

【基础研究】

作者简介:高玉霞(1982-),女,河南新乡人,硕士,主治医师,研究方向:妇科肿瘤。

group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the proliferation ability the number of cells passing through molecular sieve and the apoptotic rate between the blank control group and blank vector group ($P > 0.05$). **Conclusion** The LncRNA AFAP1-AS1 can up-regulate the expression of Caspase-3, Caspase-9 mRNA and protein in choriocarcinoma JEG-3 cells, inhibit the proliferation, migration of choriocarcinoma cells, and induce the apoptosis of cancer cells.

Key words: long noncoding RNA; actin filament-associated protein 1-antisense RNA1; choriocarcinoma cells; proliferation; migration; apoptosis

绒毛膜癌是女性常见的恶性肿瘤之一,多继发于葡萄胎、流产或足月分娩以后,少数发生于异位妊娠后,偶发于未婚妇女的卵巢(原发性绒毛膜癌)^[1]。寻求绒毛膜癌的新型分子治疗靶点一直是研究的热点。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, LncRNA) 被认为可以调节癌细胞的生长、凋亡和转移。有研究证明,肌动蛋白纤维相关蛋白 1-反义 RNA1 (actin filament-associated protein 1-antisense RNA1, AFAP1-AS1) 与乳腺癌、食管癌、肝癌等密切相关^[2-4]。目前,尚未见关于 LncRNA AFAP1-AS1 在绒毛膜癌发病机制中作用的相关研究。基于此,本研究通过构建 LncRNA AFAP1-AS1 过表达载体,探讨 LncRNA AFAP1-AS1 对人绒毛膜癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 人绒毛膜癌细胞 JEG-3 购自中国科学院上海细胞研究院。

1.2 主要试剂与仪器 RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS)、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, TRIzol RNAiso、反转录试剂盒、Lipofectamine 2000 转染试剂购自上海赛默飞世尔科技(中国)有限公司, Transwell 小室、细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、Western blot 检测试剂盒购自苏州宇恒生物科技有限公司, 山羊抗人 Caspase-3、Caspase-9 蛋白一抗以及山羊抗人 Caspase-3、Caspase-9 蛋白二抗购自美国 Novus Biologicals 公司; 酶标仪购自北京普天新桥技术有限公司, 流式细胞仪购自广州艺得诺生物科技有限公司, 倒置显微镜购自上海玉研科学仪器有限公司, 实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购自深圳瑞安康医疗器械有限公司, 凝胶电泳分析系统购自英国 CLEAVER 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 人绒毛膜癌细胞 JEG-3 的复苏及培养 将冷冻保存的 JEG-3 细胞在 37 ℃ 水中融化, 复苏后将细胞株接种于 RPMI 1640 培养基, 加入体积分数 10% 的胎牛血清, 在 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 的

培养箱中传代培养, 培养期间常规换液。

1.3.2 构建 LncRNA AFAP1-AS1 过表达载体

在美国国立生物技术信息中心数据库中检索 LncRNA AFAP1-AS1 的序列, 由上海吉凯基因化学技术有限公司构建 LncRNA AFAP1-AS1 过表达载体, 并进行基因测序, 实验室人员进行验证。

1.3.3 实验分组与干预措施 取对数生长期细胞, 胰蛋白酶消化后, 以均匀密度接种于 6 孔板中进行培养, 将细胞分为空白对照组、空白载体组和 LncRNA AFAP1-AS1 过表达组。空白对照组细胞未做任何处理, 空白载体组细胞转染空白载体, LncRNA AFAP1-AS1 过表达组细胞转染 LncRNA AFAP1-AS1 过表达载体。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测 JEG-3 细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 表达

取各组转染后培养 48 h 的细胞, 胰蛋白酶消化, 应用放射免疫沉淀裂解液进行细胞裂解, 采用 TRIzol 法提取细胞中总 RNA, 并检测 RNA 纯度。取 20 μg 总 RNA, 反转录为 cDNA, 反转录操作步骤参照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书。Caspase-3 上游引物序列为 5'-CAAGAGGTCCTGTCTTCAGATGA-3', 下游引物序列为 5'-TCTGTTTCCGTTTCCTGGTTC-3'; Caspase-9 上游引物序列为 5'-GTGATAAAGGTTTCGGTTGCTG-3', 下游引物序列为 5'-TGTTTTCTGTGGCTCCTCCTC-TGG-3'。PCR 反应条件: 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 循环 40 次; 每个样本重复 3 次。采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 相对表达量。

1.3.5 Western blot 法检测 JEG-3 细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达

取各组转染后培养 48 h 的细胞, 经胰蛋白酶消化后接种于 96 孔板, 调整细胞密度为每孔 1 × 10⁸ 个, 加入 1 mL 放射免疫沉淀细胞裂解液, 各组细胞在冰上裂解 30 min, 收集 1.5 mL 裂解后细胞溶液于离心管中, 在预冷 4 ℃ 的离心机中 5 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液, 95 ℃ 煮沸后应用二喹啉甲酸法检测总蛋白浓度。取 40 μg 总蛋白, 将其在 120 g · L⁻¹ 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 采用电转移法转移至聚偏氟乙烯膜, 室温条件下 50 g · L⁻¹ 脱脂

奶粉封闭 2 h,加入一抗山羊抗人 Caspase-3、Caspase-9 蛋白抗体(1:10 000),4℃ 孵育过夜;磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline tween, PBST)稀释液洗涤 3 次;加入山羊抗人 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白二抗(1:1 000)孵育 2 h,PBST 稀释液洗涤 3 次;二氨基联苯胺显影液处理样本。采用 Image J 软件分析蛋白条带。

1.3.6 CCK-8 实验检测细胞增殖能力 空白对照组、空白载体组及 LncRNA AFAP1-AS1 过表达组转染后细胞经胰蛋白酶消化后,按照 CCK-8 试剂盒说明书进行操作,将 3 组转染后的细胞以 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 密度接种于 96 孔板,72 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37℃ 下孵育箱中避光孵育 24 h。用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度值,每组设 3 个复孔。

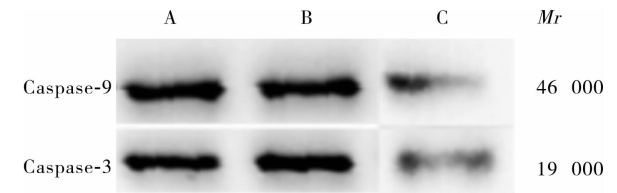
1.3.7 Transwell 小室检测细胞迁移能力 收集 3 组转染后培养 48 h 细胞,胰蛋白酶消化后,PBS 重悬细胞,将细胞密度调整为 $2.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 待用。按照试剂盒说明书中的操作步骤检测细胞迁移能力。将基底膜的基质原液储存于 4℃ 冰箱,隔夜融化,然后将经过预冷的无血清 RPMI-1640 与其按 3:1 的比例调配上室凝胶液体,在 Transwell 小室的上室中每孔用 55 μL 凝胶液体进行包被,置于 37℃ 恒温孵育箱中孵育 2 h,等待上室成胶。然后在上室内接种 200 μL 细胞悬液,在下室中加入 500 μL RPMI-1640 培养液(含体积分数 10% 胎牛血清)。取 Transwell 板置于 37℃ 恒温孵育箱内孵育培养 24 h,以结晶紫染色剂进行染色,应用倒置光学显微镜观察并拍照,

表 1 3 组 JEG-3 细胞中 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 及蛋白相对表达量比较

Tab.1 Comparison of the expression of Caspase-3,Caspase-9 mRNA and protein in JEG-3 cells among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3 mRNA	Caspase-9 mRNA	Caspase-3 蛋白	Caspase-9 蛋白
空白对照组	0.129 \pm 0.004	0.464 \pm 0.008	0.165 \pm 0.022	0.235 \pm 0.021
空白载体组	0.131 \pm 0.002	0.512 \pm 0.007	0.171 \pm 0.027	0.241 \pm 0.024
LncRNA AFAP1-AS1 过表达组	1.121 \pm 0.209 ^a	1.171 \pm 0.139 ^a	1.273 \pm 0.231 ^a	1.413 \pm 0.091 ^a

注:与空白对照组和空白载体组比较^a $P < 0.05$ 。



A:空白对照组;B:空白载体组;C:LncRNA AFAP1-AS1 过表达组。

图 1 3 组 JEG-3 细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达(Western blot)

Fig.1 Expression of Caspase-3,Caspase-9 protein in JEG-3 cells in the three groups(Western blot)

对细胞进行计数,重复 3 次,取均值。

1.3.8 流式细胞术检测 JEG-3 细胞凋亡情况 取 3 组转染后培养 48 h 的细胞,胰蛋白酶消化后接种于 96 孔板,每孔 1×10^8 个细胞;取 1 mL 细胞悬液,转移至离心管内,4℃ 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取沉淀物,PBS 冲洗 3 次,加入结合缓冲液 200 μL ,并加入 Annexin V 和 PI 各 5 μL ,避光条件下充分反应 15 min,加入结合缓冲液 400 μL ,流式细胞术检测 60 min 内细胞凋亡情况。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理。计量资料采用 S-W 法进行正态性检验,对符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不符合正态分布的计量资料以中位数表示。符合正态分布的计量资料多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验;不符合正态分布的计量资料采用秩和检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

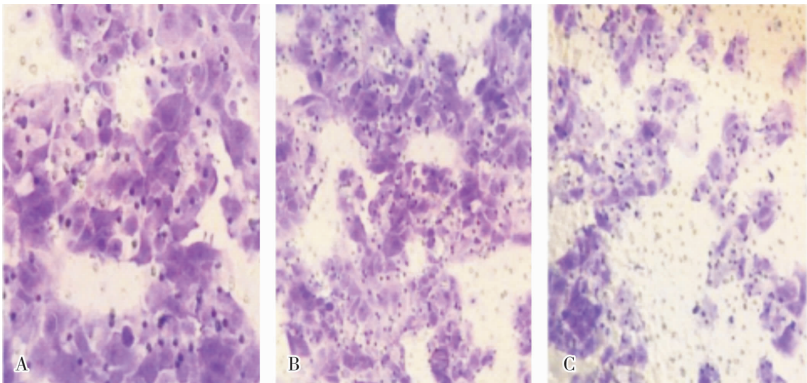
2.1 3 组 JEG-3 细胞中 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 和蛋白的相对表达量比较 结果见表 1 和图 1。LncRNA AFAP1-AS1 过表达组 JEG-3 细胞中 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 和蛋白相对表达量均高于空白对照组和空白载体组,差异有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组和空白载体组 JEG-3 细胞中 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 及蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 3 组 JEG-3 细胞增殖能力比较 空白对照组、空白载体组及 LncRNA AFAP1-AS1 过表达组 JEG-3 细胞吸光度值分别为 0.45 ± 0.04 , 0.40 ± 0.05 , 0.28 ± 0.02 。LncRNA AFAP1-AS1 过表达组 JEG-3 细胞的增殖能力(吸光度值)低于空白对照组和空白载体组,差异有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组与空白载体组 JEG-3 细胞增殖能力(吸光度值)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 3 组 JEG-3 细胞迁移能力比较 结果见图 2。空白对照组、空白载体组及 LncRNA AFAP1-AS1 过

表达组中透过分子筛的细胞数分别为(142.11 ± 18.39)、(131.32 ± 14.02)、(52.11 ± 4.09)个。LncRNA AFAP1-AS1 过表达组透过分子筛的细胞数显著低于空白载体组和空白对照组,差异均有统计

学意义($P < 0.05$);空白对照组和空白载体组透过分子筛的细胞数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



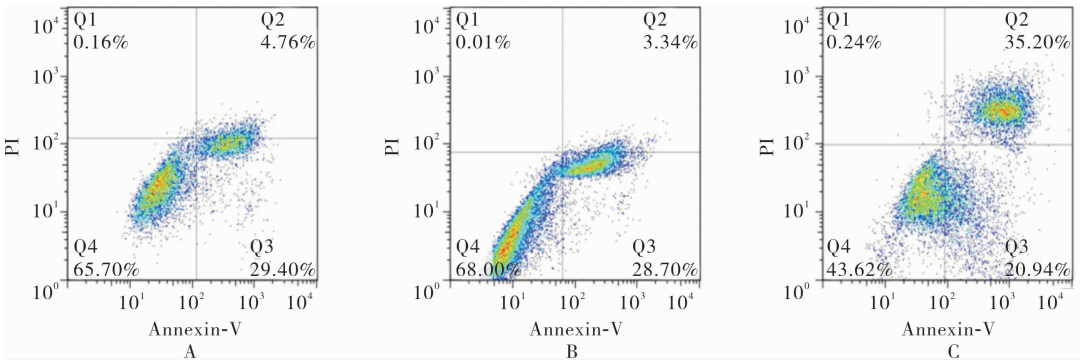
A:空白对照组;B:空白载体组;C: LncRNA AFAP1-AS1 过表达组。

图2 3组 JEG-3 细胞迁移能力(结晶紫染色, ×400)

Fig.2 Migration of JEG-3 cells in the three groups(crysal violet dyeing, ×400)

2.4 3 组细胞凋亡率比较 结果见图 3。空白对照组、空白载体组及 LncRNA AFAP1-AS1 过表达组细胞凋亡率分别为(4.21 ± 1.24)%、(3.09 ± 1.13)%、(35.21 ± 13.31)%。LncRNA AFAP1-AS1

过表达载体组细胞凋亡率显著高于空白对照组和空白载体组,差异有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组与空白载体组细胞凋亡率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:空白对照组;B:空白载体组;C:LncRNA AFAP1-AS1 过表达组。

图3 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况

Fig 3 Apoptosis of the cells in the three groups detected by flow cytometry

3 讨论

LncRNA 本身不具有编码蛋白及转录功能,其长度不超过 200 个片段。LncRNA 已经被证实相关肿瘤细胞的增殖、侵袭和凋亡过程中起十分重要的作用。既往研究表明,LncRNA 是肺癌、前列腺癌、结肠癌及肝癌等发生、发展中的重要转录因子,并且与肿瘤瘤体的体积大小及患者的临床分期密切相关^[5-6]。本研究主要探讨 LncRNA AFAP1-AS1 对人绒毛膜癌细胞的增殖、侵袭及凋亡的影响,为临床治疗提供新的目标靶点。

Caspase-3 是一种蛋白酶,1994 年 FERNANDES-

ALNEMRI 等^[7]在表达序列标记数据库中找到一段与半胱氨酸蛋白酶抑制剂活性中心同源的序列,用它合成探针后筛选人 Jurkat T 淋巴细胞基因文库,从中克隆出一种新基因,因其编码相对分子质量为 32 000 的半胱氨酸蛋白酶而称之为 CPP32,随后这种蛋白酶被命名为 Caspase-3^[8]。Caspase 是近年来发现的一组存在于细胞质基质中的半胱氨酸蛋白酶,它们的一个重要共同点是活性位点都含有半胱氨酸,可特异地断开天冬氨酸残基后的肽键^[9-10]。本研究通过实时荧光定量 PCR 检测了人绒毛膜癌细胞中凋亡基因 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达,结果发现,LncRNA AFAP1-AS1 过表达组 JEG-3 细

胞中Caspase-3、Caspase-9 mRNA表达均明显高于空白对照组和空白载体组,提示LncRNA AFAP1-AS1对人绒毛膜癌细胞的凋亡具有促进作用。另外,LncRNA AFAP1-AS1过表达组JEG-3细胞中Caspase-3、Caspase-9蛋白表达水平显著高于空白对照组和空白载体组,提示LncRNA AFAP1-AS1可以调控人绒毛膜癌细胞中凋亡因子蛋白表达水平,进而影响细胞凋亡。

本研究中,作者利用CCK-8实验检测JEG-3细胞的增殖能力结果发现,LncRNA AFAP1-AS1过表达组细胞的增殖能力低于空白对照组和空白载体组,说明LncRNA AFAP1-AS1对人绒毛膜癌细胞的增殖具有明显的抑制作用。而GUO等^[11]研究发现,敲除胃癌细胞中的AFAP1-AS1相关基因,可以有效提高抑癌基因PTEN mRNA及蛋白的表达水平,从而抑制胃癌细胞增殖,该研究也说明了AFAP1-AS1的表达可以通过多种信号通路抑制胃癌细胞的增殖。本研究还发现,AFAP1-AS1过表达可以抑制JEG-3细胞的迁移能力。而ZHOU等^[12]研究显示,AFAP1-AS1高表达可促进食管癌细胞的迁移,与本研究结果不一致。

本研究中流式细胞术实验结果发现,LncRNA AFAP1-AS1过表达组细胞凋亡率显著高于空白对照组和空白载体组,说明LncRNA AFAP1-AS1对人绒毛膜癌细胞的过度凋亡具有明显促进作用。而LUO等^[13]研究显示,AFAP1-AS1表达上调可以减少肿瘤细胞凋亡,与本研究结果不一致。谢兵^[14]研究发现,AFAP1-AS1表达可以抑制乳腺癌细胞增殖,同时降低肿瘤淋巴结转移概率,与本研究结果一致。

本研究证实了LncRNA AFAP1-AS1过表达可以抑制人绒毛膜癌细胞的增殖和迁移,促进细胞凋亡。但本研究只是初步研究了LncRNA AFAP1-AS1在人绒毛膜癌细胞增殖、迁移和凋亡中的作用,但其具体分子生物学机制尚未完全明了,需要进一步研究探讨。

参考文献:

[1] HAN X,WANG L,NING Y,et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1 facilitates tumor growth and promotes metastasis in colorectal

cancer[J]. *Biol Res*,2016,49(1):36-45.

[2] 王晓骁,邱满堂,夏文佳,等. 非小细胞肺癌中长链非编码RNA AFAP1-AS1的表达特征及其与患者预后的关系[J]. *中国肿瘤外科杂志*,2016,8(5):298-304.

[3] YE F,GONG Y,CHEN X,et al. Long noncoding AFAP1-antisense RNA 1 is upregulated and promotes tumorigenesis in gastric cancer[J]. *Oncol Lett*,2018,15(5):7523-7530.

[4] 赵岗,杜伟,魏新亭,等. 胶质瘤组织中Bcl-2相关抗凋亡基因3表达及其对U87细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. *新乡医学院学报*,2018,35(10):843-848.

[5] 王晓骁,邱满堂,夏文佳,等. 非小细胞肺癌中长链非编码RNA AFAP1-AS1的表达特征及其与患者预后的关系[J]. *中国肿瘤外科杂志*,2016,8(5):298-304.

[6] LIU R H,WANG M Y,CHEN L Y,et al. Meta-analysis of the prognostic value of long non-coding RNA AFAP1-AS1 for cancer patients in China[J]. *Oncotarget*,2018,9(8):8100-8110.

[7] FERNANDES-ALNEMRI T,ARMSTRONG R C,KREBS J,et al. *In vitro* activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains[J]. *Proc Natl Acad Sci*,1996,93(15):7464-7469.

[8] 蒋薛伟,王中林. AFAP1-AS1与恶性肿瘤发生发展关系的研究进展[J]. *山东医药*,2017,57(42):105-107.

[9] DING X X,ZHANG S,LI X,et al. Profiling expression of coding genes, long noncoding RNAs, and circular RNAs in lung adenocarcinoma by ribosomal RNA-depleted RNA sequencing[J]. *Febs Open Bio*,2018,8(4):544-555.

[10] YE Y,CHEN J,ZHOU Y,et al. High expression of AFAP1-AS1 is associated with poor survival and short-term recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Transl Med*,2015,13(1):137.

[11] GUO J Q,LI S J,GUO G X,et al. Long noncoding RNA afap1-as1 promotes cell proliferation and apoptosis of gastric cancer cells via PTEN/pAKT pathway[J]. *Dig Dis Sci*,2017,62(8):2004-2010.

[12] ZHOU X L,WANG W W,ZHU W G,et al. High expression of long non-coding rna afap1-as1 predicts chemoradioresistance and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma treated with definitive chemoradiotherapy[J]. *Mol Carcinog*,2016,55(12):2095-2105.

[13] LUO H L,HUANG M D,GUO J N,et al. Afap1-as1 is upregulated and promotes esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation and inhibits cell apoptosis[J]. *Cancer Med*,2016,5(10):2879-2885.

[14] 谢兵. 长链非编码RNA AFAP1-AS1在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*,2016,24(23):3739-3742.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)