

## •原创论著•

译作已获得版权所有者许可

假基因来源的lncRNA *DUXAP8*表观遗传沉默  
CDKN1A和KLF2促进胰腺癌细胞的生长Yifan Lian<sup>1,2</sup>, Jiebin Yang<sup>1,2</sup>, Yikai Lian<sup>1,2</sup>, Chuangxing Xiao<sup>1,2</sup>, Xuezhen Hu<sup>3\*</sup> and Hongzhi Xu<sup>1,2\*</sup>

**【摘要】 背景与目的** 最近研究表明假基因来源的长链非编码RNA (long non-coding RNAs, lncRNA) 是癌症的关键调控因子。然而, 在胰腺癌中却鲜有对lncRNA的鉴定和研究。我们旨在明确假基因来源的lncRNA *DUXAP8*与胰腺癌细胞生长的关系。**方法** 我们通过比较分析3个来自GEO的独立数据集, 筛选出与人胰腺癌相关的假基因来源的lncRNA。通过实时定量反转录PCR检测*DUXAP8*在胰腺癌组织和细胞中的相对表达水平。应用功能缺失的方法在体外和体内研究*DUXAP8*对胰腺癌细胞的增殖和凋亡的作用。在胰腺癌细胞中通过RNA免疫沉淀、染色质免疫沉淀和挽救实验分析*DUXAP8*与靶蛋白和基因的关系。**结果** *DUXAP8*在胰腺癌组织中的表达水平显著高于配对的癌旁正常组织。*DUXAP8*的高表达与胰腺癌患者的肿瘤体积较大、病理分期较晚和总生存期较短相关。此外, 在体外和体内通过siRNA或shRNA沉默*DUXAP8*表达可抑制胰腺癌细胞增殖并促进细胞凋亡。机制研究表明, *DUXAP8*部分地通过下调肿瘤抑制因子CDKN1A和KLF2表达调控胰腺癌细胞增殖。**结论** 我们的结果表明, 假基因来源的lncRNA *DUXAP8*的表达在胰腺癌进展中起到重要作用。*DUXAP8*可作为胰腺癌的候选生物标志物及新的治疗靶点。

**【关键词】** 胰腺癌; 增殖; 假基因; *DUXAP8*; CDKN1A; KLF2

胰腺癌是一种恶性程度很高的的消化系统恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。在发达国家, 2012年约有187,500人被诊断为胰腺癌, 184,400人死于该病<sup>[2]</sup>。虽然, 在包括早期发现、外科手术、全身化疗和靶向治疗在内的多个领域研究已取得了进展, 使胰腺癌治疗得到改

善<sup>[3]</sup>, 但尚未转化为临床获益: 胰腺癌患者5年总生存 (overall survival, OS) 率仅为5%<sup>[4]</sup>。阐明胰腺癌进展的分子机制对于提高胰腺癌患者的疗效具有重要意义, 但目前对胰腺癌进展的机制知之甚少。因此, 鉴定与胰腺癌进展相关的新的诊断和/或预后生物标志物具有重要的临床意义。

全基因组和转录组测序技术逐渐阐明了人类基因组的构成, 其中只有不到2%的基因是蛋白质编码基因, 其余为非编码基因, 包括假基因、microRNA基因和长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 基因<sup>[5, 6]</sup>。假基因是基因复制的结果, 复制

\*通讯作者: Xuezhen Hu, njhzh@126.com; Hongzhi Xu, xhxzmzsh@aliyun.com

<sup>1</sup>消化内科, 厦门大学附属中山医院, 厦门361005, 福建, 中国;

<sup>2</sup>微生物生态研究所, 厦门大学, 厦门361005, 福建, 中国; <sup>3</sup>江苏省中医院, 南京中医药大学附属医院, 南京210029, 江苏, 中国

原文链接: <https://cancercommun.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40880-018-0333-9>

的基因通过点突变或移码突变等分子事件丧失了蛋白质编码能力<sup>[6,7]</sup>。有趣的是，发现许多假基因被转录为长链非编码RNA，通过作为不同蛋白质复合物的支架或微小RNA (microRNA, miRNA) 的内源竞争者起作用，在基因表达的转录或转录后调控中发挥生物学功能<sup>[8]</sup>。一些研究<sup>[9]</sup>发现了经典的假基因POU5F1B、PTENP1和DUXAP10在人类癌症中的生物学作用。然而，与lncRNA类似，假基因在胰腺癌中的功能还需要进一步研究。

以往研究<sup>[12,13]</sup>显示，假基因来源的lncRNAs也可以通过其他机制调节基因表达，如与某些RNA结合蛋白结合，以及通过lncRNA调节靶基因。魏等人<sup>[11]</sup>报道在非小细胞肺癌中假基因DUXAP10通过与LSD1相互作用并抑制LATS2和RRAD，从而促进细胞增殖和侵袭。郭等人<sup>[14]</sup>报道假基因PTENP1通过调节PTEN表达抑制胃癌细胞的侵袭。

在本研究中，我们旨在研究DUXAP8表达与胰腺癌患者OS的关系，并进一步阐明在体外和体内DUXAP8对胰腺癌细胞生长的影响及其分子机制。本研究首次直接证明了DUXAP8是一个关键而强效的调控因子，其在细胞核中通过沉默CDKN1A和KLF2而调控胰腺癌进展。表明DUXAP8是胰腺癌的潜在治疗靶标。

## 1 方法

### 1.1 伦理声明

本研究方案获得厦门大学研究伦理委员会批准。所有患者签署了书面知情同意书。人组织标本的处理完全符合国家和相关机构的指导方针和规定。所有患者数据都被去除个人信息用于分析和匿名化。动物研究严格遵照美国国立卫生研究院的“实验动物护理和使用指南”进行。

### 1.2 微阵列和计算分析

从Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 下载包括GSE16515、GSE15932和GSE15471的3个人微阵列数据集，使用Robust Multichip Average (RMA) 进行标准化。从GEO下载探针序列，根据针对假基因或lncRNA的第19版GENCODE使用bowtie软件重新注释探针。

### 1.3 组织的收集

共收集58例在2007至2012年期间，于厦门大学中山医院经病理确认患有胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 后接受手术切除且未经治疗的患者纳入本研究。将所有组织标本在液氮中快速冷冻并储存在-80°C直至使用。患者的临床病理特征见表1。

### 1.4 定量逆转录聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain Reaction, qRT-PCR) 检测

使用TRIZOL试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 从胰腺癌细胞或组织中提取细胞总RNA。通过NanoDrop2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 测定RNA含量。使用Reverse Transcription Kit (Takara, Dalian, China) 将1 μg RNA逆转录成cDNA，在ABI 7500上进行qRT-PCR。以GAPDH作为内参对靶基因表达进行标准化。引物序列见附件1：表S1。

表1 DUXAP8表达水平与PDAC患者临床病理特征的相关性  
Table 1 Correlation between DUXAP8 expression and clinicopathologic characteristics of patients with PDAC

Characteristics	N	Percent (%)	DUXAP8 level		P
			Low	High	
Total cases	58	100	29	29	
Gender					0.790
Male	34	58.6	16	18	
Female	24	41.4	13	11	
Age (years)					1.000
<65	29	50.0	14	15	
≥65	29	50.0	15	14	
Tumor size					0.033
<3 cm	25	43.1	17	8	
≥3 cm	33	56.9	12	21	
Differentiation					0.289
Well/moderate	25	43.1	15	10	
Poor	33	56.9	14	19	
TNM stage					0.034
I/II	27	46.6	18	9	
III/IV	31	53.4	11	20	
Lymph-node metastasis					0.065
Negative	30	51.7	19	11	
Positive	28	48.3	10	18	

## 1.5 细胞

胰腺癌细胞系 (AsPC-1、BxPC-3和PANC-1) 和正常人胰腺HPDE6细胞系取自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。在37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下, 细胞培养于含有10%胎牛血清 (FBS, HyClone, Camarillo, CA, USA)、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素 (Invitrogen, 上海, 中国) 的RPMI 1640或DMEM (Invitrogen) 培养基中。

## 1.6 转染

将胰腺癌细胞 ( $5 \times 10^5$ 个/孔) 接种于6孔板中。第2天, 使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将特异性小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) (100 nmol/L) 或随机对照siRNA (100 nmol/L) 转染入细胞。转染48 h后收集细胞用于后续实验。引物序列和siRNA序列见附件1: 表S1。

## 1.7 细胞活力和集落形成实验

将AsPC-1、BxPC-3和PANC-1细胞 (3000个/孔) 接种于96孔板中, 并用特异性或对照siRNA进行转染。使用Cell Proliferation Reagent Kit I (MTT; Roche Applied Science) 检测细胞活力。每个实验至少进行3次独立实验, 每组实验设置5个重复。

将500个细胞接种于6孔板中, 用含有10% FBS的培养基传代培养。每隔3 d补充1次培养基。2周后, 用甲醇固定细胞, 再用0.1%结晶紫 (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) 染色。通过计数染色的克隆集落数确定可见的克隆集落形成。由50个或更多细胞组成的细胞团被认为是克隆集落, 并进行评分。每个实验至少进行3次独立实验, 每组实验设置3个重复。

## 1.8 流式细胞术

用合适的特异性或对照siRNA转染BxPC-3和PANC-1细胞, 随后使用Cycle TEST™ PLUS DNA试剂盒 (BD Biosciences) 进行碘化丙啶染色。通过配备有Cell Quest软件 (BD Biosciences) 的流式细胞仪 (FACScan; BD Biosciences) 分析细胞的DNA含量。基于相对DNA含量计算G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>、S或G<sub>2</sub>-M期细胞所占百分比。

为了分析细胞凋亡, 在转染48 h后收集BxPC-3和PANC-1细胞。室温下, 在暗处用异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 膜联蛋白V和碘化丙啶染色。然后, 通过FACScan分析细胞并计数活

细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞或死细胞。

## 1.9 异种移植实验

4周龄雄性无胸腺小鼠购自厦门大学动物中心, 并饲养于特定的无病原体条件下的层流柜中。用sh-DUXAP8或空载体转染BxPC-3细胞。收集转染后细胞, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 洗涤, 并将细胞重悬 ( $2 \times 10^7$ 个/mL)。在每只小鼠的右下腹部注射100  $\mu$ L细胞悬浮液 (每组n = 6)。每3 d检测1次肿瘤生长情况, 用卡尺测量肿瘤的长度 (L) 和宽度 (W) 来确定肿瘤体积 (V), 根据公式  $V = (L \times W^2) \times 0.5$  计算肿瘤体积。在接种15 d后, 从所有小鼠中取出肿瘤。

## 1.10 RNA免疫沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP)

使用EZMagna RIP试剂盒 (Millipore, Billerica, MA, USA) 通过RNA免疫沉淀技术来研究DUXAP8是否可以与BxPC-3细胞中的候选结合蛋白 (EZH2和LSD1) 相互作用或结合。在完全RIP裂解缓冲液中裂解BxPC-3细胞, 并将细胞裂解物与偶联有针对EZH2和LSD1的抗体的磁珠或偶联对照IgG (Millipore, Bedford, MA, USA) 的磁珠在4°C共同孵育6 h。然后, 洗涤珠子并与蛋白酶K共同孵育以除去蛋白质。最后, 使用特异性引物对纯化的RNA进行qRT-PCR以检测DUXAP8的表达。

## 1.11 染色质免疫沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP)

如前<sup>[15]</sup>所述, 使用Magna ChIP试剂盒 (Millipore) 进行ChIP实验。回收沉淀的染色质DNA并通过qRT-PCR分析。引物序列见附件1: 表S1。

## 1.12 蛋白质免疫印迹实验

通过10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离细胞蛋白裂解物, 转移至0.22  $\mu$ m NC膜 (Sigma), 并与特异性抗体共同孵育。使用ECL显色底物通过光密度测定法进行定量 (Quantity One软件; Bio-Rad)。使用针对GAPDH、CDKN1A和KLF2的抗体检测靶蛋白 (Abcam, Hong Kong, China)。通过光密度测定法 (Quantity One软件; Bio-Rad) 对蛋白质条带定量, GAPDH为上样对照。

### 1.13 免疫组化

将来自裸鼠的肿瘤标本用苏木精 & 曙红 (H & E) 和Ki67染色用于免疫组织化学评估。抗Ki67抗体购自Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。为了将主观性降至最低, 染色结果由作者 (LYF) 和病理学家 (XCX) 独立评估。

### 1.14 统计分析

使用SPSS软件22.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 进行所有统计学分析。采用配对Student's t检验比较DUXAP8在PC癌组织与癌旁正常组织中的表达差异。采用卡方检验评估DUXAP8与临床病理学特征之间的关系。采用Kaplan-Meier法和log-rank检验分析生存数据。成对比较、多组比较和相关分析分别使用Graph Pad Prism 5软件 (Graph Pad软件公司) 进行配对Student's t检验、双因素ANOVA、线性回归检验和Pearson检验。所有数据均表示为平均值 ± 标准差 (Standard Deviation, SD)。P < 0.05 (双侧) 被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DUXAP8在PDAC组织中上调并预示较短的OS

为了鉴定参与胰腺肿瘤发生的lncRNA, 我们对来自GEO数据库的GSE16515、GSE15932和GSE15471的胰腺癌微阵列图谱进行了综合分析。GSE16515数据集中共有33个lncRNA上调, GSE15932数据集中有40个lncRNA上调, GSE15471数据集中有58个lncRNA上调 (变化倍数 > 2.0, P < 0.05; 图1a)。然而, 在所有上调的lncRNA中只有3个lncRNA在所有数据集中一致上调 (图1a、b)。鉴于胰腺癌中候选lncRNA的表达水平, 我们重点关注假基因来源的lncRNA DUXAP8, 并进行后续研究。DUXAP8位于染色体基因座22q11.1并编码2107 bp的转录物 (图1c)。为了验证分析结果, 我们在58例配对的PDAC癌组织和癌旁正常组织中检测了DUXAP8的表达水平, 发现DUXAP8在PDAC癌组织中的表达水平高于癌旁正常组织 (图1d)。

我们根据DUXAP8表达的中位数将患者分为高表达 (n = 29) 和低表达 (n = 29) 组, 进一步研究了DUXAP8表达水平与临床病理变量之间的关系。然后进行卡方检验以评估两组间的临床病理变量。

如表1所示, DUXAP8高表达和低表达组患者的肿瘤大小 (P = 0.033) 和TNM分期 (P = 0.0034) 显著不同 (图1e)。DUXAP8低表达组的中位OS为31个月 (范围: 1-55个月), DUXAP8高表达组的中位OS为14个月 (范围: 1-39个月) (P < 0.001; HR = 2.458, 95%CI: 1.902-6.439) (图1f)。

### 2.2 DUXAP8下调抑制胰腺癌细胞的增殖并诱导细胞凋亡

为了研究DUXAP8在胰腺癌细胞中的生物学功能, 我们首先通过qRT-PCR检测了DUXAP8在胰腺癌细胞中的表达水平。与正常HPDE6细胞相比, DUXAP8在胰腺细胞 (AsPC-1、BxPC-3和PANC-1) 中表达水平更高 (图2a)。用siRNAs敲低AsPC-1、BxPC-3和PANC-1细胞中的内源性DUXAP8表达后分别使DUXAP8表达水平降低了81.4%、89.4%和80.6% (图2b)。MTT实验结果表明敲低DUXAP8表达抑制了胰腺癌细胞的生长 (图2c)。集落形成实验结果显示, DUXAP8表达的下调抑制了AsPC-1、BxPC-3和PANC-1细胞的增殖能力 (图2d)。流式细胞术检测发现, 敲低DUXAP8表达使细胞周期停滞在G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>期并诱导BxPC-3和PANC-1细胞凋亡 (图2e、f)。

### 2.3 DUXAP8下调抑制胰腺癌异种移植物的生长

我们进一步研究了DUXAP8对BxPC-3异种移植植物生长的影响。与对照组相比, sh-DUXAP8显著抑制了异种移植物的生长, 肿瘤体积和重量显著降低 (图3a-c)。qRT-PCR检测结果显示, 源自sh-DUXAP8转染细胞的肿瘤组织中DUXAP8水平较低 (图3d)。免疫组织化学结果显示, 携带sh-DUXAP8转染细胞的肿瘤异种移植物的Ki67染色程度弱于对照异种移植植物 (图3e)。以上数据表明DUXAP8下调显著抑制了肿瘤异种移植物的生长。

### 2.4 DUXAP8作为EZH2和LSD1的组合支架, 从而表现遗传沉默CDKN1A和KLF2

通常, lncRNA通过与特异性RNA结合蛋白相互作用来激活癌基因或抑制肿瘤抑制因子, 参与调控癌细胞表型。为了研究DUXAP8在胰腺癌细胞中的分子机制, 我们在BxPC-3和PANC-1细胞中检测了敲低DUXAP8对9种不同的与细胞增殖相关的转录产物的影响 (图4a、b)。我们发现DUXAP8下调后了CDKN1A、CDKN2B、KLF2、Bax、caspase-3、caspase-9、PTEN和EMP1的mRNA转

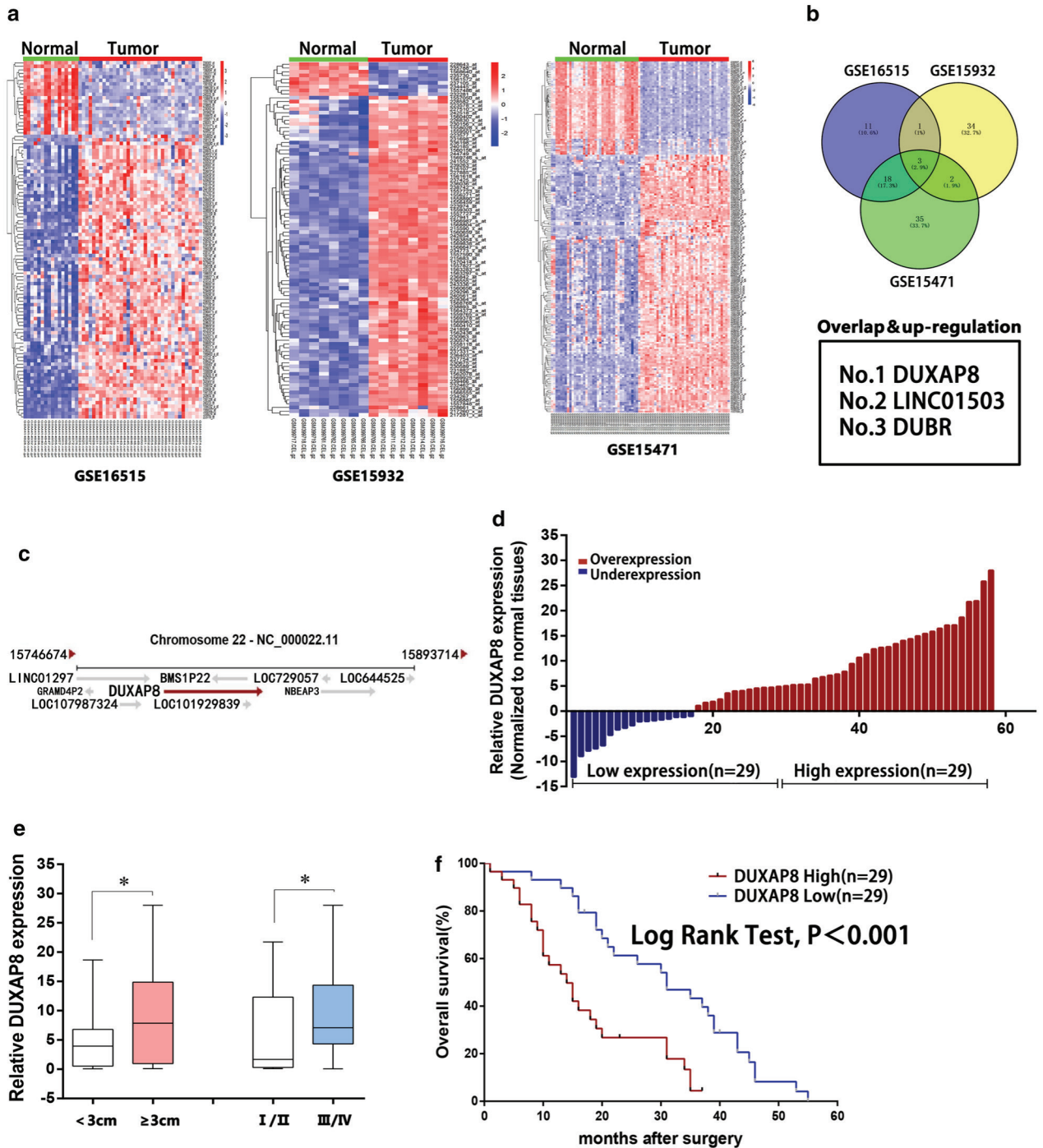


图 1 DUXAP8在胰腺癌组织中的相对表达水平及其临床意义

Fig. 1 Relative expression of DUXAP8 in pancreatic cancer tissues and its clinical significance. a: Hierarchical clustering analysis of differentially expressed lncRNAs (fold change > 2;  $P < 0.05$ ) in pancreatic cancer and normal tissues. b: Overlap of dysregulated lncRNAs in three GEO datasets. c: The DUXAP8 gene is located at the chromosomal locus 22q11.1 and encodes a 2107-bp transcript (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). d: Relative expression of DUXAP8 in pancreatic cancer tissues compared with paired adjacent normal tissues ( $n = 58$ ), and DUXAP8 expression was classified into two groups. e: DUXAP8 expression was significantly higher in patients with a larger tumor size and a more advanced pathological stage (shown as  $\Delta CT$ ). f: Patients with high DUXAP8 expression had significantly shorter overall survival than patients with low DUXAP8 expression ( $P < 0.001$ , log rank test). Bars: s.d., \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

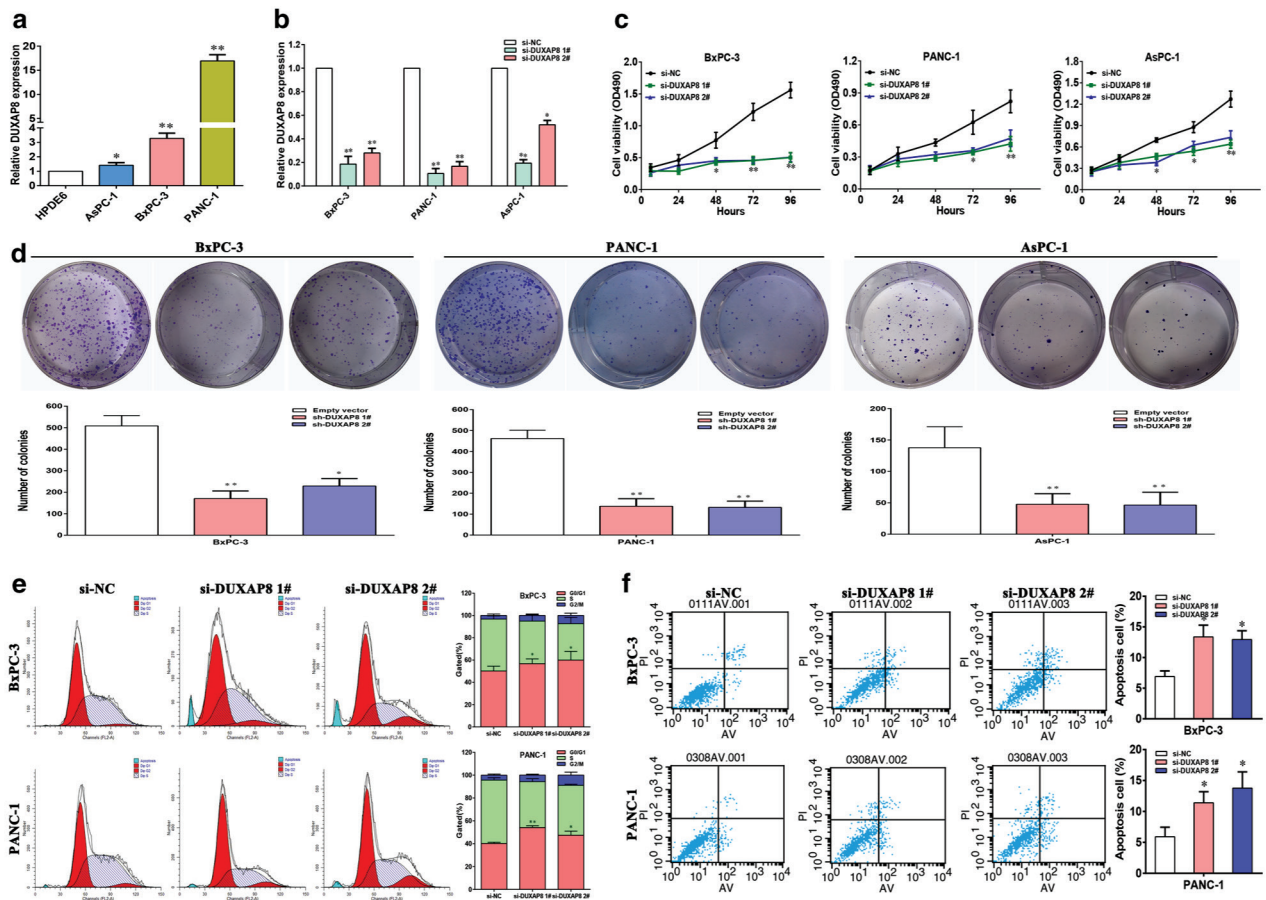


图 2 在体外DUXAP8对PC增殖和凋亡的影响

Fig. 2 Effects of DUXAP8 on PC proliferation and apoptosis in vitro. a: Analysis of DUXAP8 expression levels in PC cell lines (AsPC-1, BxPC-3 and PANC-1) compared with a normal pancreatic cell line (HPDE6) by qPCR. Data are shown as fold change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) and the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. b: DUXAP8 knockdown in PC cells transfected with si-DUXAP8 1# or si-DUXAP8 2#. c: MTT assays were performed to determine the cell viability of AsPC-1, BxPC-3 and PANC-1 cells after the transfection of siRNA against DUXAP8. d: Representative results of the colony formation of PC cells transfected with the siRNA of DUXAP8. e: Flow cytometry assays were performed to analysis the cell cycle progression when BxPC-3 and PANC-1 cells transfected with siRNA against DUXAP8. f: Flow cytometry assays were performed to analysis the cell apoptotic in siRNA-transfected BxPC-3 and PANC-1 cells. Representative images and data based on three independent experiments. Bars: s.d., \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

录水平显著增加 (图4a、b)。此外,生物信息学分析表明,2种染色质修饰物EZH2 (H3K27me3) 和LSD1 (H3K4me2) (<http://pridb.gdc.b.iastate.edu/RPISeq/references.php>) 可作为DUXAP8的结合蛋白 (图4c)。RIP实验结果显示,在BxPC-3细胞中DUXAP8可直接结合EZH2和LSD1 (图4d)。为了进一步研究与DUXAP8功能相关的候选基因,我们在BxPC-3细胞中检测了敲低LSD1或EZH2对9种不同的细胞增殖相关的转录产物的影响 (图4e-h)。结

果显示,只有CDKN1A和KLF2因为DUXAP8、LSD1或EZH2下调而一致性地上调 (图4i)。CDKN1A和KLF2是参与癌细胞增殖、凋亡和侵袭的新型肿瘤抑制因子<sup>[16-18]</sup>。因此,我们选择了CDKN1A和KLF2进行后续实验。

EZH2 是一种通过组蛋白3第27位赖氨酸的三甲基化 (H3K27me3) 来调节转录的负调控因子,而LSD1是通过组蛋白3第4位赖氨酸的去甲基化 (H3K4me2) 来调节转录的负调控因子<sup>[19,20]</sup>。

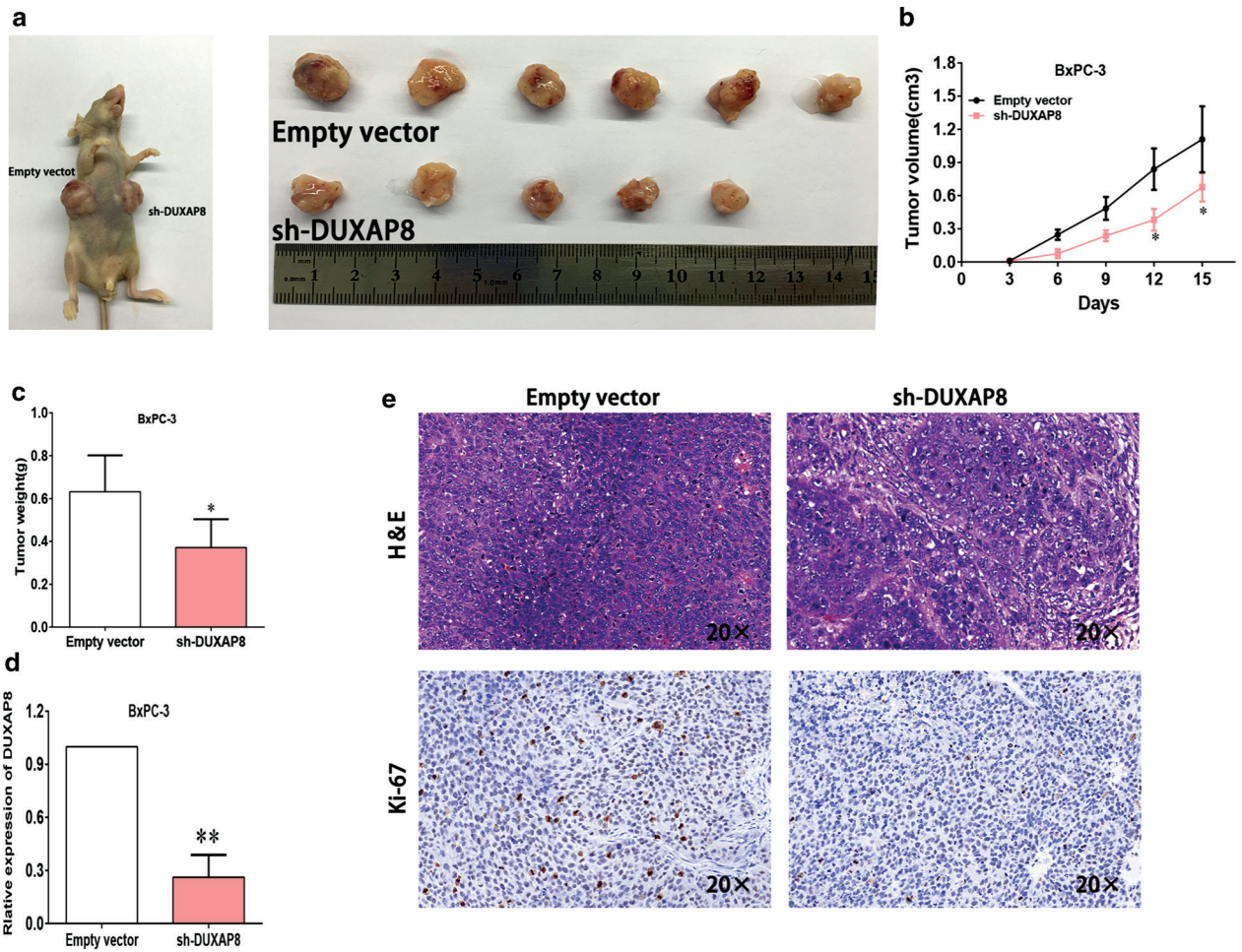


图3 在体内DUXAP8的沉默抑制PC生长

Fig. 3 The silencing of DUXAP8 inhibited PC growth in vivo. a: BxPC-3 cells with stable DUXAP8 knockdown were used for the in vivo study. Nude mice carrying tumors from respective groups are shown. b: Tumor volumes were calculated after injection every 3 days. c: Tumor weights from two groups are represented. d: Images of HE staining and immunohistochemistry of the xenograft tumors. Representative Ki-67 protein levels in xenograft tumors as evaluated by IHC. Representative images and data based on three independent experiments. e: qPCR was performed to detect the average expression of DUXAP8 in xenograft tumors ( $n = 6$ ). Bars: s.d, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

因此，DUXAP8可能通过将EZH2和LSD1募集到CDKN1A和KLF2启动子区域来抑制CDKN1A和KLF2表达，导致H3K27的三甲基化或该区域H3K4的去甲基化。为了验证这一假设，我们在CDKN1A和KLF2的启动子区域（2000 bp）设计了3对配对引物，并通过敲低DUXAP8进行ChIP实验。我们发现敲低DUXAP8后降低了EZH2和H3K27me3在CDKN1A和KLF2启动子区域的结合，并降低了LSD1和H3K4me2的结合（图4j、k）。以上结果表明DUXAP8可与EZH2和

LSD1结合而起到支架的作用，从而在胰腺癌细胞中表观遗传沉默CDKN1A和KLF2。

### 2.5 CDKN1A和KLF2的沉默部分地参与DUXAP8的致癌功能

20对胰腺癌组织和癌旁正常组织进行qRT-PCR分析的结果显示，CDKN1A和KLF2在癌组织中的表达水平较高（图5a、b）。为了验证CDKN1A和KLF2对胰腺癌细胞增殖的作用，我们在BxPC-3细胞中敲低CDKN1A和KLF2的表达（图5c-e）。MTT结

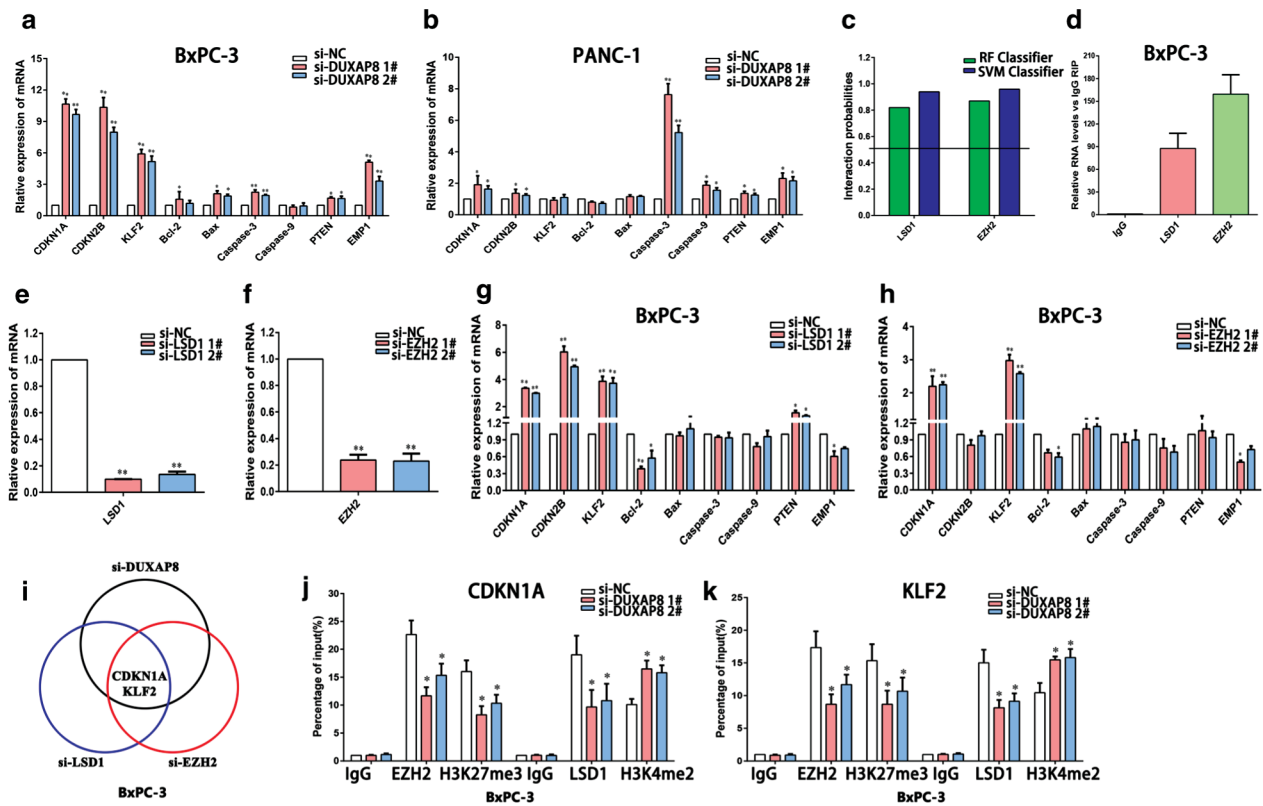


图 4 DUXAP8通过结合EZH2表观遗传沉默CDKN1A和KLF2转录

Fig. 4 DUXAP8 epigenetically silences CDKN1A and KLF2 transcription by binding with EZH2. a, b: The levels of CDKN1A, CDKN2B, KLF2, Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9, PTEN and EMP1 mRNA were detected by qPCR upon knockdown of DUXAP8 in BxPC-3 and PANC-1 cells. c: Bioinformatic analysis to predict the interaction probabilities of DUXAP8 and RNA binding proteins via RNA-protein interaction prediction (<http://pridb.gdc.broad.mit.edu/RPISeq/>). Predictions with probabilities > 0.5 were considered positive. RPISeq predictions are based on Random Forest (RF) or Support Vector Machine (SVM). d: RIP assays were performed in BxPC-3 cells and the coprecipitated RNA was subjected to qPCR for DUXAP8. e, f: LSD1 and EZH2 expression levels were determined by qPCR when LSD1 or EZH2 were knocked down in BxPC-3 cells. g, h: The levels of CDKN1A, CDKN2B, KLF2, Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9, PTEN and EMP1 mRNA after knockdown of LSD1 or EZH2 in BxPC-3 cells. i: Overlap of up-regulated genes after knockdown of DUXAP8, LSD1 and EZH2. j: ChIP-qPCR of H3K4me2 and LSD1, H3K27me3 and EZH2 of the promoter region of the CDKN1A locus after siRNA treatment targeting si-NC or si-DUXAP8 in BxPC-3 cells. k: ChIP-qPCR of H3K4me2 and LSD1, H3K27me3 and EZH2 of the promoter region of the KLF2 locus after siRNA treatment targeting si-NC or si-DUXAP8 in BxPC-3 cells. Bars: s.d., \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

果显示，敲低CDKN1A或KLF2表达可促进细胞增殖（图5f）。以上结果显示，CDKN1A和KLF2可抑制BxPC-3细胞的增殖，这与胰腺癌细胞中DUXAP8下调的作用相反。

接下来，我们进一步研究了在胰腺癌细胞中CDKN1A和KLF2是否参与DUXAP8诱导的促进细胞增殖，并进行了挽救实验。用si-DUXAP8、si-CDKN1A

或si-KLF2共转染BxPC-3细胞。MTT和集落形成实验结果显示，与si-DUXAP8转染的BxPC-3细胞相比，si-DUXAP8、si-CDKN1A或si-KLF2共转染的BxPC-3细胞的增殖能力得到恢复（图5g、h）。以上结果表明，DUXAP8部分地通过抑制CDKN1A和KLF2表达对胰腺癌细胞发挥致癌作用。



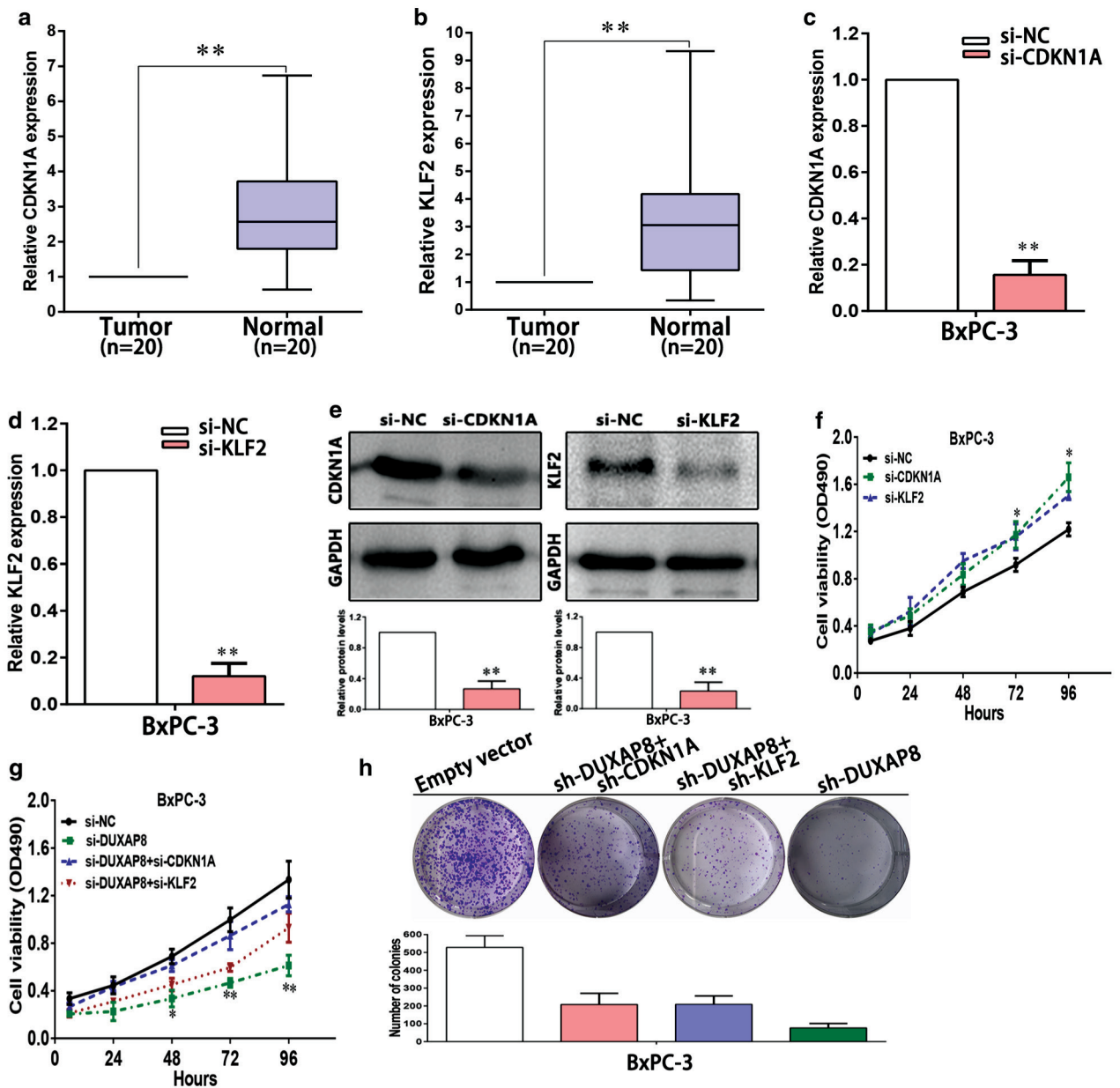


图5 拯救实验显示DUXAP8负调控KLF2表达

Fig. 5 DUXAP8 negatively regulates expression of KLF2 by rescue experiments. a, b: The levels of CDKN1A and KLF2 expression were determined by qPCR in 20 pairs of PC tissues. c, d: The levels of CDKN1A and KLF2 mRNA expression were determined by qPCR when BxPC-3 cells were transfected with si-NC, si-CDKN1A or si-KLF2. e: The CDKN1A and KLF2 protein levels were determined by Western blot in CDKN1A or KLF2 knockdown BxPC-3 cells. f: MTT assays were performed to determine the cell viability of BxPC-3 cells after the transfection of siRNA against CDKN1A or KLF2. g, h: MTT and colony formation assays were used to determine the cell proliferation ability for BxPC-3 cells transfected with si-NC and si-DUXAP8 and co-transfected with si-DUXAP8, si-CDKN1A or si-DUXAP8, si-KLF2. Representative images and data based on three independent experiments. Bars: s.d, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 3 讨论

近来,越来越多的研究显示,许多假基因被转

录成具有潜在生物学功能的长链非编码RNA<sup>[6,21]</sup>。Ma等人<sup>[13]</sup>最初报道了假基因来源的lncRNA DUXAP8。最近的研究表明, DUXAP8通过表观遗传沉默EGR1

和RHOB在非小细胞肺癌细胞的增殖和侵袭中起关键作用<sup>[13]</sup>。然而，在胰腺癌中DUXAP8表达的临床意义和功能尚未见报道。在本研究中，我们证明了假基因来源的lncRNA DUXAP8是胰腺癌进展的新的调控因子。我们的研究表明DUXAP8可作为胰腺癌干预的潜在治疗靶点。重要的是，DUXAP8在胰腺癌组织和细胞中显著上调。DUXAP8上调与胰腺癌患者较大的肿瘤体积、较晚的病理分期和较短的总生存期相关。与这些间接发现相一致，敲低DUXAP8后显著抑制了胰腺癌细胞的增殖，诱导细胞凋亡，并促进细胞周期停滞。DUXAP8诱导促进胰腺癌细胞增殖和肿瘤发生可部分地通过与EZH2和LSD1结合从而表观遗传沉默CDKN1A和KLF2的转录。总之，目前的研究表明假基因来源的lncRNA DUXAP8可作为非编码致癌基因在胰腺癌发生过程中起作用。

许多假基因来源的lncRNA可以通过与RNA结合蛋白（例如PRC2、SUV39H1和LSD1）相互作用来调控靶基因表达<sup>[12, 13, 22, 23]</sup>。EZH2是PRC2的重要催化亚基，具有组蛋白甲基转移酶活性，其特异性地诱导靶基因组蛋白H3第27位赖氨酸进行三甲基化（H3K27me3）<sup>[24]</sup>。EZH2过表达在人类肿瘤发生和发展中起到关键作用<sup>[19, 25]</sup>。LSD1也称为KDM1A，是组蛋白去甲基化酶，其特异性地使组蛋白H3的单甲基化或二甲基化的第4位赖氨酸（H3K4me2）去甲基化<sup>[26]</sup>。越来越多的证据表明，LSD1可能是一种新的细胞过程调控因子：在包括胰腺癌在内的许多癌症中均发现了LSD1的过度表达<sup>[27-29]</sup>。在之前的研究中，我们证明了在胰腺癌中lncRNA IRAIN通过与LSD1和EZH2结合来抑制细胞凋亡，并促进细胞增殖<sup>[30]</sup>。有趣的是，在本研究中，我们发现DUXAP8部分地通过与EZH2和LSD1结合从而表观遗传沉默CDKN1A和KLF2表达来介导致癌作用（图6）。

#### 4 结论

总之，我们报道了DUXAP8是胰腺癌中一种关键的促进肿瘤的假基因来源的lncRNA，其可作为治疗胰腺癌的新靶标。DUXAP8是否可以调控其他下游靶基因及其潜在的调控机制还需要进一步研究。

#### 附件

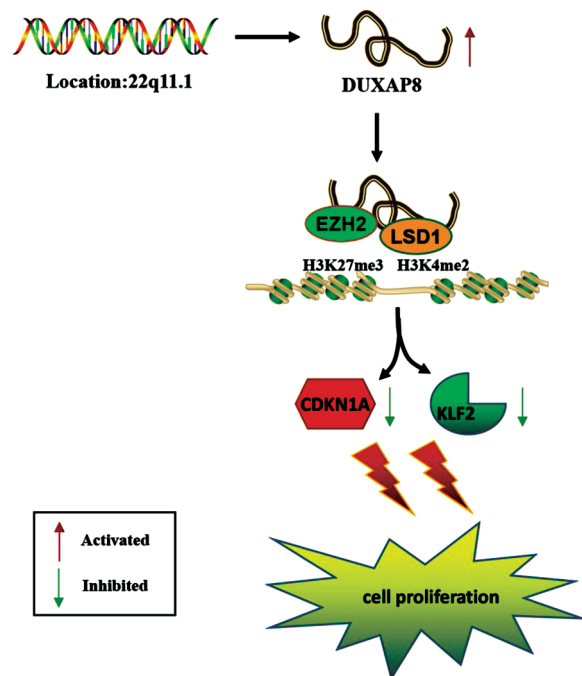


图6 DUXAP8作用的模式图

Fig. 6 Proposed model for the action of DUXAP8.

表S1. 研究中使用的引物序列和siRNA序列。详见链接：<https://doi.org/10.1186/s40880-018-0333-9>

#### 缩写

lncRNAs: 长链非编码RNA; DUXAP8: 双同源框A假基因8; KLF2: Kruppel样因子2; EZH2: zeste同源物2的增强子; LSD1: 赖氨酸特异性脱甲基酶1; PRC2: polycomb抑制复合物2; qRT-PCR: 定量逆转录聚合酶链反应; TNM: 肿瘤淋巴结转移; siRNA: 小干扰RNA

#### 作者贡献

LYF设计了本研究，研究了细胞的生物学功能，进行了RIP、ChIP和qRT-PCR实验，进行了统计分析并起草了手稿。YJB提供了组织标本和临床数据，并帮助起草手稿。LYK进行了Western印迹实验并参与了本研究的设计。XHZ和XCX构思了本项研

究，参与了研究设计和协调，并帮助起草了手稿。  
所有作者均阅读并同意了最终稿件。

#### 致谢

无。

#### 利益冲突

作者声明他们没有利益冲突。

#### 同意出版

无需。

#### 伦理批准与参与同意

本研究经厦门大学研究伦理委员会批准。所有患者签署了书面知情同意书。我们确认所有实验都是按照相关指南和规定进行的。

#### 资金

本研究得到国家自然科学基金（No.81602052、8160100460和8157040399）的资助。

#### 参考文献

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7–30.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87–108.
- King J, Bouvet M, Singh G, Williams J. Improving theranostics in pancreatic cancer. *J Surg Oncol.* 2017;116:104–13.
- Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, et al. Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(5):318–48.
- Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski F, et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012;22(9):1760–74.
- Shi X, Nie F, Wang Z, Sun M. Pseudogene-expressed RNAs: a new frontier in cancers. *Tumour Biol.* 2016;37(2):1471–8.
- Pink RC, Carter DR. Pseudogenes as regulators of biological function. *Essays Biochem.* 2013;54:103–12.
- Poliseno L, Marranci A, Pandolf PP. Pseudogenes in human cancer. *Front Med.* 2015;2:68.
- Hayashi H, Arai T, Togashi Y, Kato H, Fujita Y, De Velasco MA, et al. The OCT4 pseudogene POU5F1B is amplified and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer. *Oncogene.* 2015;34(2):199–208.
- Yu G, Yao W, Gumireddy K, Li A, Wang J, Xiao W, et al. Pseudogene PTENP1 functions as a competing endogenous RNA to suppress clear-cell renal cell carcinoma progression. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(12):3086–97.
- Wei CC, Nie FQ, Jiang LL, Chen QN, Chen ZY, Chen X, et al. The pseudo gene DUXAP10 promotes an aggressive phenotype through binding with LSD1 and repressing LATS2 and RRAD in non small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017;8(3):5233–46.
- Sun M, Nie FQ, Zang C, Wang Y, Hou J, Wei C, et al. The pseudogene DUXAP8 promotes non-small-cell lung cancer cell proliferation and invasion by epigenetically silencing EGR1 and RHOB. *Mol Ther.* 2017;25(3):739–51.
- Ma HW, Xie M, Sun M, Chen TY, Jin RR, Ma TS, et al. The pseudogene derived long noncoding RNA DUXAP8 promotes gastric cancer cell proliferation and migration via epigenetically silencing PLEKHO1 expression. *Oncotarget.* 2016;8:52211.
- Guo X, Deng L, Deng K, Wang H, Shan T, Zhou H, et al. Pseudogene PTENP1 suppresses gastric cancer progression by modulating PTEN. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016;16(4):456–64.
- Ding J, Xie M, Lian Y, Zhu Y, Peng P, Wang J, et al. Long noncoding RNA HOXA-AS2 represses P21 and KLF2 expression transcription by binding with EZH2, LSD1 in colorectal cancer. *Oncogenesis.* 2017;6(1):e288.
- Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):400–14.
- Xu TP, Liu XX, Xia R, Yin L, Kong R, Chen WM, et al. SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer. *Oncogene.* 2015;34(45):5648–61.
- Zhang D, Dai Y, Cai Y, Suo T, Liu H, Wang Y, et al. KLF2 is downregulated in pancreatic ductal adenocarcinoma and inhibits the growth and migration of cancer cells. *Tumour Biol.* 2016;37(3):3425–31.
- Yoo KH, Hennighausen L. EZH2 methyltransferase

- and H3K27 methylation in breast cancer. *Int J Biol Sci.* 2012;8(1):59–65.
20. Popova EY, Pinzon-Guzman C, Salzberg AC, Zhang SS, Barnstable CJ. LSD1-Mediated demethylation of H3k4me2 is required for the transition from late progenitor to differentiated mouse rod photoreceptor. *Mol Neurobiol.* 2016;53(7):4563–81.
21. Grandner D, Johnsson P. Pseudogene-expressed RNAs: emerging roles in gene regulation and disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016;394:111–26.
22. Poliseno L. Pseudogenes: newly discovered players in human cancer. *Sci Signal.* 2012;5(242):re5.
23. Scarola M, Comisso E, Pascolo R, Chiaradia R, Marion RM, Schneider C, et al. Epigenetic silencing of Oct4 by a complex containing SUV39H1 and Oct4 pseudogene lncRNA. *Nat Commun.* 2015;6:7631.
24. Yamaguchi H, Hung MC. Regulation and role of EZH2 in cancer. *Cancer Res Treat.* 2014;46(3):209–22.
25. Chase A, Cross NC. Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(9):2613–8.
26. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 2004;119(7):941–53.
27. Shi X, Ma C, Zhu Q, Yuan D, Sun M, Gu X, et al. Upregulation of long intergenic noncoding RNA 00673 promotes tumor proliferation via LSD1 interaction and repression of NCALD in non-small-cell lung cancer. *Onco target.* 2016;7(18):25558–75.
28. Wu Y, Zhou BP. Epigenetic regulation of LSD1 during mammary carcinogenesis. *Mol Cell Oncol.* 2014;1(3):e963426.
29. Qin Y, Zhu W, Xu W, Zhang B, Shi S, Ji S, et al. LSD1 sustains pancreatic cancer growth via maintaining HIF1alpha-dependent glycolytic process. *Cancer Lett.* 2014;347(2):225–32.
30. Lian Y, Wang J, Feng J, Ding J, Ma Z, Li J, et al. Long non-coding RNA IRAIN suppresses apoptosis and promotes proliferation by binding to LSD1 and EZH2 in pancreatic cancer. *Tumour Biol.* 2016;37(11):14929–37

(收稿: 2017-08-31 接受: 2018-10-08 发表: 2018-10-26)