

引用本文:黄荣,樊明湖,黄芬,等.长链非编码RNA膀胱癌相关转录物1对微小RNA-503-5p的靶向关系及对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响[J].安徽医药,2021,25(8):1637-1642.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.08.038.

◇临床医学◇



长链非编码RNA膀胱癌相关转录物1对微小RNA-503-5p的靶向关系及对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响

黄荣,樊明湖,黄芬,卢小菊,李新建

作者单位:中国人民解放军联勤保障部队第九〇八医院普外科,江西 鹰潭 335000

通信作者:李新建,男,副主任医师,研究方向为乳腺肿瘤,Email:964344862@qq.com

摘要: 目的 研究长链非编码RNA(lncRNA)膀胱癌相关转录物1(BLACAT1)对微小RNA(miR)-503-5p的靶向关系及结肠癌细胞增殖和凋亡的影响。方法 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测结肠癌细胞株SW620, LOVO, HT29和正常人结肠黏膜上皮细胞株NCM460中BLACAT1和miR-503-5p的表达。在HT29细胞中转染si-BLACAT1、pcDNA-BLACAT1或miR-503-5p, 噻唑蓝(MTT)检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡,蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞核相关抗原Ki-67(Ki-67)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、活化的多聚ADP-核糖聚合酶(Cleaved PARP)和活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Cleaved caspase-3)的表达,starbase预测和双荧光素酶报告分析BLACAT1与miR-503-5p之间的靶向关系。si-BLACAT1和anti-miR-503-5p共转染,观察干扰miR-503-5p对沉默BLACAT1诱导的结肠癌细胞增殖和凋亡的影响。结果 与NCM460细胞比较,SW620、LOVO和HT29中BLACAT1表达量明显增加[(4.93±0.58)、(5.66±0.53)、(6.17±0.66)比(1.03±0.22)],miR-503-5p表达量减少[(0.72±0.11)、(0.67±0.09)、(0.51±0.08)比(1.04±0.14)]($P<0.05$)。沉默BLACAT1或转染miR-503-5p明显减少HT29细胞的细胞存活率、Ki-67、CyclinD1蛋白表达量,提高细胞凋亡率、Cleaved PARP和Cleaved caspase-3蛋白水平($P<0.05$),过表达BLACAT1则反之。BLACAT1靶向miR-503-5p调控其表达。干扰miR-503-5p部分逆转沉默BLACAT1抑制结肠癌细胞增殖、Ki-67、CyclinD1蛋白表达和诱导结肠癌细胞凋亡、Cleaved PARP、Cleaved caspase-3蛋白表达的作用。结论 lncRNA BLACAT1在表达上调,沉默BLACAT1可通过靶向调控miR-503-5p的表达,来抑制结肠癌细胞增殖,并诱导细胞凋亡。

关键词: 结肠肿瘤; lncRNA BLACAT1; 微小RNA-503-5p; 增殖; 凋亡

Relationship of long-chain non-coding RNA BLACAT1 to microRNA -503-5p and the effect of colorectal cancer cell proliferation and apoptosis

HUANG Rong,FAN Minghu,HUANG Fen,LU Xiaojun,LI Xinjian

Author Affiliation:Department of General Surgery, The 908th Hospital of the Joint Logistics Support Force, Yingtan, Jiangxi 335000, China

Abstract: **Objective** To study the targeting relationship of long-chain non-coding RNA (lncRNA) BLACAT1 to microRNA (miR) -503-5p and its effect on colorectal cancer cell proliferation and apoptosis. **Methods** The expressions of BLACAT1 and miR-503-5p in colon cancer cell lines SW620, LOVO, HT29 and human normal colon mucosal epithelial cell line NCM460 were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). HT29 cells were transfected with si-BLACAT1, pcDNA-BLACAT1 or miR-503-5p. MTT was used to detect cell proliferation, flow cytometry was used to measure apoptosis, and Western blot was used to determine expression of nuclear-related antigen Ki-67 (Ki-67), cyclin D1 (Cyclin D1), cleaved Poly ADP-ribose polymerase (Cleaved PARP), and cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Cleaved caspase-3). The starbase Prediction and dual luciferase reports were used to analyze the targeting relationship between BLACAT1 and miR-503-5p. si-BLACAT1 and anti-miR-503-5p were co-transfected to observe the effect of anti-miR-503-5p interfering on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells induced by silenced BLACAT1. **Results** Compared with NCM460 cells, the expression of BLACAT1 in SW620, LOVO and HT29 increased [(4.93±0.58), (5.66±0.53), (6.17±0.66) vs. (1.03±0.22)], and the expression of miR-503-5p evidently decreased [(0.72±0.11), (0.67±0.09), (0.51±0.08) vs. (1.04±0.14)]($P<0.05$). Silencing BLACAT1 or transfecting miR-503-5p greatly reduced the cell survival rate, Ki-67, and CyclinD1 protein expression in HT29 cells, and obviously increased the apoptosis rate, Cleaved PARP and Cleaved caspase-3 protein levels ($P<0.05$), which were the opposite of overexpression of BLACAT1. BLACAT1 targeted miR-503-5p to regulate its expression. Interfering with miR-503-5p partially reversed the effects of silencing BLACAT1 on inhibiting the colorectal cancer cell proliferation, Ki-67, CyclinD1 protein expression and inducing colorectal cancer cell apoptosis, Cleaved PARP, and Cleaved caspase-3 protein expression. **Conclusion** The expression of lncRNA BLACAT1 is up-regulated. Silencing BLACAT1 can inhibit the proliferation of colorectal cancer cells and induce apoptosis by targeting the regulation of miR-503-5p expression.

Key words: Colorectal neoplasms; LncRNA BLACAT1; MiR-503-5p; Proliferation; Apoptosis

结直肠癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在癌症中排名第三,但死亡率排名第二^[1]。在结直肠癌的发生和进展中,多个种系和体细胞突变不断积累,特别是一些关键的致癌基因和肿瘤抑制基因^[2]。随着对结直肠癌发病机制认识的深入,分子靶向药物和免疫疗法等新的治疗策略被开发出来^[3],极大改善了结直肠癌患者的预后。然而,结直肠癌肿瘤发生的分子机制复杂,涉及许多过程。因此,进一步揭示其潜在的分子机制,开发更有效的治疗干预措施有助于提高患者预后。越来越多的证据表明,遗传和表观遗传失调在肿瘤的产生发展中起着至关重要的作用^[4]。日前,非编码RNA的生物学功能被广泛研究,包括微RNA(microRNA, miRNA/miR)和长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)^[5]。膀胱癌相关转录物1(bladder cancer associated transcript 1, BLACAT1)在肝癌、乳腺癌、骨肉瘤中表达上调,能促进癌细胞的增殖和转移,而BLACAT1的下调抑制癌细胞的体外增殖、侵袭和移植瘤的体内生长^[6-8]。miR-503-5p可以抑制膀胱癌细胞的增殖^[9],并调控卵巢癌细胞的增殖、凋亡、转移或耐药^[10-11]。然而BLACAT1和miR-503-5p在结直肠癌中的生物学功能仍不清楚。本研究自2019年1-10月考察BLACAT1在结直肠癌细胞中的表达,及对结直肠癌细胞增殖和凋亡的影响,并结合miR-503-5p,探讨结直肠癌潜在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 人正常结肠黏膜上皮细胞株NCM460和结肠癌细胞株SW620, LOVO, HT29购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, RPMI-1640培养基(Roswell Park Memorial Institute)购自美国Gibco公司,胎牛血清、青霉素-链霉素购自美国Hyclone公司, PrimeScript™RT试剂盒购自大连Takara公司, RIPA裂解缓冲液、噻唑蓝(MTT)购自美国Sigma公司, si-con、si-BLACAT1、miR-con、miR-503-5p、anti-miR-con、anti-miR-503-5p购自上海GenePharma公司, β 肌动蛋白(β -actin)、细胞核相关抗原67(Ki-67)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、活化的多聚ADP-核糖聚合酶(Cleaved PARP)和活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Cleaved caspase-3)抗体购自美国Cellular Signaling Technology公司,辣根过氧化物酶标记二抗购自英国Abcam公司,双重荧光素酶报告基因测定系统购自美国Promega公司。

1.2 细胞培养 NCM460、SW620、LOVO和HT29细胞在RPMI-1640培养基中培养,所有培养基均补充10%的胎牛血清、1%青霉素-链霉素,于37℃、5%二氧化碳的湿润环境中生长。

1.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测结直肠癌细胞中BLACAT1和miR-503-5p表达 利用TRIzol试剂从NCM460、SW620、LOVO和HT29细胞提取总RNA。使用PrimeScript™RT试剂盒将提取的RNA反转录为cDNA,并通过ABI 7500定量PCR进行扩增。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对基因表达,选择GAPDH和U6作为内参。引物序列: BLACAT1 5'-CAAGAGGAGCCGGCTTAGCATCTA-3'(正向), 5'-ACGGTTCCAGTCCTCAGTCAG-3'(反向)^[7]。内参GAPDH 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'(正向), 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'(反向)。miR-503-5p 5'-CCTATTTCCCATGATTCCTTCATA-3'(正向), 5'-GTAATACGGTTATCCACGCG-3'(反向)^[12]。内参U6 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3'(正向), 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'(反向)。

1.4 细胞转染 将HT29细胞接种于6孔板中(每孔 2×10^5 个细胞),待细胞融合至80%左右时,利用Lipofectamine 2000试剂,将si-con、si-BLACAT1、pcDNA、pcDNA-BLACAT1、miR-con、miR-503-5p、anti-miR-con、anti-miR-503-5p转染到HT29细胞,培养48 h后,收集细胞,依照1.3所述方法检测BLACAT1和miR-503-5p表达,并进行后续指标检测。

1.5 MTT检测结直肠癌细胞增殖 将HT29细胞接种于96孔板,培养48 h后,加入20 μ L的MTT溶液,培养4 h后加入150 μ L二甲基亚砷,剧烈震荡10 min,读取酶标仪490 nm波长处的吸光度(OD)值,计算细胞存活率(%)。胞存活率(%)=实验组OD值/对照组OD值 $\times 100\%$ 。

1.6 流式细胞术检测结直肠癌细胞凋亡 根据异硫氰酸荧光素标记的膜联素V/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒说明书的步骤,将HT29细胞密度调整为 1×10^6 个/毫升,加入5 μ L的Annexin V-FITC和5 μ L的PI染色液,分别混匀,黑暗反应15 min,于流式细胞仪检测HT29细胞的凋亡。

1.7 蛋白质印迹法(Western blotting)检测结直肠癌细胞Ki-67、CyclinD1、Cleaved PARP和Cleaved caspase-3的表达 用RIPA裂解缓冲液提取细胞总蛋白。将样品在10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)凝胶中分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。随后在4℃条件下与Ki-67、CyclinD1、Cleaved PARP、Cleaved caspase-3和内参 β -actin的一抗(稀释比为1:1 000)孵育过夜。第二天,将膜与二抗(稀释比为1:2 000)在室温孵育1 h。使用ECL检测系统检测目的蛋白的信号。

1.8 靶基因预测和双荧光素酶报告实验 starbase预测BLACAT1的靶基因,发现BLACAT1与miR-

503-5p存在互补配对位点。构建包含 miR-503-5p 结合位点的野生型 BLACAT1 (WT-BLACAT1) 和突变型 BLACAT1 (MUT-BLACAT1) 的 pmirGLO 荧光素酶基因报告质粒, 利用 Lipofectamine 2000 试剂, 将其与 miR-con、miR-503-5p 共转染, 48 h 后参照双荧光素酶检测试剂盒说明书的步骤, 进行荧光素酶活性测定。

1.9 统计学方法 数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BLACAT1 和 miR-503-5p 在结直肠癌细胞和人正常结肠黏膜上皮细胞中的表达 qRT-PCR 检测数据表明, 与人正常结肠黏膜上皮细胞 NCM460 比较, 结肠癌细胞 SW620、LOVO 和 HT29 中 BLACAT1 表达量明显增加, miR-503-5p 表达量减少 ($P < 0.05$), 见表 1。选择差异最的 HT29 细胞用于后续实验。相关性分析结果表明, 结直肠癌细胞中 BLACAT1 和 miR-503-5p 表达呈负相关, $r^2 = 0.3114$ 。

表 1 结直肠癌细胞和人正常结肠黏膜上皮细胞中 BLACAT1 和 miR-503-5p 的表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	BLACAT1	miR-503-5p
NCM460	3	1.03±0.22	1.04±0.14
SW620	3	4.93±0.58 ^①	0.72±0.11 ^①
LOVO	3	5.66±0.53 ^①	0.67±0.09 ^①
HT29	3	6.17±0.66 ^①	0.51±0.08 ^①
<i>F</i> 值		59.382	12.823
<i>P</i> 值		0.000	0.002

注: ①与 NCM460 组比较, $P < 0.05$ 。BLACAT1 为膀胱癌相关转录物 1。

2.2 沉默或过表达 BLACAT1 抑制结直肠癌细胞增殖和诱导结直肠癌细胞凋亡 与 si-con 组比较, 沉默 BLACAT1 明显减少 HT29 细胞中 BLACAT1 表达量、Ki-67、CyclinD1 蛋白表达量和细胞存活率, 增加 Cleaved PARP、Cleaved caspase-3 蛋白表达量和细

胞凋亡率 ($P < 0.05$)。与 pcDNA 组比较, 过表达 BLACAT1 明显提高 HT29 细胞中 BLACAT1 表达量、Ki-67、CyclinD1 蛋白表达量和细胞存活率, 降低 Cleaved PARP、Cleaved caspase-3 蛋白表达量和细胞凋亡率 ($P < 0.05$), 见表 2。

BLACAT1 为膀胱癌相关转录物 1, Cyclin D1 为细胞周期蛋白 D1, Cleaved PARP 为活化的多聚 ADP-核糖聚合酶, Cleaved caspase-3 为活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3。

2.3 BLACAT1 靶向 miR-503-5p 调控其表达 starbase 预测到 BLACAT1 与 miR-503-5p 部分碱基可形成互补配对现象 (图 1)。相比于 miR-con 和 WT-BLACAT1 共转染, miR-503-5p 和 WT-BLACAT1 共转染明显降低细胞的荧光素酶活性相对活性 ($P < 0.05$), miR-con、miR-503-5p 和 MUT-BLACAT1 共转染对荧光素酶活性相对活性无影响 (表 3)。qRT-PCR 检测结果发现, 转染 si-BLACAT1 较转染 si-con 明显增加 miR-503-5p 表达量; 转染 pcDNA-BLACAT1 比转染 pcDNA 减少 miR-503-5p 表达量 ($P < 0.05$), 见表 4。

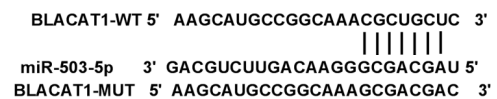


图 1 BLACAT1 与 miR-503-5p 存在互补配对位点

2.4 miR-503-5p 抑制结直肠癌细胞增殖和诱导结直肠癌细胞凋亡 与 miR-con 组比较, 转染 miR-503-5p 明显提高 HT29 细胞的 miR-503-5p 表达量、Cleaved PARP、Cleaved caspase-3 蛋白表达量和细胞凋亡率, 降低 Ki-67、CyclinD1 和细胞存活率 ($P < 0.05$), 见表 5。

2.5 干扰 miR-503-5p 部分逆转沉默 BLACAT1 抑制结直肠癌细胞增殖和诱导结直肠癌细胞凋亡的作用 与 si-BLACAT1 和 anti-miR-con 共转染比较, si-BLACAT1 和 anti-miR-503-5p 共转染明显减少 HT29 细胞的 miR-503-5p 表达量、Cleaved PARP、

表 2 沉默 BLACAT1 对结直肠癌细胞增殖和诱导结直肠癌细胞凋亡的影响/ $(\bar{x} \pm s, n=3)$

组别	BLACAT1	Ki-67	CyclinD1	Cleaved PARP	Cleaved caspase-3	细胞活力/%	凋亡率/%
NC	0.96±0.10	0.71±0.04	0.67±0.10	0.17±0.05	0.14±0.03	96.74±3.81	3.81±0.70
si-con	1.03±0.12	0.64±0.04	0.67±0.05	0.15±0.04	0.16±0.03	94.38±3.88	4.53±0.56
si-BLACAT1	0.27±0.04 ^①	0.28±0.04 ^①	0.37±0.03 ^①	0.44±0.05 ^①	0.38±0.05 ^①	71.09±5.22 ^①	17.33±1.09 ^①
pcDNA	1.00±0.11	0.59±0.03	0.65±0.03	0.24±0.03	0.18±0.03	95.87±8.18	5.74±0.54
pcDNA-BLACAT1	3.97±0.52 ^②	0.72±0.09 ^②	0.83±0.05 ^②	0.13±0.05 ^②	0.07±0.02 ^②	149.07±8.87 ^②	2.12±0.22 ^②
<i>F</i> 值	101.642	42.337	24.750	24.045	36.107	59.673	237.953
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与 si-con 组比较, $P < 0.05$; ②与 pcDNA 组比较, $P < 0.05$ 。

表3 miR-con、miR-503-5p和BLACAT1共转染对荧光素酶活性相对活性的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	WT-BLACAT1	MUT-BLACAT1
miR-con	3	0.93±0.23	1.33±0.19
miR-503-5p	3	0.52±0.21	1.29±0.29
<i>t</i> 值		2.280	0.200
<i>P</i> 值		0.085	0.853

注: WT-BLACAT1为野生型膀胱癌相关转录物1, MUT-BLACAT1为突变型膀胱癌相关转录物1。

表4 BLACAT1调控miR-503-5p的表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-503-5p
si-con	3	1.08±0.13
si-BLACAT1	3	4.26±0.55 ^①
pcDNA	3	1.04±0.09
pcDNA-BLACAT1	3	0.50±0.06 ^②
<i>F</i> 值		106.457
<i>P</i> 值		0.000

注: ①与si-con组比较, $P<0.05$; ②与pcDNA组比较, $P<0.05$ 。

Cleaved caspase-3蛋白表达量和细胞凋亡率, 增加Ki-67、CyclinD1蛋白表达量和细胞存活率($P<0.05$), 见表6。

3 讨论

在结直肠癌肿瘤发生和发展过程中, 细胞存活与凋亡至关重要^[13]。最近, 已经鉴定出许多非编码转录本, 这些非编码转录本多数与癌症机制联系紧密^[14], 为癌症的诊断和治疗提供了新的机会。这项研究探讨了lncRNA BLACAT1在结直肠癌的表达和作用, BLACAT1可能是结直肠癌的潜在预后生物标志物和治疗靶标。

lncRNA长度超过200个核苷酸, 参与了肿瘤发生和发展的各个阶段, 包括肿瘤的发生、增殖、凋亡和癌细胞的迁移、血管生成、肿瘤的侵袭和转移形成, 可作为结直肠癌等癌症的有潜力的诊断和预后生物标志物^[15]。既往研究表明, BLACAT1在肝癌、肺癌、卵巢癌、膀胱癌等多种癌症中的表达异常上调, 可用作诊断癌症的非特异性生物标志物, 并且可以作为预测子宫内膜癌预后的潜在生物标志物^[16]。BLACAT1在非小细胞肺癌组织和细胞中的表达上调, 并通过海绵miR-144促进非小细胞肺癌的增殖, 迁移和侵袭^[17], 其下调抑制了癌细胞进展, 迁移、侵袭和上皮-间充质转化^[18]。BLACAT1在胶质瘤、宫颈癌的组织 and 细胞系中均高表达, BLACAT1在体外可促进胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转化^[19], 敲除BLACAT1则抑制了宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭^[20]。这些结果提示了BLACAT1在癌症中的致癌潜能。本研究观察到, 与人正常结肠黏膜上皮细胞NCM460比较, 结直肠癌细胞SW620、LOVO和HT29中BLACAT1表达量明显增加。功能实验结果显示, 沉默BLACAT1明显减少HT29细胞的细胞存活率、Ki-67、CyclinD1蛋白表达量, 提高细胞凋亡率、Cleaved PARP和Cleaved caspase-3蛋白水平, 过表达BLACAT1与之相反。表明与前述报道相同, 结直肠癌的BLACAT1表达明显上调, 沉默BLACAT1可以抑制细胞增殖, 并促进细胞凋亡, 显现出一定的抗癌活性。

miRNA是另一个类重要的非编码RNA, 长度为21-25个核苷酸。miRNA通过与互补位点的mRNA结合, 诱导靶mRNA降解和/或翻译抑制, 调节基因的表达。miRNA总是在肿瘤发生和恶性转化中异

表5 转染miR-503-5p对结直肠癌细胞增殖和诱导结直肠癌细胞凋亡的影响/($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	miR-503-5p	Ki-67	CyclinD1	Cleaved PARP	Cleaved caspase-3	细胞活力/%	凋亡率/%
NC	1.01±0.06	0.75±0.08	0.67±0.04	0.26±0.06	0.24±0.04	98.61±5.77	2.75±0.37
miR-con	1.09±0.09	0.78±0.09	0.69±0.05	0.24±0.05	0.25±0.03	97.72±7.96	3.74±0.48
miR-503-5p	5.85±0.65 ^①	0.34±0.05 ^①	0.32±0.04 ^①	0.58±0.07 ^①	0.59±0.07 ^①	64.20±6.97 ^①	19.34±1.87 ^①
<i>F</i> 值	159.222	31.994	68.368	25.096	48.284	23.842	201.685
<i>P</i> 值	<0.001	0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.001	<0.001

注: 与miR-con组比较, ① $P<0.05$ 。BLACAT1为膀胱癌相关转录物1, Cyclin D1为细胞周期蛋白D1, Cleaved PARP为活化的多聚ADP-核糖聚合酶, Cleaved caspase-3为活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3。

表6 干扰miR-503-5p对沉默BLACAT1诱导的结直肠癌细胞增殖和凋亡的影响/($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	miR-503-5p	Ki-67	CyclinD1	Cleaved PARP	Cleaved caspase-3	细胞活力/%	凋亡率/%
si-BLACAT1+ anti-miR-con	1.09±0.13	0.31±0.05	0.27±0.05	0.49±0.06	0.39±0.05	104.36±10.25	20.07±1.79
si-BLACAT1+ anti-miR-503-5p	0.71±0.09	0.69±0.07	0.76±0.08	0.25±0.05	0.17±0.05	157.97±12.84	9.10±1.15
<i>t</i> 值	4.163	7.651	8.996	5.322	5.389	5.652	8.931
<i>P</i> 值	0.014	0.002	0.001	0.006	0.006	0.005	0.001

注: BLACAT1为膀胱癌相关转录物1, Cyclin D1为细胞周期蛋白D1, Cleaved PARP为活化的多聚ADP-核糖聚合酶, Cleaved caspase-3为活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3。

常调节,与 lncRNA 一起成为癌症发病机制的一部分^[21]。就结直肠癌细胞而言,已证实某些改变的 miRNA 可控制增殖,转移,凋亡^[22]。在 miRNA 中,miR-503-5p 在癌症中表达异常。例如,miR-503-5p 在肝细胞癌中表达下调,其高表达抑制了肝细胞癌 HCCLM3 细胞的细胞迁移,而 miR-503-5p 低表达促进了 HCCLM3 细胞的迁移和侵袭^[12]。但 miR-503-5p 在结直肠癌细胞增殖和凋亡中的作用尚未可知。本实验中,结直肠癌细胞 SW620、LOVO 和 HT29 中 miR-503-5p 表达量减少,与 Jiang 等^[23]的报道一致。另外,转染 miR-503-5p 明显减少 HT29 细胞的细胞存活率、Ki-67、CyclinD1 蛋白表达量,提高细胞凋亡率、Cleaved PARP 和 Cleaved caspase-3 蛋白水平,说明 miR-503-5p 具有一定的抗结直肠癌的功能,可以抑制结直肠癌细胞的增殖,并诱导细胞凋亡,与李小平等^[9]的研究相符。

lncRNA 的作用机制复杂。lncRNA 可以与 DNA、蛋白质、mRNA 或 miRNA 发生物理结合,并改变结合者的表达,定位和功能。在各种作用机制中,与 lncRNA 的 miRNA 竞争性结合的报道越来越多^[24]。通过竞争性结合常见的 miRNA, lncRNA 减轻了 miRNA 引起的靶向 mRNA 的降解和/或翻译抑制^[2]。如 BLACAT1 通过海绵 miR-361 调节 ABCB1 来促进胃癌的奥沙利铂耐药性^[25]。本研究检测到结直肠癌细胞中 BLACAT1 和 miR-503-5p 表达呈负相关。进一步探索 BLACAT1 影响结直肠癌细胞增殖和凋亡的机制,生物信息学预测与双荧光素酶报告实验显示, BLACAT1 靶向 miR-503-5p。上调或下调 BLACAT1 明显调控 miR-503-5p 的表达,提示 BLACAT1 具有负向 miR-503-5p 表达的作用。此外,干扰 miR-503-5p 部分逆转沉默 BLACAT1 抑制结直肠癌细胞增殖、Ki-67、CyclinD1 蛋白表达和诱导结直肠癌细胞凋亡、Cleaved PARP、Cleaved caspase-3 蛋白表达的作用。这些结果表明, BLACAT1 可能是通过靶向调控 miR-503-5p 的表达,从而影响结直肠癌细胞的增殖和凋亡过程。

综上所述, lncRNA BLACAT1 在结直肠癌中表达上调, miR-503-5p 表达下调,沉默 BLACAT1 可以抑制结直肠癌细胞的增殖,和促进细胞凋亡,沉默 BLACAT1 发挥抗肿瘤作用的机制与靶向调控 miR-503-5p 的表达密切相关,为结直肠癌的临床诊断和治疗提供了有前景的靶点。

参考文献

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J

Clin, 2018, 68(6): 394-424.

- [2] CUI C, ZHAI D, CAI L, et al. Long Noncoding RNA HEIH promotes colorectal cancer tumorigenesis via counteracting mir-939-mediated transcriptional repression of Bcl-xL [J]. Cancer Res Treat, 2018, 50(3): 992-1008.
- [3] MARGINEAN E C, MELOSKY B. Is there a role for programmed death ligand-1 testing and immunotherapy in colorectal cancer with microsatellite instability? part II —the challenge of programmed death ligand-1 testing and its role in microsatellite instability-high colorectal cancer [J]. Arch Pathol Lab Med, 2018, 142(1): 26-34.
- [4] HUO X, HAN S, WU G, et al. Dysregulated long noncoding RNAs (lncRNAs) in hepatocellular carcinoma: implications for tumorigenesis, disease progression, and liver cancer stem cells [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 165-174.
- [5] LI C, TAN F, PEI Q, et al. Non-coding RNA MF12-AS1 promotes colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion through miR-574-5p/MYCBP axis [J/OL]. Cell Prolif, 2019, 52(4): e12632. DOI: 10.1111/cpr.12632.
- [6] PENG Y, LENG W, DUAN S, et al. Long noncoding RNA BLACAT1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and its down-regulation suppressed cancer cell development through endogenously competing against hsa-miR-485-5p [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 116: 109027. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109027.
- [7] HU X, LIU Y, DU Y, et al. Long non-coding RNA BLACAT1 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by miR-150-5p/CCR2 [J]. Cell Biosci, 2019, 9(1): 14-22.
- [8] DONG Z, WANG Y. LncRNA BLACAT1 accelerates the proliferation and migration of osteosarcoma cells through regulating STAT3 [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(3): 571-579.
- [9] 李小平, 韩兴涛, 杨金辉, 等. miR-503-5p 通过干扰 Rb/E2F 信号通路抑制膀胱癌 T24 和 EJ 细胞的增殖 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(10): 1360-1364.
- [10] PARK G B, KIM D. MicroRNA-503-5p inhibits the CD97-mediated JAK2/STAT3 pathway in metastatic or paclitaxel-resistant ovarian cancer cells [J]. Neoplasia, 2019, 21(2): 206-215.
- [11] SUN Q, LI Q, XIE F. LncRNA-MALAT1 regulates proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells by targeting miR-503-5p [J]. OncoTargets and therapy, 2019, 12: 6297-6307.
- [12] JIANG S P, LI Z R. MiR-503-5p regulates cell epithelial-to-mesenchymal transition, metastasis and prognosis of hepatocellular carcinoma through inhibiting WEE1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(5): 2028-2037.
- [13] ZHENG X, ZHANG Y, ZHANG L, et al. Synergistic inhibition of sunitinib and ethaselen against human colorectal cancer cells proliferation [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 212-220.
- [14] ANASTASIADOU E, JACOB L S, SLACK F J. Non-coding RNA networks in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(1): 5-18.
- [15] GALAMB O, BARTÁK B K, KALMÁR A, et al. Diagnostic and prognostic potential of tissue and circulating long non-coding RNAs in colorectal tumors [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(34): 5026-5048.
- [16] CHEN X, DAI M, ZHU H, et al. Evaluation on the diagnostic and prognostic values of long non-coding RNA BLACAT1 in common types of human cancer [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 160.

- [17] YE J R, LIU L, ZHENG F. Long noncoding RNA bladder cancer associated transcript 1 promotes the proliferation, migration, and invasion of nonsmall cell lung cancer through sponging miR-144 [J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(10): 845-852.
- [18] XU R, CAO X R, ZHANG B Q, et al. BLACAT1 is negatively associated with prognosis in patients with NSCLC and inhibits cell progression, metastasis and epithelial-mesenchymal transition through down-regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(14): 6217-6225.
- [19] LI X, QI S, MA D, et al. Long non-coding RNA BLACAT1 promotes the proliferation and invasion of glioma cells via Wnt/ β -catenin signaling[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(6): 4703-4708.
- [20] SHAN D, SHANG Y, HU T. Long noncoding RNA BLACAT1 promotes cell proliferation and invasion in human cervical cancer [J]. Oncol Lett, 2018, 15(3): 3490-3495.
- [21] XIAN D, ZHAO Y. Lnc RNA KCNQ10T1 enhanced the methotrexate resistance of colorectal cancer cells by regulating miR-760/PPP 1R1B via the cAMP signalling pathway[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(6): 3808-3823.
- [22] YU B, YE X, DU Q, et al. The long non-coding RNA CRNDE promotes colorectal carcinoma progression by competitively binding miR-217 with TCF7L2 and enhancing the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(6): 2489-2502.
- [23] PENG C L, ZHAO X J, WEI C C, et al. LncRNA HOTAIR promotes colon cancer development by down-regulating miRNA-34a [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(13): 5752-5761.
- [24] WANG L, WEI Z, WU K, et al. Long noncoding RNA B3GALT5-AS1 suppresses colon cancer liver metastasis via repressing microRNA-203 [J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(12): 3662-3682.
- [25] WU X, ZHENG Y, HAN B, et al. Long noncoding RNA BLACAT1 modulates ABCB1 to promote oxaliplatin resistance of gastric cancer via sponging miR-361 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99: 832-838.

(收稿日期:2019-12-13,修回日期:2020-02-09)

引用本文:王征,张浩,李伟汉,等.自身免疫性甲状腺炎甲状腺组织和外周血单个核细胞中微小RNA-142-3p、微小RNA-150表达及临床意义[J].安徽医药,2021,25(8):1642-1646.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.08.039.

◇临床医学◇



自身免疫性甲状腺炎甲状腺组织和外周血单个核细胞中微小RNA-142-3p、微小RNA-150表达及临床意义

王征,张浩,李伟汉,翟晓建,宋春峰,郭满

作者单位:南阳市中心医院乳腺甲状腺外科,河南 南阳 473003

摘要: **目的** 探讨甲状腺组织和外周血单个核细胞中微小RNA-142-3p(miR-142-3p)、微小RNA-150(miR-150)在桥本甲状腺炎(HT)中的表达水平及临床意义。**方法** 选取2017年3月至2019年6月南阳市中心医院行甲状腺手术切除并经病理确诊为HT病人87例为HT组;同期选取南阳市中心医院行甲状腺腺瘤切除手术的非癌病人73例为对照组。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测两组甲状腺组织和外周血单个核细胞中miR-142-3p、miR-150表达水平;分析HT病人miR-142-3p、miR-150水平与甲状腺功能参数及相关细胞因子相关性。**结果** HT组甲状腺组织和外周血单个核细胞中miR-142-3p[(1.54±0.32)、(2.25±0.54)]比[(1.00±0.23)、(1.00±0.24)]、miR-150[(2.21±0.43)、(3.78±1.14)]比[(1.00±0.16)、(1.00±0.19)]表达水平均显著高于对照组($P<0.05$);两组甲状腺功能参数及相关细胞因子水平比较,均差异有统计学意义,HT组促甲状腺激素(TSH)、甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)、白细胞介素17(IL-17)、白细胞介素6(IL-6)、干扰素- γ (IFN- γ)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)水平显著高于对照组($P<0.05$),游离三碘甲状腺原氨酸(FT_3)、游离甲状腺素(FT_4)水平显著低于对照组($P<0.05$);HT病人甲状腺组织和外周血单个核细胞中miR-142-3p、miR-150水平呈正相关,且与TSH、TPOAb、IL-17、IL-6、IFN- γ 、TGF- β 1呈正相关,与 FT_3 、 FT_4 呈负相关($P<0.05$)。**结论** 甲状腺组织和外周血单个核细胞中miR-142-3p、miR-150水平的变化与HT有关。miR-142-3p、miR-150对评价HT的早期危险性、降低患病率有重要意义。

关键词: 甲状腺炎,自身免疫性; 甲状腺组织; 外周血单个核细胞; 微小RNA-142-3p; 微小RNA-150

Expressions and clinical significance of miR-142-3p and miR-150 in thyroid tissue and peripheral blood mononuclear cells of Hashimoto's thyroiditis

WANG Zheng,ZHANG Hao,LI Weihang,ZHAI Xiaojian,SONG Chunfeng,GUO Man

Author Affiliation:Department of Breast and Thyroid Surgery, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473003, China