

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.23.002

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190815.1626.004.html\(2019-08-16\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190815.1626.004.html(2019-08-16))

LncRNA ATB/miR-107/STAMBPL1 轴调控前列腺癌增殖、转移和侵袭的作用机制*

滕若冰¹,余 鹏²,高 漓²

(桂林医学院附属医院:1. 生殖医学中心;2. 泌尿外科,广西桂林 541000)

[摘要] **目的** 探讨转化生长因子 β 活化的长链非编码 RNA ATB(lncRNA ATB)在前列腺癌中的表达,以及通过调控 miR-107/STAM 结合蛋白水平 1(STAMBPL1)通路在前列腺癌 PC3 细胞中对增殖、转移和侵袭的影响。**方法** 反转录 PCR(RT-PCR)法检测 58 例前列腺癌组织及相应癌旁正常组织临床样本中 lncRNA ATB mRNA 的表达水平。siRNA 干扰 PC3 细胞 lncRNA ATB 基因的表达,四甲基偶氮唑蓝(MTT)实验、划痕实验和 Transwell 实验分别观察 PC3 细胞增殖、迁移和侵袭能力的改变;采用 RT-PCR 和 Western blot 法分别测定 miR-107 mRNA 及 STAMBPL1 mRNA、蛋白的表达变化。**结果** 与癌旁正常组织比较,lncRNA ATB mRNA 在前列腺癌组织中表达水平明显增加($P < 0.05$)。沉默 lncRNA ATB 基因的 PC3 细胞较正常 PC3 细胞可显著减少细胞中增殖、迁移和侵袭能力,miR-107 mRNA 表达水平增高,STAMBPL1 mRNA 和蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。**结论** lncRNA ATB 在前列腺癌中高表达,其可能通过调控 miR-107/STAMBPL1 通路改变前列腺癌 PC3 细胞增殖、转移和侵袭的能力。

[关键词] 前列腺肿瘤;RNA,长链非编码;微 RNA-107;STAM 结合蛋白水平 1

[中图分类号] R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)23-3965-05

Mechanism of lncRNA ATB/miR-107/STAMBPL1 axis in regulating proliferation,metastasis and invasion of prostate cancer*

TENG Ruobing¹,YU Peng²,GAO Li²

(1. Reproductive Genetic Center ;2. Department of Urology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of long-chain non-coding RNA activated by transforming growth factor β (lncRNA ATB) in prostate cancer and its effect on proliferation,metastasis and invasion of prostate cancer PC3 cells by regulating miR-107/STAMBPL1 pathway. **Methods** RT-PCR method was used to measure the expression level of lncRNA ATB in 58 cases of prostate cancer tissues and adjacent normal tissues. siRNA interfered with the expression of lncRNA ATB gene,MTT assay,cell scratch and transwell experiment were used to observe the effects of lncRNA ATB on cell proliferation,migration and invasion of PC3 cell. The mRNA and Protein expression levels of miR-107 and STAMBPL1 were measured by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** Compared with adjacent normal tissues,the expression level of lncRNA ATB in prostate cancer tissue was significantly increased ($P < 0.05$);silencing of lncRNA ATB significantly reduced the proliferation,migration and invasion in prostate cancer PC3 cells,increased the expression level of miR-107 mRNA,and decreased the expression levels of STAMBPL1 mRNA and protein ($P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA ATB is highly expressed in prostate cancer,which may alter the proliferation,invasion and metastasis of prostate cancer PC3 cells by regulating miR-107/STAMBPL1 signaling pathway.

[Key words] prostatic neoplasm;RNA,long noncoding;microRNA-107;STAMBPL1

前列腺癌是男性最常见的恶性肿瘤,在男性恶性肿瘤中发病率排名第 2 位,占癌症相关死亡的 13%^[1]。近年来,前列腺癌发病率和病死率呈持续增长趋势且高年龄患者比重明显上升^[2-3]。早期筛查诊断和手术切除是目前治疗早期前列腺癌的主要方

法^[4-5]。由于前列腺癌发病隐匿、容易早期转移,患者就诊时多处于癌症晚期,体内出现局部浸润及远处转移,失去手术根治的机会^[6]。长链非编码 RNA(long noncoding RNA,lncRNA)是一类转录长度超过 200 nt 的非编码 RNA,其可在翻译、翻译后修饰水平调控

基因的表达,例如 DNA 甲基化、基因沉默、组蛋白修饰等,从而发挥生物学作用^[7]。因此,本研究以转化生长因子 β 活化的 lncRNA (lncRNA ATB) 作为研究对象,探讨 lncRNA ATB 在前列腺癌组织中的表达及其对前列腺癌 PC3 细胞增殖、迁移及侵袭的影响,为前列腺癌的发病机制研究提供重要的理论依据和新的思路,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

前列腺癌 PC3 细胞株购自中国科学院上海细胞库;DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Trizol、Lipofectamine 2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司;Transwell 小室和 Matrigel 基质胶购自美国 Millipore 公司;STAM 结合蛋白样 1(STAMB-PL1)抗体、DAPDH 抗体购自德国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 病例标本收集

收集 58 例 2016 年 1 月至 2018 年 10 月于本院接受手术的 58 例前列腺癌患者病理组织及相应癌旁正常组织。术中组织液氮冻存后放入 -80°C 超低温冰箱中存用。本研究中所有方案获得了本院伦理委员会同意并获得批准,患者在术前均签署了相关知情同意书。

1.2.2 细胞培养及转染

将状态良好的前列腺癌 PC3 细胞株在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,条件为 37°C 、5% CO_2 及 100% 饱和湿度。待细胞汇合至 70%~80% 时进行传代培养。细胞培养于 6 孔板中,采用无血清的培养基同步化 24 h,将细胞分为 si-NC 组与 si-ATB 组,按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明,分别转染空白质粒和 ATB 干扰质粒。

1.2.3 反转录 PCR(RT-PCR)检测 ATB 和 miR-107 的表达

采用 Trizol 法提取组织中总 RNA,按照反转录试剂盒说明书进行操作。实时定量 PCR 运用 SYBR Premix Ex Taq I 试剂盒,仪器使用 ABI prism 7300。相应引物序列,lncRNA ATB 正向引物为 5'-TCC GCT TAT TGG TCT ATC GAT-3',反向引物为 5'-TTC GAT TGG CAC CTA ATT TAC TCG-3';GAPDH 正向引物为 5'-CGA GTC ACA GGT CGC ATA CC-3',反向引物为 5'-CGA TTC TTA TAA CTT CTA GT-3';miR-107 正向引物为 5'-AGT TAA CCT CAA GTC GCC TCT A-3',反向引物为 5'-ATT CAC GGG CTT TAC GCA-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 ATB 和 miR-107 的相对表达水平。

1.2.4 MTT 实验测定细胞增殖水平的变化

将两组对数生长期 PC3 细胞用胰蛋白酶消化,配制成细胞悬液,细胞在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后接种于 96 孔板中,每孔加入 MTT 溶液 20 μL 继续培养

4 h。孵育后加入二甲基亚砜(DMSO)振荡溶解,采用自动酶标仪在 490 nm 波长下读取光密度(OD)值,计算细胞存活率。

1.2.5 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

取两组对数生长期的 PC3 细胞用胰酶消化后用无血清 DMEM 培养基调整细胞浓度至 2×10^6 个/mL,将细胞液 50 μL 加入 Transwell 小室上室,将 Transwell 小室置入含 500 μL 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基的 24 孔培养板,在 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后观察膜及孔下细胞数。0.5% 结晶紫溶液染色 20 min,染色结束后洗脱残余结晶紫溶液,用棉签擦去基质胶和小室内的细胞进行拍照、计数和统计学分析。

1.2.6 细胞划痕实验

取两组对数生长期的 PC3 细胞置于 6 孔板中,细胞密度约为 8×10^5 个/孔。每组设 3 个复孔,用 100 μL 枪头沿直尺垂直于培养板背后的横线划线,注意枪头保持垂直不要偏斜。划线结束后采用不含血清培养基洗 2~3 次,于培养 0 h 和 24 h 在镜下拍照并测量划痕宽度。

1.2.7 Western blot 实验检测 STAMBPL1 蛋白表达

加入含 1% 苯甲基磺酰氟(PMSF)的 RIPA 裂解液,混匀后裂解 30 min,提取 si-NC 与 si-ATB 组两组细胞蛋白。BCA 试剂盒检测蛋白浓度,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后将蛋白电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,加入 STAMBPL1 和 GAPDH 抗体后在 4°C 温度下孵育过夜。采用羊抗鼠的二抗(1:1 000 稀释)孵育 50 min,TBST 液洗涤 3 次,滴加超敏 ECL 化学发光底物显影曝光。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA ATB 在前列腺癌组织及癌旁正常组织中的表达

RT-PCR 结果显示,58 例前列腺癌组织及癌旁正常组织中,前列腺癌组织中 ATB mRNA 表达水平显著增加,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

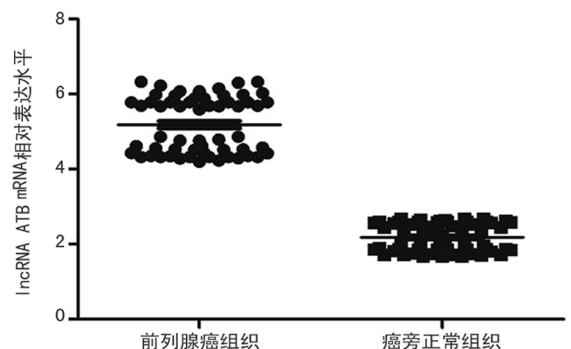
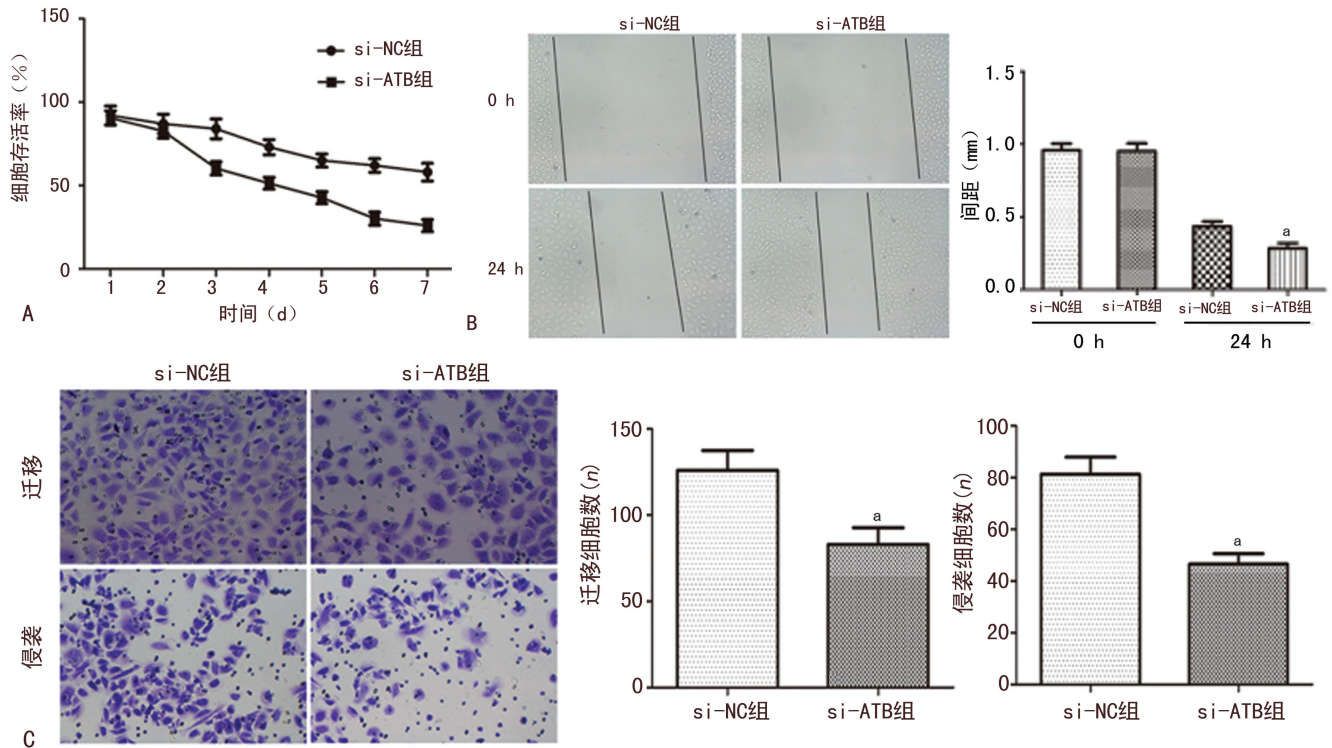
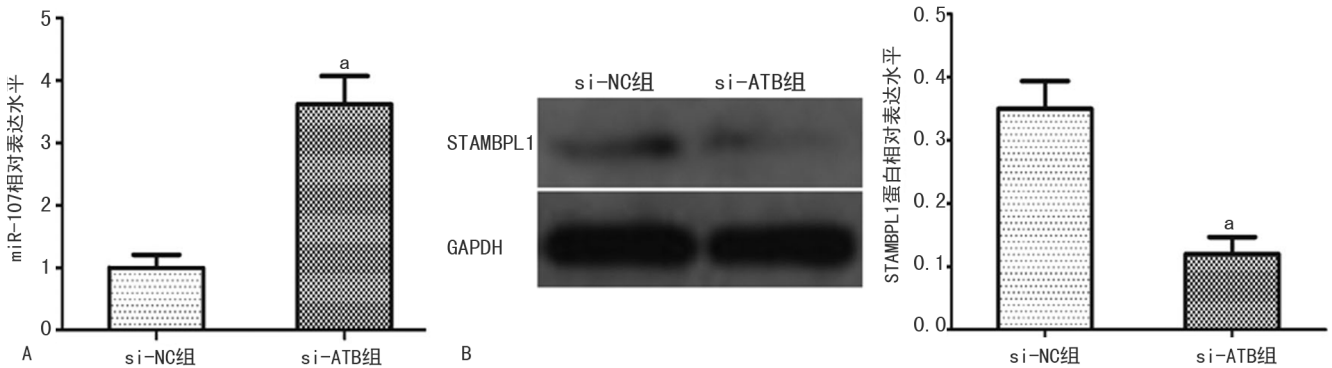


图 1 前列腺癌与癌旁正常组织中 lncRNA ATB mRNA 的表达



A: MTT 实验; B: 细胞划痕实验; C: Transwell 实验; ^a: $P < 0.05$, 与 si-NC 组比较

图 2 沉默 lncRNA ATB 对前列腺癌 PC3 细胞增殖、迁移及侵袭水平的影响



A: miR-107 RT-PCR 结果分析图; B: STAMBPL1 Western blot 及其结果分析图; ^a: $P < 0.05$, 与 si-NC 组比较

图 3 沉默 lncRNA ATB 对前列腺癌 PC3 细胞中 miR-107/STAMBPL1 信号通路的影响

2.2 前列腺癌组织中 lncRNA ATB 的表达水平与前列腺癌患者临床病理特征的相关性 分析 lncRNA ATB 的表达水平与临床病理特征的相关性, 结果提示: lncRNA ATB 的表达与术前前列腺特异性抗原 (PSA) 水平、临床分期、Gleason 评分及是否转移密切相关 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 沉默 lncRNA ATB 对前列腺癌 PC3 细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响 实验结果显示, 与 si-NC 组相比, si-ATB 组前列腺癌 PC3 细胞增殖、迁移及侵袭能力明显减低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.4 沉默 lncRNA ATB 对前列腺癌 PC3 细胞中 miR-107/STAMBPL1 信号通路的影响 采用 RT-PCR 实验检测沉默 lncRNA ATB 对前列腺癌 PC3 细胞中 miR-107 的表达变化。结果显示, 与 si-NC 组比

较, si-ATB 组中 miR-107 mRNA 表达水平明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 采用 Western blot 实验检测沉默 lncRNA ATB 对前列腺癌 PC3 细胞中 STAMBPL1 蛋白水平的影响。结果显示, 与 si-NC 组相比, si-ATB 组 STAMBPL1 蛋白表达水平明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

表 1 lncRNA ATB 表达水平与前列腺癌患者临床病理特征的相关性 (n)

项目	n	lncRNA ATB 表达水平		P
		高	低	
年龄				0.969
<70 岁	26	18	8	
≥70 岁	32	22	10	
是否转移				<0.01
否	33	27	6	

续表 1 lncRNA ATB 表达水平与前列腺癌患者临床病理特征的相关性(n)

项目	n	lncRNA ATB 表达水平		P
		高	低	
是	25	8	17	
临床分期				<0.01
T ₁	31	21	10	
T ₂ /T ₃	27	9	18	
术前 PSA 水平				0.032
<4 ng/mL	9	3	6	
4~10 ng/mL	14	2	12	
>10 ng/mL	35	19	16	
Gleason 评分				0.019
<7 分	20	16	4	
7 分	9	3	6	
>7 分	29	13	16	

3 讨 论

目前研究已证实,人类基因组中仅 1%~2% 具有蛋白编码功能,其余均为非编码序列^[8]。其中,lncRNA 多位于细胞核或细胞质内,主要由 RNA 聚合酶 II 转录生成,可调控染色质重塑、并对转录和转录后基因进行调控^[9-10]。近年研究已证实,肿瘤细胞内某些特定 lncRNA 的异常表达与肿瘤的发生、发展密切相关。许多 lncRNA 在前列腺癌中表达发生变化,具有诊断与作为治疗靶点的潜力,如 lncRNA MAL-AT1 可通过靶向 miR-320b 产生作用,从而促进前列腺癌细胞增殖和周期进程,其作用机制可能与 AR 信号通路激活有关^[11];lncRNA Meg3 在前列腺癌中呈低表达,通过 Meg3/miR-9-5p/QKI-5 轴影响前列腺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力及细胞凋亡^[12];lncRNA NAP1L6 在前列腺癌的发生、发展中发挥作用,可能是影响前列腺癌患者临床预后的重要因素^[13]。

ATB 是位于人第 14 号染色体,长度约 80 kb 的长链非编码 RNA。ATB 由转化生长因子 β (transforming growth factor β) 激活,而后者在调控肿瘤细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中具有重要作用^[14]。文献发现 ATB 可作为内源性竞争 RNA(ceRNA)竞争结合 miR-200c,并解除 miR-200c 对其靶基因 Twist1 的抑制,且通过 ATB/miR-200c/Twist1 轴在乳腺癌中影响细胞 EMT 的进程^[15];此外,ZHAI 等^[16]研究发现 ATB 在膀胱癌中表达显著增加,通过抑制 miR-126 的表达进一步促进膀胱癌的增殖、迁移和侵袭,这些发现可为膀胱癌提供潜在的预后生物标记物和治疗靶点。本研究首先对前列腺癌组织及癌旁正常组织中 ATB 的表达水平进行了检测,发现前列腺癌患者组织中 ATB

表达明显高于癌旁正常组织。接下来,本研究分析了前列腺癌组织中 ATB 的表达水平与患者临床病理特征的相关性,结果提示 ATB 与肿瘤的术前 PSA 水平、临床分期、Gleason 评分及是否转移密切相关。此外,在 PC3 细胞中沉默 ATB 后,细胞增殖、迁移及侵袭能力明显降低,提示 ATB 参与了前列腺癌的发生、发展过程,在前列腺癌中可能扮演了“促癌基因”的角色。

STAMBPL1 是 JAMM 家族成员的主要因子,已有相关研究表明 STAMBPL1 与肿瘤的发生、发展密切相关^[17]。LEE 等^[18]发现 STAMBPL1 基因在淋巴瘤细胞系中上调,其机制与病毒复制密切相关;LI 等^[19]研究显示,在子宫颈癌的 HeLa 细胞中,STAMBPL1 的甲基化可通过 NF- κ B、TGF- β 和 PI3K 信号通路途径导致细胞增殖和发挥抗凋亡的作用。miR-107 可通过多种信号转导途径调控肿瘤的发生、发展过程。研究表明,miR-107 在胃癌和乳腺癌中可分别靶向 BDNF 和 HMGAI 基因的表达,从而发挥抑制肿瘤的作用^[20]。在本研究中,沉默 ATB 后前列腺癌 PC3 细胞中 miR-107 表达上调,STAMBPL1 表达显著降低。因此,作者推测沉默 ATB 表达抑制了前列腺癌细胞的侵袭、转移,其机制可能与调控 miR-107/STAMBPL1 信号途径有一定关联。

综上所述,lncRNA ATB 的异常表达可能与前列腺癌的发生、发展密切相关,可能是通过调控 STAMBPL1 的表达影响前列腺癌 PC3 细胞增殖、转移和侵袭的能力。本研究了解了 ATB 在调节前列腺癌进展中的功能和分子机制,将为前列腺癌发病机制的阐明提供一定的理论基础和新的思路。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] 李汉忠, 张玉石. 2016 年前列腺癌诊治热点回顾[J]. 中华外科杂志, 2017, 55(1): 59-62.
- [3] 李汉忠, 董德鑫. 前列腺癌热点研究与前景展望[J]. 中华外科杂志, 2017, 53(4): 253-256.
- [4] CRAWFORD E D, STONE N N, YU E Y, et al. Challenges and recommendations for early identification of metastatic disease in prostate cancer[J]. Urology, 2014, 83(3): 664-669.
- [5] LITWIN M S, TAN H J. The diagnosis and treatment of prostate cancer: a review[J]. JAMA, 2017, 317(24): 2532-2542.
- [6] RAMSAY C R, ADEWUYI T E, GRAY J, et al. Ablative therapy for people with localised prostate cancer: a systematic review and economic evaluation[J]. Health Technol Assess, 2015, 19(49): 1-490.
- [7] GAO Y, CHEN G, ZENG Y, et al. Invasion and metastasis-related long noncoding RNA expression profiles in hepatocellular carcinoma[J]. Tumour Biol, 2015, 36(10):

7409-7422.

- [8] HANGAUER M J, VAUGHN I W, MCMANUS M T. Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic non-codingRNAs[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(6): e1003569.
- [9] CALEY D P, PINK R C, TRUJILLANO D, et al. Long non-codingRNAs, chromatin, and development [J]. *ScientificWorldJournal*, 2010, 10(1): 90-102.
- [10] MERCER T R, DINGER M E, MATTICK J S. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3): 155-159.
- [11] DAI X, LIU L, LIANG Z, et al. Silencing of lncRNA MALAT1 inhibits cell cycle progression via androgen receptor signaling in prostate cancer cells[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(4): 712-721.
- [12] WU M, HUANG Y, CHEN T, et al. LncRNA MEG3 inhibits the progression of prostate cancer by modulating miR-9-5p/QKI-5 axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1): 29-38.
- [13] ZHENG Y, GAO Y, LI X, et al. Long non-coding RNA NAP1L6 promotes tumor progression and predicts poor prognosis in prostate cancer by targeting Inhibin- β A[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 4965-4977.
- [14] 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): 11652-11663.
- [15] LI RH, CHEN M, LIU J, et al. Long noncoding RNA

ATB promotes the epithelial-mesenchymal transition by upregulating the miR-200c/Twist1 axis and predicts poor prognosis in breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1171.

- [16] ZHAI X, XU W. Long Noncoding RNA ATB promotes proliferation, migration, and invasion in bladder cancer by suppressing microRNA-126[J]. *Oncol Res*, 2018, 26(7): 1063-1072.
- [17] LAVORGNA A, HARHAJ E W. An RNA interference screen identifies the Deubiquitinase STAMBPL1 as a critical regulator of human T-cell leukemia virus type 1 tax nuclear export and NF- κ B activation[J]. *J Virol*, 2012, 86(6): 3357-3369.
- [18] LEE N H, KIM M, OH S Y, et al. Gene expression profiling of hematologic malignant cell lines resistant to oncolytic virus treatment[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1156-1165.
- [19] LI C W, CHEN B S. Investigating core genetic-and-epigenetic cell cycle networks for stemness and carcinogenic mechanisms, and cancer drug design using big database mining and genome-wide next-generation sequencing data [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(19): 2593-2607.
- [20] CHENG F, YANG Z, HUANG F, et al. microRNA-107 inhibits gastric cancer cell proliferation and metastasis by targeting PI3K/AKT pathway[J]. *MicrobPathog*, 2018, 120(5): 110-114.

(收稿日期: 2019-01-10 修回日期: 2019-04-02)

(上接第 3964 页)

- [11] MILES K A, LONDON N J, LAVELLE J M, et al. CT staging of renal carcinoma: a prospective comparison of three dynamic computed tomography techniques[J]. *Eur J Radiol*, 1991, 13(1): 37-42.
- [12] ISHII T, FUKUTA T, AGATO Y, et al. Nanoparticles accumulate in ischemic core and penumbra region even when cerebral perfusion is reduced[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(4): 1201-1205.
- [13] WANG W, WANG Q, YU W, et al. Efficacy of phosphocreatine pre-administration on XIAP and Smac in ischemic penumbra of rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2018, 33(2): 117-124.
- [14] DEMEESTERE J, GARCIA-ESPERON C, GARCIA-BERMEJO P, et al. Evaluation of hyperacute infarct volume using

ASPECTS and brain CT perfusion core volume[J]. *Neurology*, 2017, 88(24): 2248-2253.

- [15] MURPHY B D, CHEN X, LEE T Y. Serial changes in CT cerebral blood volume and flow after 4 hours of middle cerebral occlusion in an animal model of embolic cerebral ischemia[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2007, 28(4): 743-749.
- [16] 李岳勇, 陆建勋, 韦忠恒, 等. 介入方法兔急性脑梗死模型的制作及 CT 灌注成像评价[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(11): 866-868.
- [17] FANG X K, NI Q Q, SCHOEPF U J, et al. Image quality, radiation dose and diagnostic accuracy of 70kVp whole brain volumetric CT perfusion imaging: a preliminary study[J]. *EurRadiol*, 2016, 26(11): 4184-4193.

(收稿日期: 2019-03-06 修回日期: 2019-07-13)