

肝癌细胞HepG2中lncRNA *BDNF AS*对*BDNF*基因表达调控作用的研究

郭大伟 周品一 江宏伟 初晨 周勇*

(中国医科大学附属第四医院普外科, 沈阳 110032)

摘要 该文旨在探讨肝癌细胞HepG2中lncRNA *BDNF AS*(antisense brain derived neurotrophic factor)对*BDNF*基因表达的调控作用。将*BDNF AS*质粒、*BDNF AS*与*BDNF*基因完全互补序列缺失突变质粒瞬时转染肝癌细胞HepG2后采用qPCR方法检测肝癌细胞中lncRNA *BDNF AS*和*BDNF* mRNA水平;采用Western blot方法检测BDNF蛋白质水平;采用ELISA方法检测细胞培养上清中BDNF蛋白质水平;采用免疫荧光染色检测BDNF蛋白质水平;采用FISH方法检测lncRNA *BDNF AS*和*BDNF* mRNA的水平和亚细胞定位。研究结果显示,转染*BDNF AS*质粒的细胞中,lncRNA *BDNF AS*水平高于对照组($P<0.001$),*BDNF* mRNA和蛋白质水平均低于对照组($P<0.001$)。转染突变体质粒的细胞中,lncRNA *BDNF AS*水平高于对照组($P<0.05$),低于*BDNF AS*组($P<0.001$),*BDNF* mRNA和蛋白质水平低于对照组($P<0.05$, $P<0.001$),高于*BDNF AS*组($P<0.05$, $P<0.001$)。免疫荧光染色发现,转染*BDNF AS*质粒和转染突变质粒细胞的平均D值均低于同一视野中未转染的其他细胞($P<0.05$, $P<0.01$)。FISH染色显示,转染*BDNF AS*质粒的细胞中,*BDNF* mRNA在细胞中分布的核/质比低于对照组($P<0.001$);转染突变质粒的细胞中,*BDNF* mRNA在细胞中分布的核/质比低于对照组($P<0.05$),高于lncRNA *BDNF AS*过表达的细胞($P<0.05$)。该研究结果表明,肝癌细胞HepG2中lncRNA *BDNF AS*过表达下调*BDNF* mRNA和蛋白质水平,二者基因完全互补序列参与lncRNA *BDNF AS*对*BDNF*基因表达的调控作用。

关键词 lncRNA *BDNF AS*; BDNF; 肝癌细胞; 基因表达调控

The Regulatory Effects of lncRNA *BDNF AS* on the Expression of *BDNF* in Hepatocellular Carcinoma Cells

Guo Dawei, Zhou Pinyi, Jiang Hongwei, Chu Chen, Zhou Yong*

(Department of General Surgery, Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the regulatory effects of lncRNA *BDNF AS* (antisense brain derived neurotrophic factor) on the expression of *BDNF* in human hepatocellular carcinoma cells of HepG2. The *BDNF AS* plasmid or mutant plasmid with a loss of the overlap region between *BDNF AS* and *BDNF* gene was transiently transfected into HepG2 cells, and the levels of lncRNA *BDNF AS* and *BDNF* mRNA were detected by qPCR. The BDNF protein level was examined by Western blot, and cell supernatant was used to detect BDNF secretion by ELISA. The immunofluorescent staining was used to determine the expression of BDNF. FISH was used to observe subcellular localization of lncRNA *BDNF AS* and *BDNF* mRNA. Our results showed that the

收稿日期: 2017-06-05 接受日期: 2017-07-24

辽宁省自然科学基金(批准号: 2015020739)资助的课题

*通讯作者。Tel: 024-62043119, E-mail: zhouyong888@vip.sina.com

Received: June 5, 2017 Accepted: July 24, 2017

This work was supported by Natural Science Foundation of Liaoning Province (Grant No.2015020739)

*Corresponding author. Tel: +86-24-62043119, E-mail: zhouyong888@vip.sina.com

网络出版时间: 2017-09-06 17:44:10

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170906.1744.002.html>

expression of lncRNA *BDNF AS* in *BDNF AS* group was higher than control group ($P < 0.001$), and the levels of BDNF mRNA and protein were lower than control group ($P < 0.001$). lncRNA *BDNF AS* level in mutant group was higher than control group ($P < 0.05$), but lower than *BDNF AS* group ($P < 0.001$). The levels of BDNF mRNA and protein were lower than control group ($P < 0.05$, $P < 0.001$), and higher than *BDNF AS* group ($P < 0.05$, $P < 0.001$). The mean *D* value of BDNF level by immunofluorescent staining in *BDNF AS* and mutant transfected cells were both lower than the rest other cells in the same field ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The distribution of *BDNF* mRNA represented by the value of nucleus/cytoplasm in *BDNF AS* group was lower than control group ($P < 0.001$). That in mutant group was lower than control group ($P < 0.05$), but higher than *BDNF AS* group ($P < 0.05$). Our data suggested that overexpression of lncRNA *BDNF AS* inhibited the levels of BDNF mRNA and protein, and the completely complementary sequence was of critical importance for the regulatory effects of lncRNA *BDNF AS* on *BDNF* expression in HepG2 cells.

Keywords lncRNA *BDNF AS*; BDNF; hepatocellular carcinoma cells; gene expression regulation

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤, 深入探索肝癌发生、发展的分子机制对于寻找有效阻断原发性肝癌发展和提高患者生存质量的治疗方法具有重要意义。脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)维持神经元细胞的生长和存活^[1], 其信号通路的活化可以减轻中枢神经系统退行性病变时神经元细胞的退化和病理学改变^[2]。近年来, 越来越多的研究认为, BDNF促进多种人类肿瘤的发生、发展, 如直肠癌^[3]、膀胱癌^[4]和非小细胞肺癌^[5]等, 并与肿瘤的侵袭转移和不良预后密切相关。lncRNA *BDNF AS*(antisense BDNF)是*BDNF*基因的反义长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA), 在其基因的第5外显子位置与*BDNF*基因重叠并有一段225 bp序列完全互补^[6]。lncRNA是长度大于200个核苷酸的RNA分子, 属于非蛋白质编码基因转录本, 不会翻译成蛋白质, 但具有强大的基因表达调控作用^[7]。反义lncRNA转录本与蛋白质编码基因重叠, 但转录方向相反, 通过多种分子机制影响编码基因的表达^[8]。

我们以前的研究结果显示, BDNF过表达于肝癌细胞, 其表达水平与肝癌细胞的存活和侵袭能力相关^[9], 同时, lncRNA *BDNF AS*过表达后具有抑制肝癌细胞增殖和迁移的作用。因此, 本研究的目的是, 探讨lncRNA *BDNF AS*对肝癌细胞的负调控作用是否可能通过影响BDNF表达水平实现。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系HepG2由中国医科大学科学实

验中心保存。DMEM培养基和胎牛血清购自BioInd公司。细胞转染试剂Lipofectamine 3000和Trizol购自Invitrogen公司。*BDNF AS*质粒、*BDNF AS*与*BDNF*基因完全互补序列缺失突变质粒以及空载体质粒购自上海和元生物公司。无内毒素质粒中提试剂盒购自天根生化科技公司。GoScript™ Reverse Transcription System反转录试剂盒和GoTaq® qPCR Master Mix试剂盒购自Promega公司。*BDNF AS*和*BDNF*引物购自Origene公司。BDNF兔抗人一抗和*GAPDH*引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。 β -actin小鼠抗人一抗和羊抗兔IgG、羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术公司。BCA蛋白质含量检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司。Alexa Fluor® 594驴抗兔荧光二抗购自Thermo Fisher Scientific公司。Quantikine® ELISA Human *BDNF* Immunoassay试剂盒购自R&D Systems公司。FISH试剂盒以及Cy5标记的lncRNA *BDNF AS*探针和Cy3标记的*BDNF* mRNA探针由Creative Bioarray公司设计并合成, 其中, *BDNF AS*探针既能检测内源也能检测外源转入的lncRNA *BDNF AS*。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和转染 肝癌细胞HepG2使用含有10%胎牛血清的DMEM培养基, 37 °C、5% CO₂条件培养。采用细胞转染试剂Lipofectamin 3000转染, 将*BDNF AS*质粒、*BDNF AS*与*BDNF*基因完全互补序列^[6]缺失突变质粒以及空载体质粒分别瞬时转染HepG2细胞, 转染过程按试剂说明书进行, 简述如下。转染前24 h给细胞传代, 保证转染时细胞达到90%融合。用Opti-MEM稀释Lipofectamine 3000, 同

时,用Opti-MEM稀释质粒DNA后加入P3000混匀。将稀释好的DNA和Lipofectamin 3000混合,室温孵育5 min后加入细胞,继续培养48 h用于下述实验。细胞实验至少重复3次。

1.2.2 qPCR方法检测lncRNA *BDNF AS*和*BDNF* mRNA水平 Trizol提取细胞总RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度和纯度,取5 μ g总RNA反转录成cDNA。qPCR应用Roche LightCycler 480 Real-time PCR扩增仪完成,按照试剂盒提供的操作说明书进行。*BDNF AS*引物序列分别为F: 5'-TAC CAC AAG GTA CCA ACC ATA TAT G-3', R: 5'-CAT GTG GTT CTG TTT CAA TGC CC-3', PCR产物长度135 bp。*BDNF*引物序列分别为F: 5'-CAT CCG AGG ACA AGG TGG CTT G-3', R: 5'-GCC GAA CTT TCT GGT CCT CAT C-3', PCR产物长度161 bp。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性2 min; 95 $^{\circ}$ C扩增15 s, 60 $^{\circ}$ C退火1 min,共40个循环。以*GAPDH*作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行数据分析。

1.2.3 Western blot方法检测BDNF蛋白质水平 细胞加入RIPA细胞裂解液和蛋白酶抑制剂,置于冰上裂解。4 $^{\circ}$ C条件下离心,取上清,按BCA试剂盒说明测定蛋白质浓度。取80 μ g总蛋白,采用12% SDS-PAGE分离,并转移至PVDF膜。5%脱脂奶粉室温封闭2 h后,分别用兔抗人BDNF和小鼠抗人 β -actin(1:200)一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,然后用山羊抗兔IgG或山羊抗小鼠IgG(1:2 000)室温孵育2 h, ECL发光成像。采用Image Pro-plus 6.0软件测定每个蛋白条带的积分光密度值,计算同一个样品BDNF和 β -actin积分光密度之间的比值,作为BDNF的相对表达量。

1.2.4 ELISA方法检测培养上清中BDNF蛋白质水平 离心收集细胞上清液用于检测BDNF蛋白质水平。ELISA实验操作按照试剂盒说明进行,简述如下。50 μ L待测样品或标准品用100 μ L检测稀释液稀释后,加到孔板中室温孵育2 h,加入100 μ L BDNF偶联抗体室温孵育1 h,加入200 μ L底物溶液显色。多功能酶标仪校正波长设定570 nm,于450 nm波长处读取吸光度值。

1.2.5 免疫荧光染色观察BDNF蛋白质水平 PBS漂洗细胞,用4%多聚甲醛室温固定,5% BSA封闭后,向细胞中滴加兔抗人BDNF一抗(1:200稀释)及驴抗兔荧光二抗(Alexa Fluor 594), DAPI复染细胞核,荧光显微镜观察并采集图像,采用Image Pro-plus 6.0软

件测定细胞的平均光密度值。

1.2.6 FISH方法检测lncRNA *BDNF AS*和*BDNF* mRNA水平和定位 FISH实验操作按照试剂盒说明进行,简述如下。分别用0.2 mol/L HCl和0.3% Triton X-100室温孵育细胞,4%多聚甲醛室温固定细胞后,向细胞中滴加RNA杂交缓冲液,55 $^{\circ}$ C预杂交2 h。将RNA探针(探针用杂交缓冲液1:200稀释)于85 $^{\circ}$ C变性5 min,37 $^{\circ}$ C保持2 min。向细胞中滴加探针,橡胶胶水封片,在37 $^{\circ}$ C湿盒中避光杂交过夜。DAPI复染细胞核,激光扫描共聚焦显微镜(FV1000, Olympus)采集图像,采用Image Pro-plus 6.0软件测定细胞的平均光密度值。

1.3 统计学分析

实验采用SPSS 13.0软件处理数据。One-Way ANOVA分析用于比较不同处理组细胞之间的差异,组内两两比较采用LSD-*t*检验。结果用均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

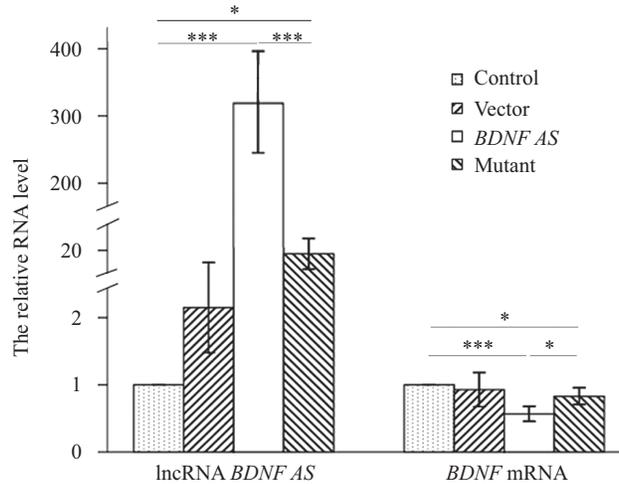
2 结果

2.1 lncRNA *BDNF AS*过表达对*BDNF* mRNA水平的影响

将*BDNF AS*质粒、*BDNF AS*与*BDNF*基因完全互补序列缺失突变质粒以及空载体质粒分别瞬时转染HepG2细胞,然后分别检测其lncRNA *BDNF AS*和*BDNF* mRNA水平。结果显示,转染空载体质粒、*BDNF AS*质粒、突变质粒的HepG2细胞中lncRNA *BDNF AS*相对水平分别为未转染细胞的 2.1 ± 0.3 、 359.8 ± 44.9 、 27.3 ± 4.6 倍($P < 0.05$)。转染空载体质粒、*BDNF AS*质粒、突变质粒的HepG2细胞中*BDNF* mRNA相对水平分别为未转染细胞的 0.9 ± 0.1 、 0.5 ± 0.1 、 0.8 ± 0.1 倍($P < 0.05$)。在不同组细胞中,lncRNA *BDNF AS*和*BDNF* mRNA水平如图1所示。

2.2 lncRNA *BDNF AS*过表达对细胞中BDNF蛋白质水平的影响

将*BDNF AS*质粒、*BDNF AS*与*BDNF*基因完全互补序列缺失突变质粒以及空载体质粒分别瞬时转染HepG2细胞,然后分别检测其BDNF蛋白质水平。结果显示,未转染的对照组、转染空载体质粒、*BDNF AS*质粒、突变质粒的HepG2细胞中BDNF蛋白质相对水平分别为 0.559 ± 0.054 、 0.512 ± 0.018 、 0.159 ± 0.037 、 0.359 ± 0.022 。转染*BDNF AS*质粒的细胞中BDNF蛋白质水平显著下降(图2A),与转染

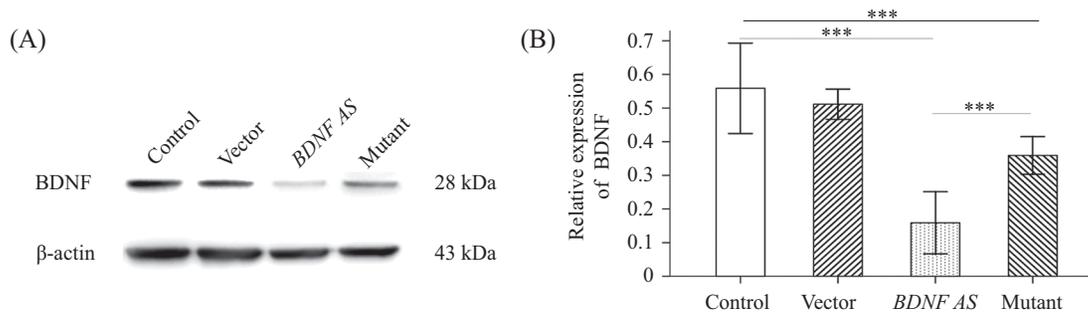


lncRNA *BDNF AS*水平在*BDNF AS*组细胞中显著上调,突变组lncRNA *BDNF AS*水平高于对照组和空载体组,低于*BDNF AS*组。*BDNF* mRNA水平在*BDNF AS*组细胞中降低,突变组*BDNF* mRNA水平低于对照组和空载体组,高于*BDNF AS*组。 $*P<0.05$, $***P<0.001$ 。

The level of lncRNA *BDNF AS* in *BDNF AS* group was upregulated, and that in mutant group was higher than control or vector group, lower than *BDNF AS* transfected group. The level of *BDNF* mRNA in *BDNF AS* group was decreased, and that in mutant group was lower than control group or vector group, higher than *BDNF AS* group. $*P<0.05$, $***P<0.001$.

图1 不同转染组细胞中lncRNA *BDNF AS*和*BDNF* mRNA水平

Fig.1 The levels of lncRNA *BDNF AS* and *BDNF* mRNA in different groups



A: 对照组、空载体组、*BDNF AS*组、突变体组细胞中BDNF蛋白质水平; B: 统计学分析表明,在*BDNF AS*组细胞中BDNF蛋白质水平降低,突变组BDNF蛋白质水平高于对照组和空载体组,低于*BDNF AS*组。 $***P<0.001$ 。

A: the levels of BDNF protein in control group, vector group, *BDNF AS* group and mutant group; B: statistical results showed that the level of BDNF protein in *BDNF AS* group was decreased, and that in mutant group was lower than control group or vector group, higher than *BDNF AS* group. $***P<0.001$.

图2 不同转染组细胞中BDNF蛋白质水平

Fig.2 The levels of BDNF protein in different group

突变质粒的细胞中BDNF蛋白质水平比较有统计学差异($P<0.001$,图2B)。

2.3 lncRNA *BDNF AS*过表达对BDNF分泌水平的影响

将*BDNF AS*质粒、*BDNF AS*与*BDNF*基因完全互补序列缺失突变质粒以及空载体质粒分别瞬时转染HepG2细胞,然后分别检测其分泌的BDNF蛋白质水平。结果显示,未转染的对照组细胞培养上清中BDNF蛋白质含量为 $(91.80\pm 3.03)\times 10^{-12}$ g/mL,提示BDNF可能对细胞本身具有一定的生物学功能。转染空载体、*BDNF AS*质粒、突变质粒的HepG2细胞

培养上清中BDNF含量分别为 $(94.38\pm 4.81)\times 10^{-12}$ g/mL、 $(36.71\pm 3.38)\times 10^{-12}$ g/mL、 $(60.04\pm 4.78)\times 10^{-12}$ g/mL。与对照组和空载体组细胞相比,转染*BDNF AS*质粒的细胞培养上清中BDNF蛋白质水平显著下降($P<0.001$),而转染突变质粒的细胞培养上清中BDNF蛋白质水平高于*BDNF AS*质粒转染的细胞($P<0.001$),低于对照组和空载体组细胞($P<0.001$)(图3)。

2.4 lncRNA *BDNF AS*过表达对转染细胞中BDNF蛋白质水平的影响

将*BDNF AS*质粒、*BDNF AS*与*BDNF*基因完全互补序列缺失突变质粒以及空载体质粒分别

瞬时转染HepG2细胞后,采用免疫荧光染色方法检测BDNF蛋白质水平及定位。GFP为绿色荧光,BDNF为红色荧光,DAPI复染细胞核为蓝色荧光,融合为3个荧光通道的叠加(图4)。BDNF表达于细胞质,测得未转染的对照组细胞的平均光密度(*D*)值为 29.70 ± 5.85 ,转染空载体细胞的平均*D*值为 28.00 ± 3.49 (表1)。转染*BDNF AS*质粒细胞的平均*D*值为 22.66 ± 5.71 ,低于同一视野中未表达GFP的其他细胞(28.90 ± 11.39 , $P < 0.05$)。转染突变质粒细胞的平均*D*值为 19.15 ± 4.15 ,低于同一视野中未表达GFP的其他细胞(27.06 ± 8.97 , $P < 0.01$)。不同转染组细胞中BDNF蛋白质水平和定位如图4所示。

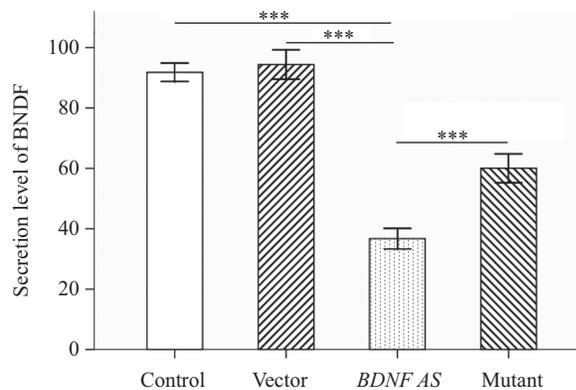
2.5 FISH染色结果

将*BDNF AS*质粒、*BDNF AS*与*BDNF*基因完全互补序列缺失突变质粒以及空载体质粒分别瞬时转染HepG2细胞后,采用FISH方法检测lncRNA *BDNF AS*和*BDNF* mRNA水平及定位。lncRNA *BDNF AS*为绿色荧光,*BDNF* mRNA为红色荧光,DAPI复染细胞核为蓝色荧光,融合为3个荧光通道的叠加(图5A)。结果显示,未转染的对照组细胞和转染空载体的细胞中,lncRNA *BDNF AS*主要表达于细胞质和部分细胞核,*BDNF* mRNA在细胞核和细胞质中均有表达,且核/质比值分别为 0.92 ± 0.22 和 0.93 ± 0.23 (图5B)。转染*BDNF AS*质粒的细胞中,lncRNA *BDNF AS*分布无变化,主要定位于细胞质和部分细胞核,但*BDNF* mRNA核内分布减少,检

测到核/质为 0.54 ± 0.14 ,显著低于对照组($P < 0.001$)和空载体组细胞($P < 0.001$)(图5B)。转染突变质粒的细胞中,观察到lncRNA *BDNF AS*同样分布于细胞质和部分细胞核,检测到*BDNF* mRNA在细胞中的分布为核/质为 0.72 ± 0.23 ,低于对照组($P < 0.05$)和空载体组($P < 0.05$),但高于lncRNA *BDNF AS*过表达的细胞($P < 0.05$)(图5B)。不同转染组细胞中lncRNA *BDNF AS*和*BDNF* mRNA水平和定位如图5A所示。

3 讨论

有研究表明,抑制lncRNA *BDNF AS*的表达可以显著上调*BDNF* mRNA水平,增加BDNF蛋白质水平并诱导神经元细胞的生长和分化^[10]。视网膜母细胞瘤的研究发现,上调lncRNA *BDNF AS*的表达,可能通过抑制BDNF及细胞分裂周期蛋白42(cell division cycle 42, cdc42)、cyclin E导致细胞周期阻滞,进而抑制视网膜母细胞瘤进展^[11]。BDNF信号通路的活化为肿瘤细胞得以存活和扩散提供有利条件,因此,BDNF可能成为潜在的肿瘤治疗靶点^[12]。对肝癌的研究表明,BDNF通过诱导血管新生促进肝癌组织生长^[13],BDNF刺激也能增强肝癌细胞的迁移和侵袭能力^[14]。我们以前的研究证实,干扰BDNF的表达可以抑制肝癌细胞侵袭^[15]。近期的研究还发现,上调lncRNA *BDNF AS*的表达干扰肝癌细胞的增殖和迁移^[15]。因此,本研究重点在于lncRNA *BDNF AS*是否

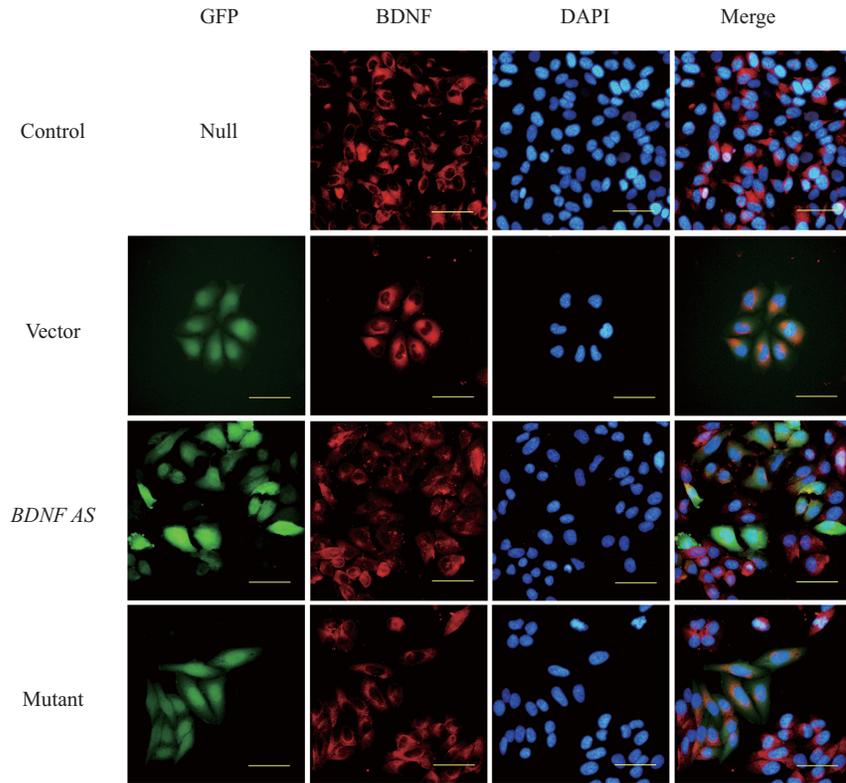


对照组、空载体组、*BDNF AS*组、突变体组细胞中BDNF蛋白质的分泌水平。统计学分析表明,在*BDNF AS*组细胞中BDNF蛋白质分泌水平降低,突变体组BDNF蛋白质分泌水平高于对照组和空载体组,低于*BDNF AS*组。*** $P < 0.001$ 。

The secretion levels of BDNF protein in control group, vector group, *BDNF AS* group and mutant group cells. Statistical results showed that the secretion level of BDNF protein in *BDNF AS* group was decreased, and that in mutant group was lower than control group or vector group, higher than *BDNF AS* group. *** $P < 0.001$.

图3 不同转染组细胞中BDNF蛋白质的分泌水平

Fig.3 The secretion levels of BDNF protein in differently transfected cells



BDNF主要表达于细胞质, *BDNF AS*组中GFP阳性细胞BDNF蛋白质水平的 D 值低于同一视野中的其他细胞, 突变组中GFP阳性细胞BDNF蛋白质水平的 D 值低于同一视野中的其他细胞。标尺=10 μm 。

BDNF was mainly expressed in cytoplasm. The D value of BDNF level in GFP positive cells of *BDNF AS* group was lower than the rest other group in the same field. The D value of BDNF level in GFP positive cells of mutant group was lower than the rest other cells in the same field. Scale bars=10 μm .

图4 不同转染组细胞中BDNF蛋白质水平和定位

Fig.4 The level and localization of BDNF protein in differently transfected cells

表1 免疫荧光染色测定各组细胞中BDNF蛋白质水平

Table 1 BDNF protein level among different groups by immunofluorescence

分组 Group	GFP表达 GFP expression	BDNF平均光密度值 Mean optical density of BDNF	t	P 值 P value
Control ($n=3$)	Null	29.70 \pm 5.85		
Vector ($n=3$)	GFP (-)	30.28 \pm 8.36	0.681	0.505
	GFP (+)	28.00 \pm 3.49		
<i>BDNF AS</i> ($n=3$)	GFP (-)	28.90 \pm 11.39	-2.378	0.023*
	GFP (+)	22.66 \pm 5.71		
Mutant ($n=3$)	GFP (-)	27.06 \pm 8.97	-2.871	0.007**
	GFP (+)	19.15 \pm 4.15		

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与空载体组比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs vector group.

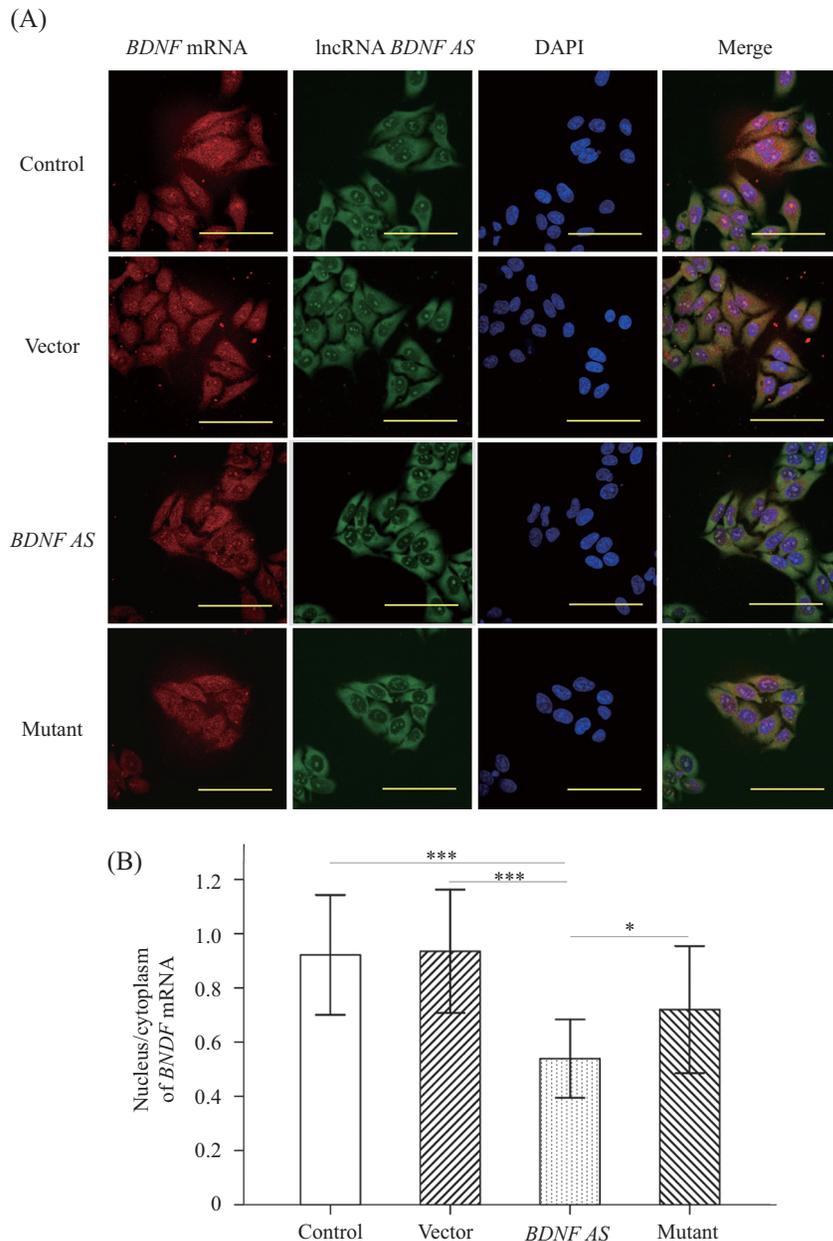
可能通过调节肝癌细胞中BDNF的表达水平实现对肝癌细胞的抑制作用。

本研究分析了肝癌细胞HepG2转染*BDNF AS*质粒后BDNF mRNA和蛋白质水平的变化。定量实验结果证实, 转染过表达质粒后, lncRNA *BDNF AS*的表达水平显著上调, 同时BDNF mRNA和蛋白质水平均降低, BDNF蛋白质的分泌水平也降低, 这表明

lncRNA *BDNF AS*能够抑制BDNF mRNA和蛋白质水平。免疫荧光染色也证实, lncRNA *BDNF AS*过表达的细胞(GFP阳性)中BDNF蛋白质水平较低。FISH染色发现, lncRNA *BDNF AS*主要定位于细胞质, 在细胞核的部分区域也有少量表达。lncRNA在细胞中的不同定位有助于推测其分子调控机制, 表达于细胞质可能影响mRNA的稳定性或作为lncRNA竞

竞争性结合microRNA等^[16], 表达于细胞核可能影响激活型或抑制型染色质修饰等^[17]。因此我们推测, lncRNA *BDNF AS*对*BDNF*表达的调控作用可能主要表现为两方面, 在细胞核内通过调控组蛋白修饰、染色质可塑性等机制抑制*BDNF*基因转录, 在细胞质内通过调控出核、剪接及稳定性等机制减少*BDNF*

mRNA水平。*BDNF* mRNA在对照组和空载体组的细胞核和细胞质的分布比较均匀, 核/质比接近1, 而在转染*BDNF AS*质粒的细胞核中的分布显著少于细胞质。这表明, lncRNA *BDNF AS*可以减少细胞核中*BDNF* mRNA水平, 分析原因可能是由于抑制*BDNF* mRNA的转录, 或是增加细胞核中*BDNF* mRNA的



A: lncRNA *BDNF AS*主要表达于细胞质和部分细胞核, *BDNF* mRNA在对照组和空载体组的细胞核和细胞质中均有表达; 标尺=20 μ m。B: *BDNF AS*组细胞的核/质显著低于对照组和空载体组, mutant组细胞的核/质高于*BDNF AS*组, 仍低于对照组和空载体组。* P <0.05, *** P <0.001。
A: lncRNA *BDNF AS* was mainly expressed in cytoplasm and part of nucleus. *BDNF* mRNA was expressed in both nucleus and cytoplasm of control or vector transfected cells with an even distribution (scale bars=20 μ m)。B: statistical results showed that the value of nucleus/cytoplasm in *BDNF AS* group was lower than control or vector group. The value of nucleus/cytoplasm in mutant group was more than *BDNF AS* group but less than control or vector group. * P <0.05, *** P <0.001.

图5 不同转染组细胞中lncRNA *BDNF AS*和*BDNF* mRNA水平和定位

Fig.5 The level and localization of lncRNA *BDNF AS* and *BDNF* mRNA in differently transfected cells

降解,或是促进*BDNF* mRNA的核质穿梭,其具体的分子机制还有待于我们进一步深入研究。我们的结果表明, *lncRNA BDNF AS*对肝癌细胞的负调控作用很可能是通过影响*BDNF*信号通路实现的,但也可能有其他的分子机制和靶蛋白信号通路参与,毕竟*lncRNA*的调控机制非常多。我们准备在以后的研究中,通过*BDNF*恢复实验、外源*BDNF*刺激、干扰*BDNF*受体、信号通路抑制剂等手段,进一步验证完善我们的结论。

本研究中,我们还对肝癌细胞HepG2转染*BDNF AS*与*BDNF*基因重叠区内完全互补序列缺失突变质粒(长度为225 bp)探讨了*BDNF* mRNA和蛋白质水平的变化。定量实验结果表明,转染突变质粒后,*lncRNA BDNF AS*的表达水平高于对照组和空载体组细胞,但低于*BDNF AS*质粒转染组。我们分析原因可能是,缺失的序列对于维持*lncRNA BDNF AS*的稳定性非常重要,*lncRNA BDNF AS*的不稳定造成表达量降低,同时影响其分子调控作用,即*BDNF* mRNA和蛋白质水平低于对照组和空载体组细胞,但高于*BDNF AS*质粒转染组细胞。研究表明,某些反义*lncRNA*对其蛋白编码序列的调控机制是通过*lncRNA*-mRNA相互作用实现的^[18],因此,我们推测,完全互补序列的缺失导致*lncRNA BDNF AS*与*BDNF* mRNA不能结合,影响*lncRNA BDNF AS*对*BDNF* mRNA水平的调控。免疫荧光染色结果显示,转染突变质粒的细胞(GFP阳性)中*BDNF*蛋白质水平也有所下降。FISH染色发现,*BDNF AS*突变体与*lncRNA BDNF AS*具有相同的细胞定位。转染突变体质粒的细胞中,*BDNF* mRNA分布的核/质比低于对照组和空载体组细胞,但高于过表达质粒转染组。这些结果提示,完全互补序列的缺失对于*lncRNA BDNF AS*调控*BDNF* mRNA水平具有重要意义。

总之,本研究结果表明,肝癌细胞HepG2中*lncRNA BDNF AS*过表达可以降低*BDNF* mRNA和蛋白质水平,*BDNF AS*与*BDNF*基因的完全互补序列对于*lncRNA BDNF AS*的调控作用具有重要意义。*BDNF*基因天然的反义*lncRNA*转录本即*lncRNA BDNF AS*可能为阻断肝癌进展提供新的治疗策略。*lncRNA BDNF AS*通过降低细胞核中*BDNF* mRNA水平实现对*BDNF*蛋白质水平的下调作用,但还需要双链RNA形成、RNA降解抑制、核内滞留等实验进一步验证我们的推论,其具体的分子机制将成为今后

研究的主要方向。

参考文献 (References)

- Burk K, Murdoch JD, Freytag S, Koenig M, Bharat V, Markworth R, *et al.* EndophilinAs regulate endosomal sorting of BDNF-TrkB to mediate survival signaling in hippocampal neurons. *Sci Rep* 2017; 7(1): 2149.
- Beeri MS, Sonnen J. Brain BDNF expression as a biomarker for cognitive reserve against Alzheimer disease progression. *Neurology* 2016; 86(8): 702-3.
- Huang SM, Lin C, Lin HY, Chiu CM, Fang CW, Liao KF, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor regulates cell motility in human colon cancer. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22(3): 455-64.
- Lai PC, Chiu TH, Huang YT. Overexpression of BDNF and TrkB in human bladder cancer specimens. *Oncol Rep* 2010; 24(5): 1265-70.
- Zhang SY, Hui LP, Li CY, Gao J, Cui ZS, Qiu XS. More expression of BDNF AS sociates with lung squamous cell carcinoma and is critical to the proliferation and invasion of lung cancer cells. *BMC Cancer* 2016; 16: 171.
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 2007; 90(3): 397-406.
- Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 2009; 136(4): 629-41.
- Villegas VE, Zaphropoulos PG. Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs. *Int J Mol Sci* 2015; 16(2): 3251-66.
- Guo D, Hou X, Zhang H, Sun W, Zhu L, Liang J, *et al.* More expressions of BDNF and TrkB in multiple hepatocellular carcinoma and anti-BDNF or K252a induced apoptosis, suppressed invasion of HepG2 and HCCLM3 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 97.
- Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, Fatemi RP, Magistri M, Brothers SP, *et al.* Inhibition of natural antisense transcripts *in vivo* results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nat Biotechnol* 2012; 30(5): 453-9.
- Shang W, Yang Y, Zhang J, Wu Q. Long noncoding RNA *BDNF-AS* is a potential biomarker and regulates cancer development in human retinoblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.134.
- Yang X, Martin TA, Jiang WG. Biological influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on colon cancer cells. *Exp Ther Med* 2013; 6(6): 1475-81.
- Lam CT, Yang ZF, Lau CK, Tam KH, Fan ST, Poon RT. Brain-derived neurotrophic factor promotes tumorigenesis via induction of neovascularization: implication in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17(10): 3123-33.
- 肖震宇, 王雅丹, 陈孝平. 脑源性神经营养因子对肝癌细胞株 HepG2体外转移能力的影响. *癌症(Xiao Zhenyu, Wang Yadan, Chen Xiaoping. Effect of brain-derived neurotrophic factor on *in vitro* metastasis of hepatocellular carcinoma cell line HepG2. Chinese Journal of Cancer) 2006; 25(3): 287-91.*
- Guo D, Sun W, Zhu L, Zhang H, Hou X, Liang J, *et al.* Knockdown of BDNF suppressed invasion of HepG2 and

- HCCLM3 cells, a mechanism associated with inactivation of RhoA or Rac1 and actin skeleton disorganization. *APMIS* 2012; 120(6): 469-76.
- 16 Johnsson P, Ackley A, Vidarsdottir L, Lui WO, Corcoran M, Grandér D, *et al.* A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(4): 440-6.
- 17 Li L, Liu B, Wapinski OL, Tsai MC, Qu K, Zhang J, *et al.* Targeted disruption of Hotair leads to homeotic transformation and gene derepression. *Cell Rep* 2013; 5(1): 3-12.
- 18 Lepoivre C, Belhocine M, Bergon A, Griffon A, Yammine M, Vanhille L, *et al.* Divergent transcription is associated with promoters of transcriptional regulators. *BMC Genomics* 2013; 14: 914.