doi:10.11659/jjssx.03E024147

·基础研究·

LINC01915对人结直肠癌细胞增殖、迁移、侵袭的作用及机制

韩 炜[1],李 程[1],李文翰[1],霍斌亮[1],师 文[2] (1.陕西省人民医院肿瘤外科,陕西 西安,710068;2.西安交通大学第一附属医院消化内科,陕西 西安 710061)

[摘 要] **目的** 观察LINC01915对人结直肠癌细胞增殖、迁移、侵袭的作用,并探讨其可能的调控机制。**方法** 取人结直肠癌细胞系SW620、SW480、LOVO、HCT116与正常人结直肠细胞系NCM460,RT-qPCR测定LINC01915表达。取LINC01915表达最高的HCT116细胞系,分为上调组、下调组、上调对照组、下调对照组、空白组。荧光显微镜检测各组细胞转染效率;RT-qPCR检测各组细胞LINC01915表达;二苯基四氮唑溴盐(MTT)法检测各组细胞增殖活性;划痕愈合实验和Transwell检测各组细胞迁移、侵袭活性;RT-qPCR检测细胞miR-92a-3p及大肿瘤抑制激酶2(LATS2)、转录因子21(TCF21)、Kruppel样因子4(KLF4) mRNA表达;Western blot检测细胞LATS2、TCF21、KLF4蛋白表达。双荧光素酶报告基因实验验证LINC01915与miR-92a-3p的靶向关系。**结果** 各种人结直肠癌细胞系LINC01915表达均低于NCM460细胞($P<0.05$),且癌细胞系中HCT116的LINC01915表达最高($P<0.05$);各转染组细胞转染效率均较高;与空白组、上调对照组比较,上调组细胞LINC01915表达及LATS2、TCF21、KLF4 mRNA与蛋白表达均升高($P<0.05$),A值、划痕愈合率、侵袭细胞数、miR-92a-3p表达均下降($P<0.05$);与空白组、下调对照组比较,下调组细胞中LINC01915表达及LATS2、TCF21、KLF4 mRNA与蛋白表达均下降($P<0.05$),A值、划痕愈合率、侵袭细胞数、miR-92a-3p表达均升高($P<0.05$)。LINC01915与miR-92a-3p存在结合位点,且与miR-NC组相比,miR-92a-3p mimics组WT-LINC01915荧光素酶活性降低($P<0.05$)。**结论** LINC01915在人结直肠癌细胞中低表达,上调LINC01915表达可抑制细胞的增殖、迁移和侵袭能力,这可能与抑制miR-92a-3p上调LATS2、TCF21、KLF4表达有关。

[关键词] LINC01915;结直肠癌;增殖;迁移;侵袭

[中图分类号] R735.3 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-03-27

Effects of LINC01915 on proliferation,migration,and invasion of human colorectal cancer cells and its mechanism

HAN Wei[1], LI Cheng[1], LI Wen-han[1], HUO Bin-liang[1], SHI Wen[2] (1. Department of Surgical Oncology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an Shaanxi 710068, China; 2. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shaanxi 710061, China)

Abstract: Objective To observe the effects of LINC01915 on the proliferation, migration and invasion of human colorectal cancer cells, and to explore its possible regulatory mechanism. **Methods** The colorectal cancer cell lines of SW620, SW480, LOVO, HCT116 and the normal colorectal cell line of NCM460 were selected, and the expression of LINC01915 was detected by RT-qPCR. HCT116 cell line with the highest expression of LINC01915 was taken and divided into the upregulation group, the downregulation group, the upregulation control group, the downregulation control group and the blank group. The transfection efficiency of each group was detected by fluorescence microscope; RT-qPCR was used to detect the expression of LINC01915 in each group; methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the proliferative activity in each group; scratch wound healing assay and Transwell assay were used to detect the migration and invasion activities in each group; RT-qPCR was used to detect the expression of miR-92a-3p and mRNA expression of large tumor suppressor homolog 2 (LATS2), transcription factor 21 (TCF21) and Kruppel like factor 4 (KLF4); and Western blot was used to detect the expression of LATS2, TCF21, and KLF4 proteins. Dual-fluorescein reporter assay was used to verify the targeting relationship between LINC01915 and miR-92a-3p. **Results** The expression of LINC01915 in various human colorectal cancer cell lines were lower than that in the NCM460 cell ($P<0.05$), and the highest LINC01915 expression in human colorectal cancer cell lines was observed in HCT116 ($P<0.05$). The transfection efficiency of cells in each transfection group was high. Compared with the blank group and the upregulation control group, the expression of LINC01915, and mRNA and protein expression of LATS2, TCF21, and KLF4 in the upregulation group increased ($P<0.05$), and the A value, scratch healing rate, number of invasive cells and miR-92a-3p expression decreased ($P<0.05$). Compared with the blank group and the downregulation control group, the expression of LINC01915, and mRNA and protein expression of LATS2, TCF21, and KLF4 in the downregulation group decreased ($P<0.05$), and the A value, scratch healing rate, number of invasive cells and miR-92a-3p expression increased ($P<0.05$). LINC01915 had binding sites with miR-92a-3p, and compared with the miR-NC group, the miR-92a-3p mimics group

[基金项目] 陕西省自然科学基础研究计划(2021JQ-917);陕西省人民医院科技人才支持计划(2021JY-46)

[通信作者] 师 文,E-mail:drshiwen@163.com

showed a decrease in the luciferase activity of WT-LINC01915 ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of LINC01915 in the human colorectal cancer cell lines decreases, and upregulation of LINC01915 expression can inhibit cell proliferation, migration, and invasion, which may be related to the up-regulation of the expression of LATS2, TCF21 and KLF4 by inhibiting miR-92a-3p.

Keywords: LINC01915; colorectal cancer; proliferation; migration; invasion

结直肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤,其发病率在我国恶性肿瘤中排名第二[1]。另外,近年来我国结直肠癌的发病率增加了126%,年均增长9.5%[2]。LINC是一类产生于基因间区、长度超过200个核苷酸的非编码RNA,可参与miRNAs的调控,影响细胞的生物学行为[3-4]。LINC01915是一种具有抑癌作用的RNA。Zhou等[5]研究发现,上调LINC01915表达可抑制miR-92a-3p表达,从而上调Kruppel样因子4(Kruppel like factor 4,KLF4)表达,抑制正常成纤维细胞向结直肠癌细胞转化。也有研究显示,miR-92a-3p在恶性肿瘤中高表达,可靶向肿瘤抑制基因大肿瘤抑制激酶2(large tumor suppressor homolog 2,LATS2)、转录因子21(transcription factor 21,TCF21)[6-7]。但是LINC01915影响结直肠癌细胞增殖、侵袭及迁移的作用仍有待观察,其是否可通过调控miR-92a-3p及其下游分子参与上述生物学行为的调控也需深入探讨。基于此,本研究通过细胞实验探讨LINC01915影响人结直肠癌细胞增殖、侵袭及迁移的作用与机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器

人结直肠癌细胞系SW620、SW480、LOVO、HCT116与正常人结直肠细胞系NCM460(上海雅吉生物科技有限公司,批号:100162、115148、109137、114155、007145)。

DMEM(美国Sigma公司,批号:2109134);TRIzol试剂(广州碧云天公司,批号:202106);RNA逆转录反应试剂盒(美国Qiagen公司,批号:200810A);pcDNA3.1-LINC01915、pcDNA3.1-control、siRNA-LINC01915、siRNA-NC质粒由深圳晶美生物科技有限公司合成;二苯基四氮唑溴盐(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)试剂盒(东思科捷生物技术有限公司,批号:2107103C);LINC01915、miR-92a-3p、LATS2、TCF21、KLF4、β-actin、U6引物序列由深圳晶美生物科技有限公司合成;鼠抗人LATS2、TCF21、KLF4单克隆抗体一抗(美国Thermo Fisher公司,批号:2106137、2107125、2107186);酶标记的兔抗鼠LATS2、TCF21、KLF4多克隆抗体二抗(美国Thermo Fisher公司,批号:2107151、2107183、2108121)。

StepOnePlus型PCR仪(美国ABI公司);CFM-100A型荧光显微镜(上海长方光学仪器有限公司);DL19-DYCZ-22B型蛋白质凝胶电泳仪(北京北信科仪分析仪器有限公司);WD-9413型凝胶成像分析系统(北京六一仪器厂);Dual-Lumi™Ⅱ型双荧光素酶报告基因系统(广州碧云天科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 LINC01915表达检测 将人结直肠癌细胞系SW620、SW480、LOVO、HCT116与正常人结直肠细胞系NCM460培养至对数生长期,采用RT-qPCR测定LINC01915表达,每种细胞设3个复孔。采用TRIzol试剂提取总RNA,按反转录说明书进行逆转录。设计并合成引物,LINC01915正向引物5′-TGCTAGAGCGAGACGAGA-3′,反向引物5′-TGAGGACGAAAGCTAGAGC-3′;β-actin正向引物5′-CTGAGAGAATGCGAGATGCTA-3′,反向引物5′-AGGAGAGCTTAGAGCTAGCA-3′。采用PCR系统进行扩增反应,$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算LINC01915的表达。

1.2.2 分组及干预 取LINC01915表达最高的HCT116细胞系,制备细胞悬液,浓度为1.0×10^5/mL,分为上调组(转染pcDNA3.1-LINC01915)、下调组(转染siRNA-LINC01915)、上调对照组(转染pcDNA3.1-control)、下调对照组(转染siRNA-NC)、空白组。转染操作:4 μg质粒+5 μL脂质体加入无血清培养基500 μL,室温孵育5 min,混匀质粒与脂质体,室温孵育20 min。加入混合液1 mL+RPMI 1640 1 mL,转染6 h后换液,24 h后消化,重新接种至培养板。次日加入含1 μg/mL嘌呤霉素的筛选培养基,隔天换液,2周可见集落形成。空白组不转染,将质粒和脂质体替换为无菌生理盐水,其余操作均相同。每组3个复孔。

1.2.3 各组细胞LINC01915表达检测 培养24 h后,利用荧光显微镜检测各组细胞转染效率,其中转染效率=荧光视野细胞数/明视野细胞数×100%。RT-qPCR法检测各组细胞LINC01915表达。

1.2.4 细胞增殖活性检测 按照MTT试剂盒操作,使用酶标仪测定492 nm处的吸光度(absorbance,A)值。

1.2.5 细胞迁移能力检测 在6孔板底画3条等间距直线,接种并培养细胞至汇合度达90%。采用10 μL微量移液器枪尖画划痕使其垂直于直线。PBS液清洗后,加入无血清培养基。划痕愈合率=(0 h划痕

宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%。

1.2.6 细胞侵袭能力检测 将50 μL Matrigel按照1∶3稀释并包被Transwell小室上室底部,4 ℃风干。加入50 μL无血清的培养液,然后于37 ℃二氧化碳培养箱中培养30 min。将细胞重悬,取200 μL细胞悬液接种至上室,下室加入500 μL含5%的胎牛血清培养基,注意避免气泡产生。培养24 h后,将Matrigel与上室内的细胞用棉签擦去。室温下风干膜片,4%多聚甲醛固定。加入500 μL结晶紫染色液,37 ℃孵育20 min。倒置显微镜下观察每个视野中细胞个数。

1.2.7 RT-qPCR检测各组细胞中miR-92a-3p、LATS2、TCF21、KLF4 mRNA表达 采用RT-qPCR检测miR-92a-3p、LATS2、TCF21、KLF4 mRNA表达,方法同上。miR-92a-3p正向引物5′-AGAGCTAGAGCTA-3′,反向引物5′-AGAGCGAGACTAG-3′;U6正向引物5′-GGCGAGAGCTAGAGCGA-3′,反向引物5′-GCGGTTGAGAGATATAATC-3′;LATS2正向引物5′-ATAGATCGAAGCTAGATC-3′,反向引物5′-GAGATCTATATATATCGATA-3′;TCF21正向引物5′-TGAGCTTCGAGAGCTA TAG-3′,反向引物5′-TAGAGCTTAGAGCTATAGC-3′;KLF4正向引物5′-GCGATAGAGGCTATAGCTA-3′,反向引物5′-GAGAGCTATAGGAGCTAGAGCTAG-3′。

1.2.8 Western blot检测各组细胞中LATS2、TCF21、KLF4蛋白表达 将细胞裂解,4 ℃下以12 000 r/min离心15 min。定量总蛋白,加入蛋白上样缓冲液(4∶1),电泳、转膜后封闭。加入一抗,4 ℃过夜。次日加入酶标二抗,室温孵育1 h。洗膜、曝光、显影,计算目的蛋白条带灰度值与内参条带灰度值的比值。

1.2.9 LINC01915靶向miR-92a-3p验证 利用Target官网预测LINC01915的3′UTR与miR-92a-3p相结合的位点。将WT-LINC01915、MUT-LINC01915分别与miR-92a-3p mimics、miR-NC共转染,培养24 h后采用双荧光素酶报告基因系统测定LINC01915的荧光素酶活性。

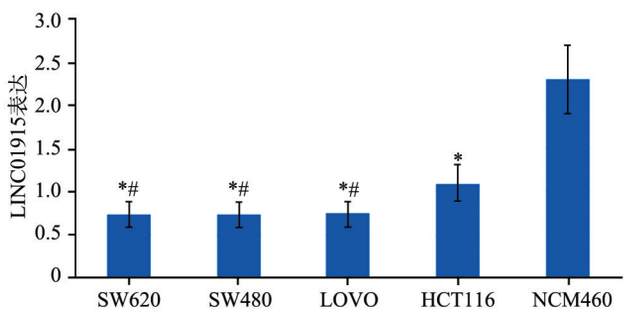
1.3 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计学分析。计量资料经*S-W*检验符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用*SNK-q*检验,2组间比较采用独立样本*t*检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同细胞系中LINC01915表达

与NCM460细胞比较,SW620、SW480、LOVO、HCT116细胞中LINC01915表达均较低(*P*<0.05);与SW620、SW480、LOVO细胞比较,HCT116细胞中LINC01915表达较高(*P*<0.05),见图1。因此,选择HCT116细胞进行后续实验。



*:与NCM460细胞比较,*P*<0.05;#:与HCT116细胞比较,*P*<0.05

图1 各种细胞系中LINC01915表达比较

2.2 各组HCT116细胞转染效率

上调组、下调组、上调对照组和下调对照组HCT116细胞转染效率分别为(90.50±2.19)%、(90.78±2.35)%、(91.06±3.12)%和(90.88±2.27)%,见图2。

与空白组、上调对照组比较,上调组HCT116细胞中LINC01915表达升高(*P*<0.05);与空白组、下调对照组比较,下调组HCT116细胞中LINC01915表达下降(*P*<0.05),见图3。

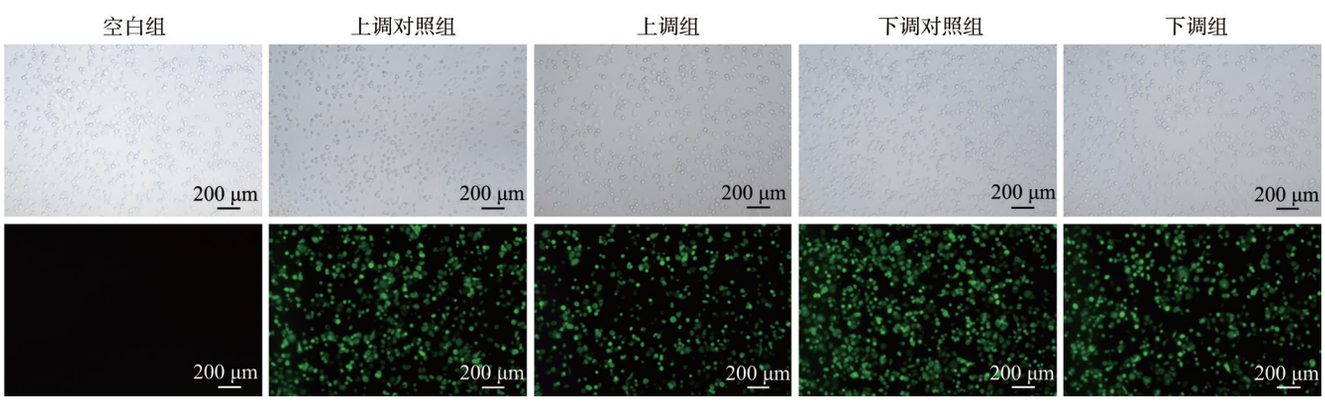
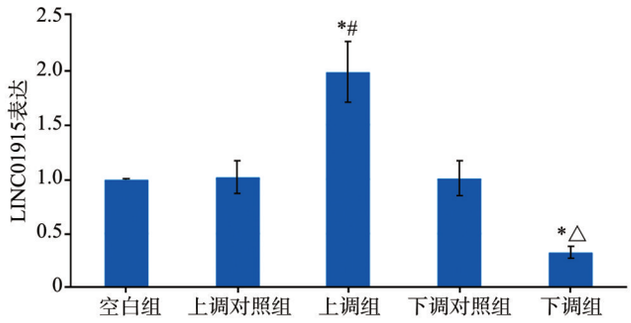


图2 各组转染效率



*:与空白组比较,$P<0.05$;#:与上调对照组比较,$P<0.05$;△:与下调对照组比较,$P<0.05$

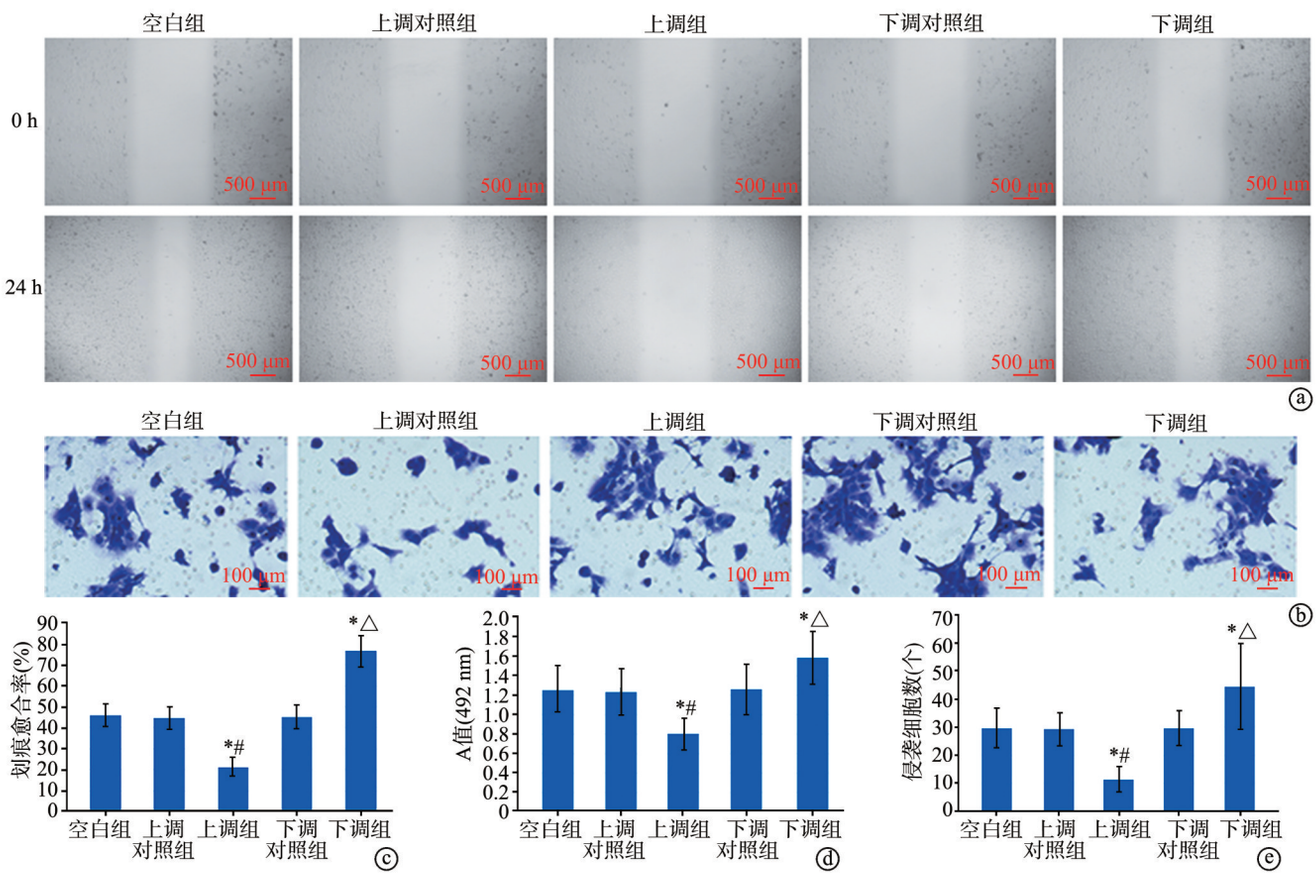
图3　各组HCT116细胞中LINC01915表达

2.3　各组HCT116细胞增殖、迁移、侵袭能力检测

与空白组、上调对照组比较,上调组HCT116细胞划痕愈合率、A值、侵袭细胞数均下降/减少($P<0.05$);与空白组、下调对照组比较,下调组HCT116细胞划痕愈合率、A值、侵袭细胞数均升高/增加($P<0.05$),见图4。

2.4　各组HCT116细胞相关mRNAs表达

与空白组、上调对照组比较,上调组HCT116细胞中miR-92a-3p表达下降($P<0.05$),LATS2、TCF21、KLF4 mRNA表达均升高($P<0.05$);与空白组、下调对照组比较,下调组HCT116细胞中miR-92a-3p表达升高($P<0.05$),LATS2、TCF21、KLF4 mRNA表达均下降($P<0.05$),见表1。



a:细胞划痕愈合实验;b:侵袭细胞图;c:细胞划痕愈合率;d:细胞增殖活性;e:侵袭细胞数定量图　*:与空白组比较,$P<0.05$;#:与上调对照组比较,$P<0.05$;△:与下调对照组比较,$P<0.05$

图4　各组HCT116细胞增殖、迁移、侵袭能力检测

2.5　各组HCT116细胞中LATS2、TCF21、KLF4蛋白表达比较

与空白组、上调对照组比较,上调组HCT116细胞中LATS2、TCF21、KLF4蛋白表达均升高($P<0.05$);与空白组、下调对照组比较,下调组HCT116细胞中LATS2、TCF21、KLF4蛋白表达均下降($P<0.05$),见图5、表2。

2.6　LINC01915靶向miR-92a-3p验证

LINC01915与miR-92a-3p存在结合位点,见图6。与miR-NC组相比,miR-92a-3p mimics组细胞WT-LINC01915荧光素酶活性降低($P<0.05$);miR-NC组与miR-92a-3p mimics组MUT-LINC01915荧光素酶活性比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表3。

表1 各组HCT116细胞中miR-92a-3p及LATS2、TCF21、KLF4 mRNA表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	miR-92a-3p	LATS2	TCF21	KLF4
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
上调对照组	1.01±0.19	1.02±0.20	1.01±0.19	0.99±0.18
上调组	0.47±0.07*#	1.79±0.26*#	1.82±0.30*#	1.80±0.31*#
下调对照组	1.02±0.19	1.01±0.19	0.99±0.18	1.01±0.20
下调组	1.85±0.29*△	0.42±0.06*△	0.45±0.08*△	0.43±0.07*△
F	22.784	24.172	21.843	20.643
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*:与空白组比较,*P*<0.05;#:与上调对照组比较,*P*<0.05;△:与下调对照组比较,*P*<0.05

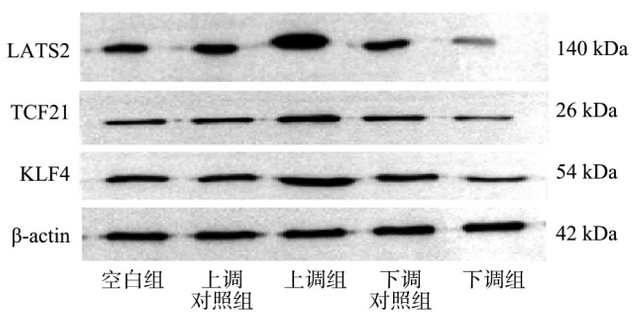


图5 各组HCT116细胞中LATS2、TCF21、KLF4蛋白条带

表2 各组HCT116细胞中LATS2、TCF21、KLF4蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	LATS2	TCF21	KLF4
空白组	0.75±0.12	1.14±0.20	1.28±0.24
上调对照组	0.77±0.14	1.16±0.21	1.25±0.26
上调组	1.56±0.22*#	1.72±0.25*#	1.86±0.34*#
下调对照组	0.76±0.14	1.15±0.22	1.30±0.27
下调组	0.40±0.07*△	0.55±0.09*△	0.51±0.10*△
F	25.646	12.646	10.688
P	<0.001	0.001	0.001

*:与空白组比较,*P*<0.05;#:与上调对照组比较,*P*<0.05;△:与下调对照组比较,*P*<0.05

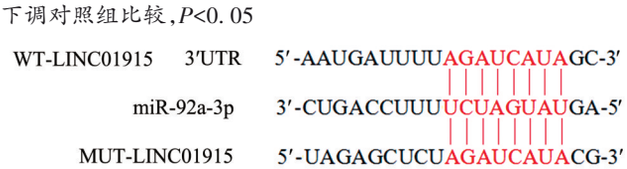


图6 LINC01915与miR-92a-3p结合位点预测

表3 LINC01915与miR-92a-3p的靶向关系验证($\bar{x}\pm s$)

组别	WT-LINC01915荧光素酶活性	MUT-LINC01915荧光素酶活性
miR-NC组	1.02±0.14	1.01±0.15
miR-92a-3p mimics组	0.42±0.07	1.04±0.16
t	6.639	0.237
P	0.003	0.824

3 讨论

LINC缺乏长的进化保守开放阅读框,无编码蛋白质功能,但可调节细胞生长、新陈代谢,并参与转录起始、转录过程及转录后的调控。研究显示,LINC可参与癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭及放化疗敏感性的调控[8-10]。本研究基于前期预实验和Zhou等[5]报道,设计开展了细胞实验,结果显示,人结直肠癌细胞系中LINC01915表达均低于正常人结直肠细胞系NCM460,证实LINC01915在人结直肠癌中低表达。

本研究荧光显微镜和RT-qPCR法检测证实,各组细胞转染效率高,转染质粒对LINC01915表达的干预作用稳定。本研究还显示,上调组细胞增殖、迁移、侵袭活性均下降,而下调组细胞增殖、迁移、侵袭活性均升高。LINC01915在结直肠癌细胞株HCT116中低表达,上调其表达可抑制癌细胞增殖、迁移与侵袭活性,反之则可促进癌细胞增殖、迁移与侵袭活性。既往研究显示,发挥抑癌作用的LINC较多,且LINC01915也具有抑癌作用[11-12]。但是LINC01915调控结直肠癌细胞恶性生物学行为的具体机制尚需要进一步研究。

miR-92a-3p是一种小分子核糖核酸,不仅可参与细胞生长、增殖、凋亡、迁移及侵袭,还可影响血管内皮增生,参与缺血性心脑血管疾病的发生发展。有研究显示,miR-92a-3p在恶性肿瘤中高表达,且LATS2、TCF21、KLF4均是其靶基因[13-14]。敲低癌细胞中miR-92a-3p表达,则LATS2、TCF21表达上调,表明miR-92a-3p可抑制LATS2、TCF21表达,其可调控癌细胞的恶性生物学行为[15];此外,LINC01915可靶向miR-92a-3p/KLF4信号通路参与结直肠癌的发生[5]。本研究结果显示,与空白组、上调对照组比较,上调组HCT116细胞中miR-92a-3p表达下降,LATS2、TCF21、KLF4 mRNA与蛋白表达均升高,下调组则与之相反,且LINC01915与miR-92a-3p存在靶向关系。表明LINC01915可靶向调控结直肠癌细胞中miR-92a-3p表达,上调LINC01915可抑制miR-92a-3p表达并上调LATS2、TCF21、KLF4表达,下调LINC01915可促进miR-92a-3p表达并下调LATS2、TCF21、KLF4表达。

综上,LINC01915在人结直肠癌细胞中低表达,上调LINC01915表达可降低细胞的增殖、迁移与侵袭能力,推测与抑制miR-92a-3p,上调LATS2、TCF21、KLF4表达有关。

[参考文献]

[1] Wang Z, Dan W, Zhang N, et al. Colorectal cancer and gut microbiota studies in China [J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2236364. doi: 10.1080/19490976.2023.2236364.

[2] 周海茸,王巍巍,罗鹏飞,等. 1990—2019年中国结直肠癌疾病负担变化趋势分析[J]. 肿瘤防治研究,2024,51(2):115-120. doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2024.23.0883.

[3] Dastmalchi N, Akbarzadeh S, Amini F, et al. Alterations in the expression levels of long intergenic non-coding RNA APOC1P1-3 in cervical cancer tissue samples [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids,2023,42(6):495-505. doi:10.1080/15257770.2022.2160459.

[4] Hosseini FA, Rejali L, Zabihi MR, et al. Long non-coding RNA LINC00460 contributes as a potential prognostic biomarker through its oncogenic role with ANXA2 in colorectal polyps [J]. Mol Biol Rep, 2023,50(5):4505-4515. doi:10.1007/s11033-023-08393-6.