

长链非编码 RNA *BRE-AS1* 在非小细胞肺癌中的表达及其调控功能

王娴^{1a, 1b}, 张艳秋², 申娴^{1a, 1b}, 尹立红^{1a, 1b}, 浦跃朴^{1a, 1b}, 梁戈玉^{1a, 1b}

1. 东南大学 a. 公共卫生学院 b. 环境医学工程教育部重点实验室, 江苏 南京 210000

2. 江苏省泰州市疾病预防控制中心环境职业卫生科, 江苏 泰州 225300

摘要:

[背景] 非小细胞肺癌 (NSCLC) 是严重危害人类健康的恶性肿瘤, 长链非编码 RNA (lncRNA) 可能在其发生发展中发挥重要作用。

[目的] 探讨 lncRNA *BRE-AS1* 在 NSCLC 中的表达、生物学功能和调控作用, 为进一步了解 NSCLC 发病机制提供理论依据。

[方法] 利用实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 技术对 91 例来自南京胸科医院的原发性 NSCLC 患者的癌组织和癌旁组织以及 NSCLC 细胞中 *BRE-AS1* 表达水平进行检测, 应用 TCGA RNASeqV2 系统分析 TCGA 数据库中 *BRE-AS1* 在 1016 例 NSCLC 组织和 110 例正常组织中的表达水平。应用受试者工作特征 (ROC) 曲线评价 *BRE-AS1* 对 NSCLC 的诊断价值, 应用 *t* 检验分析不同临床特征 NSCLC 患者的 *BRE-AS1* 表达水平。采用慢病毒转染在 NSCLC 细胞 A549 中构建 *BRE-AS1* 过表达稳转细胞株, 分别以 CCK8 法和流式细胞术检测 *BRE-AS1* 对细胞增殖、周期及凋亡的影响。通过功能富集分析 *BRE-AS1* 的下游信号通路并用 Western blotting 法检测信号通路中关键蛋白表达水平。

[结果] RT-qPCR 和 TCGA 数据库分析结果显示 *BRE-AS1* 在 NSCLC 组织 [RT-qPCR: 差异表达倍数 (FC) = -13.15, TCGA: FC = -4.85, $P < 0.05$] 和 NSCLC 细胞 A549 (FC = -4.87, $P < 0.05$) 中表达下调。ROC 分析结果显示 *BRE-AS1* 对 NSCLC 具有较强的诊断能力 (NSCLC 组织: 曲线下面积为 0.916, 95% CI: 0.872~0.960; TCGA 数据库: 曲线下面积为 0.853, 95% CI: 0.809~0.897)。CCK8 结果显示, 在 A549 细胞中过表达 *BRE-AS1* 后, 细胞增殖能力在 24、36、48 h 降低 ($P < 0.01$); 同时流式细胞术分析显示, 过表达 *BRE-AS1* 阻滞 A549 细胞周期于 G2/M 期, 并诱导细胞凋亡率上升 ($P < 0.05$)。功能富集分析发现, 磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K) - 蛋白激酶 B (AKT) - 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路与 NSCLC 发生发展相关 ($P < 0.05$), 进一步 Western blotting 法分析发现, 过表达 *BRE-AS1* 后, A549 细胞中 AKT3、p-AKT3、mTOR、p-mTOR 表达以及 p-AKT3/AKT3、p-mTOR/mTOR 均下降, PTEN 表达上升, 提示过表达 *BRE-AS1* 可抑制 A549 细胞中 PI3K-AKT-mTOR 信号通路。

[结论] *BRE-AS1* 在 NSCLC 中表达下调, 具有较高诊断价值。*BRE-AS1* 可能通过抑制 PI3K-AKT-mTOR 信号传导途径降低 A549 细胞生长活力, 阻滞细胞周期, 诱导细胞凋亡, 进而影响 NSCLC 发生发展。

关键词: 非小细胞肺癌; 长链非编码 RNA; *BRE-AS1*; PI3K-AKT-mTOR 信号通路; 调控机制

Expression of long non-coding RNA *BRE-AS1* and its function in non-small cell lung cancer

WANG Xian^{1a, 1b}, ZHANG Yanqiu², SHEN Xian^{1a, 1b}, YIN Lihong^{1a, 1b}, PU Yuepu^{1a, 1b}, LIANG Geyu^{1a, 1b}
(1. a. Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education b. School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210000, China; 2. Department of Environmental Occupational Health, Taizhou Center for Disease Control and Prevention, Taizhou, Jiangsu 225300, China)

Abstract:

[Background] Non-small cell lung cancer (NSCLC) is a malignant tumor which seriously affects human health. Long non-coding RNA (lncRNA) may play an important role in its occurrence and development.

[Objective] This study is designed to explore the expression, biological function, and regulation

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21024

基金项目

国家自然科学基金项目 (81972998, 81803201, 81472939)

作者简介

王娴 (1995—), 女, 硕士生;
E-mail: 1851419406@qq.com

通信作者

梁戈玉, E-mail: lianggeyu@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-01-07

录用日期 2021-06-06

文章编号 2095-9982(2021)07-0709-08

中图分类号 R734.2

文献标志码 A

► 引用

王娴, 张艳秋, 申娴, 等. 长链非编码 RNA *BRE-AS1* 在非小细胞肺癌中的表达及其调控功能 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (7): 709-716.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21024

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIANG Geyu, E-mail: lianggeyu@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-01-17

Accepted 2021-06-06

► To cite

WANG Xian, ZHANG Yanqiu, SHEN Xian, et al. Expression of long non-coding RNA *BRE-AS1* and its function in non-small cell lung cancer [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(7): 709-716.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21024

mechanism of lncRNA *BRE-AS1* in NSCLC and provide a theoretical basis for further understanding of the pathogenesis of NSCLC.

[Methods] Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) technology was used to detect the expression level of *BRE-AS1* in NSCLC cell lines and in tumor and adjacent non-tumor tissues from 91 NSCLC patients of Nanjing Chest Hospital. The TCGA RNASeqV2 system was used to analyze the expression level of *BRE-AS1* in 1016 NSCLC tissues and 110 normal lung tissues from the TCGA database. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic value of *BRE-AS1* for NSCLC, and *t* test was used to compare the expression levels of *BRE-AS1* in NSCLC patients with different clinical characteristics. Lentiviral transfection was used to construct a stable *BRE-AS1* overexpression cell strain in NSCLC cells A549, and the effects of *BRE-AS1* on cell proliferation, cycle, and apoptosis were detected by CCK8 and flow cytometry assay. The potential signaling pathways regulated by *BRE-AS1* were evaluated by functional enrichment analysis and the expression levels of key proteins in the signaling pathways were detected by Western blotting.

[Results] The results of RT-qPCR and TCGA database analysis showed that the expression of *BRE-AS1* was significantly down-regulated in NSCLC tissues [RT-qPCR: fold change (FC)=-13.15, TCGA: FC=-4.85, $P<0.05$] and NSCLC cells A549 (FC=-4.87, $P<0.05$). The results of ROC analysis showed that the expression levels of *BRE-AS1* distinguished between tumor and non-tumor with high diagnostic power (tissues of NSCLC patients: area under curve=0.916, 95% CI: 0.872-0.960; TCGA database: area under curve=0.853, 95% CI: 0.809-0.897). The results of CCK8 showed that the cell proliferation ability was significantly reduced at 24, 36, and 48 h after overexpression of *BRE-AS1* in A549 cells ($P<0.01$). The results of flow cytometry analysis showed that overexpression of *BRE-AS1* arrested A549 cell cycle at G2/M phase and induced an increase of cell apoptosis rate ($P<0.05$). The results of functional enrichment analysis found that phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (AKT)-mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway was significantly related to the occurrence and development of NSCLC ($P<0.05$). The Western blotting results showed that overexpression of *BRE-AS1* in A549 cells decreased the expressions of AKT3, p-AKT3, mTOR, p-mTOR, p-AKT3/AKT3, and p-mTOR/mTOR, and increased the expression of PTEN, suggesting that overexpression of *BRE-AS1* inhibit the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway in A549 cells.

[Conclusion] *BRE-AS1* is significantly down-regulated in NSCLC and has a high diagnostic value. *BRE-AS1* may reduce A549 cell viability, block cell cycle, and induce cell apoptosis by inhibiting the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway to affect NSCLC occurrence and development.

Keywords: non-small cell lung cancer; long non-coding RNA; *BRE-AS1*; PI3K-AKT-mTOR signaling pathway; regulation mechanism

肺癌是中国新发病例和死亡人数最多的癌症^[1]。2020年,中国肺癌新发病例数为815 563,占新发癌症数的17.9%;因肺癌死亡714 699人,占癌症总死亡人数的23.8%^[2]。除遗传因素外,吸烟、汽车尾气、雾霾等环境因素是肺癌的主要危险因素^[3]。肺癌最主要的病理学亚型为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),占比超过80%^[4]。大多数NSCLC患者发现时已为癌症末期,难以治愈^[5]。此外,许多NSCLC患者会在手术后复发^[6],这些癌症末期和复发患者的生存率很低^[5]。因此,世界卫生组织呼吁进一步探索NSCLC的发病机制,在NSCLC的诊断和治疗中应重视分子生物标志物,以便早期筛查,监测疾病进展,提供治疗靶标,改善患者预后。

长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)是一类不编码蛋白质的调节性RNA,其异常表达与多种疾病有关,包括恶性肿瘤^[7]。研究发现lncRNAs参与了NSCLC的发生发展,如BRCA1相邻基因2通过调控Notch1信号通路抑制NSCLC上皮间充质转化进程^[8],过渡前相关RNA可促进NSCLC细胞增殖、迁移和侵袭^[9],叉头蛋白F1毗连非编码发育调控RNA通过与miR-761结合并调节尿金属蛋白酶2表达来抑制NSCLC的发展^[10]。目前人细胞中鉴定出的lncRNA超

过50 000种,大多数lncRNA的表达、作用和机制尚不明确,迫切需要进一步研究。

本课题组前期应用芯片筛选NSCLC相关lncRNAs,发现脑和生殖器官表达蛋白反义RNA 1(brain and reproductive organ-expressed protein antisense RNA 1, *BRE-AS1*) 在NSCLC中表达下调^[11]。*BRE-AS1*是长度为1659bp的非编码RNA,位于2p23.2染色体^[12]。脑和生殖器官表达蛋白(brain and reproductive organ-expressed protein, BRE)是存在各种组织中稳定细胞蛋白,主要功能为DNA损伤修复和抗细胞凋亡^[13]。*BRE-AS1*可调控多种肿瘤细胞的生物学功能。例如,*BRE-AS1*可通过与miR-145-5p相互作用调节前列腺癌细胞的增殖和凋亡^[14];过表达*BRE-AS1*可以通过抑制信号转导和转录激活因子3的磷酸化抑制膀胱癌细胞增殖^[15],但*BRE-AS1*在NSCLC中的功能尚未明确。因此,本研究从多角度检测*BRE-AS1*在NSCLC中的表达,并探索*BRE-AS1*的诊断能力、生物学功能以及调控机制,为进一步了解NSCLC发病机制提供新的理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本次研究收集91例原发性NSCLC患者(无放疗或

化疗史)的肿瘤组织及其配对癌旁组织样本,患者来自江苏省南京市胸科医院。采集后立即置于RNA保存液中,4°C过夜后-20°C保存备用,同时记录所有患者临床信息。人支气管样上皮细胞(16HBE)、人肺泡上皮细胞(HpAEpiC)、NSCLC细胞(A549和NCI-H1395)均来自环境医学工程教育部重点实验室,均采用含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基于37°C培养箱中培养。本研究已通过东南大学附属中大医院伦理委员会审批(编号:2014ZDSYLL031.0),并获得患者签署的知情同意书。

1.2 试剂与仪器

RNA保存液(Tiandz,中国),TRIzol试剂(Invitrogen,加拿大),RIPA裂解液(汉恒,中国),特异引物(捷瑞,中国),胎牛血清(四季青,中国),SYBR Green试剂盒(Promega,美国),双抗(国药集团,中国),培养基(四季青,中国),A214试剂盒(GenStar,中国),KGA512周期检测试剂盒(凯基,中国),CCK8试剂(Beyotime,中国),异丙醇(国药集团,中国),KGA107凋亡检测试剂盒(凯基,中国),*BRE-AS1*过表达慢病毒及相应的阴性对照慢病毒(汉恒,中国),嘌呤霉素(白鲨易,中国);NanoDrop 2000光谱仪、酶标仪(Thermo Fisher Scientific,美国),StepOnePlus实时PCR(Applied Biosystems,加拿大)等。

1.3 方法

本研究首先检测了*BRE-AS1*在NSCLC组织样本和不同肺癌细胞中的表达,同时分析了*BRE-AS1*在癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中的表达,和组织及细胞的表达相互印证,并评估了*BRE-AS1*的诊断能力以及与NSCLC临床特征之间的关系;其次通过慢病毒转染在肺癌A549细胞中过表达*BRE-AS1*,检测*BRE-AS1*对细胞增殖、周期和凋亡的影响;最后通过功能富集分析*BRE-AS1*的下游通路,并通过Western blotting法检测*BRE-AS1*对下游磷酸肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路关键蛋白的影响。

1.3.1 NSCLC组织和细胞中*BRE-AS1*表达的检测及分析 应用实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)技术检测组织或细胞中*BRE-AS1*的表达。首先用TRIzol试剂从组织或细胞中提取总RNA,并用NanoDrop 2000

光谱仪测量纯度和浓度。再用A214试剂盒将RNA逆转录成cDNA。通过StepOnePlus实时PCR系统检测目标mRNA表达。PCR反应组分包括1 μL cDNA、5 μL SYBR Qpcr Mix、0.1 μL 特异引物和3.8 μL 无酶水。反应条件为预变性95°C 1 min;变性95°C 15 s,退火60°C 30 s,延伸72°C 30 s,共40个循环。特异引物序列见表1。*BRE-AS1*表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,用差异表达倍数(fold change, FC)表示*BRE-AS1*在各组织中的差异表达情况, $FC = -1/2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线及其曲线下面积评价*BRE-AS1*的诊断能力。应用独立样本t检验分析不同临床特征(性别、年龄、肿瘤淋巴结转移分期、病理类型)的NSCLC患者的*BRE-AS1*表达水平有无差异。

表1 *lncRNA BRE-AS1*和内参基因*GAPDH*的引物序列

Table 1 Primer sequences of *lncRNA BRE-AS1* and *GAPDH*

基因 (Gene)	引物序列 (Primer sequence)
<i>BRE-AS1</i>	正向 (Forward): 5'-TCCCTCATCAGGCAACA-3'
	反向 (Reverse): 5'-TCTCATCCCCATCACGCT-3'
<i>GAPDH</i>	正向 (Forward): 5'-GGGAGCCAAAGGGTCATCA-3'
	反向 (Reverse): 5'-TGATGGCATGGACTGTGGTC-3'

1.3.2 TCGA数据库中*BRE-AS1*表达分析 从TCGA数据库(更新于2020年10月)下载1016例NSCLC患者肿瘤组织与110例正常肺组织测序数据。应用TCGA RNASeqV2系统提取NSCLC组织与正常肺组织中*lncRNA BRE-AS1*表达数据。采用受者工作特征曲线及其曲线下面积评价*BRE-AS1*诊断能力。

1.3.3 构建*BRE-AS1*过表达A549肺癌细胞模型 通过慢病毒转染,过表达A549细胞中的*BRE-AS1*,并设置三个实验组:LV-*BRE-AS1*组、阴性组和空白组。将*BRE-AS1*过表达慢病毒和阴性对照慢病毒用感染增强液稀释至 1×10^8 TU·mL⁻¹,感染融合度50%左右的A549细胞,72 h后用含2 μg·mL⁻¹嘌呤霉素的培养基持续培养两周后得到LV-*BRE-AS1*组和阴性组,正常培养细胞为空白组。最后利用RT-qPCR技术检测慢病毒转染效率。

1.3.4 细胞增殖能力检测 使用CCK8法检测过表达*BRE-AS1*对A549细胞增殖能力的影响。将LV-*BRE-AS1*组和阴性组细胞种于96孔板(每孔3 000个细胞)中正常培养12、24、36、48 h后,每孔中加入10 μL CCK8试剂,在37°C下反应2 h后,在酶标仪中于450 nm波长处测量光密度值。

1.3.5 细胞周期与凋亡检测 使用KGA512周期检

测试试剂盒评估过表达 *BRE-AS1* 对 A549 细胞周期的影响。各实验组收集 1×10^6 个细胞, 逐步加入 0.5 mL 乙醇, 混匀后 4°C 过夜。在洗净的细胞沉淀中加入 0.1 mL 的 RNaseA, 置于 37°C 水浴锅中 30 min, 加 0.4 mL RNaseA PI 混匀后 4°C 避光反应 30 min, 使用流式细胞仪检测 488 nm 处与 DNA 结合的 PI 红色荧光强度。

使用 KGA107 凋亡检测试剂盒评估过表达 *BRE-AS1* 对 A549 细胞凋亡的影响。A549 细胞转染 96 h 后, 各实验组收集 1×10^6 个细胞, 洗净的细胞沉淀中加入 0.1 mL 结合缓冲液、0.005 mL Annexin V-APC 和 0.01 mL 7-ADD 混匀后避光放置 15 min, 加 0.38 mL 结合缓冲液后, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.6 富集分析和蛋白分析 通过差异分析 TCGA 和课题组前期三对 NSCLC 及癌旁组织芯片测序的数据^[11] 获得 NSCLC 相关差异 mRNA, 并取交集。然后, 通过 R 语言 cluster profiler 包进行功能富集分析, 包括基因本体论 (Gene Ontology, GO) 富集和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG), 分析寻找受 lncRNA *BRE-AS1* 影响的信号通路。

应用 Western blotting 法检测 PI3K-AKT-mTOR 信号通路中关键蛋白表达水平的变化。收集细胞并用 RIPA 裂解液提取总蛋白后, 电泳分离蛋白条带后转膜, 封闭后置于 4°C 孵育一抗 (兔抗人 IgG-HRP) 过夜。一抗孵育后洗涤, 加入二抗 (山羊抗兔 IgG-HRP) 室温孵育 1 h。蛋白表达由 ECL 化学发光系统测量。

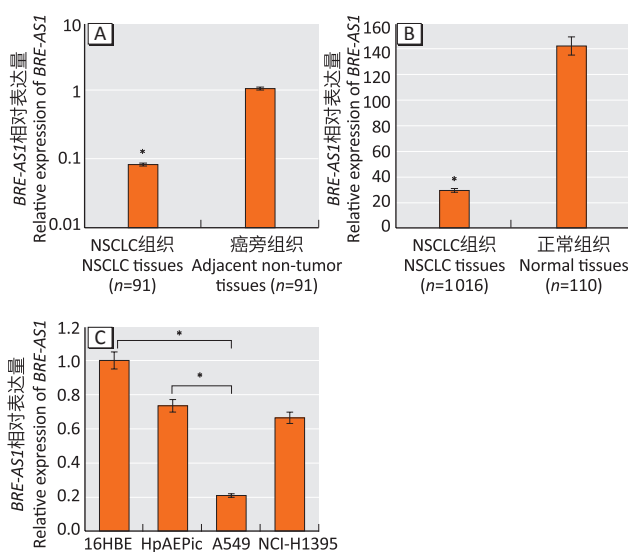
1.4 统计学分析

应用 SPSS 22.0 软件和 Excel 2016 软件进行统计分析。结果以均数 $\pm$ 标准差表示。应用 *t* 检验、卡方检验和单因素方差分析各组之间的差异, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 *BRE-AS1* 在 NSCLC 中表达

RT-qPCR 结果显示, 与癌旁组织相比, *BRE-AS1* 在 NSCLC 组织中表达下调 ($FC=-13.15$, $P<0.05$, 图 1A)。TCGA 数据库分析结果显示, 与正常组织相比, *BRE-AS1* 在 NSCLC 组织中表达也下调 ($FC=-4.85$, $P<0.05$, 图 1B)。此外, 细胞检测结果表明, 与 16HBE 和 HpAEPic 细胞相比, A549 细胞中 *BRE-AS1* 表达下调 ($FC=-4.87$, $P<0.05$, 图 1C), 而 NCI-H1395 中 *BRE-AS1* 表达无统计学差异 ($P>0.05$, 图 1C)。



[注] A: 数据来自 NSCLC 病人组织; B: 数据来自 TCGA 数据库。*: $P<0.05$ 。

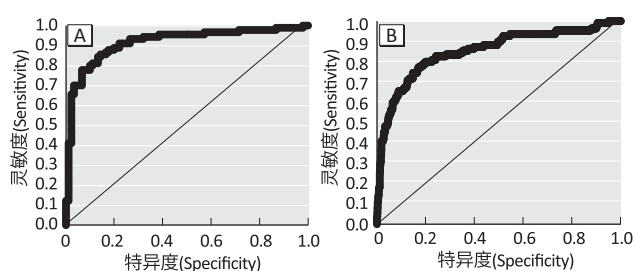
[Note] A: Data from tissues of NSCLC patients; B: Data from TCGA database. *: $P<0.05$.

图1 *BRE-AS1* 在 NSCLC 组织 (A、B) 及细胞 (C) 中的表达水平

Figure 1 Expression levels of *BRE-AS1* in NSCLC tissues (A and B) and cells (C)

2.2 *BRE-AS1* 对 NSCLC 的诊断能力

结果如图 2 所示, 肺癌患者组织 *BRE-AS1* 诊断的 ROC 曲线下面积为 0.916, 95% *CI* 为 0.872~0.960, 灵敏度为 85.6%, 特异度为 85.7% (图 2A); TCGA 数据库中 *BRE-AS1* 诊断的 ROC 曲线下面积为 0.853, 95% *CI* 为 0.809~0.897, 灵敏度为 84.5%, 特异度为 66.1% (图 2B), 提示 *BRE-AS1* 对 NSCLC 具有较高的诊断能力。



[注] A: 数据来自 NSCLC 病人组织; B: 数据来自 TCGA 数据库。

[Note] A: Data from tissues of NSCLC patients; B: Data from TCGA database.

图2 *BRE-AS1* 诊断 NSCLC 的 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve of *BRE-AS1* in predicating NSCLC

2.3 不同临床特征的 NSCLC 患者的 *BRE-AS1* 表达差异

不同性别和病理类型的 NSCLC 患者的 *BRE-AS1* 表达水平存在差异 ($P<0.05$), 男性患者低于女性, 肺鳞状细胞癌患者低于肺腺癌患者 (表 2)。不同年

龄和肿瘤淋巴结转移分期的 NSCLC 病人的 *BRE-AS1* 表达水平无统计学差异 ($P \geq 0.05$)。

表 2 不同临床特征的 NSCLC 患者的 *BRE-AS1* 表达差异分析
Table 2 Expressions of *BRE-AS1* in NSCLC patients with different clinical characteristics

变量 Variable	病例数 Cases	构成比/% Proportion/%	NSCLC 中 <i>BRE-AS1</i> 差异表达倍数 (FC) # Fold change of <i>BRE-AS1</i> in NSCLC (FC) #	P
性别 (Sex)				0.044
男性 (Male)	69	76	-16.309	
女性 (Female)	22	24	-6.767	
年龄 / 岁 (Age/years)				0.050
>50	84	92	-14.633	
≤ 50	7	8	-3.714	
肿瘤淋巴结转移分期 Tumor node metastasis stage				0.066
I+II	53	58	-9.864	
III+IV	38	42	-19.863	
病理类型 (Pathological type)				0.045
肺鳞状细胞癌 Lung squamous cell carcinoma	39	43	-20.414	
肺腺癌 Lung adenocarcinoma	52	57	-9.540	

[注] #: 与癌旁组织相比, 癌组织中的表达倍数, 负数代表下调。

[Note] #: Compared with adjacent non-tumor tissues, negative numbers of fold change represent down-regulation.

2.4 过表达 *BRE-AS1* 抑制 A549 细胞增殖

以 A549 细胞作为研究对象, 并利用慢病毒构建 *BRE-AS1* 过表达稳转细胞株 (图 3A-C)。图 3D 结果表明, 与阴性组相比, LV-*BRE-AS1* 组的光密度值在 24、36、48 h 降低 ($P < 0.01$), 提示过表达 *BRE-AS1* 可抑制 A549 细胞的增殖。

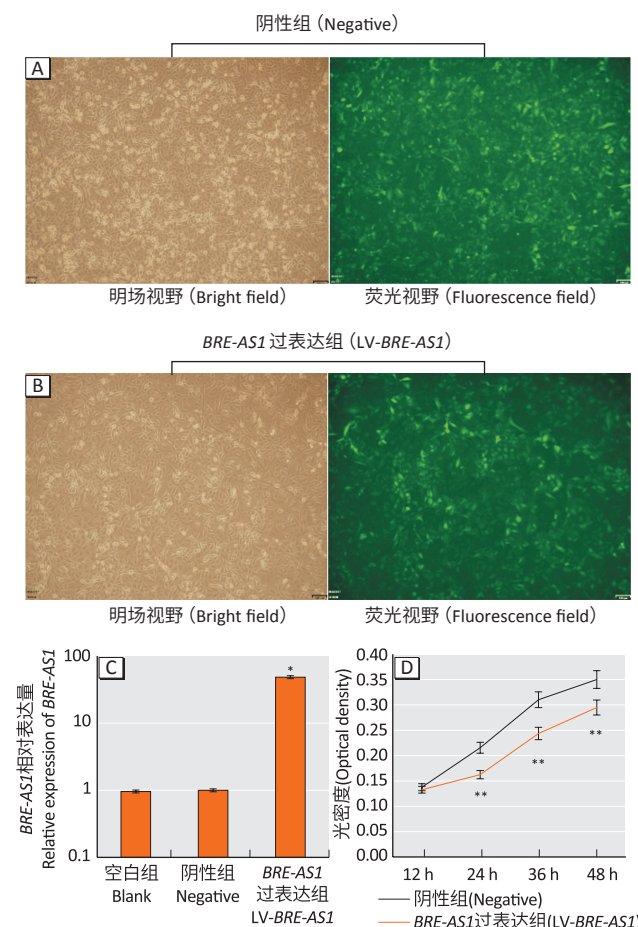
2.5 过表达 *BRE-AS1* 影响 A549 细胞周期与凋亡

细胞周期检测结果显示, 与阴性组相比, LV-*BRE-AS1* 组中 S 期比例降低, G2/M 期中比例升高 ($P < 0.01$), 提示过表达 *BRE-AS1* 可阻滞 A549 细胞周期于 G2/M 期 (图 4A)。细胞凋亡检测结果表明, 与阴性组相比, LV-*BRE-AS1* 组的晚期凋亡和总凋亡比例增加 ($P < 0.05$), 提示 *BRE-AS1* 过表达可诱导 A549 细胞凋亡 (图 4B)。

2.6 过表达 *BRE-AS1* 对 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的影响

功能富集分析发现, NSCLC 相关差异 mRNA 主要富集于 133 种基因功能条目以及 22 种信号通路 (图 5A、5B, $P < 0.05$), 其中 PI3K-AKT 信号通路基因富集数量最多, 因此, 推测 *BRE-AS1* 可能通过 PI3K-AKT 信号通路介导 NSCLC 生物功能。Western blotting 分析结果

表明, 与阴性组相比, LV-*BRE-AS1* 组中 AKT3、p-AKT3、mTOR、p-mTOR 表达降低, PTEN 表达增高 (图 5C、5D), 且 p-AKT3/AKT3 及 p-mTOR/mTOR 也降低 (图 5E、5F, $P < 0.05$), 提示过表达 *BRE-AS1* 可抑制 PI3K-AKT-mTOR 信号传导途径。

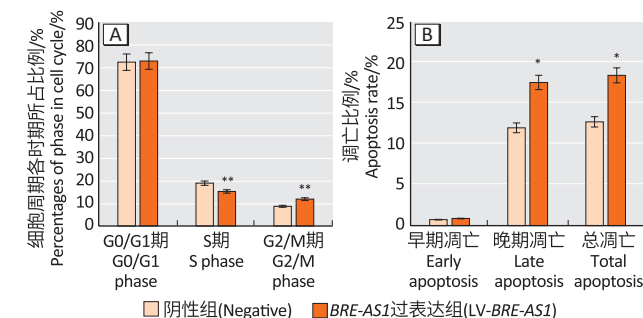


[注] 与阴性组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

[Note] Compared with the negative group, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

图 3 *BRE-AS1* 过表达稳转细胞株的构建 (A、B、C) 及 *BRE-AS1* 对 A549 细胞增殖的影响 (D)

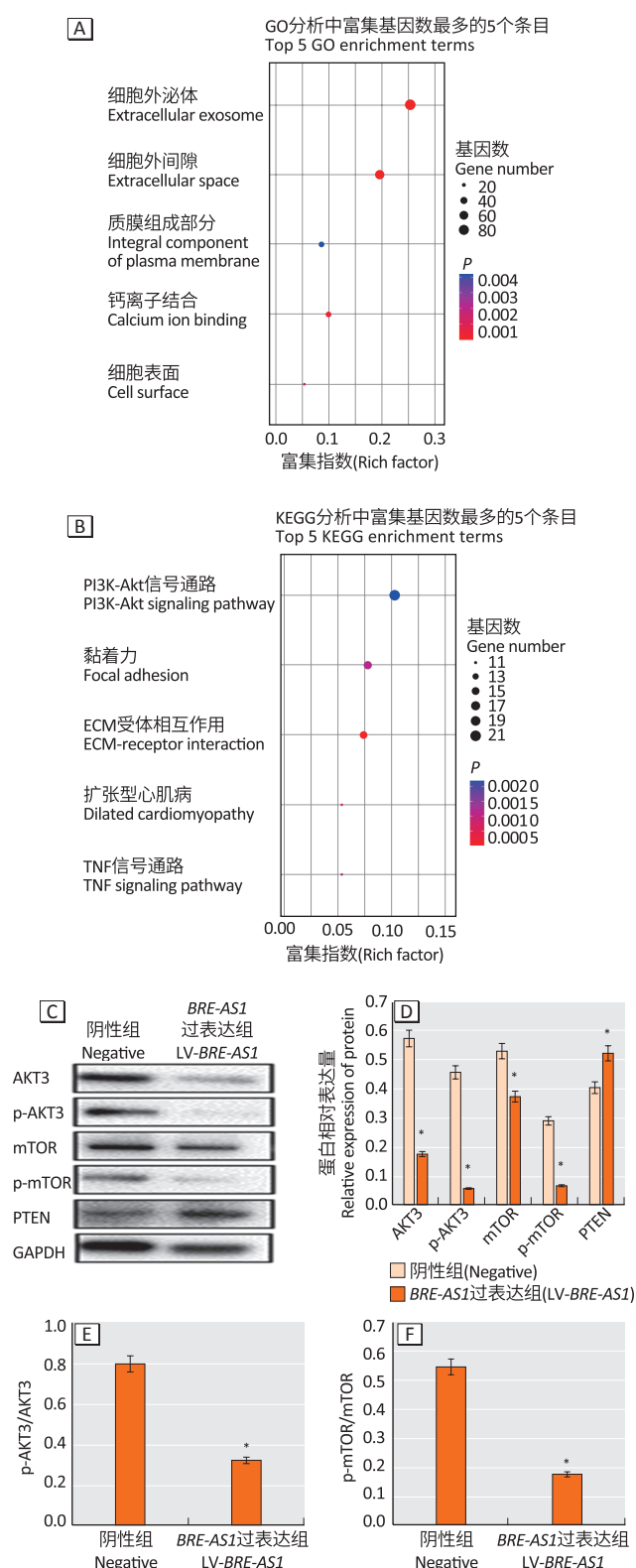
Figure 3 Building stable *BRE-AS1* over-expressed cells (A, B, and C) and effect of *BRE-AS1* over-expression on A549 cell viability (D)



[注 (Note)] *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

图 4 *BRE-AS1* 过表达对 A549 细胞周期 (A) 和细胞凋亡 (B) 的影响

Figure 4 Effect of *BRE-AS1* over-expression on cell cycle (A) and cell apoptosis (B) in A549 cells



[注 (Note)] *: $P < 0.05$.

图5 非小细胞肺癌中BRE-AS1相关的GO (A) 和KEGG (B) 富集分析及蛋白印迹分析结果 (C-F)

Figure 5 BRE-AS1 related GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis results in NSCLC and Western blotting results (C-F)

3 讨论

近年来, NSCLC新发和死亡病例逐年增多, 疾病

负担严重。由于缺乏有效筛查手段, 早期NSCLC难以及时发现, 晚期及复发NSCLC难以治愈^[16], 因此NSCLC生存率很低^[17], 迫切需要进一步探索NSCLC的发病机制, 为寻找更加有效、实用、经济的生物标志物提供理论依据^[18]。

随着分子生物学技术的不断成熟^[19], 越来越多的lncRNA被发现。lncRNA是转录长度超过200 nt但缺乏蛋白质编码能力的RNA分子, 研究表明其具有调控肿瘤发生发展的能力^[20]。例如被转化生长因子 β 激活的长链非编码RNA在肝癌、结直肠癌、胃癌和肺癌等多种肿瘤中异常表达, 并且可以通过结合miRNA诱导上皮间质转化来促进肿瘤发生和进展^[21]; lncRNA肺癌相关转录物1在肺癌、肝癌、乳腺癌等肿瘤中高表达, 可通过多种机制调节肿瘤的增殖、侵袭和迁移^[22]。这些研究提示lncRNA也可能在NSCLC发生发展中发挥重要作用。

课题组前期对原发性NSCLC组织lncRNA芯片检测中发现, BRE-AS1在癌组织中表达下调^[11]。为进一步探讨BRE-AS1在NSCLC中的作用, 本研究首先检测了NSCLC患者组织、TCGA数据库、NSCLC细胞中BRE-AS1表达, 发现BRE-AS1在NSCLC组织及细胞中表达下调, 进一步分析发现, BRE-AS1对NSCLC具有较高的诊断价值, 且男性患者BRE-AS1的表达水平明显低于女性, 肺鳞状细胞癌患者明显低于肺腺癌患者, 提示BRE-AS1和男性肺鳞状细胞癌患者的发病关系更加密切。既往研究发现了一些与NSCLC相关的重要lncRNA, 如被转化因子 β 激活的长链非编码RNA、lncRNA肺癌相关转录物1和烟酰胺核苷酸转氢酶反义RNA1等在NSCLC中表达上调^[21-23], 转录超保守区454等在NSCLC中表达下调^[24]。关于BRE-AS1的报道较少, Zhang等^[12]通过GEO数据库分析同样发现BRE-AS1在NSCLC中表达下调, 与本研究结果相互印证。

通过细胞实验进一步揭示BRE-AS1在NSCLC中的功能, 结果显示过表达BRE-AS1可抑制NSCLC细胞增殖, 阻滞细胞周期, 促进细胞凋亡。既往研究显示不同lncRNAs对NSCLC细胞功能的影响不同, 如过表达过渡前相关RNA可促进A549细胞增殖、迁移和侵袭^[9], 敲低lncRNA X染色体失活特异性转录物可抑制细胞增殖并促进细胞凋亡^[25], 而过表达转录超保守区454则会抑制A549细胞迁移和侵袭^[24]。既往报道与本研究均显示BRE-AS1对肿瘤(膀胱癌、前列腺癌、肺癌)细胞功能的影响主要体现在抑制细胞增殖

和促进细胞凋亡方面^[12, 14-15], 提示 *BRE-AS1* 在 NSCLC 中具有抑癌作用。

lncRNA 在肿瘤中存在多种调控机制, 如转录、翻译、细胞内信号通路、蛋白质修饰以及 RNA-蛋白质或蛋白质-蛋白质复合物形成等, 其中通过信号通路来调控肿瘤的发生发展是最普遍的方式之一^[26]。Peng 等^[20]报道 lncRNAs 可通过影响 Notch、PI3K-AKT-mTOR、核因子 κ B 等多种信号通路来调控肿瘤发生发展。为探讨 *BRE-AS1* 调控 NSCLC 细胞功能的潜在分子机制, 本研究首先通过富集分析发现 PI3K-AKT 可能是 *BRE-AS1* 的重要下游通路。目前已知 PI3K-AKT 通路的激活可以促进多种癌症包括肺癌的发生^[27], 其中关键分子 AKT 活化后可进一步磷酸化 mTOR 来介导细胞增殖、周期和糖代谢^[28], 故常常将 PI3K-AKT 信号通路与 mTOR 信号通路放在一起研究。mTOR 主要调节细胞生长、能量代谢及细胞骨架重建^[29], 另一关键蛋白 PTEN 活化后主要抑制细胞生长并诱导细胞凋亡^[30]。本研究通过 Western blotting 实验对上述关键蛋白及其磷酸化水平进行检测, 结果发现 *BRE-AS1* 可能通过抑制 PI3K-AKT-mTOR 信号传导通路来发挥抑癌作用。

目前关于 *BRE-AS1* 在 NSCLC 中作用的报道较少。本研究利用 RT-qPCR 技术以及 TCGA 数据库分析, 从多方面检测 *BRE-AS1* 的表达并相互验证, 结果准确可信。本研究仍然存在一定的局限性, 仅采用过表达 *BRE-AS1* 进行细胞实验, 缺乏体内实验的验证。因此, 未来将结合体内实验进一步阐明 *BRE-AS1* 在 NSCLC 发生发展中的作用。

综上所述, 本研究首先检测分析了 *BRE-AS1* 在 NSCLC 组织样本、TCGA 数据库和不同肺癌细胞中的表达, 并评估了 *BRE-AS1* 的诊断能力, 发现 *BRE-AS1* 在 NSCLC 中低表达且具有较高的诊断能力; 其次通过慢病毒转染在 A549 中过表达 *BRE-AS1*, 检测 *BRE-AS1* 对细胞增殖、周期和凋亡的影响; 最后通过功能富集和 Western blotting 检测分析 *BRE-AS1* 对下游 PI3K-AKT-mTOR 信号通路关键蛋白的影响, 发现 *BRE-AS1* 可能通过抑制 PI3K-AKT-mTOR 信号通路来抑制 NSCLC 细胞生长、诱导细胞凋亡并阻滞细胞周期, 研究为进一步了解 NSCLC 发病机制及筛选新的候选生物标志提供依据。

参考文献

- [1] BARTA JA, POWELL CA, WISNIEWSKY JP. Global epidemiology

of lung cancer [J]. Ann Glob Health, 2019, 85 (1): 8.

- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.

- [3] DE GROOT P, MUNDEN RF. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention [J]. Radiol Clin North Am, 2012, 50 (5): 863-876.

- [4] HIRSCH FR, SCAGLIOTTI GV, MULSHINE JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. Lancet, 2017, 389 (10066): 299-311.

- [5] HERBST RS, MORGENSZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. Nature, 2018, 553 (7689): 446-454.

- [6] STEWART DJ. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2010, 75 (3): 173-234.

- [7] STEIN CS, JADIYA P, ZHANG X, et al. Mitoregulin: a lncRNA-encoded microprotein that supports mitochondrial supercomplexes and respiratory efficiency [J]. Cell Rep, 2018, 23 (13): 3710-3720.e8.

- [8] GAO YP, LI Y, LI HJ, et al. LncRNA NBR2 inhibits EMT progression by regulating Notch1 pathway in NSCLC [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23 (18): 7950-7958.

- [9] YU W, SUN Z, YANG L, et al. LncRNA PTAR promotes NSCLC cell proliferation, migration and invasion by sponging microRNA-101 [J]. Mol Med Rep, 2019, 20 (5): 4168-4174.

- [10] ZHANG G, WANG Q, ZHANG X, et al. LncRNA FENDRR suppresses the progression of NSCLC via regulating miR-761/TIMP2 axis [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109309.

- [11] 张艳秋. 肺癌相关非编码 RNA 的筛选及功能研究 [D]. 南京: 东南大学, 2017.

ZHANG YQ. Screening and Function Research of non-coding RNA in Lung Cancer [D]. Nanjing: Southeast University, 2017.

- [12] ZHANG M, WU J, ZHONG W, et al. Long non-coding RNA BRE-AS1 represses non-small cell lung cancer cell growth and survival via up-regulating NR4A3 [J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 660: 53-63.

- [13] JIN F, WANG Y, WANG X, et al. Bre enhances osteoblastic

- differentiation by promoting the Mdm2-mediated degradation of p53 [J]. *Stem Cells*, 2017, 35 (7) : 1760-1772.
- [14] CHEN Z, ZHEN M, ZHOU J. LncRNA BRE-AS1 interacts with miR-145-5p to regulate cancer cell proliferation and apoptosis in prostate carcinoma and has early diagnostic values [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39 (3) : BSR20182097.
- [15] ZHANG L, LIU B, DENG QH, et al. LncRNA BRE-AS1 acts as a tumor suppressor factor in bladder cancer via mediating STAT3 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24 (10) : 5320-5328.
- [16] WANGARI-TALBOT J, HOPPER-BORGE E. Drug resistance mechanisms in non-small cell lung carcinoma [J]. *J Can Res Updates*, 2013, 2 (4) : 265-282.
- [17] STEWART DJ, TOMIAK E, SHAMJI FM, et al. Phase II study of alternating chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2004, 44 (2) : 241-249.
- [18] BEGNAUD A, YANG P, ROBICHAUX C, et al. Evidence that established lung cancer mortality disparities in american indians are not due to lung cancer genetic testing and targeted therapy disparities [J]. *Clin Lung Cancer*, 2020, 21 (3) : e164-e168.
- [19] SASTRE J, SASTRE-IBÁÑEZ M. Molecular diagnosis and immunotherapy [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2016, 16 (6) : 565-570.
- [20] PENG WX, KOIRALA P, MO YY. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36 (41) : 5661-5667.
- [21] LI J, LI Z, ZHENG W, et al. LncRNA-ATB : An indispensable cancer-related long noncoding RNA [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50 (6) : e12381.
- [22] XING C, SUN SG, YUE ZQ, et al. Role of lncRNA LUCAT1 in cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134 : 111158.
- [23] HUANG JW, LUO XY, LI ZH, et al. LncRNA NNT-AS1 regulates the progression of lung cancer through the NNT-AS1/miR-3666/E2F2 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24 (1) : 238-248.
- [24] ZHOU J, WANG C, HUANG C, et al. TUCR.454 inhabits metastasis in lung cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11 (3) : 1289-1296.
- [25] LIU J, YAO L, ZHANG M, et al. Downregulation of LncRNA-XIST inhibited development of non-small cell lung cancer by activating miR-335/SOD2/ROS signal pathway mediated pyroptotic cell death [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (18) : 7830-7846.
- [26] YANG G, LU X, YUAN L. LncRNA : a link between RNA and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2014, 1839 (11) : 1097-1109.
- [27] AOKI M, FUJISHITA T. Oncogenic roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 407 : 153-189.
- [28] BARRETT D, BROWN VI, GRUPP SA, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling axis in children with hematologic malignancies [J]. *Pediatr Drugs*, 2012, 14 (5) : 299-316.
- [29] EVANGELISTI C, CHIARINI F, PAGANELLI F, et al. Crosstalks of GSK3 signaling with the mTOR network and effects on targeted therapy of cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867 (4) : 118635.
- [30] ÁLVAREZ-GARCIA V, TAWIL Y, WISE HM, et al. Mechanisms of PTEN loss in cancer : It's all about diversity [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59 : 66-79.

(英文编辑：汪源；责任编辑：陈姣)