

下调 CRNDE 基因表达对 MAPK/ERK 通路中相关基因的影响

邓文月, 杜浩, 何远志, 黄玲玥, 路营营, 汤伟, 景世元

【摘要】 目的 探讨下调 LncRNA CRNDE 基因表达对 MAPK/ERK 通路及转录因子中相关基因的影响。方法 将 CRNDE 基因干扰 siRNA 转染人胶质瘤 U251 细胞系, 并同时设置空白组及对照组, 利用实时 PCR 检测细胞系中 MAPK/ERK 通路及转录因子中相关基因表达量的变化。结果 与空白组及对照组相比, 转染组 (si783, si809) 中相关基因 NF- κ B、MEK2、ERK1、ERK2、c-Myc、Raf-1 表达量均明显下降 (均 $P < 0.05$), 具有统计学意义。结论 CRNDE 可能通过调节 MAPK/ERK 通路中及转录因子中一系列相关基因表达, 增加胶质瘤细胞的增殖和迁移能力, 同时抑制细胞凋亡。

【关键词】 结直肠癌差异表达长链非编码 RNA; MAPK/ERK 通路; 增殖; 凋亡; 迁移

【中图分类号】 Q344⁺.13 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-7770(2019)04-0294-05

Effect of down-regulated LncRNA CRNDE expression in MAPK/ERK pathway DENG Wen-yue, DU Hao, HE Yuan-zhi, et al. Department of Pediatric Neurosurgery, Wuhan Children's Hospital (Wuhan Maternal and Child Healthcare Hospital), Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430016, China

Corresponding author: DU Hao

Abstract: Objective To investigate the effect of down-regulated LncRNA CRNDE expression for key kinases and transcription factors in the MAPK/ERK pathway. **Methods** The LncRNA CRNDE in U251 cells were interfered by using SiRNA. The non-transfected and control group were set up. By Real Time PCR method, the effect of interfering LncRNA CRNDE on U251 cell for key kinases and transcription factors in the MAPK/ERK pathway was observed. **Results** Compared to the non-transfected group and control group, the expression of the key kinases (Raf-1, MEK2, ERK1, ERK2) and transcription factors (c-Myc, NF- κ B) in MAPK/ERK pathway were down-regulated for siRNA group. There were significant differences between non-transfected group, control group and siRNA group (all $P < 0.05$). **Conclusion** CRNDE can enhance the abilities of cell proliferation and migration, inhibit the ability of cell apoptosis in glioma through activating related gene expression in MAPK/ERK pathway.

Key words: CRNDE; MAPK/ERK pathway; proliferation; apoptosis; migration

CRNDE (colorectal neoplasia differentially expressed) 是结直肠癌差异表达长链非编码 RNA, 在许多肿瘤组织中出现异常表达^[1-2], 尤其是在胶质瘤中上调 14~32 倍^[3], 从而推断 CRNDE 可能在胶质瘤演变过程中发挥重要功能。为探讨下调 LncRNA CRNDE 基因表达对 MAPK/ERK 通路及转录因子中

相关基因的影响, 本研究进行 U251 细胞的 siRNA 干扰, 利用实时 PCR 检测细胞系中 MAPK/ERK 通路及转录因子中相关基因表达量的变化, 进一步分析 CRNDE 对胶质瘤细胞增殖和迁移以及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑胶质细胞瘤 U251 (来源于胶质母细胞瘤 WHO IV 级) 购自江苏齐氏生物科技有限公司。其他材料见表 1。

基金项目: 武汉市卫生计生科研基金 (WX17Q27)

作者单位: 430016 武汉, 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院神经外科

通信作者: 杜浩

表 1 所用试剂及其生产厂家

试剂名称	生产厂家
CCK8 试剂盒	BEYOTIME
Lipofectamine2000	INVITROGEN
Annexin-VFITC/PI 细胞凋亡试剂盒	SOLARBIO
transwell 小室	CONING
U251 细胞株	ATCC
DMEM 培养基	HYCLONE
胎牛血清	HYCLONE
青霉素	SIGMA
链霉素	SIGMA
谷氨酰胺	SIGMA
0.25% 胰蛋白酶	SIGMA
台盼蓝	SIGMA
DMSO	SIGMA

1.2 方法 将人脑胶质细胞瘤 U251 经过细胞复苏、细胞传代及细胞冻存等步骤完成。CRNDE 干扰 siRNA 及目的基因引物序列的设计。

1.2.1 细胞培养 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养、传代。转染前 24 h, 弃去培养基, 加 PBS 洗 3 遍, 加入 0.25 胰酶, 37 °C 消化至待细胞回缩变圆, 加终止液终止消化, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用不加双抗的完全培养基重悬, 接种在六孔板中, 每孔 (0.5 ~ 2) × 10⁵ 个细胞, 待细胞汇合度为 60% ~ 80%。取三种 siRNA 各取 100 pmol, 稀释于 250 mL Opti-MEM 培养基, 将 5 μL Lipofectamine 2000 稀释于 250 μL Opti-MEM 培养基, 混匀室温放置 5 min, 将两管混合放置 20 min。将六孔板内培养基弃掉, PBS 洗 2 遍, 每孔加 1.5 mL Opti-MEM 培养基, 将上述混合液加入相应孔。将转染入无关序列 NC 的细胞作为阴性对照组, 将未转染入任何序列的细胞作为空白组。

1.2.2 实时 PCR 检测 首先进行 CRNDE 引物设计。F: AAATCAAAGTGCTCGAGTG, GTR: ACCTTC-TT-CTGCGTGACAAC。利用 Trizol 提取未转染及转染 CRNDE siRNA 的细胞总 RNA。将 1 μg 总 RNA 反转录为 cDNA, 基因组 DNA 的除去及反转录反应采用 TIANScript RT KIT 试剂盒(天根生物科技有限公司)。实时 PCR 反应体系参考 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 说明书, SuperReal PreMix Plus 10 μL, FW Primer 0.6 μL, RV Primer 0.6 μL, cDNA 模板 100 ng, RNase-Free dd H₂O 7.4 μL。利用荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 进行实时定量

PCR, 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 53 °C 20 s, 72 °C 20 s, 延伸阶段收集荧光信号, 40 个循环; 55 ~ 95 °C 绘制溶解曲线。结束后确认实时 PCR 的扩增曲线和溶解曲线, 每个样本重复 3 遍。利用 2^{-ΔΔCt} 法计算目标基因的相对表达量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 目的基因相对表达量以均数 ± 标准差表示, 采用 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 U251 细胞 siRNA 干扰效率的验证 见图 1。利用 siRNA 在胶质瘤细胞 U251 中进行干扰, 24、48 h 后进行提取细胞内总 RNA, 经过逆转录后进行 CRNDE 的 PCR 检测。si783、si809 干扰组在转染 24 h 后 CRNDE 表达量为对照组的 8.6% 和 12.6%; 48 h 后 CRNDE 表达量为对照组的 11.4% 和 18.5%, 均有统计学意义 (均 P < 0.05)。说明在转染 24、48 h 后, si783、si809 对靶基因 CRNDE 表达干扰效果良好。

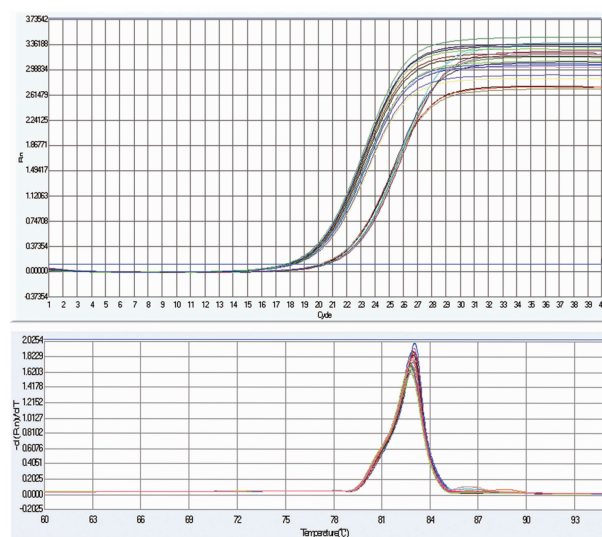


图 1 CRNDE 基因实时扩增曲线图及产物溶解曲线图

2.2 si783、si809 干扰 CRNDE 表达对相关目的基因表达的影响 本研究对相关目的基因表达水平进行 PCR 分析, 结果显示 Raf-1、MEK2、ERK1、ERK2、c-Myc、NF-κB 的 RNA 表达量均有不同程度下降。Raf-1 基因表达水平在 si783、si809 干扰组中分别下降为对照组的 31.7% 和 72.2%; MEK2 基因表达水平降低为对照组的 31.3% 和 41.9%; ERK1 基因表达水平降至对照组的 60.4% 和 48.2%; ERK2 基因表达水平降至对照组 75.3% 和 70.4%; 与干扰组相比, si783、si809 干扰组中 NF-κB 表达水平降至 39.9% 和 69.4%, c-Myc 表达水平降至 36.1% 和 47.3% (图 2-8 及表 2)。

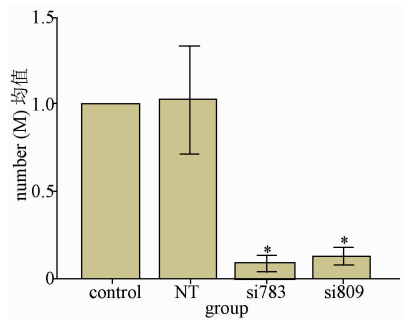


图2 siRNA 后 CRNDE mRNA 水平表达情况

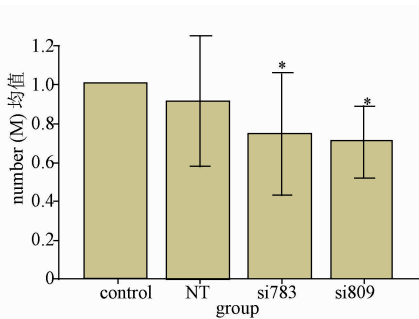


图3 siRNA 后 ERK2 mRNA 水平表达情况

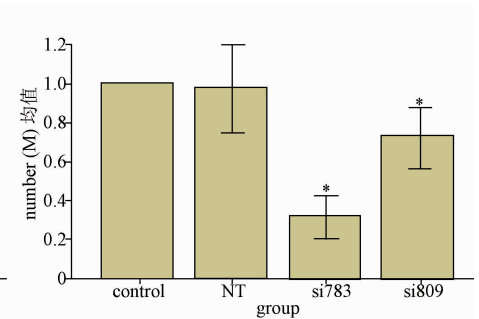


图4 siRNA 后 Raf-1 mRNA 水平表达情况

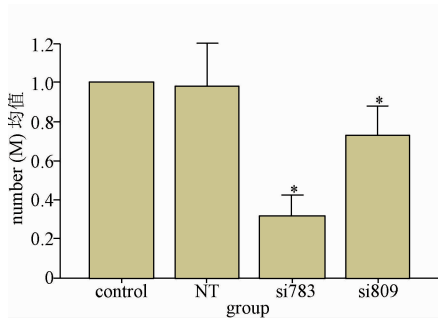


图5 siRNA 后 MEK2 mRNA 水平表达情况

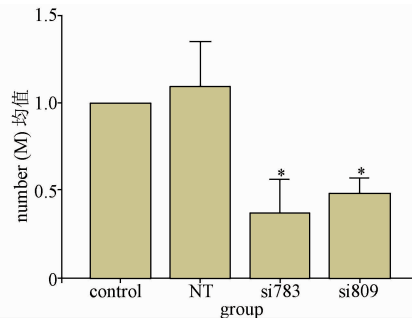


图6 siRNA 后 c-Myc mRNA 水平表达情况

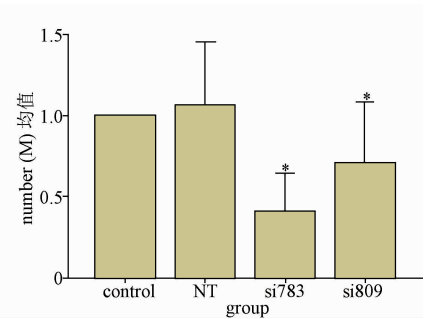


图7 siRNA 后 NF-κB mRNA 水平表达情况

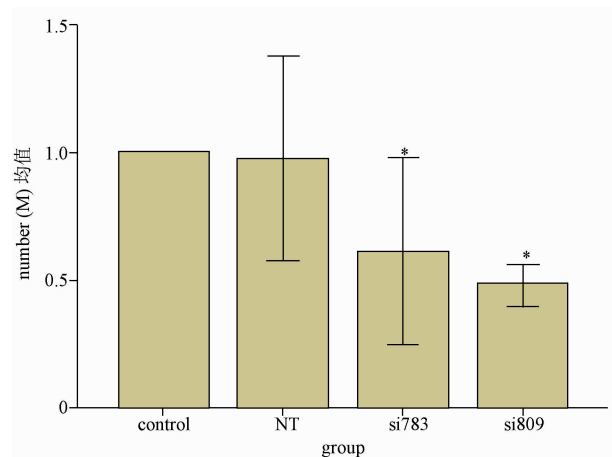


图8 siRNA 后 ERK1 mRNA 水平表达情况。
注:与 NT 组比较 *P < 0.05

表2 MAPK/ERK 通路中相关基因及转录因子 c-Myc、NF-κB mRNA 表达水平

组别	Raf-1	MEK2	ERK1	ERK2	c-Myc	NF-κB
对照组	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
空白组	0.975	0.918	0.989	0.905	1.089	1.052
si783 组	0.317	0.313	0.604	0.753	0.361	0.399
si809 组	0.722	0.419	0.482	0.704	0.473	0.694

3 讨论

LncRNA 在肿瘤发生、发展中的作用及机制是目前的研究热点之一。CRNDE 是目前发现的在脑胶质瘤中上调最明显的长链非编码 RNA^[1]。

CRNDE 可能在染色质表观遗传学调控,主要是通过调节组蛋白甲基化或非甲基化状态抑制基因转录从而发挥功能,同时参与胰岛素/IGF 和 mTOR 信号通路的过程^[4-5]。但其在脑胶质瘤中的作用机制仍然有待阐明。Wang 等^[6]通过体内及体外实验证明 CRNDE 的过度表达能促进肿瘤细胞的增殖,增加肿瘤细胞的侵袭性,CRNDE 能通过 mTOR 通路促进胶质瘤细胞的增殖与侵袭。李昊文^[7]等通过 Western 实验发现胶质瘤细胞中 Caspase 3、Caspase 7、Caspase 9、PARP 的表达增加,凋亡信号通路就会被激活从而导致细胞凋亡水平增加。PARP (poly ADP-ribosepolymerase,聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶)可特异性的识别 DNA 在多种因素作用下造成的局部错配,进而启动基因修复过程,PARP 在 DNA 损伤修复与细胞凋亡中发挥关键的作用。在体内,PARP 可以被 Caspase (尤其是 Caspase 3) 剪切后失活,促进细胞凋亡,PARP 的剪切过程被认为是细胞凋亡活跃的迹象^[8]。Caspases 家族是一组结构上相似的半胱氨酸蛋白酶,细胞凋亡的多种通路都需要 Caspases 参与。Caspase 2、Caspase 8、Caspase 9 和 Caspase 10 都参与细胞凋亡的启动,Caspase 3、Caspase 6 和 Caspase 7 参与细胞凋亡的实施。其激活会引起 DNA 破碎、细胞皱缩、细胞膜起泡、凋亡小体形成,最终导致细胞解体^[9-10]。

BLAKE 等^[11]发现抑制 CRNDE 的转录是通过 P13K/AKT/mTOR 与 Raf-1/MAPK /ERK 通路来完成的,所以可通过调节这两种通路上的关键基因来

影响肿瘤细胞的增殖及凋亡。有研究已经证实了 CRNDE 表达水平与表皮生长因子受体基因扩增有正相关关系,但 CRNDE 在神经胶质细胞分化中的确切机制仍不明确^[12-13]。另外,CRNDE 的表达水平还受到 Myc 的调节^[14]。Ellis 等^[15]的实验证实与瘤旁组织相比 CRNDE 在肿瘤组织中的表达水平明显升高,具有统计学意义;尤其在胶质母细胞瘤中表达水平明显升高,而在少突胶质细胞瘤中表达水平无明显差异。

研究发现^[16] MAPK/ERK 信号通路与细胞增殖、迁移及凋亡等过程密切相关。MAPK 信号通路将细胞外信号转导至细胞内,引起下游激酶的级联反应,激活细胞质中的靶蛋白或作用于核内转录因子,从而调节靶基因表达。

为了探讨下调 CRNDE 基因表达对 MAPK/ERK 通路及转录因子中相关基因的影响,进而分析 CRNDE 在胶质瘤演变过程中的可能机制。本研究在 U251 细胞中进行 siRNA 干扰,采用实时 PCR 分析 MAPK/ERK 通路及转录因子中相关基因的表达情况。

实验结果(表 1)显示:干扰组(si783、si809)中 Raf-1、MEK2、ERK1、ERK2、c-Myc、NF-κB 的表达水平均有不同程度的降低,与对照组的相对表达量比较均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。在 si783 干扰细胞系中,MAPKKK 类激酶 Raf-1、MAPKK 类激酶 MEK2 表达量均降为对照组的 30% 左右;在 si809 干扰细胞系中,MAPK 类激酶 ERK1 表达量均降为对照组的一半,在 si783、si809 干扰细胞系中 ERK2 基因表达水平降至对照组 75.3% 和 70.4%。

实验结果表明:通过 siRNA 对 U251 细胞中 CRNDE 下调表达从而引起 Raf-1、MEK2、ERK1、ERK2 的表达水平明显降低,反之在 U251 细胞中 CRNDE 的异常表达引起 MAPK/ERK 信号通路上相应蛋白激酶基因的表达被激活。推测 CRNDE 可能在 MAPK/ERK 通路激活上起作用,这些蛋白激酶基因的激活,势必导致调节细胞增殖、迁移等功能蛋白活性增强。

随着胶质瘤恶性程度增加 CRNDE 的表达量升高,通过 Raf-1/MEK/ERK 等基因的激活,导致下游相应蛋白的磷酸化增强,相应转录因子的活性增加,相应功能蛋白活性的增强导致细胞增殖、迁移能力提高。

而且在 si783 干扰细胞系中转录因子 NF-κB、c-Myc 的表达量降为对照组的 40% 左右。这两种转录因子在肿瘤发生发展中起重要作用,可

导致其他肿瘤相关基因的异常表达,对肿瘤细胞凋亡起抑制作用^[17-20]。在肿瘤细胞中 CRNDE 可能提高 NF-κB、c-Myc 的表达水平,进而导致其他肿瘤相关基因的异常表达,从而抑制肿瘤细胞凋亡。

通过 siRNA 对 U251 细胞中 CRNDE 下调表达引起 MAPK/ERK 信号通路上相关基因及转录因子表达水平明显降低,从而引起细胞增殖及迁移能力降低,而细胞凋亡数目增加,从而起到抑制肿瘤生长。随着肿瘤的恶性程度增加 CRNDE 的过度表达能引起 MAPK/ERK 信号通路的激活,同时转录因子 NF-κB、c-Myc 的表达量也会增加,从而引起细胞增殖及迁移能力增加,而细胞凋亡数目降低,参与胶质瘤发生及发展过程。

本研究的实验初步探讨了 CRNDE 的表达与 MAPK/ERK 信号通路上相关基因及转录因子的变化情况,通过 siRNA 抑制 CRNDE 的表达后 MAPK/ERK 信号通路上 Raf-1、MEK2、ERK1、ERK2 基因及相关转录因子 NF-κB、c-Myc 基因表达量下降,可抑制 Raf-1/MEK/ERK 信号通路的激活,从而抑制肿瘤细胞的表达、转录及增殖,同时促进肿瘤细胞的凋亡。

下一步实验中本研究需要进行 Western blot 法检测转染 siRNA 后 U251 细胞 Raf-1、MEK2、ERK1、ERK2、c-Myc、NF-κB 等基因蛋白水平的变化。进一步研究转染胶质瘤细胞株 U251 后通过改变何种通路发挥抑制肿瘤的作用。

随着 RNA 干扰技术在肿瘤基因治疗中的应用,能够通过某些通路影响肿瘤细胞增殖、凋亡及侵袭迁移从而对胶质瘤演变起关键作用,靶向针对特异的 LncRNA 能够显著抑制肿瘤发展,为寻找新的抗胶质瘤药物靶点提供了一条思路。

[参 考 文 献]

- [1] Zhang XQ, Sun S, Pu JK, *et al.* Long non-coding RNA expression profiles predict clinical phenotypes in glioma [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 48:1.
- [2] Jing SY, Lu YY, Yang JK, *et al.* Expression of long non-coding RNA CRNDE in glioma and its correlation with tumor progression and patient survival [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20:3992.
- [3] Han L, Zhang KL, Shi ZD, *et al.* LncRNA profile of glioblastoma reveals the potential role of lncRNAs in contributing to glioblastoma pathogenesis [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40:2004.
- [4] Yang G, Lu X, Lncrna YL. A Link between RNA and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839:1097.

(下转第 302 页)

- syndrome: A case report [J]. *Epilepsia*, 2008, 49:905.
- [12] Da Silva AV, Houzel JC, Yacubian EM, *et al.* Dysmorphic neurons in patients with temporal lobe epilepsy [J]. *Brain Res*, 2006, 1072:200.
- [13] Lawn N, Londono A, Sawrie S, *et al.* Occipitoparietal epilepsy, hippocampal atrophy, and congenital developmental abnormalities [J]. *Epilepsia*, 2000, 41:1546.
- [14] Eriksson SH, Nordborg C, Rydenhag B, *et al.* Parenchymal lesions in pharmacoresistant temporal lobe epilepsy: dual and multiple pathology [J]. *Acta Neurol Scand*, 2005, 112:151.
- [15] Represa A, Niquet J, Pollard H, *et al.* Cell-death, gliosis, and synaptic remodeling in the hippocampus of epileptic rats [J]. *J Neurobiol*, 1995, 26:413.
- [16] Mueller SG, Laxer KD, Cashdollar N, *et al.* Spectroscopic evidence of hippocampal abnormalities in neocortical epilepsy [J]. *Eur J Neurol*, 2006, 13:256.
- [17] Briellmann RS, Wellard RM, Jackson GD. Seizure-associated abnormalities in epilepsy: Evidence from MR imaging [J]. *Epilepsia*, 2005, 46:760.
- [18] Parmar H, Lim SH, Tan NC, *et al.* Acute symptomatic seizures and hippocampus damage: DWI and MRS findings [J]. *Neurology*, 2006, 66:1732.
- [19] Cohen-Gadol AA, Ozduman K, Bronen RA, *et al.* Long-term outcome after epilepsy surgery for focal cortical dysplasia [J]. *J Neurosurg*, 2004, 101:55.
- [20] Tassi L, Colombo N, Garbelli R, *et al.* Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome [J]. *Brain*, 2002, 125:1719.
- [21] Fauser S, Schulze-Bonhage A, Honegger J, *et al.* Focal cortical dysplasias: surgical outcome in 67 patients in relation to histological subtypes and dual pathology [J]. *Brain*, 2004, 127:2406.
- [22] Fauser S, Bast T, Altenmueller DM, *et al.* Factors influencing surgical outcome in patients with focal cortical dysplasia [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008, 79:103.
- [23] Kim DW, Lee SK, Chu K, *et al.* Predictors of surgical outcome and pathologic considerations in focal cortical dysplasia [J]. *Neurology*, 2009, 72:211.
- [24] Krsek P, Maton B, Jayakar P, *et al.* Incomplete resection of focal cortical dysplasia is the main predictor of poor postsurgical outcome [J]. *Neurology*, 2009, 72:217.
- [25] 赵伟, 朱海涛, 陈芳卿, 等. 局灶性皮质发育不良所致癫痫手术预后的影响因素分析 [J]. *临床神经外科杂志*, 2017, 14:190.
- [26] 孙恒, 冯兆海, 姜磊, 等. 局灶性脑皮质发育不良致难治性癫痫手术预后影响因素分析 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2014, 40:513.

(收稿 2018-08-30 修回 2018-11-05)

(上接第 297 页)

- [5] Van Herreweghe F, Festjens N, Declercq WA. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question [J]. *Cellular Molecular Life Sci*, 2010, 67:1567.
- [6] Wang YL, Wang YT, Li JF, *et al.* CRNDE, a long-noncoding RNA, promotes glioma cell growth and invasion through mTOR signaling [J]. *Cancer Lett*, 2015, 367:122.
- [7] 李昊文, 季楠, 董成亚, 等. 长链非编码 RNA CRNDE 调控胶质瘤细胞凋亡 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23:190.
- [8] Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease [J]. *Cell*, 2011, 147:742.
- [9] Kurokawa MK. Kinases in a death grip [J]. *Cell*, 2009, 138:838.
- [10] Pradelli LA, Beneteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death [J]. *Cellular Molecular Life Sci*, 2010, 67:1589.
- [11] Ellis BC, Graham LD, Molloy PC. A long non-coding RNA responsive to insulin/IGF signaling, regulates genes involved in central metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843:372.
- [12] Zheng J, Li XD, Wang P, *et al.* CRNDE affects the malignant biological characteristics of human glioma stem cells by negatively regulating miR-186 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6:25339.
- [13] Mizoguchi M, Yoshimoto K, Ma X, *et al.* Molecular characteristics of glioblastoma with 1p/19q codeletion [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2012, 29:148.
- [14] Khalil AM, Guttman M, Huarte M, *et al.* Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106:11667.
- [15] Ellis BC, Graham LD, Molloy PL. CRNDE, a long non-coding RNA responsive to insulin/IGF signaling, regulates genes involved in central metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta-Molecular Cell Res*, 2014, 1843:372.
- [16] Sun Y, Liu WZ, Liu T, *et al.* Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transd*, 2015, 35:600.
- [17] Hung CL, Wang LY, Yu YL, *et al.* A long noncoding RNA connects o-Myc to tumor metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111:18697.
- [18] Kim T, Jeon YJ, Cui R, *et al.* Role of MYC-regulated long noncoding RNAs in cell cycle regulation and tumorigenesis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 107:505.
- [19] Shao K, Shi TM, Yang Y, *et al.* Highly expressed lncRNA CRNDE promotes cell proliferation through Wnt/ β -catenin signaling in renal cell carcinoma [J]. *Tumor Biol*, 2016, 38:14505.
- [20] Gao YF, Wang ZB, Zhu T, *et al.* A critical overview of long non-coding RNA in glioma etiology 2016: an update [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37:14403.

(收稿 2018-10-10 修回 2019-01-03)