

长链非编码 RNA *LINC00239* 在结直肠癌中的表达及生物学意义

吴建龙, 颜畅, 邓兴明, 吕国庆*

北京大学深圳医院 胃肠外科, 广东 深圳 518036

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA *LINC00239* 在结直肠癌中的表达及生物学意义。方法 GEPIA2 在线数据库 (<http://gepia2.cancer-pku.cn>) 分析 *LINC00239* 在结直肠癌中的表达量, 荧光定量 PCR 验证 *LINC00239* 在北京大学深圳医院结直肠癌生物样本库中的表达水平。小干扰 RNA 敲低结直肠癌细胞内 *LINC00239* 表达, 通过 CCK-8 细胞增殖实验和 Transwell 检测 *LINC00239* 对结直肠癌细胞增殖、迁移及转移能力的影响及潜在的调控机制。结果 公共数据库资料和本中心结直肠癌生物样本库均提示与配对癌旁组织相比, *LINC00239* 在结直肠癌组织中高表达。下调 *LINC00239* 的表达可显著干扰结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。结论 *LINC00239* 是结直肠癌的潜在治疗靶点。

【关键词】 结直肠癌; *LINC00239*; 增殖; 转移

The expression and biological role of long non-coding RNA *LINC00239* in colorectal cancer

Wu Jianlong, Yan Chang, Deng Xingming, Lyu Guoqing*

Department of Gastrointestinal Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong, China

Corresponding author: Lyu Guoqing, E-mail: lvguoqing1001@163.com

【Abstract】 Objective To clarify the potential role and regulatory mechanism of *LINC00239* in colorectal cancer (CRC). **Methods** We detected the expression levels of *LINC00239* in CRC tissues in a public database, and further validated its expression in CRC samples from Peking University Shenzhen Hospital, by using quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Regulation of *LINC00239* on CRC cells were constructed by siRNA transfection, and then cell proliferation and metastasis capacities and related pathways were identified by cell counting Kit-8 and Transwell respectively. **Results** Our data showed that *LINC00239* was overexpressed in CRC tissues in contrast to adjacent non-tumor tissues. In addition, downregulation of *LINC00668* could significantly suppress proliferation, migration and invasion. **Conclusion** *LINC00239* might be a potential target of CRC therapy.

【Key words】 Colorectal cancer; *LINC00239*; Proliferation; Metastasis

结直肠癌是全球范围内影响人类健康与生活质量的常见恶性胃肠道肿瘤之一, 结直肠癌占有恶性肿瘤死亡原因的第 5 位^[1]。目前, 结直肠癌的根治性治疗仍首推外科手术治疗, 然而其 5 年生存率仅为 50%^[2]。化疗是中晚期结直肠癌患者手术前新辅助治疗和术后辅助治疗的有效方法之一, 但药物不良反应大并且容易产生耐药, 治疗效果较差, 甚至失败^[3]。肿瘤复发转移是治疗失败的

关键原因, 因此, 分析结直肠癌的生物学特性, 探索其复发转移治疗靶点具有重要的临床价值。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类没有蛋白编码和开放读码框的 RNA, 其长度 >200 nt^[4]。人类肺脏、肝脏、乳腺和胃肠道等恶性肿瘤中均发现 lncRNA 存在异常表达或功能失调^[5-8]。lncRNA 通过转录、转录后以及表观遗传学水平的调控作用, 在恶性肿瘤发生发展过程中充当促癌或抑癌基因^[9-11]。*LINC00239* 是定位于染色体 14q32.31 的内含子 lncRNA。既往研究报道 *LINC00239* 在急性髓性白血病中表达明显上

基金项目: 深圳市“医疗卫生三名工程”(SZSM201612051)

* 通信作者: 吕国庆, E-mail: lvguoqing1001@163.com

调,并提示肿瘤患者的高复发可能性^[12]。然而,目前尚缺少 LINC00239 对结直肠癌生物学作用影响的报道,本文将探究 LINC00239 在结直肠癌组织中的表达特点,并研究其对结直肠癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。

1 资料与方法

1.1 组织标本 选取 2016 年 1 月至 2019 年 12 月在北京大学深圳医院进行结直肠癌根治性手术的患者 30 例,收集其新鲜癌组织和配对癌旁组织标本以及临床资料。

1.2 主要试剂和仪器 Total RNA 提取试剂(RNAiso Plus)、逆转录试剂盒(RR036)、荧光定量 PCR 试剂盒(RR820)购自日本 Takara 公司,细胞培养基、胎牛血清及 Matrigel 胶均购自美国 Gibco 公司,CCK-8 细胞增殖试剂盒购自上海碧云天公司。

1.3 方法

1.3.1 生物信息学分析 采用 GEPIA2 在线数据库(<http://gepia2.cancer-pku.cn>)分析 LINC00239 在结直肠癌组织和癌旁组织中的表达水平。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 反应 采用总 RNA 提取试剂(RNAiso Plus)提取组织或细胞的总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行目的基因的实时荧光定量 PCR 反应。反应条件设置:预变性 95℃ 30 s,变性 95℃ 5 s,退火 65℃ 30 s 及延伸 95℃ 5 s,共 40 个循环。引物序列由上海生工公司合成:LINC00239 引物上游 5'-TGTTTCTCATCACACAGGAAGAC-3',下游 5'-GGTCTCGGTCTGACAATCTCTA-3';GAPDH 引物上游 5'-CTCCTCACAGTTGCCATGTA-3',下游 5'-GTTGAGCACAGGGTACTTTATTG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达水平,内参为 GAPDH。

1.3.3 细胞培养与转染 人正常结直肠黏膜细胞(FHC)以及结直肠癌细胞(RKO、SW620、LoVo、HCT116、HT-29、SW480)置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中进行培养,均使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。收集处于对数生长期的结直肠癌细胞接种于 6 孔板(5×10^5 /孔),按照 Lipofectamine 3000 说明书进行 siRNA 转染处理,实验分组为 si-NC 组、si-LINC00239-1 组和 si-LINC00239-2 组。

1.3.4 CCK-8 细胞增殖实验 收集转染 24 h 后的结直肠癌细胞接种于 96 孔板(1000/孔),分别

接种后 24 h、48 h、72 h 加入 10 μ l CCK-8 细胞增殖试剂,避光孵育 2 h,450 nm 波长下测定 OD 值,绘制生长曲线。

1.3.5 Transwell 实验 采用 Transwell 法分别检测细胞迁移和侵袭。收集转染 48 h 后的结直肠癌细胞,以不含胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞,按 2×10^5 /100 μ l 接种于 Transwell 培养板上室(侵袭实验所用上室经 10% Matrigel 胶预包被处理),下室加入 500 μ l 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,培养 24 h 后取出小室,4% 多聚甲醛固定细胞,0.5% 结晶紫溶液染色,显微镜下选取 5 个高倍视野进行拍照,统计细胞数量。

1.3.6 统计学分析 统计学分析采用 GraphPad Prism 8.0 软件。计数资料组间比较则采用卡方检验,计量资料中两组间比较采用 *t* 检验,三组及三组以上组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LINC00239 在结直肠癌组织中表达升高 GEPIA2 在线数据库分析发现,LINC00239 在结直肠癌组织中的表达显著高于癌旁组织($P < 0.05$)(图 1)。

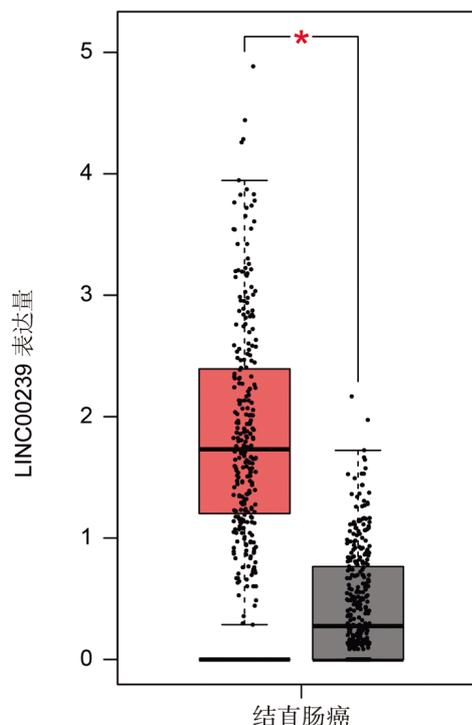


图 1 LINC00239 在公共队列中结直肠癌组织的表达水平注:红色方框为结直肠癌组织($n=275$),灰色方框为癌旁组织($n=349$),* 为 $P < 0.05$ 。

采用荧光定量 PCR 检测 30 例配对结直肠癌组织和癌旁组织结果显示, LINC00239 在癌组织中的表达亦显著高于癌旁组织($P<0.001$)(图 2)。

2.2 LINC00239 在结直肠癌细胞株中的表达升高
荧光定量 PCR 检测 5 株结直肠癌细胞(RKO、SW620、LoVo、HCT116、HT-29、SW480) 内 LINC00239 的表达, 以人正常结直肠黏膜细胞(FHC)作为对照组。结果显示, LINC00239 在结直肠癌细胞中的表达均高于人正常结直肠黏膜细胞, 且 RKO 呈最高表达量 ($P<0.001$)(图 3A); 选择 RKO 细胞构建 LINC00239 低表达细胞模型, 荧光定量 PCR 检测发现, 转染 siRNA 后 RKO 细胞内 LINC00239 表达显著受到抑制($P<0.001$)(图 3B), 提示模型构建成功。

2.3 敲低 LINC00239 表达抑制结直肠癌细胞的增殖能力
为了探究 LINC00239 对结直肠癌细胞增殖特性的影响, 本研究利用 LINC00239 低表达

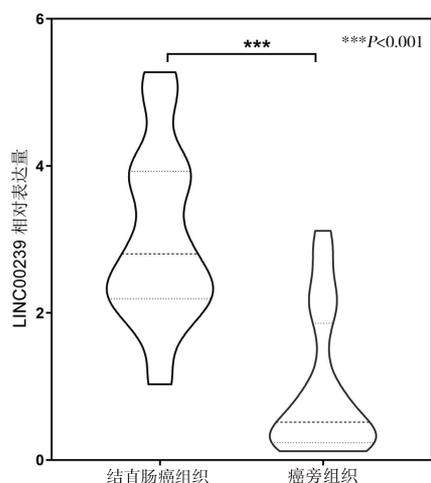


图 2 LINC00239 在临床队列中结直肠癌组织的表达水平

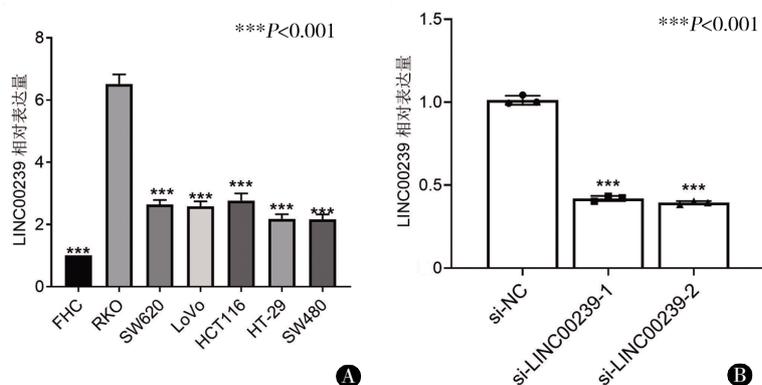


图 3 LINC00239 在人结直肠癌细胞、正常结直肠黏膜细胞(A)及 siRNA 转染后的 RKO 细胞(B)中的表达情况

细胞进行了 CCK-8 细胞增殖实验。结果显示, si-LINC00239-1 组和 si-LINC00239-2 组细胞的增殖能力较 si-NC 组明显减弱($P<0.001$)(图 4)。说明敲低 LINC00239 表达抑制细胞增殖能力。

2.4 敲低 LINC00239 表达抑制结直肠癌细胞迁移及侵袭能力
为了探究 LINC00239 对结直肠癌细胞转移能力的影响, 通过 Transwell 实验检测发现, si-LINC00239-1(约 40 个)组和 si-LINC00239-2(约 40 个)组细胞迁徙数量均较 si-NC 组(约 125 个)显著减少 ($P<0.001$)(图 5A); si-LINC00239-1(约 45 个)组和 si-LINC00239-2(约 40 个)组细胞侵袭数量均较 si-NC 组(约 150 个)显著减少($P<0.001$)(图 5B)。说明敲低 LINC00239 表达抑制细胞迁移及侵袭能力。

3 讨论

恶性肿瘤的发生是由于促癌基因被激活和/或抑癌基因下调/失活所诱发, 近年研究发现, 肿瘤组织和正常组织中 lncRNA 表达量存在显著差异, 提示其在肿瘤演进过程中起着重要作用, 其既可能是推动肿瘤演进的重要因素, 又可能是抑制肿瘤发展的重要成分^[13]。lncRNA 通过各种机制的表达失调参与多种肿瘤的演进, 有望成为具有恶性肿瘤诊断、治疗及预测预后的生物学标志物^[11]。结直肠癌组织内也存在多种 lncRNA 异常表达, 与肿瘤演进及复发转移密切相关^[14]。本研究发现 LINC00239 高表达于结直肠癌组织, 提示 LINC00239 是结直肠癌潜在的促癌基因, 有望成为新型的肿瘤标志物和预后判断指标。

lncRNA 在多种肿瘤组织中构建了复杂而又精密地调控体系, 其表达失调能够引起肿瘤细

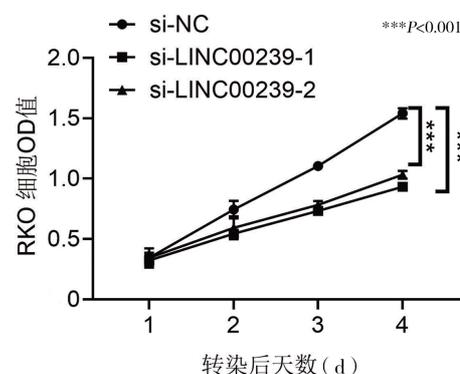


图 4 敲低 LINC00239 表达对 RKO 细胞增殖能力的影响

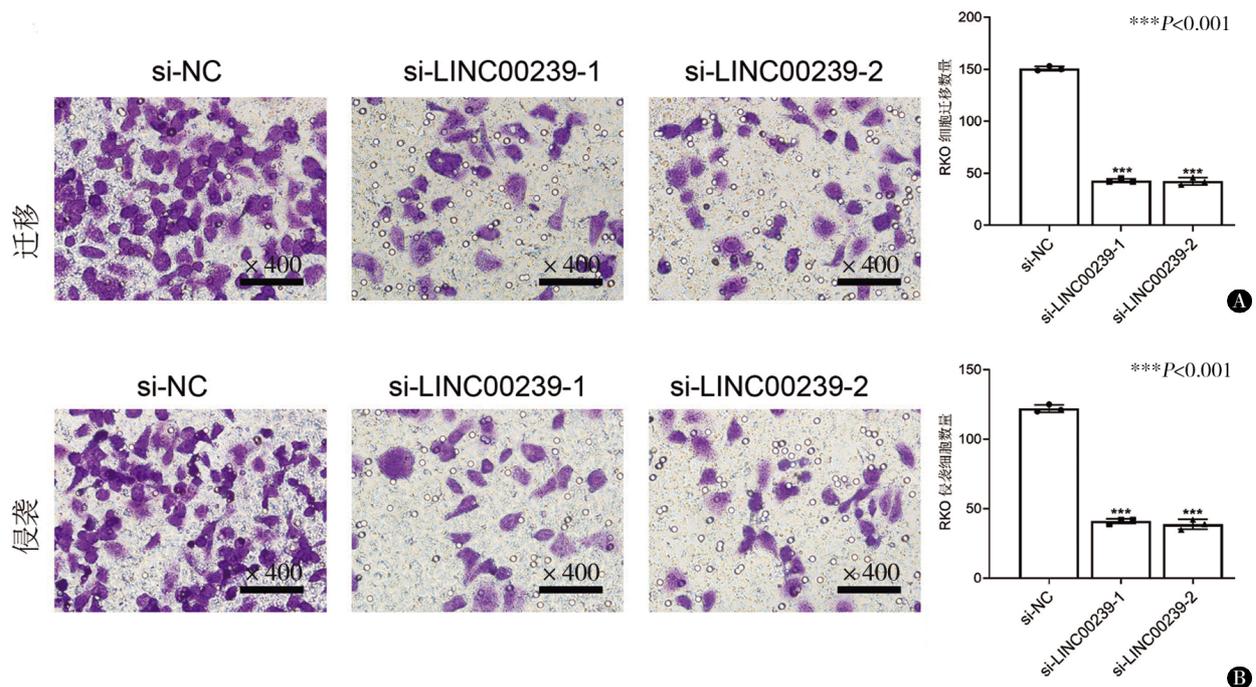


图5 敲低 LINC00239 表达对 RKO 细胞迁移(A)及侵袭(B)能力的影响

胞内的各种生物学变化,在不同层次精细地调控肿瘤细胞的增殖、分化和转移^[15]。研究显示, LINC00239 高表达能够促进急性粒细胞白血病细胞的增殖能力^[12]。本研究也发现 LINC00239 能够调控结直肠癌细胞的增殖特性,敲低 *LINC00239* 表达能够降低结直肠癌细胞的增殖能力,提示靶向抑制 LINC00239 表达可以发挥抗肿瘤作用。肿瘤细胞迁移和侵袭是恶性肿瘤的关键特征,是导致恶性肿瘤患者死亡的直接因素^[16]。本研究揭示 LINC00239 是结直肠癌细胞迁移和侵袭的重要调控因子,敲低 *LINC00239* 表达可以同时抑制结直肠癌细胞的迁徙及侵袭能力。

综上所述, LINC00239 高表达于结直肠癌。 LINC00239 能够调控结直肠癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力。 LINC00239 有可能成为结直肠癌预后及靶向治疗的潜在肿瘤标志物。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69 (1):7-34.
- [2] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L A, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2019, 394 (10207):1467-1480.
- [3] AMAWI H, SIM H M, TIWARI A K, et al. ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1141:549-580.
- [4] CECH T R, STEITZ J A. The noncoding RNA revolution - trashing old rules to forge new ones [J]. Cell, 2014, 157 (1):77-94.
- [5] ZHOU H, FENG B, ABUDOUREYIMU M, et al. The functional role of long non-coding RNAs and their underlying mechanisms in drug resistance of non-small cell lung cancer [J]. Life Sci, 2020, 261:118362.
- [6] UCHIDA S, KAUPPINEN S. Long Non-Coding RNAs in Liver Cancer and Nonalcoholic Steatohepatitis [J]. Noncoding RNA, 2020, 6(3):34.
- [7] DU T, SHI Y, XU S, et al. Long Non-Coding RNAs in Drug Resistance of Breast Cancer [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 7075-7087.
- [8] TAN H, ZHANG S, ZHANG J, et al. Long non-coding RNAs in gastric cancer: New emerging biological functions and therapeutic implications [J]. Theranostics, 2020, 10 (19):8880-8902.
- [9] YANG G, LU X, YUAN L. LncRNA: a link between RNA and cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1839 (11):1097-1109.
- [10] OKUGAWA Y, GRADY W M, GOEL A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers [J]. Gastroenterology, 2015, 149 (5):1204-1225.
- [11] CHANDRA GUPTA S, NANDAN TRIPATHI Y. Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: From biomarkers to therapeutic targets [J]. Int J Cancer, 2017, 140 (9):1955-1967.
- [12] YANG Y, DAI W, SUN Y, et al. Long noncoding RNA linc00239 promotes malignant behaviors and chemoresistance against doxorubicin partially via activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in acute myeloid leukaemia cells [J]. Oncol Rep, 2019, 41 (4):2311-2320.

- [13] DAI X, KAUSHIK A C, ZHANG J. The Emerging Role of Major Regulatory RNAs in Cancer Control[J]. *Front Oncol*,2019, 9: 920.
- [14] AMIRKHAH R, NADERI-MESHKIN H, SHAH J S, et al. The Intricate Interplay between Epigenetic Events, Alternative Splicing and Noncoding RNA Deregulation in Colorectal Cancer[J]. *Cells*,2019, 8 (8): 929..
- [15] DHAMIJA S, DIEDERICHS S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis[J]. *Int J Cancer*,2016, 139 (2):269-280.
- [16] DE WEVER O, PAUWELS P, DE CRAENE B, et al. Molecular and pathological signatures of epithelial -mesenchymal transitions at the cancer invasion front[J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130 (3):481-494.

·读者·作者·编者·

本刊对参考文献撰写的最新要求

针对多数作者来稿中参考文献书写不规范的情况,本刊在此将文稿书写要求刊登出来,烦请各位作者注意。本刊文稿引用参考文献时,必须与其原文核对无误,请按采用顺序编码著录,依照其在正文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。未发表的观察资料一般不作为参考文献,确定需要引用时,可将其在正文相应处注明。2次文献不适宜作为参考文献。尽量避免引用摘要作为参考文献。文献作者在3位以内者,姓名均予以列出;3位以上者,只列出前3位,后加“等”“et al”(西文)、“他”(日文)、“и.т.д.”(俄文);作者姓名一律姓氏在前,名字在后。外国人名字采用首字母缩写形式,缩写名后不加缩写点;日文汉字请按规定书写,勿与我国汉字及简化字混淆。不同作者姓名之间用“,”隔开,不用“和”“and”等连词。文献类型和电子文献载体标志代码参照GB 3469《文献类型与文献载体代码》,题名后标注文献类型标志,电子文献必须标注著录项目。外文期刊名称用缩写,以美国国立医学图书馆编辑的*Index Medicus*格式为准。每条参考文献必须著录完整的起止页码。