twist、Slug 3 个 EMT 相关蛋白的变化。结果如图 5-B 显示, 过表达 lncRNA CTD-3252C9.4 能够促进 E-cadherin 的表达, 抑制 Twist 和 Slug 的表达, 而过表达 BMP7 可以使 E-cadherin 的表达减少, Twist 和 Slug 蛋白表达增多, 同时回复实验显示 BMP7 能够反转 lncRNA CTD-3252C9.4 对蛋白的影响。此外, 敲降实验及其回复实验也显示证明了以上结果。这表明 lncRNA CTD-3252C9.4 能够抑制 BMP7 调控的 EMT 过程。

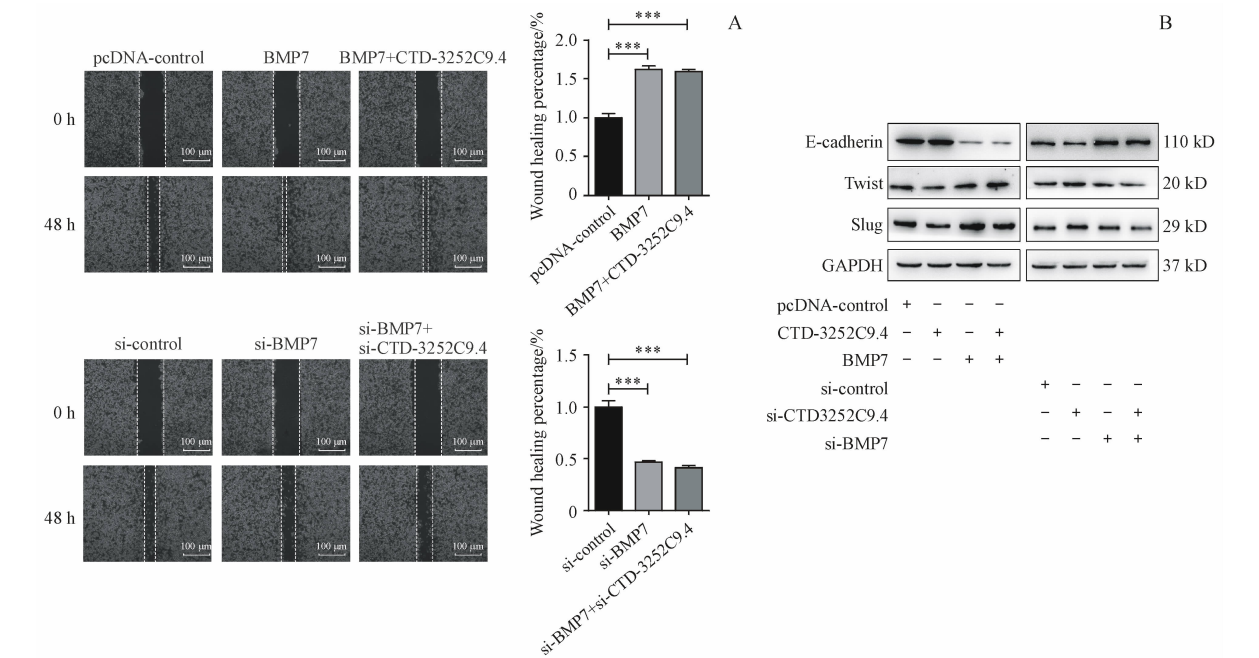


Figure 5 Effects of scratch healing (A) and the changes of bone morphogenetix protein 7 (EMT)-related proteins (B) affected by lncRNA CTD-3252C9.4 and BMP7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
*** $P < 0.001$ vs pcDNA/si-control group

4 讨论

目前, 随着对肿瘤的深入研究, 肿瘤干细胞逐渐被发现具有重要研究价值。胰腺癌干细胞被认为是具有自我更新、多向分化和高致癌性的多潜能细胞^[14-15], 它的恶性程度要远高于普通的胰腺癌细胞。为了寻找与胰腺癌发生相关的变化因子, 前期本课题组使用三维半固体培养体系, 培养出具有干性特性的胰腺癌干细胞微球体, 并将其进行了

高通量测序, 在测序结果中发现的明显差异表达并且可能与干性维持及肿瘤恶性程度相关的分子, 越来越多证据表示 lncRNA 在肿瘤发生相关发展中发挥重要作用, 因此本研究对其中明显下调的 lncRNA CTD-3252C9.4 进行了研究。肿瘤的侵袭和迁移是大多数胰腺癌患者死亡的原因, 表皮生长因子是实验室前期用作三维半固体培养体系的重要成分之一, EGF 是一种作用广泛的生长因子, 能够在多种细胞和组织中发挥促进细胞生长分裂、调

节细胞代谢周期、刺激组织再生与修复等作用^[16], 此外 EGF 在肿瘤中发挥促进肿瘤生长和血管生成等功能^[17–18]。因此为了探究 EGF 对 lncRNA CTD-3252C9.4 是否存在调控作用, 本研究设计了 4 种不同成分的培养基对 Panc-1 细胞进行刺激培养, 结果表明, 相比于普通培养环境, 添加了 EGF 的培养基能够使 Panc-1 中的 lncRNA CTD-3252C9.4 含量显著降低, 因此本研究推测, EGF 是诱导 lncRNA CTD-3252C9.4 下调的主要因素之一。

研究发现, lncRNA 在不同的肿瘤类型中有独特的表达, 其表达的变化是影响肿瘤等疾病的重要因素^[19]。lncRNA CTD-3252C9.4 是一个长链非编码 RNA, 定位在细胞核内, 且已被证明无编码能力, 它在乳腺癌、前列腺癌、子宫癌和肾癌中具有抑癌作用, 但其作用机制尚不明确^[20]。在 NCBI 中 lncRNA CTD-3252C9.4 的 Gene Accession 为 NR_036515.2, 根据 hg38 基因组注释, 它定位于 chr19:13945330–13947473。为进一步揭示 lncRNA CTD-3252C9.4 的可能作用机制, 本研究构建了过表达和敲降载体, 并转染到胰腺癌细胞 Panc-1 中进行功能实验。划痕和 Transwell 实验结果显示, 相比于其对照组, 过表达和敲降 lncRNA CTD-3252C9.4 后能够分别显著抑制和促进细胞的侵袭和迁移能力, 说明 lncRNA CTD-3252C9.4 具有能够参与胰腺癌细胞转移过程的能力。

为进一步研究 lncRNA CTD-3252C9.4 的作用机制, 本研究寻找了其可能作用的靶点。在测序结果中, 发现并验证了 BMP7 是其下游的潜在反式调控基因。据报道, 某些 lncRNA 可以直接结合染色体中邻近位置的 DNA 调节基因表达, 发挥顺式调控作用^[21], 而一些 lncRNA 也可以与远端蛋白(通常是转录因子)结合, 形成 DNA-蛋白复合物, 从而调控下游分子的转录, 也称为反式调控^[22]。BMP7 是转化生长因子- β (TGF- β) 超家族的成员之一, 位于 20 号染色体, 其主要功能是参与骨骼的发育和诱导异位骨的形成, 且被广泛报道与肿瘤细胞上皮间质转化的过程密切相关, 具有促进肿瘤细胞侵袭的迁移的能力^[23–24]。BMP7 刺激激活 TGF- β , 调控信号传导和细胞周期途径, 在经典的 BMPs/Smad 信号通路中, BMPs 配体与 BMPs 受体结合, 从而导致 Smad 1/5/8 磷酸化, 聚合 Smad 4, 进入细胞核, 调节下游靶基因^[25–26]。本研究发现, 在胰腺癌细

胞 Panc-1 中过表达 lncRNA CTD-3252C9.4 能够显著抑制 BMP7 的 mRNA 和蛋白水平, 然而敲降 lncRNA CTD-3252C9.4 后, BMP7 的表达量增加, 表明 BMP7 受到 lncRNA 的负向调控作用。在 BMP7 功能实验中, 发现其能够显著促进细胞的侵袭和迁移能力, 并且逆转 lncRNA CTD-3252C9.4 造成的抑制效果, 达到回复的目的。此外, 通过 Western blot 检测 EMT 相关蛋白的变化时, 发现 BMP7 能够促进 EMT 的过程, 而 lncRNA CTD-3252C9.4 发挥相反的作用, 回复实验能使其表达水平改变。以上实验结果表明 lncRNA CTD-3252C9.4 可能通过在转录水平上抑制 BMP7 的转录, 进而影响细胞内 BMP7 所调控的通路, 发挥抑制胰腺癌细胞侵袭和迁移的能力。

综上所述, 本研究首次发现 EGF 作为肿瘤微环境中丰富表达的促肿瘤细胞因子, 可以抑制胰腺癌细胞 Panc-1 中的 lncRNA CTD-3252C9.4 表达, 并且证明了 lncRNA CTD-3252C9.4 具有抑制肿瘤细胞侵袭和迁移的能力。在机制研究中, 发现促癌基因 BMP7 是其潜在的作用靶点, 且 lncRNA CTD-3252C9.4 能够通过 BMP7 参与到调控肿瘤 EMT 的过程。lncRNA CTD-3252C9.4 作为胰腺癌中一个新的具有调控功能的 lncRNA, 将为胰腺癌的诊断和治疗提供新的研究参考依据。

参考文献

- [1] Mohammed S, Van Burden IIG, Fisher WE, et al. Pancreatic cancer: advances in treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, **20**(28): 9354–9360.
- [2] Wei W, Liu Y, Lu Y, et al. lncRNA XIST promotes pancreatic cancer proliferation through miR-133a/EGFR[J]. *J Cell Biochem*, 2017, **118**(10): 3349–3358.
- [3] Long J, Luo GP, Xiao ZW, et al. Cancer statistics: current diagnosis and treatment of pancreatic cancer in Shanghai, China[J]. *Cancer Lett*, 2014, **346**(2): 273–277.
- [4] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2009, **136**(4): 629–641.
- [5] Muers M. RNA: genome-wide views of long non-coding RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, **12**(11): 742.
- [6] Zhou Y, Chen Y, Ding W, et al. lncRNA UCA1 impacts cell proliferation, invasion, and migration of pancreatic cancer through regulating miR-96/FOXO3[J]. *Jubmb Life*, 2018, **70**(4): 276–290.
- [7] Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, et al. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreat-

- ic cancer[J]. *Oncogene*,2013,**32**(13):1616–1625.
- [8] Yating C, Indira J, Gayathri C, *et al.* The long non-coding RNA HOTTIP enhances pancreatic cancer cell proliferation, survival and migration[J]. *Oncotarget*,2015,**6**(13):10840–10852.
- [9] Murphy LO, Cluck MW, Lovas S, *et al.* Pancreatic cancer cells require an EGF receptor-mediated autocrine pathway for proliferation in serum-free conditions[J]. *Br J Cancer*,2001,**84**(7):926–935.
- [10] Han L, Ma Q, Li J, *et al.* High glucose promotes pancreatic cancer cell proliferation via the induction of EGF expression and transactivation of EGFR[J]. *PLoS One*,2011,**6**(11):e27074.
- [11] Yang Z, Zhang Y, Tang T, *et al.* Transcriptome profiling of Panc-1 spheroid cells with pancreatic cancer stem cells properties cultured by a novel 3D semi-solid system[J]. *Cell Physiol Biochem*,2018,**47**(5):2109–2125.
- [12] Sheng W, Chen C, Dong M, *et al.* Calreticulin promotes EGF-induced EMT in pancreatic cancer cells via Integrin/EGFR-ERK/MAPK signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*,2017,**8**(10):e3147.
- [13] Lim M, Chuong CM, Royburman P. PI3K, Erk signaling in BMP7-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of PC-3 prostate cancer cells in 2-and 3-dimensional cultures[J]. *Horm Cancer*,2011,**2**(5):298–309.
- [14] Chenwei L, Heidt DG, Piero D, *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. *Cancer Res*,2007,**130**(2):194–195.
- [15] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, *et al.* Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer[J]. *Cell Stem Cell*,2007,**1**(3):313–323.
- [16] Silva CO, Petersen SB, Reis CP, *et al.* EGF functionalized polymer-coated gold nanoparticles promote EGF photostability and EGFR internalization for photothermal therapy[J]. *PLoS One*,2016,**11**(10):e0165419.
- [17] Guo B, Gao J, Zhan J, *et al.* Kindlin-2 interacts with and stabilizes EGFR and is required for EGF-induced breast cancer cell migration[J]. *Cancer Lett*,2015,**361**(2):271–281.
- [18] Yang CC, Chang KW. Eicosanoids and HB-EGF/EGFR in cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*,2018,**37**(1/2/3/4):1–11.
- [19] Schmitt A, Chang H. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways[J]. *Cancer Cell*,2016,**29**(4):452–463.
- [20] Das M, Renganathan A, Dighe SN, *et al.* DDX5/p68 associated lncRNA LOC284454 is differentially expressed in human cancers and modulates gene expression[J]. *RNA Biol*,2017,**15**(2):214–230.
- [21] Faghihi M, Modarresi F, Am, Wood D, *et al.* Expression of a non-coding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase[J]. *Nat Med*,2008,**14**(7):723–730.
- [22] Deng SJ, Chen HY, Ye Z, *et al.* Hypoxia-induced LncRNA-BX111 promotes metastasis and progression of pancreatic cancer through regulating ZEB1 transcription[J]. *Oncogene*,2018,**37**(44):5811–5828.
- [23] Alarmo EL, Pärssinen J, Ketolainen JM, *et al.* BMP7 influences proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells[J]. *Cancer Lett*,2009,**275**(1):35–43.
- [24] Zeng YH, Zhou LY, Chen QZ, *et al.* Resveratrol inactivates PI3K/Akt signaling through upregulating BMP7 in human colon cancer cells[J]. *Oncol Rep*,2017,**38**(1):456–464.
- [25] Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors[J]. *Genes Dev*,2005,**19**(23):2783–2810.
- [26] Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*,1998,**9**(1):49–61.