

慢病毒介导 lncRNA - AK058003 过表达 对肝癌裸鼠移植瘤生长的影响

周宇杰 徐细明 梁慧玲

摘要 目的 探究上调 SK - Hep1 肝癌细胞中 lncRNA - AK058003 的表达对肝癌裸鼠移植瘤生长的影响。方法 采用慢病毒转染的方法将 lncRNA - AK058003 的重组质粒和空质粒分别转入 SK - Hep1 肝癌细胞株中,经新霉素筛选出 lncRNA - AK058003 稳定过表达的细胞株,用定量 PCR 的方法检测 lncRNA - AK058003 在 SK - Hep1 肝癌细胞中的过表达,并且将稳定过表达 lncRNA - AK058003 的 SK - Hep1 肝癌细胞和含有空质粒的 SK - Hep1 肝癌细胞分别注射入裸鼠腋下皮下,定期测量裸鼠移植瘤的长径和短径,从而计算出移植瘤的体积,饲养 35 天后测量移植瘤的重量。结果 构建稳定过表达 lncRNA - AK058003 的肝癌细胞株,裸鼠皮下荷瘤实验结果显示,过表达组裸鼠移植瘤的体积($308.4 \pm 439.4 \text{mm}^3$)、重量($0.464 \pm 0.518 \text{g}$)和生长速度均低于空质粒组($1410.0 \pm 973.0 \text{mm}^3$, $1.363 \pm 0.856 \text{g}$, $P < 0.05$)。结论 lncRNA - AK058003 对肝癌裸鼠移植瘤的增殖具有抑制作用。

关键词 lncRNA - AK058003 肝癌 裸鼠移植瘤

中图分类号 R735.7

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.09.013

Effects of lncRNA - AK058003 Overexpression on the Growth of Human Hepatocellular Carcinoma in Nude Mice. Zhou Yujie, Xu Ximing, Liang Huiling. Department of Oncology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To investigate up - regulation of lncRNA - AK058003 expression in SK - Hep1 hepatocellular carcinoma cells and its effect on the growth of human hepatocellular carcinoma xenograft tumor in nude mice. **Methods** The recombinant plasmid of lncRNA - AK058003 and empty plasmid were transferred into SK - Hep1 human hepatocellular carcinoma cell line by the method of slow virus transfection. The overexpression of lncRNA - AK058003 cell line was screened by neomycin. Overexpression of lncRNA - AK058003 in SK - Hep1 hepatocarcinoma cells was detected by quantitative PCR. SK - Hep1 hepatocellular carcinoma cells stably overexpressing lncRNA - AK058003 and SK - Hep1 hepatocellular carcinoma cells containing empty plasmids were injected subcutaneously into armpit of nude mice. The long and short diameters of the transplanted tumor were measured regularly to calculate the volume of the xenograft tumor. After 35 days of feeding we measure the weight of the xenograft tumor. **Results** The recombinant plasmid of lncRNA - AK058003 was successfully constructed and stably over expressed in hepatocellular carcinoma cells. The experimental results of subcutaneous tumor bearing nude mice showed that the volume($308.4 \pm 439.4 \text{mm}^3$), weight ($0.464 \pm 0.518 \text{g}$) and growth rate of the xenograft tumor in the over expression group were lower than that of the empty plasmid group($1410.0 \pm 973.0 \text{mm}^3$, $1.363 \pm 0.856 \text{g}$, $P < 0.05$).

Conclusion lncRNA - AK058003 has inhibitory effect on the proliferation of human hepatocellular carcinoma xenograft tumor in nude mice.

Key words lncRNA - AK058003; Liver cancer; Xenograft tumor in nude mice

原发性肝癌是世界上常见的恶性肿瘤之一,在中国每年大约有 383000 人死于肝癌,占全世界肝癌死亡病例的 51%^[1]。肝癌的发病机制、发展过程、诊断和治疗的分子机制均不明确,亟待从 RNA、蛋白质以及基因层面找到与肝癌相关的特异性分子机制,从而在未来为肝癌的临床治疗提供新的指导和策略。

长链非编码 RNA (long chain non coding RNA, lncRNA) 近些年来成为恶性肿瘤诊断和治疗方面研究的热点,在肝癌中,同样存在一些异常表达的 lncRNAs 参与肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移、化疗药物耐药以及放疗抵抗等^[2,3]。本研究选取 lncRNA - AK058003 作为研究的出发点,探讨其对肝癌细胞增殖方面的作用。

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2012FKC14301)

作者单位:430060 武汉大学人民医院肿瘤科

通讯作者:徐细明,电子邮箱:doctorxu120@aliyun.com

材料与方法

1. 材料与试剂:人肝癌细胞株 SK - Hep1 购自中

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所;MEM培养液购自美国Hyclone公司;胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司;引物由武汉巴菲尔生物公司合成;雄性BALB/c裸鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

2. 方法:(1)细胞培养:人肝癌细胞系SK-Hep1用含有10%胎牛血清、100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的MEM培养基中培养,且置于37 $^{\circ}$ C、含5%CO₂、饱和湿度的恒温培养箱中培养。当细胞生长至融合度约为80%~90%时,用胰蛋白酶消化,常规传代培养;用含有50%MEM培养基,40%血清和10%DMSO的冻存液进行梯度冻存,并且保存于液氮中备用。(2)lncRNA-AK058003目的基因获取和PCR扩增:按照Trizol说明书,取处于对数生长期的SK-Hep1肝癌细胞,用Trizol法提取细胞中总的RNA,之后用Nano-Drop2000C紫外分光光度计测RNA浓度和纯度,用PrimeScript反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA。之后按照已经合成的cDNA为模板,进行目的基因扩增,每组设置3个复孔,GAPDH为内参基因。GAPDH上游引物:5'-AGAAGGCTGGGGCT-CATTG-3';下游引物:5'-AGGGCCATCCA-CAGTCTTC-3'。AK058003上游引物:5'-GGGAA-CAAAGATGTTTCTACGT-3';下游引物:5'-ACT-GGTTCATAGTTAGGCTGGAT-3'。结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行标准化,实验重复3次。(3)构建过表达lncRNA-AK058003的质粒及鉴定重组质粒:取上述PCR产物片段1 μ l,将PCR产物片段及空质粒pHAGE-CMV-MCS-IZsGreen进行BamH I和Xho I双酶切,反应条件37 $^{\circ}$ C,时间4h,目的基因经双酶切后行琼脂糖凝胶电泳。将双酶切载体和目的基因片段进行连接反应,4 $^{\circ}$ C条件下连接过夜。取出DH5 α 感受态细胞,冰浴30min,并向其中加入连接后的质粒,轻轻旋转离心管,使之混匀。将离心管放在42 $^{\circ}$ C水浴锅中90s,后快速转移至冰浴中,冷却1~2min。每个离心管加入600 μ l不含抗生素的无菌LB培养液,置于水平摇床上,温度37 $^{\circ}$ C 200r/min条件下培养1h。之后,取200 μ l已经转化的细胞,均匀涂布于已铺LB且含有新霉素的琼脂板上,37 $^{\circ}$ C,倒置培养过夜。挑取阳性菌落,以提取的质粒为模板进行PCR扩增,行琼脂糖凝胶电泳及基因测序鉴定重组质粒。(4)慢病毒的包装:将pMD2.G、ps-PAX₂以及重组质粒分别进行高纯度无内毒素抽取,利用脂质体共转染293T细胞,并置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养

箱中培养。8h后,更换新鲜的培养基,继续培养72h后收集上清液。用0.45 μ m过滤器过滤后,分装至无菌离心管中,4 $^{\circ}$ C 87000 \times g超速离心2h。弃上清液,用500 μ l MEM培养基过夜重悬,后分装至无菌离心管,-80 $^{\circ}$ C条件下保存。同时设立慢病毒空质粒组作为阴性对照组,其他处理均一致。(5)重组慢病毒感染细胞:将SK-Hep1肝癌细胞接种于24孔板中,待细胞融合度达到50%且生长状态良好时,加入pHAGE-lncRNA-AK058003或者空质粒的病毒液1ml,培养24h后更换培养基,继续置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养箱中培养48h,用荧光显微镜观察感染效率,用新霉素筛选慢病毒感染之后稳定过表达lncRNA-AK058003的SK-Hep1肝癌细胞,并且继续传代培养。(6)定量PCR检测lncRNA-AK058003在SK-Hep1肝癌细胞中的过表达:设置两组。lncRNA-AK058003过表达组:感染pHAGE-lncRNA-AK058003的SK-Hep1肝癌细胞。阴性对照组:感染空质粒的SK-Hep1肝癌细胞。用定量PCR的方法检测各组lncRNA-AK058003的表达。(7)裸鼠成瘤实验:在注射前3天购买14只雄性裸鼠,周龄2~4周,随机分为过表达组和空质粒组,置于武汉大学人民医院动物实验中心SPF环境饲养,温度及湿度适宜,使用高压灭菌食物饲养。将上述稳定过表达lncRNA-AK058003的SK-Hep1肝癌细胞(过表达组)和转染空质粒的SK-Hep1肝癌细胞(阴性对照组)培养至对数生长期,PBS洗涤细胞两次,胰酶消化,离心后,加磷酸缓冲液调整细胞浓度为 1×10^7 /ml,每只裸鼠接种200 μ l的细胞悬液于左侧腋下皮下,每天观察肿瘤生长情况,待肿瘤长出后,每5天用游标卡尺测量并记录肿瘤的长径(a)和短径(b),并按照计算公式计算肿瘤体积 $V=1/2\times a\times b^2$,裸鼠生长35天后,使用麻醉机,异氟烷吸入式麻醉处死全部裸鼠,取出移植瘤,移植瘤称重并记录。

3. 统计学方法:采用SPSS 20.0统计学软件对实验数据进行统计处理分析,计量资料数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间均数比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. lncRNA-AK058003质粒构建和筛选鉴定:构建lncRNA-AK058003过表达的质粒(图1A),挑取阳性菌落,扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳鉴定(图1B),再经基因测序分析,基因测序结果与琼脂糖凝胶电泳结果相符。

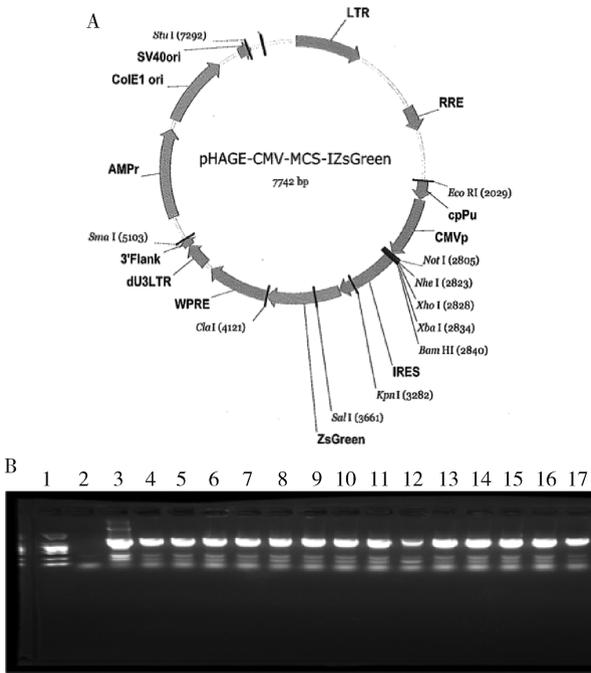


图1 lncRNA - AK058003 质粒的构建和筛选鉴定

A. 构建所需质粒图谱; B. 重组质粒行琼脂糖凝胶电泳验证; 1 为marker 自上而下依次为 5kb、3kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp、100bp, 2 为空白对照 (ddH₂O), 3 ~ 17 为转化子

2. 慢病毒包装荧光显微镜观察结果: 慢病毒的

pMD2. G、ps - PAX₂ 质粒以及 lncRNA - AK058003 重组质粒或者慢病毒空质粒共转染 293T 细胞, 48h 后用荧光显微镜观察 (图 2)。

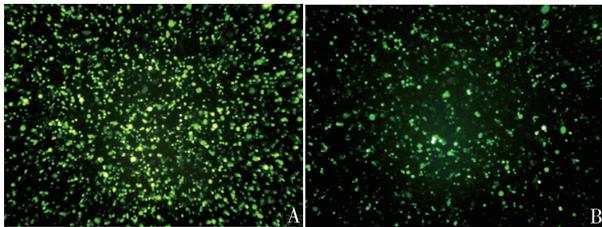


图2 慢病毒包装荧光照片 (×100)

A. 慢病毒空质粒转染 293T 细胞 48h 荧光照片; B. lncRNA - AK058003 重组质粒转染 293T 细胞 48h 荧光照片

3. 慢病毒感染后 lncRNA - AK058003 在 SK - Hep1 肝癌细胞中表达情况: 实时荧光定量 PCR 显示: 慢病毒转染后, SK - Hep1 肝癌细胞中 lncRNA - AK058003 的表达量, 过表达组显著高于空质粒组 (P < 0.05, 图 3)。

4. 裸鼠成瘤实验: lncRNA - AK058003 过表达组和空质粒组的裸鼠均成瘤。通过对裸鼠移植瘤体积的定量分析, 相对于空质粒组, 过表达组移植

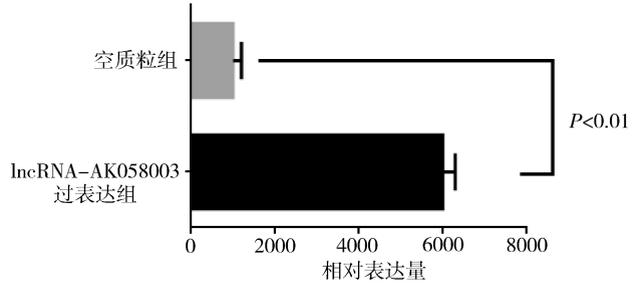


图3 慢病毒感染肝癌细胞后 lncRNA - AK058003 的相对表达量 两组间比较, P < 0.01

瘤体积较小, 从第 10 天起, 两组移植瘤体积有显著性差异 (P < 0.05) (35 天时移植瘤体积, 过表达组 308.4 ± 439.4 mm³, 空质粒组 1410.0 ± 973.0 mm³, 表 1), 过表达组瘤体的生长速度较空质粒组慢 (图 4、图 5)。35 天后, 取出裸鼠移植瘤, 称重, 过表达组 (0.464 ± 0.518g) 移植瘤重量也较空质粒组 (1.363 ± 0.856g) 轻, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。实验结果证实 lncRNA - AK058003 抑制了 SK - Hep1 肝癌细胞在体内的增殖, 对肝癌细胞成瘤具有抑制作用。

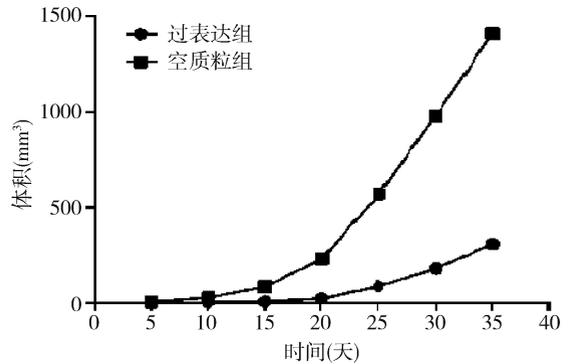


图4 肿瘤生长曲线

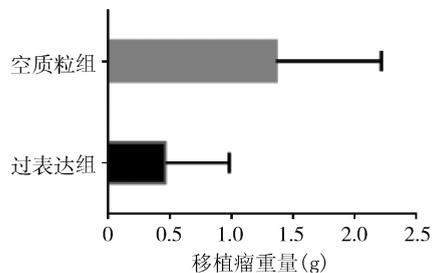


图5 移植瘤重量

讨 论

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 在癌症相关性死亡中居第 3 位, 在 60 岁之前, 肝癌是最常



图6 裸鼠成瘤实验结果

A. lncRNA - AK058003 过表达组; B. 空质粒组

表1 过表达组和空质粒组裸鼠皮下移植瘤平均体积及重量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	体积 (mm ³)						处死时移植瘤的重量 (g)
	第5天	第10天	第15天	第20天	第25天	第30天	
过表达组	0	2.676 ± 4.758	8.947 ± 9.369	23.770 ± 26.680	88.420 ± 52.160	180.200 ± 266.100	308.400 ± 439.400
空质粒组	7.062 ± 9.709	29.190 ± 26.500	85.650 ± 91.660	232.500 ± 172.900	569.900 ± 407.500	979.200 ± 711.400	1410.000 ± 973.000

的有 lncRNA H19、lncRNA MEG3、lncRNA HULC^[8-10] 等。lncRNA - AK058003 在胃癌组织的表达量高于癌旁组织,并且在缺氧条件下,胃癌细胞系中 lncRNA - AK058003 表达量增加,下调 lncRNA - AK058003 胃癌细胞的侵袭和迁移能力降低,并且缺氧诱导 lncRNA - AK058003 表达增加,进一步通过调控 SNCG 表达增加从而增加胃癌细胞的侵袭和迁移^[11]。生物信息学分析 γ - 突触核蛋白基因 (SNCG) 可能是受 lncRNA - AK058003 调控的靶基因,实验证实下调 lncRNA - AK058003 的表达, γ - 突触核蛋白基因 (SNCG) 表达下降,并且乳腺癌细胞 MCF - 7 的增殖、侵袭和迁移能力均降低。lncRNA - AK058003 和 SNCG 在乳腺癌组织中表达高于癌旁组织,并且 lncRNA - AK058003 通过促进 SNCG 的表达促进乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[12]。

关于 lncRNA - AK058003 在肝癌中的研究较少,有研究表明 SNCG 过表达能够促进 HepG2 肝癌细胞的增殖^[13]。以往关于 lncRNA 与肝癌细胞增殖的关系尚未涉及 AK058003,有研究发现表明,在 HepG2 和 Hep3B 细胞中,下调 lncRNA TUG1 的表达抑制肝癌细胞的增殖,lncRNA CAMTA1 在肝癌及肝癌肿瘤干细胞中均是高表达的,且 lncRNA CAMTA1 过表达促进了 HCCLM3 肝癌细胞的增殖^[14]。本研究结合上述两项研究中关于 lncRNA - AK058003 及 SNCG 对增殖的影响,首先通过慢病毒转染建立 lncRNA - AK058003 过表达的肝癌细胞,建立裸鼠人肝癌模型,探究在肝癌细胞中上调 lncRNA - AK058003 的表达

见的被诊断出的恶性肿瘤,并且在男性癌症相关性死亡中比例最高,据估计 2015 年有新发肝癌病例数 46.7 万,死亡病例 42.2 万^[4]。长链非编码 RNA (long chain non coding RNA, lncRNA) 一类长度 > 200nt 的非编码 RNA,由 RNA 聚合酶 II 转录形成的副产物,能够在表观遗传学、转录水平和转录后水平发挥对基因表达的调控作用^[5-7]。有许多 lncRNA 参与到恶性肿瘤发生、发展的过程,并且与恶性肿瘤的预后密切相关。在肝癌中,也有许多特异性的 lncRNA 参与肿瘤的增殖、侵袭及转移,研究较为清楚

对裸鼠移植瘤的影响^[15]。本研究发现上调 lncRNA - AK058003 的表达之后,与空质粒组比较,lncRNA - AK058003 过表达组的裸鼠移植瘤体积小且重量轻,且移植瘤生长速度缓慢。基于以上研究结果,推测 lncRNA - AK058003 过表达后抑制 SK - Hep1 肝癌细胞在裸鼠体内的增殖。推测 lncRNA - AK058003 将来很有可能成为恶性肿瘤诊断和治疗的新靶标,为恶性肿瘤的诊断和治疗提供新的策略和指导。

本研究通过动物实验初步探究了 lncRNA - AK058003 对肝癌裸鼠移植瘤的作用,从具体的分子机制、下游的靶基因以及具体的信号通路尚未研究,虽然如此,本研究为以后进一步研究 lncRNA - AK058003 在肝癌中的作用及具体的分子生物学机制提供了依据和参考,本研究也提示了在 lncRNAs 中寻找与肝癌发病机制、诊断及治疗特异性相关的 lncRNA 将有可能成为未来几年肝癌研究的热点和方向。

参考文献

- 1 Wang F, Fan J, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: The major impact of China [J]. Hepatology, 2014, 60 (6): 2099 - 2108
- 2 Engreitz JM, Haines JE, Perez EM, et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing [J]. Nature, 2016, 539 (7629): 452 - 455
- 3 Dickson I. Hepatocellular carcinoma: A role for lncRNA in liver cancer [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13 (3): 122 - 123
- 4 Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115 - 132
- 5 Necseula A, Soumillon M, Warnefors M, et al. The evolution of lnc-

- cRNA repertoires and expression patterns in tetrapods [J]. *Nature*, 2014, 505(7485): 635 - 640
- 6 Morris KV, Mattick JS. The rise of regulatory RNA [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(6): 423 - 437
- 7 Zhang Y, He Q, Hu Z, *et al.* Long noncoding RNA LINP1 regulates repair of DNA double - strand breaks in triple - negative breast cancer [J]. *Nat Stru Mol Bio*, 2016, 23(6): 522 - 530
- 8 Li H, Li J, Jia S, *et al.* miR675 upregulates long noncoding RNA H19 through activating EGR1 in human liver cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31958 - 31984
- 9 Zhang L, Yang Z, Trottier J, *et al.* LncRNA MEG3 induces cholestatic liver injury by interaction with PTBP1 to facilitate Shp mRNA decay [J]. *Hepatology*, 2016. Doi:10.1002/hep.28882
- 10 Hammerle M, Gutschner T, Uckelmann H, *et al.* Posttranscriptional destabilization of the liver - specific long noncoding RNA HULC by the IGF2 mRNA - binding protein 1 (IGF2BP1) [J]. *Hepatology*, 2013, 58(5): 1703 - 1712
- 11 Wang Y, Liu X, Zhang H, *et al.* Hypoxia - inducible lncRNA - AK058003 promotes gastric cancer metastasis by targeting γ - synuclein [J]. *Neoplasia*, 2014, 16(12): 1094 - 1106
- 12 He K, Wang P. Unregulated long non - coding RNA - AK058003 promotes the proliferation, invasion and metastasis of breast cancer by regulating the expression levels of the γ - synuclein gene [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(5): 1727 - 1732
- 13 Cheng S X, Zhang S, Zhang H, *et al.* Overexpression of synuclein - gamma confers resistance to antimicrotubule drugs against human hepatoma cells [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2010, 45(6): 724 - 729
- 14 Huang M, Chen W, Qi F, *et al.* Long non - coding RNA TUG1 is up - regulated in hepatocellular carcinoma and promotes cell growth and apoptosis by epigenetically silencing of KLF2 [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1): 165
- 15 He L, Tian DA, Li PY, *et al.* Mouse models of liver cancer: Progress and recommendations [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23306 - 23322
- (收稿日期:2016 - 12 - 02)
- (修回日期:2016 - 12 - 28)

右美托咪定联合咽喉部表面麻醉在老年患者左心耳封堵术中的研究

李 涛 夏中元 赵 博 雷少青 刘志刚

摘要 目的 观察右美托咪定联合咽喉部表面麻醉在老年患者经皮左心耳封堵术中的安全性和舒适度。方法 选择拟行左心耳封堵术患者 28 例,随机均分为两组,即对照组(S 组, $n = 14$)和右美托咪定组(M 组, $n = 14$)。S 组腹股沟局部浸润麻醉, M 组 1% 盐酸丁卡因咽喉表面麻醉 2 次,右美托咪定泵注负荷剂量 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 10min 后改为 $0.3 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 泵注维持,铺巾后腹股沟局部浸润麻醉。记录患者术前、术中及术后生命体征(MAP、HR、 SpO_2)的改变,置入食管超声镜期间恶心、呕吐发生率,并对患者进行 VAS, Ramsay 及 BCS 评分。**结果** S 组患者术中 HR、MAP、恶心、呕吐发生率高于 M 组($P < 0.05$); 两组患者术前 VAS, Ramsay 及 BCS 评分差异无统计学意义($P > 0.05$), S 组术中与术后 VAS 评分高于 M 组, Ramsay 及 BCS 评分低于 M 组($P < 0.05$)。**结论** 右美托咪定联合咽喉部表面麻醉可以安全用于左心耳封堵术,有效降低患者恶心、呕吐发生率,提高患者舒适度。

关键词 右美托咪定 表面麻醉 咽喉部 经皮左心耳封堵术

中图分类号 R614

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.09.014

Effect of Dexmedetomidine Combined with Surface Anesthesia in Elderly Patients of Percutaneous Closure of Left Atrial Appendage Occlusion.

Li Tao, Xia Zhongyuan, Zhao Bo, *et al.* Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To observe the effect of dexmedetomidine (Dex) combined with surface anesthesia in elderly patients of percutaneous closure of left atrial appendage occlusion. **Methods** Twenty - eight patients were randomly divided into two groups: group S, group M. Group S were received Local infiltration anesthesia in the groin. Group M were accepted not only surface anesthesia, but also Dex by intravenous and tetracaine for laryngopharynx. We recorded the MAP, HR, SpO_2 , the ratio of nausea and vomiting, VAS score,

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2016CFB167)

作者单位:430060 武汉大学人民医院麻醉科

通讯作者:夏中元,教授、博士,电子信箱:xiazhongyuan2005@aliyun.com