· 实验研究 ·

# LncRNA MALAT1 对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 增殖与凋亡影响*

陈海英，孟涛

**摘 要：目的** 探讨长链非编码 RNA（lncRNA）肺腺癌相关转录本 1（MALAT1）对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 增殖和凋亡的影响。**方法** 构建 MALAT1-RNAi 质粒载体，应用脂质体法转染人脐静脉内皮细胞 HUVEC 细胞；设空白细胞对照组、阴性对照组和 MALAT1-RNAi 转染组，采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）法检测各实验组细胞中 MALAT1 的表达水平；CCK8 法检测细胞的增殖情况，流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染检测各组细胞的凋亡能力。**结果** qRT-PCR 检测结果显示，MALAT1-RNAi 转染组人脐静脉内皮细胞 HUVEC 中 MALAT1 的相对表达量为（0.051 ± 0.03），均低于空白细胞对照组和阴性对照组（均 $P < 0.01$）；CCK8 检测结果显示，MALAT1-RNAi 转染组培养 48 和 72h 的吸光度（*A*）值分别为（0.072 ± 0.087）和（1.115 ± 0.077），均低于空白细胞对照组和阴性对照组（均 $P < 0.05$）；Annexin Ⅴ-FITC/PI 双染流式细胞术检测结果显示，MALAT1-RNAi 转染组 HUVEC 细胞凋亡率为（14.08 ± 1.05）%，均高于空白细胞对照组和阴性对照组（均 $P < 0.01$）。**结论** MALAT1-RNAi 可抑制人脐静脉内皮细胞 HUVEC 的增殖能力，并促进其凋亡。

**关键词：**长链非编码 RNA（lncRNA）；肺腺癌相关转录本 1（MALAT1）；人脐静脉内皮细胞（HUVEC）；增殖；凋亡
**中图分类号：**R 734.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-0580(2016)10-1340-04 DOI：10.11847/zgggws2016-32-10-12

## Effect of LncRNA MALAT1 on proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells

CHEN Hai-ying, MENG Tao (*Obstetrics, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning Province* 110001, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of long non-coding RNA (LncRNA) metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) on the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** We constructed RNA interference (RNAi) plasmid vectors for MALAT1 and then transfected them into HUVECs by liposome method. A blank control and a negative control group of HUVECs were also established. The expression of MALAT1 in HUVECs of the three groups was detected with quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The proliferation of HUVECs was determined with caerulein and cholecystokinin octapeptide (CCK-8) assay and the apoptosis of the HUVECs was analyzed by flow cytometry with annexin Ⅴ-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (FITC/PI) double staining. **Results** The relative MALAT1 expression was 0.051 ± 0.03 in MALAT1-RNAi transfected HUVECs and significantly higher than that of in blank and negative control HUVECs (both $P < 0.01$); the absorbance values (A) of culture medium for MALAT1-RNAi transfeced HUVECs were 0.072 ± 0.087 and 1.115 ± 0.077 at 48 and 72 hours of incubation and were both significantly lower than those of the blank and negative control HUVECs ($P < 0.05$ for all); the apoptosis rate of MALAT1-RNAi transfeced HUVECs was 14.08 ± 1.05% and significantly higher than that blank and negative control HUVECs (both $P < 0.01$). **Conclusion** MALAT1-RNAi could inhibit the proliferation and promote the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells.

**Key words:** long chain non-coding RNA; metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1; human umbilical vein endothelial cell; proliferation; apoptosis

妊娠作为一种特殊的生理状态，可导致生理变化和血流动力学的改变，据报道，妊娠期静脉血栓的发生率为非妊娠者的 4 ~ 5 倍，而目前对妊娠期静脉血栓病因研究尚未引起足够的重视[1-2]。肺腺癌转移相关转录本 1（metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1，MALAT1），全长 6.7kb，为长链非编码 RNA（long non-coding RNA，lncRNA）的重要成员，普遍表达于人类和鼠组织细胞中，尤其在神经系统突出[3]。有研究表明，抑制食管鳞状细胞癌细胞 MALAT1 的表达可有效抑制其增殖并诱导凋亡[4]。内皮细胞的凋亡，可以促进血小板的粘附和血栓的形成，这可能是引起静脉血栓的一个重要原因，因此 MALAT1 可能会通过促进内皮细胞增殖和凋亡参与妊娠期静脉血栓的形成。本研究通过观察

* **基金项目：** 辽宁省自然科学基金（2013021087）
**作者单位：** 中国医科大学附属第一医院产科，辽宁 沈阳 110001
**作者简介：** 陈海英（1975 - ），女，辽宁沈阳人，副主任医师，硕士，研究方向：围产期疾病。
**通讯作者：** 孟涛，E-mail：cmumt@163.com
**数字出版日期：**2016 - 9 - 8 15：11
**数字出版网址：**http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160908.1511.016.html

lncRNA MALAT1 对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)增殖和凋亡的影响,旨在为妊娠期静脉血栓的诊治提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)培养基(美国 Hyclone 公司);Lipofectamine 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司);CCK8 试剂盒和 annexin Ⅴ-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (FITC/PI)双染凋亡试剂盒(中国凯基公司);RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和 SYBR 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒(日本 TAKARA 公司;(型号:TP950 96 孔实时荧光定量 PCR 仪)。Thermo Multiskan FC 酶联免疫检测仪(美国 Thermo 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 HUVEC 细胞培养与转染 人脐静脉内皮细胞系(HUVEC)购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,置于 37 ℃、5% $CO_2$ 培养,培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,适时换液传代。由上海吉凯公司代为合成 MALAT1-RNA interference (RNAi)质粒载体和阴性对照,按照 Lipofectamine 2000 操作说明进行转染 HUVEC 细胞,转染 8 h 后更换培养基继续培养至 48 h。MALAT1-RNAi-a:GATCCCGGGCTTCTCTTAACATTTACTCGAGTAAATGTTAAGAGAAGCCCTTTTTGGAT;MALAT1-RNAi-b:AGCTATCCAAAAAGGGCTTCTCTTAACATTTACTCGAGTAAATGTTAAGAGAAGCCCGG。

1.3 qRT-PCR 法检测 HUVEC 细胞 MALAT1 表达 收集各组细胞,根据 Traziol 法提取总 mRNA。反转录条件是:37 ℃ 15 min;85 ℃ 5 s。按说明书要求扩增体系为:SYBR Premix EaqTMII(2 ×) 为 12.5 μL;PCR 正向引物(10 μmol)为 1 μL;PCR 反向引物(10 μmol) 为 1μL;模板 cDNA 为 2 μL;加灭菌蒸馏水调整至总体积为 25 μL。实时定量 PCR 扩增反应条件为:95 ℃ 30 s 1 个循环,95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s,40 个循环;95 ℃ 15 s、60 ℃ 30 s,1 个循环。MALAT1 上游引物为 5′-CAAGGTCGGGCAGGAAGAG-3′,下游引物为 5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′。

1.4 CCK8 法检测 HUVEC 细胞增殖能力 调整各组 HUVEC 细胞浓度为 $1 \times 10^4$/mL,接种于 96 孔板,100 μL/孔;继续于 37 ℃、5% $CO_2$ 孵育箱中培养,培养 24、48、72 h 后应用 CCK8 法检测 HUVEC 细胞的增殖能力,再加入 10 μL CCK8 继续培养 4 h 后,用酶联免疫检测仪测定波长为 490 nm 吸光度(A)值。

1.5 Annexin Ⅴ-FITC/PI 双染流式细胞术检测 HUVEC 细胞凋亡 收集细胞后,调整各组细胞浓度到 $1 \times 10^6$/mL,再用冷磷酸盐缓冲液吹打并离心,缓冲液重悬后取细胞悬液 500 μL,加入 annexin Ⅴ-FITC 5 μL 和 PI 5 μL,4 ℃避光孵育 30 min,应用流式细胞仪进行检测。

1.6 统计分析 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料多组件比较采用房产分析,两两比较采用 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 不同组别 HUVEC 中 MALAT1 表达量比较 qRT-PCR 法检测结果显示,空白细胞对照组人脐静脉内皮细胞 HUVEC 中 MALAT1 的表达量为相对值 1,阴性对照组相对表达量为(1.03 ± 0.05),MALAT1-RNAi 转染组相对表达量为(0.51 ± 0.03)。不同组别比较,MALAT1-RNAi 转染组 MALAT1 相对表达量均低于空白细胞对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);阴性对照组与空白细胞对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

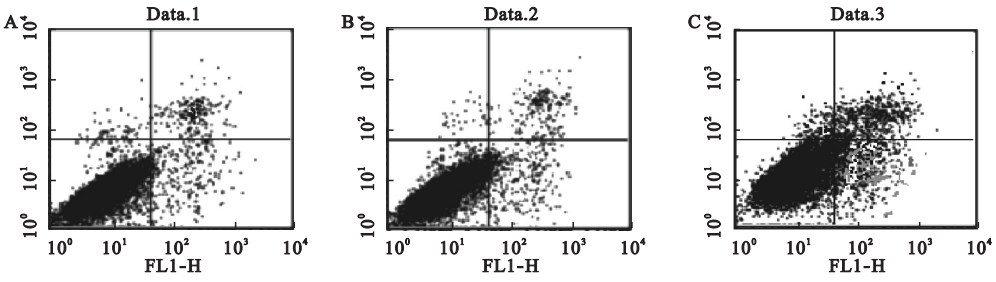
2.2 MALAT1 对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 增殖的影响(表 1) CCK8 检测结果显示,空白细胞对照组、阴性对照组和 MALAT1-RNAi 转染组培养 24 h,3 组吸光度(A)值差异无统计学意义($P > 0.05$);MALAT1-RNAi 转染组培养 48 和 72 h 的吸光度(A)值均低于空白细胞对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),而阴性对照组与空白细胞对照组差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

**表 1** 不同组别不同培养时间人脐静脉内皮细胞 HUVEC 吸光度(A)值比较

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|---|---|---|
| 空白细胞对照组 | 0.501 ± 0.068 | 0.947 ± 0.076 | 1.452 ± 0.085 |
| 阴性对照组 | 0.501 ± 0.068 | 1.021 ± 0.102 | 1.522 ± 0.091 |
| MALAT1-RNAi 转染组 | 0.501 ± 0.068 | 0.742 ± 0.087[ab] | 1.115 ± 0.077[ab] |

注:a 与空白细胞对照组比较,$P < 0.05$;b 与阴性对照组比较,$P < 0.05$。

2.3 MALAT1 对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 凋亡的影响(图 1) Annexin Ⅴ-FITC/PI 双染流式细胞术检测结果显示,空白细胞对照组、阴性对照组和 MALAT1-RNAi 转染组细胞凋亡率分别为(2.93 ± 0.19)%、(3.19 ± 0.20)% 和(14.08 ± 1.05)%;不同组别比较,MALAT1-RNAi 转染组 MALAT1 相对表达量均低于空白细胞对照组和阴性对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);阴性对照组与空白细胞对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。




注：A：空白细胞对照组；B：阴性对照组；C：MALAT1-RNAi 转染组。

**图 1**　不同组别人脐静脉内皮细胞（HUVEC）凋亡率（%）

## 3　讨　论

静脉血栓在临床上有“高危、多发而少见”的特点，与肿瘤、心血管疾病并称三大高危疾病[5]。静脉血栓形成的三要素包括：血流瘀滞、血管内皮细胞受损和血小板粘附、聚集和释放[6]。随着孕周的增长，子宫也随之增大，进而压迫髂静脉及下腔静脉，导致静脉回流发生障碍，使血流瘀滞，引起了血管内皮细胞受损，血管壁发生改变，从而易导致妊娠期静脉血栓的发生。

血管腔内面覆盖着的单层扁平细胞是血管内皮细胞，血管自身正常结构和功能的维持借助于血管内皮细胞增殖和凋亡的平衡，血管内皮细胞的凋亡可促进血小板的粘附和血栓的形成，这可能是引起静脉血栓形成的一个重要原因。lncRNA 是长度超过 200 nt 的 RNA 分子，本身并不编码蛋白质，而以 RNA 形式在多种层面上调控基因的表达水平[7-8]。MALAT1 作为 lncRNA 家族的重要成员之一，其长度大约为 8 700 bp，定位于人类染色体 11q13，有研究表明，MALAT1 与肿瘤的增殖和凋亡有关[9]，但 MALAT1 是否对人脐静脉内皮细胞有调控增殖和凋亡的作用尚未见文献报道。微小 RNA（microRNA，miRNA）是一类长约为 21 ~ 23 个核苷酸的非编码单链小分 RNA，在生命活动中普遍存在并发挥着重要作用，一般 miRNA 以沉默复合体的方式抑制靶基因的表达和功能[10]。本研究构建的 MALAT1-RNAi，使人脐静脉内皮细胞（HUVEC）中 MALAT1 的相对表达量下降到（0.51 ± 0.03），说明其转染是有效的。娄振凯等[11]研究表明，PI3-K/Akt 和 MAPKs 信号通路通过诱导人脐静脉内皮细胞凋亡可促进静脉血栓的形成。吴胜春等[12]研究结果显示，HIF-1α 通过调控人脐静脉内皮细胞 EVC304 的增殖和凋亡参与静脉血栓的发病。本研究结果显示，MALAT1-RNAi 转染组培养 48 和 72 h 的吸光度（A）值分别为（0.072 ± 0.087）和（1.115 ± 0.077），均低于空白细胞对照组和阴性对照组（均 $P < 0.05$）；MALAT1-RNAi 转染组 HUVEC 细胞凋亡率为（14.08 ± 1.05）%，均高于空白细胞对照组和阴性对照组（均 $P < 0.01$）。提示下调 MALAT1 表达量可抑制 HUVEC 细胞的增殖能力，并促进其凋亡。这可能是妊娠期静脉血栓形成的重要调控基因，有可能成为诊治妊娠期静脉血栓的靶点之一。但 MALAT1 影响内皮细胞的功能是通过何途径、何基因的变化来完成的尚有待于进一步研究。

### 参考文献


[1] 李娜，曾万江. 产科血栓性疾病溶栓治疗的研究进展[J]. 中华产科急救电子杂志，2014，3（2）：132 - 135.

[2] 雷森，李梦来，蒲鹏，等. 妊娠期合并静脉血栓栓塞性疾病的发病特点及治疗分析[J]. 中国妇幼保健，2015，30（6）：848 - 850.

[3] Bernard D，Prasanth KV，Tripathi V，et al. A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression[J]. EMBO J，2010，29（18）：3082 - 3093.

[4] Hu L，Wu Y，Tan D，et al. Up-regulation of long noncoding RNA MALAT1 contributes to proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res，2015，34：7 - 19.

[5] Bates SM，Greer IA，Pabinger I，et al. Venous thromboembolism，thrombophilia，antithrombotic therapy，and pregnanc11：American College of Chest Physicians evidence based clinical practice guidelines（8th edition）[J]. Chest，2008，133（Suppl）：844 - 866.

[6] 谢露，貉静，胡世凤. 海带半纤维素对老龄大鼠血栓形成的影响[J]. 中国公共卫生，2004，20（4）：446 - 447.

[7] Haemmerle M，Gutschner T. Long non-coding RNAs in cancer and development：where do we go？[J]. Int J Mol Sci，2015，16：1395 - 1405.

[8] Quinodoz S，Guttman M. Long noncoding RNAs：an emerging link between gene regulation and nuclear organization[J]. Trends Cell Biol，2014，24：651 - 663.

[9] Liu S，Song L，Zeng S，et al. MALAT1-miR-124-RBG2 axis is involved in growth and invasion of HR-HPV-positive cervical cancer cells[J]. Tumour Biol，2016，37（1）：633 - 640.

[10] 周世权，张艳炜，董秋实，等. miRNA 与心脑血管病研究进展[J]. 中国公共卫生，2014，30（3）：378 - 380.

[11] 娄振凯，李兴国，张福厚，等. PI3-K/Akt 和 MAPKs 信号通路在氧化应激诱导人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用[J]. 中国急救医学，2016，36（1）：78 - 82.

[12] 吴胜春，石晓明，唐雷，等. HIF-1α 对缺氧条件下人脐静脉内皮细胞 EVC34 增殖和凋亡的影响[J]. 第二军医大学学报，2013，34（7）：808 - 811.


**收稿日期**：2016-02-28　　（郭薇编辑　吴少慧校对）

· 实验研究 ·

# Lrig1 在结肠癌组织和细胞株中表达意义

葛立春,李红

**摘 要:目的** 探讨富含亮氨酸重复序列免疫球蛋白样蛋白 1(Lrig1)在结肠癌组织和细胞株中的表达,并比较其与正常结肠组织和正常结肠上皮细胞表达的差异性。**方法** 采用免疫组化、逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白印迹(WB)方法检测结肠癌组织和癌旁正常组织以及各细胞株中的表达水平,并比较其差异性。**结果** 免疫组化结果显示,结肠癌组织中 Lrig1 的表达水平(31.43%,22/70)明显低于癌旁正常结肠组织(86.11%,31/36)。Lrig1 在结肠癌组织中的表达与分化、分期及有无淋巴结转移有关($P<0.05$),与性别、年龄和肿瘤大小无关($P>0.05$)。RT-PCR 结果显示,与正常肠上皮细胞株 NCM460(0.95±0.12)比较,Lrig1 mRNA 在结肠癌细胞株 SW480 和 HCT116 中相对表达量降低,分别为(0.65±0.09)和(0.47±0.06),组间比较具有统计学意义($P<0.05$)。WB 的结果显示,与 NCM460(0.98±0.16)比较,Lrig1 蛋白在 SW480 和 HCT116 细胞中的相对表达量降低,分别为(0.71±0.06)和(0.54±0.05),组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Lrig1 在结肠癌的发生和发展中可能起着抑癌基因的作用。

**关键词**:结肠癌;免疫组化;RT-PCR;WB;Lrig1 基因

**中图分类号**:R 735.3+5 **文献标志码**:A **文章编号**:1001-0580(2016)10-1343-03 **DOI**:10.11847/zgggws2016-32-10-13

## Expression and significance of Lrig1 in colon cancer tissue and cell lines

GE Li-chun, LI Hong (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning Province* 121001, China)

**Abstract: Objective** To detect the expression of leucine-rich repeats and immunoglobulin like domain protein 1 (Lrig1) in human colon cancer tissues and cell lines, normal colon tissue, and colonic epithelium and to compare the expressions in cancer and normal tissures. **Methods** We collected 70 colon adenocarcinoma tissue samples and 36 normal colon tissues adjacent to the tumors from 70 inpatients with surgery but without radiotherapy or chemotherapy before the operation. We used immunohistochemical method to detect Lrig1 expression in colon cancer tissues and adjacent normal tissues; we also used reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) and Western blot to detect Lrig1 mRNA and protein in colonic epithelial cells; then the differences in the expressions in different tissues were analyzed. **Results** The expression of Lrig1 in colon cancer tissues (31.43%, 22/70) was obviously lower than that (86.11%, 31/36) in normal tissues adjacent to the tumor. The expression of Lrig1 in colon cancer tissues was correlated with the differentiation and staging of tumors and the status of lymph node metastasis ($P<0.05$ for all) but not related to tumor size, gender and age of the patients ($P>0.05$ for all). The results of RT-PCR illustrated that the relative expression of Lrig1 mRNA in colon cancer cells (SW480 and HCT116) was significantly lower than in normal colon epithelial cells (NCM460) (0.65±0.09 and 0.47±0.6 vs. 0.95±0.12) (both $P<0.05$); the relative expressions of Lrig1 protein in the SW480 and HCT116 cells (0.71±0.06 and 0.54±0.05) were also significantly lower than that in the NCM460 cells (both $P<0.05$) based on the results of Western blot test. **Conclusion** Lrig1 may play the role of a cancer suppressor gene in the occurrence and development of colon cancer.

**Key words**: colon cancer; immunohistochemistry; reverse transcriptase-PCR; Western blot; Lrig1 gene

近年来中国结肠癌的病死率呈现明显上升的趋势,已经成为中国最常见的恶性肿瘤之一。目前认为抑癌基因和癌基因的活性失衡,是结肠癌发生的重要机制之一。Lrig1(leucine-rich repeats and immunoglobulin like domain protein 1)是新近发现的人类基因成员,定位在染色体 3p14.3 位点,此位点容易出现数个抑癌基因杂合性缺失。有研究报道,在前列腺癌、恶性胶质瘤、肺癌等组织中可检测到 Lrig1 的表达降低甚至缺失[1-3],但对于 Lrig1 在结肠癌中作用的研究较少,尚无定论。本研究运用免疫组化、逆转录 PCR(reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)和蛋白印迹(Western blot, WB)方法检测 Lrig1 在结肠癌组织和细胞株与癌旁正常结肠组织和正常结肠上皮细胞中的表达,并比较其差异性,旨在探讨 Lrig1 在结肠癌发生发展中可能的作用,为结肠癌的诊断和基因治疗提供一个新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织样本 70 例人结肠腺癌组织和 36 例

**作者单位**:辽宁医学院生物化学与分子生物学教研室,辽宁 锦州 121001
**作者简介**:葛立春(1983-),男,满族,辽宁丹东人,硕士,研究方向:肿瘤分子生物学。
**通讯作者**:李红,E-mail:jzmu_lihong@sina.com

**数字出版日期**:2016-9-8 15:24
**数字出版网址**:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160908.1524.028.html