PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2015, 42(12): 1155~1158
www.pibb.ac.cn

长链非编码 RNA AFAP1-AS1 促进肿瘤侵袭转移 *

曾朝阳[1, 2, 3] 孛 昊[2] 龚朝建[2] 李夏雨[3] 连 瑜[2] 荆益州[2] 唐艳艳[2] 陈 攀[1, 2]
廖前进[1, 2] 李小玲[1, 2, 3] 熊 炜[1, 2, 3]** 李桂源[1, 2, 3]**

([1] 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院，湖南省肿瘤医院，长沙 410013；
[2] 中南大学肿瘤研究所卫生部癌变原理重点实验室及教育部癌变与侵袭原理重点实验室，长沙 410078；
[3] 中南大学湘雅三医院疾病基因组研究中心湖南省非可控性炎症与肿瘤重点实验室，长沙 410013)

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0161

人类基因组计划及其后续的 DNA 元件百科全书计划(The Encyclopedia of DNA Elements Project, ENCODE)研究成果表明，蛋白质编码基因序列仅占人类基因组序列的 1%～3%，人基因组中绝大部分可转录的序列为长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNAs)[1]. LncRNA 广泛地存在于各种生物中，且随着生物复杂程度的升高，基因组中 lncRNA 序列的比例也相应地增大，提示 lncRNA 在生物进化过程中可能有着重要意义[2-4]. 随着 lncRNA 不断被发现，以及对它们功能的诠释，科学家们发现 lncRNA 可作为功能蛋白质的信号(signal)、诱导(guide)、诱饵(decoy)或支架(scaffold)分子等多种方式，在染色质重构、基因转录、翻译及蛋白质修饰等多重水平调控基因的表达，并参与了包括发育、免疫、生殖等基本生理过程. 更重要的是，lncRNA 的表达与功能失调已经与包括恶性肿瘤在内的人类多种疾病紧密联系在一起[5-9]. 最近，国内外几个课题组发现了一个长链非编码 RNA 基因 AFAP1-AS1 在多种肿瘤中表达上调，且与患者不良预后相关，功能研究提示 AFAP1-AS1 的高表达促进了肿瘤的侵袭转移[10-13].

1 AFAP1-AS1 在多种肿瘤中表达上调且与患者不良预后相关

目前在 lncRNA 数据库 NONCODE (www.noncode.org)中已登录的人类 lncRNA 基因多达 54 073 个，绝大部分 lncRNA 基因功能未知[14]，系统了解 lncRNA 在不同细胞类型不同病理条件下的表达状态，筛选差异表达 lncRNA 是研究 lncRNA 的第一步. Wu 等[10]利用 HELP-tagging 技术结合第二代测序对食道腺癌组织中的全基因组甲基化谱进行了研究，发现 lncRNA AFAP1-AS1 基因位点在食道癌中由于低甲基化而呈现高表达. 鼻咽癌是中国南方常见的高发恶性肿瘤[15-16]，Bo (孛昊)等[11]利用基因芯片技术构建了鼻咽癌组织中的 lncRNA 表达谱，从中筛选和验证了 AFAP1-AS1 在鼻咽癌组织中高表达，随后在大量鼻咽癌石蜡存档样本中通过原位杂交实验进一步证实了 AFAP1-AS1 的高表达与鼻咽癌患者的临床分期、淋巴结转移、远处转移及不良预后密切相关，AFAP1-AS1 高表达的患者总体生存时间和无病生存时间均短于 AFAP1-AS1 低表达的患者. 另外，通过对美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 GEO 数据库 (Gene Expression Omnibus)中已发表的 4 组独立的肺癌基

* 国家自然科学基金(81172189, 81272298, 81372907, 81301757, 81472531, 81402009, 81528019, 81572787)和湖南省自然科学基金(14JJ1010, 2015JJ1022)资助项目.
** 通讯联系人. Tel: 0731-84805383
熊 炜. E-mail: xiongwei@csu.edu.cn
李桂源. E-mail: lgy@csu.edu.cn
收稿日期：2015-06-09，接受日期：2015-09-10

因芯片数据进行数据挖掘[17-20]，我们发现AFAP1-AS1在全部4组肺癌样本中表达都显著高于对照样本，且AFAP1-AS1高表达的患者生存时间明显短于AFAP1-AS1低表达的患者[12]. Ye等[13]同样利用lncRNA芯片技术，筛选了胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma)中的差异表达lncRNA，发现AFAP1-AS1在胰腺导管腺癌中同样高表达，AFAP1-AS1的高表达与肿瘤的侵袭、转移及患者的不良预后密切相关.

2 干扰AFAP1-AS1的表达抑制肿瘤细胞侵袭转移

发现AFAP1-AS1在恶性肿瘤中高表达且与肿瘤侵袭转移及不良预后相关后，上述三个课题组都对AFAP1-AS1在恶性肿瘤发生发展中的生物学功能进行了初步探讨，通过Transwell实验或者细胞划痕等实验发现，用siRNA或者shRNA技术干扰AFAP1-AS1的表达后，食道癌[10]、鼻咽癌[11]、肺癌[12]和胰腺癌[13]等肿瘤细胞的侵袭和迁移能力都受到了明显的抑制. Bo(孛昊)等[11]还利用裸鼠尾静脉注射-肺转移模型，在体内(*in vivo*)验证了在高转移潜能的鼻咽癌细胞株5-8F中敲低AFAP1表达后，裸鼠肺转移灶数目减少且转移灶小于对照组，表明在鼻咽癌细胞中抑制AFAP1-AS1表达后，细胞转移能力显著下降.

3 AFAP1-AS1调控其反义链蛋白编码基因AFAP1的表达

最近的研究发现，位于蛋白质编码基因反义链(antisense)的lncRNA往往可以通过调控其互补链上蛋白编码基因的表达或改变其可变剪接形式来发挥生物学功能[21-24]. AFAP1-AS1基因全称为AFAP1 antisense RNA 1，就是位于蛋白质编码基因AFAP1反义链上的lncRNA，AFAP1 (actin filament associated protein 1，原名AFAP-110)是一个肌动纤维相关蛋白，作为一个肌动蛋白与其他蛋白间的连接(adaptor)分子，AFAP1可被PKC磷酸化而激活，并活化Src等蛋白，从而导致肌动蛋白纤维(细胞骨架中微丝的主要成分)完整性的改变，影响细胞的吞噬、运动及肿瘤的侵袭与转移[25-30]. 而AFAP1-AS1的第2外显子刚好与AFAP1的第14、15和16外显子重叠、互补[11]. 我们随后也确实发现在鼻咽癌细胞中敲低AFAP1-AS1的表达可以抑制AFAP1的表达[11].

4 AFAP1-AS1可能通过Rho/Rac通路促进肿瘤侵袭转移

为了获得AFAP1-AS1促进肿瘤细胞侵袭转移的进一步的功能线索，我们利用蛋白质组学平台检测了敲低AFAP1-AS1前后鼻咽癌细胞中蛋白质组水平的表达变化图谱，发现敲低AFAP1-AS1后，鼻咽癌细胞中可检测出差异表达蛋白209个(133个上调，76个下调)，对这些差异表达蛋白进行功能聚类和信号通路分析，发现其中有多个蛋白是Rho/Rac通路成员，采用Western blotting对蛋白质组学筛选出来的Rho/Rac通路部分关键成员的表达进行了验证[11]. Rho/Rac蛋白家族是Ras蛋白超家族(Ras superfamily)中的一个分支，它们可通过影响微管和微丝的聚合与稳定性，调节细胞骨架的重构，从而在细胞极性和形态的维持，以及细胞黏附、侵袭与迁移等过程中发挥重要的调节功能[31]. 我们随后检测了敲低AFAP1-AS1后鼻咽癌细胞中细胞骨架的变化情况，敲低AFAP1-AS1表达后，对细胞中F-actin染色，发现细胞中应力纤维(stress fiber)完整性和分布都发生了明显的改变，表明AFAP1-AS1确实参与了细胞内微管微丝的聚合和稳定性，调节了细胞骨架的重构，这可能是它参与调控肿瘤细胞侵袭与迁移的分子机制之一[11].

5 研究展望

我们及其他几个课题组在肿瘤活检组织或存档的石蜡标本中检测AFAP1-AS1的表达，证实AFAP1-AS1在多种恶性肿瘤中表达上调，且与患者的不良预后相关[10-13]，因此AFAP1-AS1是一个新的肿瘤预后分子标记，具有一定的临床应用前景. 但从肿瘤组织中检测AFAP1-AS1的表达，不论是抽提RNA后采用Real-time PCR的方法，还是在石蜡切片中采用原位杂交的方法，都不够便捷，这将限制其临床应用[32-34]. 最近的研究发现，存在于血液(血清或血浆)等体液中的细胞外游离核酸(循环核酸，circulating nucleic acid，CNA)与人体的生理和病理状态密切相关[35-37]，在恶性肿瘤组织中高表达的一些RNA，包括lncRNA[38]和miRNA[39]能在患者外周血中检测到. 因此循环核酸作为一种微创、简便的肿瘤生物学标记检测方法，在肿瘤的早期诊断、预后预测等方面具有重要意

义．下一步我们将进一步探讨肿瘤患者外周血中 AFAP1-AS1 的表达水平及其临床意义，以期建立基于 AFAP1-AS1 的新的肿瘤预后检测方法．在机制研究方面，尽管我们已初步证实了 AFAP1-AS1 通过调控其反义链上的蛋白质编码基因 AFAP1 的表达，并通过 AFAP1 影响 Rho/Rac 信号通路，调控细胞骨架重构，从而促进肿瘤的侵袭转移，但其中更具体的分子机制，比如 AFAP1-AS1 是如何调控 AFAP1 表达的，AFAP1 又是如何调控 Rho/Rac 通路的，AFAP1 及 Rho/Rac 通路对细胞骨架重构的精细调控机制等，还值得进一步深入探讨．

目前已发现的 lncRNA 基因的数目已远远超过了蛋白质编码基因，但已鉴定的 5 万多个 lncRNA 基因中，报道有功能的仅数百个[40]，相对于蛋白质编码基因[41−46]以及小分子 RNAs(如 miRNA 等[47−51])，lncRNAs 的研究还刚刚兴起，绝大部分 lncRNA 的功能还有待深入研究．因此，深入研究 lncRNA 的功能，不仅可以从蛋白质编码基因以外的角度重新注释和阐明基因组的结构与功能，深入地探讨生命活动的本质和规律，还有望从一个新的视角认识包括肿瘤在内的多种人类常见疾病的发病机理，并为这些疾病的诊断与治疗提供更多的新的分子标志物与治疗靶点．

参 考 文 献

[1] Maher B. ENCODE: The human encyclopaedia. Nature, 2012, **489**(7414): 46−48

[2] 唐 珂, 魏 芳, 孛 昊, 等. 一个肝癌相关长链非编码 RNA 的克隆及序列分析. 生物化学与生物物理进展, 2014, **41**(2): 153−162
Tang K, Wei F, Bo H, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2014, **41**(2): 153−162

[3] Yang Y, Umetsu J, Lu Z J. Global signatures of protein binding on structured RNAs in Saccharomyces cerevisiae. Sci China Life Sci, 2014, **57**(1): 22−35

[4] Gong Z, Zhang S, Zeng Z, *et al*. LOC401317, a p53-regulated long non-coding RNA, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the nasopharyngeal carcinoma cell line HNE2. PloS One, 2014, **9**(11): e110674

[5] 李雨薇, 王裕民, 张雪莹, 等. 长链非编码 RNA HOTAIR 在恶性肿瘤中的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2015, **42**(3): 228−235
Li Y W, Wang Y M, Zhang X Y, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2015, **42**(3): 228−235

[6] Gong Z, Zhang S, Zhang W, *et al*. Long non-coding RNAs in cancer. Sci China Life Sci, 2012, **55**(12): 1120−1124

[7] Huang B. Long non-coding RNA: dancing on immune stage. Sci China Life Sci, 2014, **57**(6): 643−644

[8] Zhang W, Huang C, Gong Z, *et al*. Expression of LINC00312, a long intergenic non-coding RNA, is negatively correlated with tumor size but positively correlated with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. J Mol Histol, 2013, **44**(5): 545−554

[9] Zeng Z, Fan S, Zhang X, *et al*. Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 (EBER-1) could predict good prognosis in nasopharyngeal carcinoma. Clin Transl Oncol, 2015[Epub ahead of print]

[10] Wu W, Bhagat T D, Yang X, *et al*. Hypomethylation of noncoding DNA regions and overexpression of the long noncoding RNA, AFAP1-AS1, in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. Gastroenterology, 2013, **144**(5): 956−966 e954

[11] Bo H, Gong Z, Zhang W, *et al*. Upregulated long non-coding RNA AFAP1-AS1 expression is associated with progression and poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. Oncotarget, 2015, **6**(24): 20404−20418

[12] Zeng Z, Bo H, Gong Z, *et al*. AFAP1-AS1, a long noncoding RNA upregulated in lung cancer and promotes invasion and metastasis. Tumour Biol, 2015[Epub ahead of print]

[13] Ye Y, Chen J, Zhou Y, *et al*. High expression of AFAP1-AS1 is associated with poor survival and short-term recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma. J Transl Med, 2015, **13**: 137

[14] Xie C, Yuan J, Li H, *et al*. NONCODEv4: exploring the world of long non-coding RNA genes. Nucleic Acids Res, 2014, **42**(Database issue): D98−103

[15] Xiong W, Zeng Z Y, Xia J H, *et al*. A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to familial nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res, 2004, **64**(6): 1972−1974

[16] Zeng Z, Zhou Y, Zhang W, *et al*. Family-based association analysis validates chromosome 3p21 as a putative nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus. Genet Med, 2006, **8**(3): 156−160

[17] Okayama H, Kohno T, Ishii Y, *et al*. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. Cancer Res, 2012, **72**(1): 100−111

[18] Lu T P, Tsai M H, Lee J M, *et al*. Identification of a novel biomarker, SEMA5A, for non-small cell lung carcinoma in nonsmoking women. Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev, 2010, **19**(10): 2590−2597

[19] Sanchez-Palencia A, Gomez-Morales M, Gomez-Capilla J A, *et al*. Gene expression profiling reveals novel biomarkers in nonsmall cell lung cancer. Int J Cancer, 2011, **129**(2): 355−364

[20] Botling J, Edlund K, Lohr M, *et al*. Biomarker discovery in non-small cell lung cancer: integrating gene expression profiling, meta-analysis, and tissue microarray validation. Clin Cancer Res, 2013, **19**(1): 194−204

[21] Sung Y Y, Cheung E. Antisense now makes sense: dual modulation of androgen-dependent transcription by CTBP1-AS. EMBO J, 2013, **32**(12): 1653−1654

[22] Takayama K, Horie-Inoue K, Katayama S, *et al*. Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. EMBO J, 2013, **32**(12): 1665−1680

[23] Sehgal L, Mathur R, Braun F K, *et al*. FAS-antisense 1 lncRNA and production of soluble versus membrane Fas in B-cell lymphoma.

Leukemia, 2014, **28**(12): 2376-2387

[24] Yuan S X, Tao Q F, Wang J, *et al*. Antisense long non-coding RNA PCNA-AS1 promotes tumor growth by regulating proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett, 2014, **349**(1): 87-94

[25] Baisden J M, Gatesman A S, Cherezova L, *et al*. The intrinsic ability of AFAP-110 to alter actin filament integrity is linked with its ability to also activate cellular tyrosine kinases. Oncogene, 2001, **20**(45): 6607-6616

[26] Baisden J M, Qian Y, Zot H M, *et al*. The actin filament-associated protein AFAP-110 is an adaptor protein that modulates changes in actin filament integrity. Oncogene, 2001, **20**(44): 6435-6447

[27] Qian Y, Baisden J M, Cherezova L, *et al*. PC phosphorylation increases the ability of AFAP-110 to cross-link actin filaments. Mol Biol Cell, 2002, **13**(7): 2311-2322

[28] Gatesman A, Walker V G, Baisden J M, *et al*. Protein kinase Calpha activates c-Src and induces podosome formation *via* AFAP-110. Mol Cell Biol, 2004, **24**(17): 7578-7597

[29] Zhang J, Park S I, Artime M C, *et al*. AFAP-110 is overexpressed in prostate cancer and contributes to tumorigenic growth by regulating focal contacts. J Clin Invest, 2007, **117**(10): 2962-2973

[30] Clump D A, Yu J J, Cho Y, *et al*. A polymorphic variant of AFAP-110 enhances cSrc activity. Transl Oncol, 2010, **3**(4): 276-285

[31] Ridley A. GTPase switch: Ras then Rho and Rac. Nature Cell Biol, 2013, **15**(4): 337

[32] Zeng Z, Zhou Y, Xiong W, *et al*. Analysis of gene expression identifies candidate molecular markers in nasopharyngeal carcinoma using microdissection and cDNA microarray. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, **133**(2): 71-81

[33] Zeng Z Y, Zhou Y H, Zhang W L, *et al*. Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway. Human Pathol, 2007, **38**(1): 120-133

[34] Zhou Y, Zeng Z, Zhang W, *et al*. Identification of candidate molecular markers of nasopharyngeal carcinoma by microarray analysis of subtracted cDNA libraries constructed by suppression subtractive hybridization. Eur J Cancer Prev, 2008, **17**(6): 561-571

[35] Wimberger P, Roth C, Pantel K, *et al*. Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. Int J Cancer, 2011, **128**(11): 2572-2580

[36] Lim S H, Becker T M, Chua W, *et al*. Circulating tumour cells and circulating free nucleic acid as prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. Cancer Lett, 2014, **346**(1): 24-33

[37] Beck J, Urnovitz H B, Riggert J, *et al*. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. Clin Chem, 2009, **55**(4): 730-738

[38] Dong L, Qi P, Xu M D, *et al*. Circulating CUDR, LSINCT-5 and PTENP1 long noncoding RNAs in sera distinguish patients with gastric cancer from healthy controls. International Journal of Cancer, 2015[Epub ahead of print]

[39] Zeng X, Xiang J, Wu M, *et al*. Circulating miR-17, miR-20a, miR-29c, and miR-223 combined as non-invasive biomarkers in nasopharyngeal carcinoma. PloS One, 2012, **7**(10): e46367

[40] Gong Z, Yang Q, Zeng Z, *et al*. An integrative transcriptomic analysis reveals p53 regulated miRNA, mRNA and lncRNA networks in nasopharyhgeal carcinoma. Tumour Biol, 2015 [Epub ahead of print]

[41] Xu K, Xiong W, Zhou M, *et al*. Integrating ChIP-sequencing and digital gene expression profiling to identify BRD7 downstream genes and construct their regulating network, Mol Cell Biochem, 2015 [Epub ahead of print]

[42] Liao Q, Zeng Z, Guo X, *et al*. LPLUNC1 suppresses IL-6-induced nasopharyngeal carcinoma cell proliferation *via* inhibiting the Stat3 activation. Oncogene, 2014, **33**(16): 2098-2109

[43] Yang Y, Liao Q, Wei F, *et al*. LPLUNC1 inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth *via* down-regulation of the MAP kinase and cyclin D1/E2F pathways. PloS One, 2013, **8**(5): e62869

[44] Zeng Z, Huang H, Zhang W, *et al*. Nasopharyngeal carcinoma: advances in genomics and molecular genetics. Sci China Life Sci, 2011, **54**(10): 966-975

[45] Zhang W, Fan S, Zou G, *et al*. Lactotransferrin could be a novel independent molecular prognosticator of nasopharyngeal carcinoma. Tumour Biol, 2015, **36**(2): 675-683

[46] Zhang W, Zeng Z, Fan S, *et al*. Evaluation of the prognostic value of TGF-beta superfamily type I receptor and TGF-beta type Ⅱ receptor expression in nasopharyngeal carcinoma using high-throughput tissue microarrays. J Mol Histol, 2012, **43**(3): 297-306

[47] 范元元, 龙 波, 刘 昉, 等. 心肌细胞特异性 miR-30b 转基因小鼠的建立及其功能研究. 生物化学与生物物理进展, 2014, **41**(6): 575-582
Fan Y Y, Long B, Liu F, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2014, **41**(6): 575-582

[48] 潘耀谦, 潘 博, 刘兴友, 等. Dicer 及其 miRNAs 是血管平滑肌细胞分化和增殖所必需的基因和调节因子. 生物化学与生物物理进展, 2014, **41**(12): 1255-1264
Pan Y Q, Pan B, Liu X Y, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2014, **41**(12): 1255-1264

[49] 吴 刚, 王 丹, 黄 毅, 等. 衰老相关 microRNAs 研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2014, **41**(3): 273-287
Wu G, Wang D, Huang Y, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2014, **41**(3): 273-287

[50] Song X, Shan D, Chen J, *et al*. miRNAs and lncRNAs in vascular injury and remodeling. Sci China Life Sci, 2014, **57**(8): 826-835

[51] Zeng Z, Huang H, Huang L, *et al*. Regulation network and expression profiles of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs and their potential target host genes in nasopharyngeal carcinomas. Sci China Life Sci, 2014, **57**(3): 315-326