

敲减长链非编码 RNA ATB 抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭

张新雨, 马春春, 卞尔保, 王洪亮, 宗 钢, 赵 兵

摘要 目的 采用 shRNA ATB 敲减胶质瘤 U87 细胞中 ATB 后, 研究其对胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

方法 本研究采用实时定量 PCR (qRT-PCR) 方法检测 ATB 在人胶质瘤细胞系 U87 与正常人脑胶质细胞 HEB 中的表达情况。并在此基础上构建了 ATB 表达载体 shRNA ATB 质粒, 利用其转染人胶质瘤 U87 细胞株, 获取低表达 ATB 的 U87 细胞。应用 MTT 法检测敲减 ATB 后对 U87 细胞增殖的影响; 应用细胞克隆实验检测敲减 ATB 后对 U87 细胞克隆增殖能力的影响; 应用 Transwell 实验检测敲减 ATB 后对 U87 细胞迁移和侵袭能力的影响。**结果** qRT-PCR 结果显示, 与正常人脑胶质细胞 HEB 相比, 人脑胶质瘤细胞系 U87 中 ATB 表达明显上调 ($P < 0.01$); 与 shRNA 对照组相比, 转染了 shRNA-ATB 实验组能显著减少 ATB 水平 ($P < 0.01$); 细胞克隆实验显示 shRNA-ATB 实验组细胞克隆形成能力较 shRNA 对照组明显降低 ($P < 0.01$); MTT 结果表明敲减细胞内 ATB 后细胞增殖的速率明显低于 shRNA 对照组 ($P < 0.01$)。此外, Transwell 实验进一步验证了敲减胶质瘤 U87 细胞中的 ATB 后, 细胞迁移和侵袭能力明显受到抑制 ($P < 0.01$)。**结论** 靶向敲减 U87 细胞中的 ATB 后能够抑制其增殖、迁移和侵袭, 表明 ATB 基因可能是胶质瘤患者的潜在治疗靶点。

关键词 胶质瘤; 长链非编码 RNA; ATB; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1123-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.006

近期大量研究^[1-2]报道, 人类基因组中有一类长度 > 200 个核苷酸而无编码蛋白功能的 RNA (long non-coding RNA, lncRNA), 已经被证实生物学人体内的转录和转录后过程中, 在调节基因表达和染色质重组方面发挥重要的调控作用。

2017-04-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 81402078、81502149); 安徽省自然科学基金项目(编号: 1608085MH225、1508085MH194); 安徽医科大学校科研基金(编号: 2015xkj021)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院神经外科, 合肥 230601

作者简介: 张新雨, 男, 硕士研究生;

赵 兵, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhaopumcmd@yeah.net

ATB 是首个被发现的能被转化生长因子激活的长链非编码 RNA, 研究^[3]报道 ATB 在肝癌中通过竞争性结合 miR-200 家族, 进而诱导上皮间质转化和促进侵袭能力, ATB 在肝癌中表达升高, 同时与肝癌患者的临床预后直接相关性。ATB 作为 lncRNA 的最新成员之一。因此, ATB 基因的激活与肿瘤发生发展有重要关系, 并且很有可能肿瘤分子靶向治疗的切入点。该研究旨在探究 shRNA ATB 干扰 ATB 后对人胶质瘤 U87 细胞功能实验的研究, 这些结果为神经胶质瘤进展阐述了一个新的分子机制, 并神经胶质瘤的分子靶向治疗提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 胶质瘤细胞 U87 和正常胶质细胞 HEB 购自上海生命科学院; MTT 试剂购自美国 Sigma 公司; DEPC 无酶水、DMSO 试剂均购自上海碧云天科技有限公司; FBS、Opti-MEM 及 DMEM 均购自美国 Gibco 公司; 胰酶消化液购自美国 Hyclone 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; TRIzol 购自美国 Life Technologies 公司; shRNA-ATB 及 shRNA 对照组质粒寡核苷酸片段是由上海吉凯公司合成; 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 购自日本 TaKaRa 公司; 脂质体 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; 八排管和 7300 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; FlexCycler 多功能 PCR 仪购自德国 Jena 公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司; NanoPhotometer Pearl 330 购自德国 IMPLLEN 公司; ATB 引物序列由上海生物工程公司合成。其中 shRNA-ATB 实验组序列和对照组序列见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞转染 将生长良好的 U87 细胞, 经胰酶消化, 离心计数后, 取 50×10^3 个/瓶接种于 6 孔板中, 用无双抗含 10% FBS 培养液培养 24 ~ 48 h, 待 6 孔板中细胞汇合达 65% 左右时可进行 Opti-MEM 和脂质体 Lipofectamine 2000 介导转染。shRNA 对照组、shRNA-ATB 实验组进行转染, 转染 6 h 后, 换成无双抗含 10% 的 FBS 培养基, 继续培养 48

h 后,以此建立细胞模型,待后续实验。

表 1 shRNA-ATB 和 shRNA 对照组序列

项目	序列(5'-3')
shRNA-ATB 实验组	F: GATCCGCCTGTCTGTATTTGCGAATACCTTTTTC- AAGAGAAAAGGTATTTCGCAAATACAGACAGGCTT- TTTTG
	R: AATTCAAAAAAGCCTGTCTGTATTTGCGAATAC- CTTTTCTCTTGAAAAAGGTATTTCGCAAATACAGAC- AGGCC
shRNA 对照组	F: GATCCGTTCTCCGAACGTGTACGTTTCAAGAG- AACGTGACACGTTCCGGAGAAGCTTTTTTTC
	R: AATTCAAAAAAGTCTCCGAACGTGTACGTTTC- TCTTGAACGTGACACGTTCCGGAGAAGC

1.2.2 qRT-PCR 检测 ATB 表达变化 将生长良好的人脑正常胶质 HEB 细胞和人胶质瘤细胞 U87 置于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中培养,待细胞汇合达 90% 左右时,用 TRIzol 分别提取 U87 细胞、HEB 细胞以及上述转染后 shRNA-ATB 实验组与 shRNA 对照组中的总 RNA,用 NanoPhotometer Pearl 330 仪器定量后,分别取 600 ng 总 RNA 用逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix,经 FlexCycler 多功能 PCR 仪逆转录成 cDNA 生成反应条件如下: 37 °C、15 min, 85 °C、5 s, 4 °C、10 min。cDNA 稀释成 10 倍后,放于 -20 °C 保存,待后续跑 PCR 使用。用 7300 型荧光定量 PCR 仪进行反应扩增,ATB 上游引物: 5'-ACAAGCTGTGCAGTCTCAGG-3', 下游引物: 5'-CTAGGCCCAAAGACAATGGA-3'; GAPDH 上游引物: 5'-AGCAAGAGCACAAGAGGAAG-3', 下游引物: 5'-GGTTGAGCACAGGGTACTTT-3'。扩增模式如下: 50 °C、2 min, 95 °C、10 min, 95 °C、15 s, 60 °C、1 min; 共 45 个循环。并于反应结束后记录 U87 细胞、HEB 细胞以及 shRNA-ATB 实验组与 shRNA 对照组结果,以 GAPDH 作为分子内标,以 $\Delta\Delta Ct$ 值来分析各组的结果。HEB 细胞组表达量的均数为 1, 计算出 U87 细胞组 ATB 的相对表达量; shRNA 对照组表达量的均数设为 1, 计算出 shRNA-ATB 实验组 ATB 的相对表达量。

1.2.3 细胞克隆实验检测细胞增殖能力 分别取 shRNA-ATB 实验组与 shRNA 对照组细胞各 250 个/孔接种于 6 孔板,每孔加入培养液 2 ml 并置于 37 °C 培养,每 3 d 换液并观察细胞克隆增殖情况,待细胞团块最多聚集不超过 50 个细胞时,开始处理细胞。用枪头吸尽 6 孔板中的培养液,PBS 洗 2 遍后沿着 6 孔板边缘依次加入 4% 多聚甲醛 0.8 ml 固定

20 min 后,弃去甲醛,再依次加入美兰染料 0.8 ml 染色,10 min 后弃去染料,并用水轻轻洗数次后自然晾干,在显微镜下观察并进行拍照。所有实验重复 3 次。

1.2.4 MTT 法检测 U87 细胞生长 细胞增殖速率用 MTT 法测定,将转染 shRNA 对照组的 U87 细胞及转染 shRNA-ATB 的 U87 细胞按 2×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中分别培养 0、24、48、72、96 h 5 个时间点的培养板弃去培养基,每孔依次加入 MTT 20 μ l (5 mg/ml),继续培养 3 h 后弃去每孔中的所有培养液,并在每个孔中加入 DMSO 150 μ l,轻轻震荡混匀后,用酶标仪测定 490 nm 的吸光度值。所有实验均重复 3 次。

1.2.5 Transwell 实验检测 U87 细胞迁移和侵袭能力 将转染 shRNA 对照组的 U87 细胞及转染 shRNA-ATB 的 U87 细胞常规消化、离心后,用无双抗的 DMEM 重悬细胞并计数。本实验分别作了铺(侵袭实验)或者不铺(迁移实验) Matrigel 基质胶。实验前将基质胶置于冰盒中,使其处于液体状态,在 Transwell 小室里分别加入 200 μ l DMEM 并放入到温箱中进行水化 1 h。在铺基质胶的实验中,水化 1 h 后吸去 200 μ l DMEM,并在小室内加入基质胶与 DMEM 的混合液 60 μ l(基质胶:DMEM=1:2),再次放入温箱中培养 30 min 使其凝固。取 200 μ l 重选细胞液,在铺 Matrigel 基质胶,即侵袭实验中 200 μ l 重悬细胞液含有 8×10^4 个细胞;而在不铺 Matrigel 基质胶,即迁移实验中 200 μ l 重悬细胞液含有 1.5×10^4 个细胞放入 Transwell 小室内,下部的小室中均加入 500 μ l 含 20% 新生胎牛血清 DMEM 培养液。并放入培养箱中继续培养(其中迁移实验继续培养 24 h,侵袭实验继续培养 48 h)。待培养时间到了之后,轻轻地取出 Transwell 小室,并注意不要晃动小室,以免小室底面的细胞脱落,用中号枪头吸去小室里的培养液,并用棉签轻轻拭去残余的基质胶,PBS 轻轻地洗两边后,将小室放于盛有 500 μ l 的含 4% 多聚甲醛,固定 15 min,并用结晶紫染色 10 min,待晾干后用 Olympus 显微镜随机选取视野进行拍照并计数。所有的实验分别独立重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,作图采用 Graph Pad Prism 6.0 软件。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 法检测 HEB 细胞与 U87 细胞中

ATB 表达情况 qRT-PCR 结果表明, U87 细胞中 ATB 表达较 HEB 细胞组明显升高 ($P < 0.01$), 见图 1。

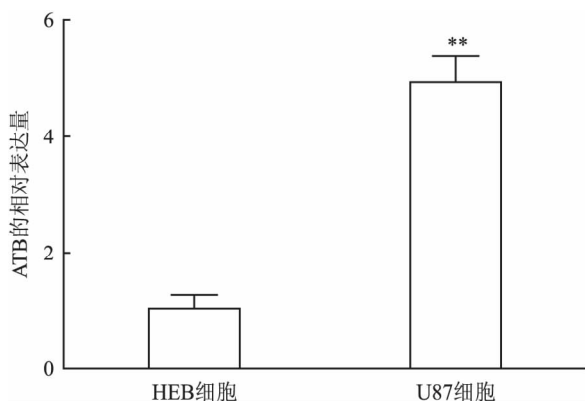


图1 HEB 细胞与 U87 细胞 ATB 的表达情况
与 HEB 细胞比较: ** $P < 0.01$

2.2 qRT-PCR 检测 U87 细胞 ATB 基因表达

qRT-PCR 结果显示, 与转染 shRNA 对照组相比, 在水平上转染 shRNA-ATB 实验组 ATB 的表达量明显低于 shRNA 对照组 ($P < 0.01$), 见图 2。

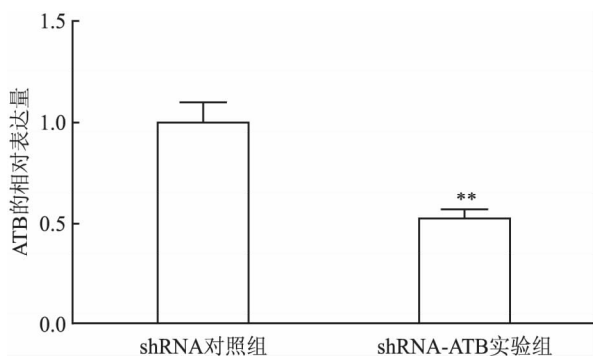


图2 ATB 的表达情况
与 shRNA 对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 克隆实验检测 ATB 基因对 U87 细胞增殖克隆能力的影响 结果表明, 无论从细胞团块大小以及细胞克隆数量上, shRNA-ATB 实验组都明显低于 shRNA 对照组。因此, 敲减 U87 细胞内的 ATB 基因后, 细胞增殖能力明显受到抑制, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3。

2.4 MTT 实验检测 ATB 对 U87 细胞增殖的影响

结果表明, 与 shRNA 对照组相比较, shRNA-ATB 实验组在转染 0、12 h U87 细胞生长差异无统计学意义, 但转染 48、72、96 h 后, shRNA-ATB 实验组细胞增殖速率下降幅度较 shRNA 对照组更加明显 (P

< 0.01), 见图 4。

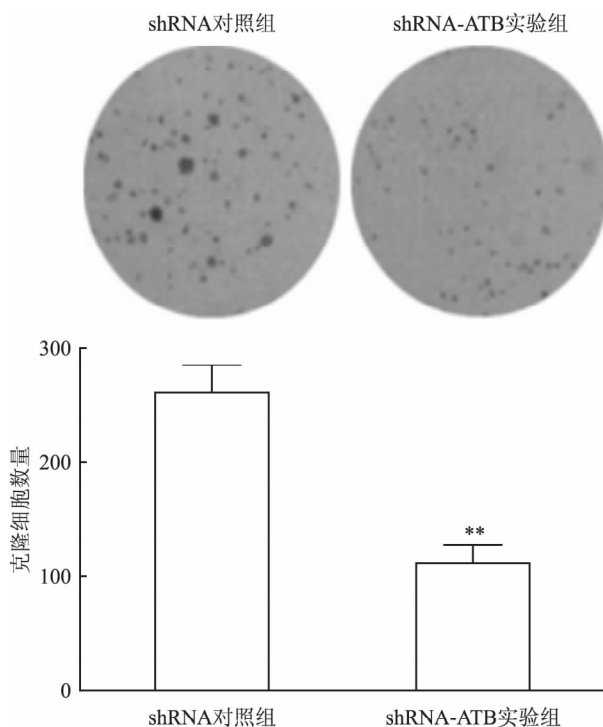


图3 细胞克隆形成能力 美兰染色 $\times 10$
与 shRNA 对照组比较: ** $P < 0.01$

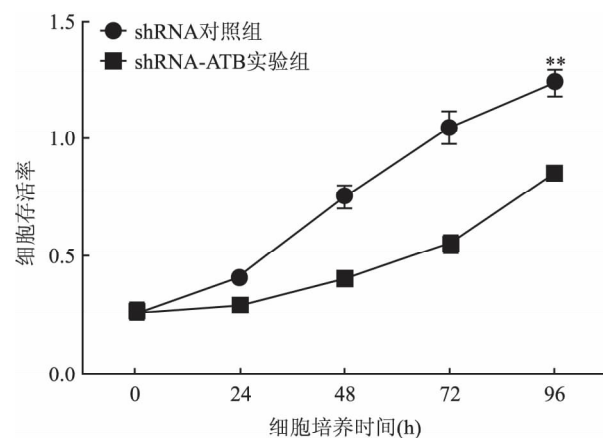


图4 不同时间点 U87 细胞增殖生长情况
与 shRNA-ATB 实验组比较: ** $P < 0.01$

2.5 Transwell 实验不铺 Matrigel 基质胶检测 U87 细胞迁移能力

Transwell 实验结果显示, shRNA 对照组穿膜细胞数明显高于 shRNA-ATB 实验组, 因此, 敲减了 U87 细胞内 ATB 后, 可明显抑制细胞迁移能力 ($P < 0.01$), 见图 5。

2.6 Transwell 实验铺 Matrigel 基质胶检测 U87 细胞侵袭能力

Transwell 实验结果显示, shRNA 对照组穿膜细胞数明显高于 shRNA-ATB 实验组, 因此, 敲减了 U87 细胞内 ATB 后, 可明显抑制细胞侵

袭能力($P < 0.01$), 见图 6。

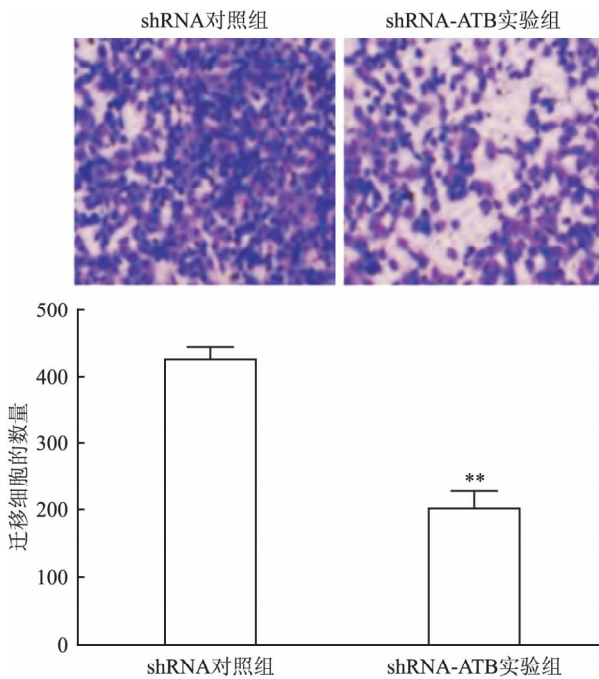


图 5 细胞迁移能力 结晶紫染色 × 10
与 shRNA 对照组比较: ** $P < 0.01$

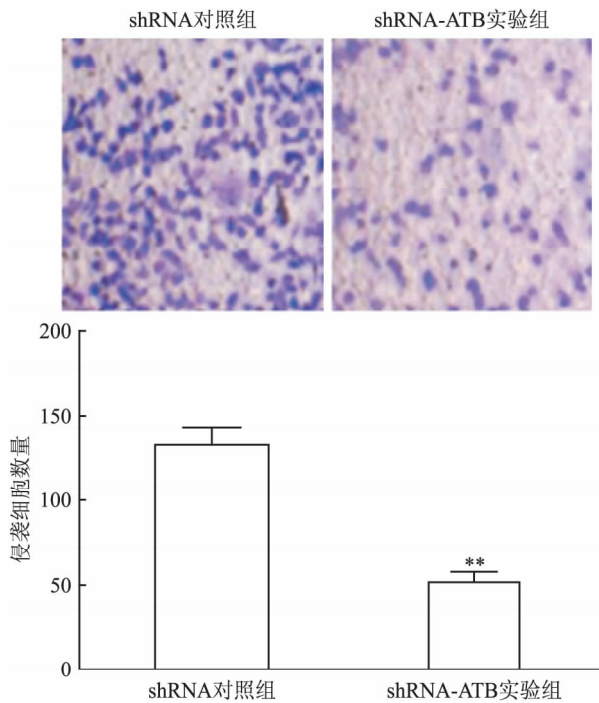


图 6 细胞侵袭能力 结晶紫染色 × 10
与 shRNA 对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

胶质细胞瘤是成人中枢神经系统中最常见的恶性肿瘤, 具有临床预后极差以及复发率高, 并被认为

是人类最致命的癌症之一^[4]。当前手术联合放化疗被称作为治疗胶质瘤的综合疗法, 但因其恶性程度高, 发展比较迅速, 治疗困难等因素, 总体来说患者临床预后仍不甚理想^[5]。近年来, 从基因水平上研究胶质瘤的发生机制越来越得到大家关注, 并且成为一个崭新的领域。因此, 本研究从分子生物学水平研究胶质瘤的发生、发展的作用机制, 从而为人脑胶质瘤基因治疗策略的临床应用研究积累必要经验以及指导临床人脑胶质瘤的分子生物学诊断和预后判断, 进而为胶质瘤基因治疗提供了新的思路。

现阶段研究^[6]表明: lncRNA 可参与对基因组表观遗传的修饰, 如在乳腺癌、肝癌中过表达 HOX 反义基因间 RNA (HOTAIR), 其能够结合恢复多梳抑制复合物 2 (PRC2), 并将其定位到特定位点, 通过 DNA 甲基化抑制该位点基因转录。lncRNA 也可以直接结合特异性 DNA 或者 RNA 来调控靶基因表达, 或者扮演 ceRNA 的角色间接对靶基因进行调控^[7]。由其在肿瘤方面的相关性研究, 使 lncRNA 成为可以参与肿瘤诊断和治疗的靶向分子标志。

近期研究^[6]显示 lncRNA 在人类胶质瘤中异常表达, 在促进胶质瘤的成瘤性以及促进其增殖、侵袭以及复发中起重要作用。表达上调的 H19 是促进胶质瘤进展中最重要的原癌基因之一, 过表达 H19 能促进胶质瘤细胞侵袭和血管形成, 并且与临床患者预后直接相关性^[8]; CRNDE 在胶质瘤中表达上调, 敲减 CRNDE 后, 可促进细胞发生凋亡, 抑制其增殖、迁移^[9]。MEG3 是母源表达印记基因, 在人胶质瘤中表达下调已被证实, 过表达 MEG3 可明显抑制胶质瘤细胞增殖, 并且可通过激活 P53 途径来发挥其抑癌基因效应^[10]。

目前, 国内外已有很多文献^[3, 11-13]证实 ATB 参与肾癌、乳腺癌、肠癌等多种肿瘤发生发展过程。研究发现, ATB 在胃癌与肠癌中均是表达上调, 并且是其判断临床预后的标志性指标^[13-14]。此外, ATB 在胰腺癌中却是低表达的, 也是判断临床不良预后的标志^[13]。Zhu et al^[15]最近研究报道, ATB 在瘢痕疙瘩纤维化中通过 miR-200c 上调 ZNF-217, 从而参与对自分泌 TGF-β2 的调控。

本实验采用 shRNA-ATB 敲减 ATB 后, 探究其对人胶质瘤 U87 细胞功能的影响, 将胶质瘤细胞 ATB 基因敲减作为 shRNA-ATB 实验组, 转染 shRNA 质粒作为 shRNA 对照组与之相比较。对两组细胞进行实验后, 首先用 qRT-PCR 法验证了胶质瘤 U87 细胞中 ATB 的表达含量较人脑正常胶质细胞

HEB 明显升高。接着用 qRT-PCR 法证 shRNA-ATB 可靶向敲减胶质瘤细胞中 ATB 基因的表达,以获取 ATB 低表达的 U87 细胞。随后,验证 ATB 胶质细胞的增殖是否有影响。细胞克隆实验和 MTT 实验结果均显示 shRNA-ATB 实验组在转染 shRNA-ATB 后,可明显抑制细胞增殖;此外,Transwell 实验进一步验证了敲减胶质瘤 U87 细胞中 ATB 后,细胞迁移和侵袭能力明显下降。因此,细胞功能实验结果均支持敲减 ATB 后,可以抑制胶质瘤细胞生物学行为。因此,推断出 ATB 基因是在促进胶质瘤生物学行为方面发挥重要作用,且是一种重要潜在的致癌基因。

本次研究结果及结合 ATB 对肝癌、乳腺癌等多种肿瘤的表达情况综合考虑,可以得出 ATB 基因在胶质瘤细胞中的作用,可为临床上治疗胶质瘤及其他肿瘤提供一定的理论依据,进而为肿瘤患者进行靶向治疗提供了新的策略。然而对于 ATB 基因在胶质瘤细胞中的上游以及下游的靶点以及确切作用机制、途径、方式有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Geisler S, Collier J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(11): 699-712.
- [2] Yuan J H, Yang F, Wang F, et al. A long noncoding RNA activated by TGF- β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(5): 666-81.
- [3] Shi S J, Wang L J, Yu B, et al. LncRNA-ATB promotes trastuzumab resistance and invasion-metastasis cascade in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13): 11652-63.
- [4] Louis D N, Ohgaki H, Wiestler O D, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2): 97-109.
- [5] Brandsma D, Stalpers L, Taal W, et al. Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas [J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(5): 453-61.
- [6] Tsai M C, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes [J]. *Science*, 2010, 329(5992): 689-93.
- [7] Bian E B, Ma C C, He X J, et al. Epigenetic modification of miR-141 regulates SKA2 by an endogenous "sponge" HOTAIR in glioma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21): 30610-25.
- [8] Jiang X, Yan Y, Hu M, et al. Increased level of H19 long non-coding RNA promotes invasion, angiogenesis, and stemness of glioblastoma cells [J]. *J Neurosurg*, 2016, 124(1): 129-36.
- [9] Wang Y, Wang Y, Li J, et al. CRNDE, a long-noncoding RNA, promotes glioma cell growth and invasion through mTOR signaling [J]. *Cancer Lett*, 2015, 367(2): 122-8.
- [10] Li J, Bian E B, He X J, et al. Epigenetic repression of long non-coding RNA MEG3 mediated by DNMT1 represses the p53 pathway in gliomas [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(2): 723-33.
- [11] Xiong J, Liu Y, Jiang L, et al. High expression of long non-coding RNA lncRNA-ATB is correlated with metastases and promotes cell migration and invasion in renal cell carcinoma [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2016, 46(4): 378-84.
- [12] Yue B, Qiu S, Zhao S, et al. LncRNA-ATB mediated E-cadherin repression promotes the progression of colon cancer and predicts poor prognosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(3): 595-603.
- [13] Qu S, Yang X, Song W, et al. Downregulation of lncRNA-ATB correlates with clinical progression and unfavorable prognosis in pancreatic cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 3933-8.
- [14] Saito T, Kurashige J, Nambara S, et al. A long non-coding RNA activated by transforming growth factor- β is an independent prognostic marker of gastric cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22 Suppl 3: S915-22.
- [15] Zhu H Y, Bai W D, Li C, et al. Knockdown of lncRNA-ATB suppresses autocrine secretion of TGF- β 2 by targeting ZNF217 via miR-200c in keloid fibroblasts [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24728.

ATB knockdown inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells

Zhang Xinyu, Ma Chunchun, Bian Erbao, et al

(Dept of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effects of long non-coding RNA activated by TGF- β (ATB) on the proliferation, migration and invasion of human U87 glioma cell line. **Methods** The expression of ATB in human U87 glioma cell line and human normal astrocyte(HEB) were detected by real-time quantitative PCR(qRT-PCR). And based on this, shRNA ATB plasmid were constructed, which could knockdown ATB expression after transfected into U87 cells. The proliferation ability of cell was investigated through MTT assay and the colony-formation ability

HIF-1 α 基因转染人胃腺癌 SGC7901 细胞对裸鼠移植瘤的影响及机制

汪晓庆¹, 曹威², 宋先兵¹, 潘献柱¹, 吴义春¹, 陈晓宇²

摘要 **目的** 探讨低氧诱导因子(HIF)-1 α 基因转染人胃腺癌 SGC7901 对裸鼠移植瘤血管生成及 EphA2 表达的影响及其可能机制。**方法** 采用 HIF-1 α 基因重组质粒 pGCsi-shHIF-1 α , 转染胃腺癌 SGC7901 细胞并接种裸鼠(SGC7901/shRNA, 实验组), 建立裸鼠皮下人胃腺癌移植瘤模型, 动态观测裸鼠肿瘤体积和质量; 设 SGC7901(未转染组)、转染空质粒的 SGC7901(SGC7901/Neo, 空载体组) 为对照。观察移植瘤生长情况, 8 周后, 获取移植瘤模型瘤组织, 称取湿重, 免疫组化 SP 法检测移植瘤组织的微血管密度, Western blot 检测上皮细胞激酶 A2(EphA2) 表达。**结果** 与未转染组比较, 空载体组瘤体积、质量改变不明显, HIF-1 α 转染的实验组的瘤体积、质量明显降低; HIF-1 α 转染的实验组诱导血管增生、形成血管生成拟态和 EphA2 蛋白表达较未转染组、空载体组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** HIF-1 α 基因转染可明显抑制裸鼠人胃腺癌移植瘤的生长, 该作用可能与其抑制肿瘤血管新生、形成血管拟态及 EphA2 蛋白表达有关。

关键词 胃腺癌; 裸鼠; 低氧诱导因子 1 α ; 基因转染; 血管

2017-03-30 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究重点项目(编号: KJ2015A359);
国家自然科学基金资助项目(编号: 81373421)

作者单位: ¹安徽医学高等专科学校病理学教研室, 合肥 230601

²安徽医科大学组胚教研室, 合肥 230032

作者简介: 汪晓庆, 女, 硕士;

陈晓宇, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:
cxyayd@163.com

生成

中图分类号 R 977.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)08-1128-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.007

恶性肿瘤的失控性增生常引起肿瘤组织的微环境低氧, 刺激低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 α 的表达增加, 进而激活血管内皮生长因子, 促进血管新生和形成血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM), 从而引起肿瘤早期发生转移^[1]。研究^[2-5]证实 HIF-1 α 参与恶性肿瘤发生发展过程。上皮细胞激酶 A2(epithelial cell kinase, EphA2) 在恶性肿瘤中呈高表达, 抑制 EphA2 的表达能够抑制肿瘤血管生成, 并阻止 VM 管道的形成^[5]。胃腺癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 目前有关胃腺癌中血管新生及 VM 的形成机制尚不明确, 该实验拟将胃腺癌细胞 SGC7901 株通过稳定转染重组质粒 pGCsi-shHIF-1 α , 接种裸鼠, 观测裸鼠皮下移植瘤生长情况, 探讨 HIF-1 α 表达沉默对肿瘤血管新生及 EphA2 表达的影响, 进一步筛选出 HIF-1 α 作用于血管新生及 VM 形成的可能靶基因。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃腺癌 SGC7901 细胞系由安徽医科大学免疫学应松成博士提供, 本研究室传代保存。

was tested by the cell cloning assay. Cell migration and invasion were measured by non-Matrigel transwell assay and Matrigel transwell assay *in vitro*. **Results** Using qRT-PCR analysis, we found ATB expression levels in U87 cell line was significantly increased compared with HEB($P < 0.01$). The expression of ATB was remarkable reduced after U87 transfected with shRNA-ATB plasmid(the experimental group) compared with U87 cells transfected with shRNA control(the control group). Cloning formation experiment indicated that colony-formation ability was decreased than that of control group($P < 0.01$). MTT assay indicated that the number of viable cell was lower than that of control group($P < 0.01$). In addition, Transwell assay further verified that knockdown of ATB significantly inhibited the migration and invasion ability of U87 cells($P < 0.01$). **Conclusion** ATB knockdown inhibit glioma cell proliferation, migration and invasion, which indicates that ATB may represent a potential therapeutic target for the treatment of human glioma.

Key words glioma; long non-coding RNA; ATB; cell proliferation; cell migration; cell invasion