

## 人类肿瘤组织中非编码 RNA-NC28 和 NC119 的鉴定及表达

孙贞媛<sup>1,2</sup>, 袁艳华<sup>2</sup>, 刘长宁<sup>3</sup>, 赵屹<sup>3</sup>, 黄洁夫<sup>1</sup>, 桑新亭<sup>1</sup>,  
毛一雷<sup>1</sup>, 卢欣<sup>1</sup>, 王歙<sup>3</sup>, 常永生<sup>4</sup>, 赵海涛<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院肝脏外科, 北京 100730

<sup>2</sup>北京大学 临床肿瘤学院生物诊疗中心, 北京 100036

<sup>3</sup>中国科学院 计算技术研究所生物信息学研究组, 北京 100080

<sup>4</sup>中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

通信作者: 赵海涛 电话: 010-65296042, 电子邮件: dr\_zht@yahoo.com.cn

**摘要:** **目的** 寻找并验证与肿瘤相关的非编码 RNA。 **方法** 采用 RT-PCR 和 Northern blot 分析非编码 RNA 在肿瘤组织及细胞系中的表达情况。 **结果** RT-PCR 在实体肿瘤和细胞系中鉴定了 2 个非编码 RNA - NC28 和 NC119 的表达, Northern blot 检测发现 NC28 转录子长度大约为 1 800 个核苷酸, NC119 转录子长度大约为 1 200 个核苷酸。 **结论** 这两种非编码 RNA 具有一定的肿瘤共享性, 非编码 RNA 在肿瘤发生发展中可能发挥一定作用。

**关键词:** 肿瘤; 非编码 RNA; 肿瘤特异性; 差异表达; 表达序列标签

中图分类号: Q522 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)05-0618-04

### Identification and Expression of Non-coding RNAs NC28 and NC119 in Human Tumors

SUN Zhen-yuan<sup>1,2</sup>, YUAN Yan-hua<sup>2</sup>, LIU Chang-ning<sup>3</sup>, ZHAO Yi<sup>3</sup>, HUANG Jie-fu<sup>1</sup>,  
SANG Xin-ting<sup>1</sup>, MAO Yi-lei<sup>1</sup>, LU Xin<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>3</sup>, CHANG Yong-sheng<sup>4</sup>, ZHAO Hai-tao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Liver Surgery, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

<sup>2</sup>Biological Diagnosis and Therapy Center, School of Oncology, Peking University, Beijing 100036, China

<sup>3</sup>Bioinformatics Laboratory, Institute of Computing Technology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

<sup>4</sup>National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Corresponding author: ZHAO Hai-tao Tel: 010-65296042, E-mail: dr\_zht@yahoo.com.cn

**ABSTRACT:** **Objective** To explore and identify the non-coding RNAs related to tumors. **Methods** We used RT-PCR and Northern blot to analyze non-coding RNAs in tumor tissues and cell lines. **Results** Two predicted non-coding RNAs were confirmed to be expressed in cancer tissues and cell lines by RT-PCR and DNA sequencing. We detected the expression of two non-coding RNA transcripts by Northern blot. The length of NC28 was about 1800 nt, and that of NC119 was about 1200nt. **Conclusions** NC28 and NC119 have a tumor-associated expression pattern. The non-coding RNAs may play a role in the development of tumors.

**Key words:** tumor; non-coding RNA; tumor-specific; differential expression; expressed sequence tags

*Acta Acad Med Sin*, 2007, 29(5): 618-621

从高等生物和人基因组序列转录而来的绝大多数 RNA 都不编码蛋白质, 这些非编码 RNA 一度被认为没有任何功能。近来研究发现, 多种非编码 RNA 可直接在 RNA 水平发挥作用, 参与质粒复制、噬菌体发育、细菌毒力、染色体结构、DNA 复制、RNA 加工和修饰、发育控制和其他各种过程<sup>[1]</sup>, 其与肿瘤的发生发展也有一定联系<sup>[2]</sup>。如非编码 RNA 基因 *MALAT-1* 可与编码基因一样, 在非小细胞肺癌中特异性表达, 临床资料显示, 非小细胞肺癌中该 RNA 早期的表达水平与肿瘤转移密切相关<sup>[3]</sup>。中国科学院计算技术研究所生物信息实验室通过 EST 数据库搜索和电子差异表达差减算法等生物信息学方法, 预测得到一些可能在肿瘤中高表达的非编码 RNA, 本研究从中选择了 2 个预计可在肿瘤组织有较高表达率的非编码 RNA - NC28 和 NC119, 对其在实体肿瘤中的表达模式进行了研究。

## 材料和方法

**组织标本收集和细胞培养** 60 例组织标本均取自北京肿瘤医院标本库, 包括: 8 例子宫内膜癌组织及 8 例相应的远癌正常组织、10 例肾癌组织及 10 例相应远癌正常组织、8 例肺癌组织及 8 例对应的远癌正常组织, 8 例卵巢癌组织标本。肿瘤组织和远癌正常组织标本均由北京肿瘤医院外科医师自手术后 30 min 内切取自新鲜组织, 立即浸入液氮中, 并保存于 -80℃ 冰箱中。全部标本均经病理学检查明确诊断。

肺癌细胞系 A549 由本室保存, 肝癌细胞系 PKU-hep-11 由本室原代培养建系。培养条件: 含 10% 灭活胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基 (美国 Sigma 公司), 37℃、

5% CO<sub>2</sub> 培养。

**RNA 提取和纯化** 参照 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 说明书提取总 RNA, 具体为: 取新鲜冻存组织或离心后细胞团, 加入 Trizol 充分匀浆, 然后依次加入三氯甲烷、异丙醇、75% 乙醇, 提取总 RNA, 然后用 DNase I (Ambion, 美国) 去除总 RNA 中混杂的基因组 DNA 污染。用紫外分光光度仪分别在 260 和 280 nm 波长下分析 RNA 的光密度值, 测定 RNA 纯度并定量。

**cDNA 合成** 采用随机引物将纯化后的 RNA 逆转录得到 cDNA (Invitrogen, 美国)。在无菌的 0.2 ml 管中准备 RNA/引物混合物, 包括: 2 μg 总 RNA、10 mmol/L dNTP mix 1 μl、Random hexamers (50 ng/μl) 2 μl。每个样品于 65℃ 加热 5 min, 然后置于冰上至少 1 min, 依次添加 10 × RT buffer 2 μl、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4 μl、0.1 mol/L DTT 2 μl、RNase Inhibitor 1 μl, 25℃ 2 min 后, 添加 1 μl (50 unit) SuperScript™ II RT, 条件为: 25℃ 10 min, 42℃ 50 min, 70℃ 15 min, 终止反应。

**PCR 反应** PCR 引物序列及反应条件见表 1。具体为: 取 cDNA 2.5 μl, 分别加入 10 × buffer 2.5 μl、dNTP 1.0 μl、上游引物 (10 μmol/L) 0.5 μl、下游引物 (10 μmol/L) 0.5 μl、TaqE (2.5 U/μl)。反应条件: 94℃ 变性 1 min, 50 ~ 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 7 min 结束反应。分别取反应产物 8 μl, 加 2 μl DNA loading buffer 在 1% 的琼脂糖凝胶上于 100 V 电压下电泳 30 min, 溴化乙锭 (EB) 染色, 紫外灯下观察, 出现相应大小条带者为阳性表达。使用预测非编码 RNA 的特异性引物进行 PCR 扩增。

表 1 PCR 引物序列及条件

Table 1 PCR primers and reaction conditions

引物名称 Primers	引物序列 5'至 3' Primer sequences 5'to 3'	退火温度 Rennealing temperature	循环数 Cycles	产物大小 (bp) Product length
GAPDH	GTCAACGGATTTGCTCGTATT AGTCTTCTGGTGCCAGTGAT	56℃	24	540
NC28	GTATGCATTATATTCAGGCAGTCT GAGTACAGTGTATTGCACAATGTGTT	56℃	35	386
NC119	TTACACGCTGTTTCTCCA CCATTCACATGTCACAGATG	56℃	35	413

**PCR 产物测序与 DNA 同源性分析** 将反应获得的 PCR 产物和 PGEM-T easy 载体连接, 转化扩增

后, 提取质粒 DNA, 由上海基康生物公司完成测序工作。将测序结果用 BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))

BLAST) 软件与 Genebank 序列进行同源性分析。

使用紫外成像仪中的密度对比软件 Area Density, 将肿瘤组织和对应远癌正常组织来源的特异性扩增产物表达量进行比较分析。如果某个非编码 RNA, 肿瘤组织来源的扩增产物表达量达到远癌正常组织来源的 2 倍以上, 就认为这个非编码 RNA 在这个肿瘤组织标本中高表达, 视为表达阳性。

**Northern blot** 配制甲醛变性胶, 将从肿瘤细胞系 A549 和 HEP-PKU-11 中分别提取出来的总 RNA 预先变性, 然后和变性上样缓冲液一起加入上样孔, 按 100 V 进行变性凝胶电泳约 3 h。采用虹吸法转膜约 24 h, 120°C 干烤 30 min 进行核酸固定。用 Gene Labeling System Kit (Promega, 美国) 将 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (福瑞生物) 标记于非编码 RNA 所包含的已知序列上制成特异性探针。探针和带有核酸的膜在杂交液 (Clontech, 美国) 中共同孵育 2 h, 然后洗脱探针, 放射自显影。2~5 d 后, 显影定影可见特异性条带, 根据 RNA Marker 推算转录子大小。

**统计学处理** 采用 SPSS10.0 统计软件, 应用分

组资料的 Pearson  $\chi^2$  FISHER 精确检验分析,  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 结 果

**RT-PCR 分析结果** 与远癌正常组织对比, NC28 在所有 8 例子宫内膜癌组织中有 6 例高表达, 8 例肺癌组织中有 6 例高表达, 10 例肾癌组织中仅有 2 例高表达, 8 例卵巢癌组织中 4 例有表达; NC28 在肺癌细胞系 A549 和肝癌细胞系 HEP-PKU-11 中均有表达。NC119 在 8 例肺癌组织中有 6 例高表达, 10 例肾癌组织中仅有 3 例高表达, 8 例卵巢癌组织中仅 2 例有表达, 在所有 8 例子宫内膜癌组织中均未见 NC119 表达; NC119 在肺癌细胞系 A549 中可见表达, 而在肝癌细胞系 HEP-PKU-11 中未见表达 (表 2)。统计学分析显示, NC28 在子宫内膜癌和肺癌中都显示出肿瘤相关性 ( $P < 0.05$ ), 而 NC119 只在肺癌中提示有肿瘤相关性 ( $P < 0.05$ )。

表 2 NC-28 和 NC-119 在 4 种常见实体瘤组织和 2 种肿瘤细胞系中的表达情况

Table 2 Expressions of NC28 and NC119 in 4 types of solid tumors and 2 types of tumor cell lines

非编码 RNA Non-coding RNA	子宫内膜癌 Endometrial cancer	非小细胞肺癌 Non-small cell lung cancer	肾癌 Renal carcinoma	卵巢癌 Ovary cancer	A549	HEP-PKU-11
NC28	6/8	6/8	2/10	4/8	+	+
NC119	-	6/8	3/10	2/8	+	-

**Northern blot 分析结果** 肝癌细胞系 HEP-PKU-11NC28 中可表达 NC28, 长度大约为 1 800 个核苷酸, 肺癌细胞系中可表达 NC119, 长度大约为 1 200 个核苷酸 (图 1)。

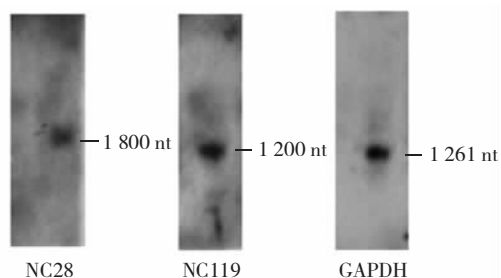


图 1 Northern blot 分析 NC 28 和 NC119

Fig 1 Northern blot analysis of NC28 and NC119

## 讨 论

目前针对非编码 RNA 的研究很广泛, 但多集中

在线虫领域<sup>[4]</sup>, 对于人类中非编码 RNA 的研究也曾有过, 如莫斯科一个实验室首先使用电子差异表达算法预测肿瘤特异性的 EST 片断<sup>[5]</sup>, 然后于 clontech 购买了多种人类肿瘤 cDNA, 对其中 6 个没有编码蛋白质潜能的 EST 片断进行 PCR 实验分析, 结果发现计算机预测和实验验证结果基本上相吻合<sup>[6]</sup>。本研究中对生物信息学方法预测的、在肿瘤中特异表达的非编码 RNA-NC28 和 NC119 进行了表达分析, 结果显示 NC28 和 NC119 具有一定的肿瘤相关性。

基因组上产生非编码 RNA 的序列是一段连续的 DNA 序列, 中间没有外显子序列相间隔, 提取 RNA 的过程中如果有基因组 DNA 污染, 则将无法区分这段扩增信号的真实来源。本研究提取了 4 种肿瘤组织及其相应远癌正常组织中的总 RNA, 用 DNase I 去除总 RNA 提取过程中可能污染的基因组 DNA, 以保证后面的 PCR 反应信号都来源于真实的 RNA 转录体。实验中在 PCR 扩增反应同时采用基因组对照,

以明确是否有基因组 DNA 污染导致的假阳性结果。一般实验通常采用 mRNA-like 引物作为反转录中所使用的引物,而对于非编码 RNA,它们可能不同于 mRNA,从而不一定具备多聚 A 尾,所以本研究采用随机引物将 RNA 逆转录转成 cDNA,可以使尽可能多的各种非编码 RNA 都逆转录合成为 cDNA,以减少实验误差。

由于卵巢癌无法取得正常组织对照,而肾癌组织和对应远癌正常组织中非编码 RNA 的表达强度差别不大,所以本研究只在肺癌和子宫内膜组织中统计这些非编码 RNA 的表达情况与肿瘤的相关性。结果显示,NC28 在子宫内膜癌和肺癌中都显示出肿瘤相关性,而 NC119 只在肺癌中提示有肿瘤相关性。这两种非编码 RNA 在肿瘤组织中高表达,提示其具有一定的肿瘤共享性,可能在肿瘤细胞的发生和生长过程中发挥重要作用。这些非编码 RNA 与预后关系的统计有赖于标本数量的继续扩大和临床资料的进一步收集。

本研究还通过 Northern blot 方法在 PKU-hep-11 和 A549 细胞系中检测到 NC28 和 NC119 转录子的表达,并且根据 RNA marker 大体估测出 NC28 的长度约为 1 800 nt,而 NC119 大约为 1 200 nt。在低等生物,如细菌、线虫中含量丰富的调节性 RNA 被发现多是长度在 21~24 nt 的小 RNA 如 miRNA 家族<sup>[4]</sup>,而本研究在人类肿瘤中新发现的非编码 RNA 长达数千个核苷酸长,预示着他们可能具有更为复杂的调节功能。

人类肿瘤中广泛存在着大量的没有蛋白编码能力的 RNA,这部分非编码 RNA 的数量和功能远远超出人们的预计<sup>[7]</sup>。本研究结果提示,部分非编码 RNA 的特异性表达有可能是肿瘤细胞的重要特点,

非编码 RNA 在肿瘤的发生发展过程中有可能发挥一定作用。今后笔者将扩大肿瘤组织类型和病例数,进一步收集所采用病例的预后情况,以便筛选出更多的肿瘤相关非编码 RNA。

(志谢:感谢管又飞教授和吴静同学对 Northern blot 分析实验的帮助)

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Eddy SR. Non-Coding RNA genes and the modern RNA world [ J ]. *Nature Genetics*, 2001, 2( 12 ) : 919-929.
- [ 2 ] Hall PA, Russell SH. New perspectives on neoplasia and the RNA world [ J ]. *Hematol Oncol*, 2005, 23( 2 ) : 49-53.
- [ 3 ] Ji P, Diederichs S, Wang W, *et al.* MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer [ J ]. *Oncogene*, 2003, 22( 39 ) : 8031-8041.
- [ 4 ] Lee RC, Rhonda L. Feinbaum & Victor Ambros The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with anti-sense complementarity to lin-14 [ J ]. *Cell*, 1993, 75( 5 ) : 843-854.
- [ 5 ] Baranovaa AV, Lobasheva AV, Ivanova DV, *et al.* In silico screening for tumour-specific expressed sequences in human genome [ J ]. *FEBS Letters*, 2001, 508( 1 ) : 143-148.
- [ 6 ] Krukovskaja LL, Baranovac A, Tyezelovab T, *et al.* Experimental study of human expressed sequences newly identified in silico as tumor specific [ J ]. *Tumor Biol*, 2005, 26( 1 ) : 17-24.
- [ 7 ] Morey C, Avner P. Employment opportunities for non-coding RNAs [ J ]. *FEBS Letters*, 2004, 567( 1 ) : 27-34.

( 2007-04-29 收稿 )