

引用本文:任继兵,陈梦琳,李传斌.长链基因间非编码RNA 00963通过靶向微小RNA-148b-3p对结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J].安徽医药,2021,25(10):2093-2098.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.043.

◇临床医学◇



长链基因间非编码RNA 00963通过靶向微小RNA-148b-3p对结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

任继兵,陈梦琳,李传斌

作者单位:松滋市人民医院普外二科,湖北 松滋 434200

摘要: **目的** 探讨长链基因间非编码RNA00963(LINC00963)对结直肠癌细胞恶性生物学行为的影响及作用机制。**方法** 本研究于2018年8月至2019年5月进行;正常结直肠黏膜上皮细胞NCM460以及结直肠癌细胞系HT29、SW480、SW1116购自中国科学院上海细胞库,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测微小RNA-148b-3p(miR-148b-3p)和LINC00963的表达水平;双荧光素酶报告实验检测miR-148b-3p和LINC00963的靶向关系。将HT29细胞分为miR-NC组、miR-148b-3p组、si-NC组、si-LINC00963组、si-LINC00963+anti-miR-NC组、si-LINC00963+anti-miR-148b-3p组;蛋白质印迹法(Western Blotting)检测蛋白表达;四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞活性;Transwell检测各组细胞迁移和侵袭。**结果** 与NCM460细胞相比,HT29、SW480、SW1116细胞中miR-148b-3p的表达水平显著降低[(0.32±0.04)、(0.48±0.04)、(0.39±0.04)比(1.03±0.09)],LINC00963的表达水平显著升高[(3.13±0.31)、(2.76±0.27)、(2.91±0.28)比(1.00±0.09)],差异有统计学意义($P<0.05$)。LINC00963靶向调控miR-148b-3p的表达。干扰LINC00963后,细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)蛋白表达水平降低,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)表达水平升高,HT29细胞活性[48 h为(0.43±0.04)比(0.65±0.06),72 h为(0.56±0.05)比(1.05±0.09)]降低,及迁移数量减少[(39.65±3.42)个比(81.24±8.06)个],侵袭数量减少[(32.14±3.28)个比(69.54±6.27)个],差异有统计学意义($P<0.05$)。过表达miR-148b-3p后,Cyclin D1、MMP-2、MMP-9表达水平降低,p21表达水平升高,HT29细胞活性[48 h为(0.49±0.04)比(0.67±0.06),72 h为(0.62±0.06)比(1.06±0.09)]降低,及迁移数量减少[(45.32±4.28)个比(86.27±8.25)个],侵袭数量减少[(39.54±4.03)个比(73.65±7.24)个],差异有统计学意义($P<0.05$)。抑制miR-148b-3p表达可逆转干扰LINC00963对HT29细胞的作用。**结论** 干扰LINC00963可通过上调miR-148b-3p抑制结直肠癌HT29细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词: 结直肠肿瘤; 长链基因间非编码RNA00963; 微小RNA-148b-3p; 增殖; 迁移; 侵袭

Effect of long intergenic non-coding RNA 00963 (LINC00963) on the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting microRNA-148b-3p (miR-148b-3p)

REN Jibing, CHEN Menglin, LI Chuanbin

Author Affiliation: Second Department of General Surgery, Songzi People's Hospital, Songzi, Hubei 434200, China

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of long-chain intergenic non-coding RNA 00963 (LINC00963) on the malignant biological behavior of colorectal cancer cells. **Methods** This experiment was conducted from August 2018 to May 2019, normal colorectal mucosal epithelial cells NCM460 and colorectal cancer cell lines HT29, SW480, SW1116 were purchased from the Shanghai Cell Bank of the Chinese Academy of Sciences, real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of microRNA-148b-3p (miR-148b-3p) and LINC00963; double luciferase reporter experiment was used to detect the targeting relationship between miR-148b-3p and LINC00963. HT29 cells were assigned into miR-NC group, miR-148b-3p group, si-NC group, si-LINC00963 group, si-LINC00963+anti-miR-NC group, si-LINC00963+anti-miR-148b-3p group; Western blotting was used to detect protein expression; tetramethylazolium salt colorimetric method (MTT) to detect cell viability; Transwell was used to detect cell migration and invasion in each group. **Results** Compared with NCM460 cells, the expression level of miR-148b-3p in HT29, SW480 and SW1116 cells was significantly reduced [(0.32±0.04), (0.48±0.04), (0.39±0.04) vs. (1.03±0.09)], LINC00963 expression level was significantly increased [(3.13±0.31), (2.76±0.27), (2.91±0.28) vs. (1.00±0.09)], the difference was statistically significant ($P<0.05$). LINC00963 targeted the expression of miR-148b-3p. After interference with LINC00963, Cyclin D1, matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) protein expression levels were decreased, and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) expression level was increased, the activity of HT29 cells [48 h: (0.43±0.04) vs. (0.65±0.06), 72 h: (0.56±0.05) vs. (1.05±0.09)] was decreased, and the number of migration [(39.65±3.42) vs. (81.24±8.06)] was decreased, the number of invasions was decreased [(32.14±3.28) vs. (69.54±6.27)], the difference was statistically significant ($P<0.05$). After over-expression of miR-148b-3p, Cyclin D1, MMP-2,

MMP-9 expression levels were decreased, p21 expression was increased, HT29 cell viability [48 h: (0.49±0.04) *vs.* (0.67±0.06), 72 h: (0.62±0.06) *vs.* (1.06±0.09)] was decreased, and the number of migration was decreased [(45.32±4.28) *vs.* (86.27±8.25)], and the number of invasion was decreased [(39.54±4.03) *vs.* (73.65±7.24)], the difference was statistically significant ($P<0.05$). Suppressing the expression of miR-148b-3p can reverse the effect of LINC00963 on HT29 cells. **Conclusion** Interfering with LINC00963 can inhibit the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer HT29 cells by up-regulating miR-148b-3p.

Key words: Colorectal neoplasms; LINC00963; miR-148b-3p; Proliferation; Migration; Invasion

结直肠癌(CRC)是常见的消化道恶性肿瘤之一,靶向治疗可有效改善生存率,降低病死率^[1]。研究表明异常表达的长链非编码RNA(lncRNA)影响了CRC的发生发展,并作为结直肠癌诊断、治疗及预后的靶标^[2]。长链基因间非编码RNA 00963(LINC00963)是一种新的长非编码RNA,敲低LINC00963可减弱C4-2细胞的增殖、侵袭能力,促进细胞凋亡,通过表皮生长因子受体(EGFR)信号通路参与前列腺癌从雄激素依赖向雄激素独立的转变^[3]。LINC00963在肝癌细胞中上调,其通过激活磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)途径和促进肝细胞癌细胞的增殖能力显著延长肝细胞癌细胞的G0/G1期^[4]。复发和转移是导致结直肠癌病人死亡的重要原因,而上皮-间质转化(EMT)在多种类型肿瘤的原位浸润和远处转移扮演重要角色,研究发现miRNA可参与调控EMT转化影响结直肠癌的侵袭及转移^[5]。微小RNA-148b-3p(miR-148b-3p)是miRNA的一种,研究发现miR-148b-3p在胶质瘤细胞中低表达,过表达抑制胶质瘤增殖和侵袭^[6];此外,微小RNA-148-b(miR-148b)可调节垂体腺瘤细胞的增殖和侵袭^[7]。但LINC00963和miR-148b-3p对结直肠癌细胞增殖、迁移侵袭的影响还尚未可知。本研究旨在研究LINC00963是否通过控miR-148b-3p影响结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究于2018年8月至2019年5月进行。

1 材料与方法

1.1 材料 正常结直黏膜上皮细胞NCM460和结直肠癌细胞株HT29、SW480、SW1116购自中国科学院上海细胞库。RPMI-1640培养基(美国Gibico);荧光定量试剂盒(日本TaKaRa公司);Transwell小室、基质胶(美国BD公司);四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国Sigma公司);放射免疫沉淀分析(RIPA)蛋白裂解液(上海碧云天)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 用RPMI-1640培养基常规培养正常结直黏膜上皮细胞NCM460和结直肠癌细胞株HT29、SW480、SW1116;取生长至80%融合的HT29细胞,将LINC00963过表达载体阴性对照

(pcDNA)、LINC00963过表达载体(pcDNA-LINC00963)、LINC00963抑制表达载体阴性对照(si-NC)、LINC00963抑制表达载体(si-LINC00963)、miR-148b-3p模拟物阴性对照(miR-NC)、miR-148b-3p模拟物(miR-148b-3p)转染至HT29细胞,分别记为pcDNA组、pcDNA-LINC00963组、si-NC组、si-LINC00963组、miR-NC组、miR-148b-3p组;将si-LINC00963分别与miR-148b-3p抑制剂(anti-miR-148b-3p)及阴性对照(anti-miR-NC)共转染至HT29细胞,记为si-LINC00963+anti-miR-NC组、si-LINC00963+anti-miR-148b-3p组。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2.2 qRT-PCR检测 miR-148b-3p 和 LINC00963 表达水平 提取各组细胞总RNA,反转录成cDNA,按试剂盒说明进行PCR,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。miR-148b-3p引物的正向序列为5'-GGATGT-CAGTGCATCACAGAAC-3',反向序列为5'-CAGTGC-GTGTCTGTGGAGT-3';LINC00963引物的正向序列为5'-GGTAAATCGAGGCCAGAGAT-3',反向序列为5'-ACGTGGATGACAGCGTGTGA-3';U6引物的正向序列为5'-CGCTTCGGGCACATATAC-3',反向序列为5'-TTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物的正向序列为5'-CATGAGAAG-TATGACAACAGCCT-3',反向序列为5'-AGTCCTTC-CACGATACCAAAGT-3'。

1.2.3 蛋白质印迹法(Western blotting)检测蛋白的表达 提取细胞总蛋白,定量后进行SDS-PAGE电泳,转膜、封闭;加入细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9等一抗在4℃冰箱孵育过夜,洗膜后加入二抗室温孵育2h,显影,定影,分析蛋白条带吸光度值。

1.2.4 MTT检测细胞增殖 各组HT29细胞分别培养24h、48h、72h,按试剂盒说明操作,酶标仪检测490nm处吸光度(OD)值。

1.2.5 Transwell检测细胞迁移和侵袭 将无血清培养基重悬的细胞接种于Transwell上室,培养24h,用结晶紫染色细胞,显微镜下随机选取5个计数,取均值。侵袭实验:用基质胶覆盖Transwell上室,其余同迁移操作。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验 将LINC00963野生型报告质粒(WT-LINC00963)和突变型报告质粒(MUT-LINC00963)分别 miR-NC 和 miR-148b-3p 与转染至 HT29 细胞,按试剂盒说明操作,检测荧光素酶活性。

1.3 统计学方法 用 SPSS 20.00 进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较行 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌细胞系中 LINC00963 和 miR-148b-3p 的表达 结直肠癌细胞 HT29、SW480、SW1116 中 LINC00963 的表达水平高于 NCM460 细胞,而 miR-148b-3p 的表达水平低于 NCM460 细胞 ($P < 0.05$),见表 1。选择表达变化最明显的 HT29 细胞用作后续试验。

表1 LINC00963和miR-148b-3p在结直肠癌细胞中的表达 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	LINC00963	miR-148b-3p
NCM460	9	1.00±0.09	1.03±0.09
HT29	9	3.13±0.31 ^①	0.32±0.04 ^①
SW480	9	2.76±0.27 ^①	0.48±0.04 ^①
SW1116	9	2.91±0.28 ^①	0.39±0.04 ^①
F 值		134.917	291.814
P 值		0.000	0.000

注:LINC00963 为长链基因间非编码 RNA00963,miR-148b-3p 为微小 RNA-148b-3p。

①与 NCM460 组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 LINC00963 靶向调控 miR-148b-3p 的表达 LINC00963 与 miR-148b-3p 有结合位点(图 1)。miR-148b-3p 与 WT-LINC00963 共转染的 HT29 细胞的荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$);而 miR-148b-3p 与 MUT-LINC00963 共转染的 HT29 细胞荧光素酶活性差异无统计学意义(表 2)。pcDNA-LINC00963 组 miR-148b-3p 的表达水平低于 pcDNA 组; si-LINC00963 组 miR-148b-3p 的表达水平高于 si-NC 组 ($P < 0.05$)(表 3)。可见, LINC00963 可靶向调控 miR-148b-3p 的表达。

2.3 干扰 LINC00963 对 HT29 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 与 si-NC 组相比, si-LINC00963 组 LINC00963 表达水平, Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 表达水平降低, p21 表达水平升高, HT29 细胞活性及迁移侵袭数量降低($P < 0.05$)(图 2, 表 4)。可见,干

WT-LINC00963 5' cugaugccucccauUGCACUGg 3'
miR-148b-3p 3' uguuucagacacuACGUGACu 5'
MUT-LINC00963 5' cugaugccucccauCAUGAGCg 3'

图1 LINC00963与miR-148b-3p的互补核苷酸序列

表2 HT29细胞荧光素酶活性 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	WT-LINC00963	MUT-LINC00963
miR-NC	9	1.02±0.09	1.00±0.08
miR-148b-3p	9	0.33±0.04 ^①	0.98±0.09
t 值		21.018	0.498
P 值		0.000	0.625

注: WT-LINC00963 为 LINC00963 野生型报告质粒, MUT-LINC00963 为 LINC00963 突变型报告质粒, miR-NC 为 miR-148b-3p 模拟物阴性对照, miR-148b-3p 为 miR-148b-3p 模拟物。

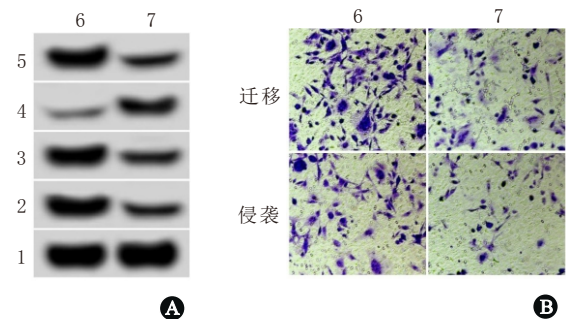
①与 miR-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

表3 LINC00963 调控 miR-148b-3p 的表达 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-148b-3p
pcDNA	9	1.01±0.09
pcDNA-LINC00963	9	0.36±0.03 ^①
si-NC	9	1.03±0.08
si-LINC00963	9	2.87±0.28 ^②
F 值		448.308
P 值		0.000

注:LINC00963 为长链基因间非编码 RNA00963,miR-148b-3p 为微小 RNA-148b-3p, pcDNA 为 LINC00963 过表达载体阴性对照, pcDNA-LINC00963 为 LINC00963 过表达载体, si-NC 为 LINC00963 抑制表达载体阴性对照, si-LINC00963 为 LINC00963 抑制表达载体。

①与 pcDNA 组比较, $t = 9.004$, $P < 0.05$ 。②与 si-NC 组比较, $t = 25.489$, $P < 0.05$ 。

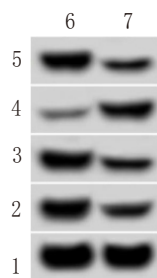


注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 2—基质金属蛋白酶-9; 3—基质金属蛋白酶-2; 4—细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A; 5—细胞周期蛋白 D1; 6—LINC00963 抑制表达载体阴性对照; 7—LINC00963 抑制表达载体。

图2 干扰LINC00963对HT29细胞迁移侵袭和相关蛋白表达的影响: A为Cyclin D1、p21、MMP-2、MMP-9蛋白的表达; B为HT29细胞迁移侵袭数(结晶紫染色×200倍)

扰 LINC00963 表达抑制结直肠癌 HT29 细胞增殖、迁移和侵袭。

2.4 miR-148b-3p 过表达对结直肠癌 HT29 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 与 miR-NC 组相比, miR-148b-3p 组 miR-148b-3p 表达水平升高, Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 表达水平降低, p21 表达水平升高, HT29 细胞活性及迁移侵袭数量降低($P < 0.05$)(图 3, 表 5)。可见, miR-148b-3p 过表达抑制结直肠癌 HT29 细胞增殖、迁移和侵袭。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—基质金属蛋白酶-9;3—基质金属蛋白酶-2;4—细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A;5—细胞周期蛋白D1;6—LINC00963抑制表达载体阴性对照;7—LINC00963抑制表达载体。

图3 Cyclin D1、p21、MMP-2、MMP-9蛋白表达

2.5 抑制 miR-148b-3p 表达逆转了干扰 LINC00963 表达对 HT29 细胞增殖、迁移和侵袭的作用 与 si-LINC00963+anti-miR-NC 组相比, si-LINC00963+anti-miR-148b-3p 组 miR-148b-3p 的表达水平降低, Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 表达水平升高, p21 表达水平降低, HT29 细胞活性以及迁移侵袭数量升高 ($P<0.05$) (表6, 图4)。

3 讨论

目前, 结直肠癌的发病率和死亡率均较高, 复发、转移和耐药已成为其临床治疗的主要问题, 特异性的靶向药物可明显提高肿瘤对药物的反应率, 延长病人的无病生存期和总生存期, 改善病人生活质

表4 干扰 LINC00963 对 HT29 细胞增殖、迁移和侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	LINC00963	细胞活性			迁移细胞数	侵袭细胞数	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白	MMP-2 蛋 白	MMP-9 protein
		24 h	48 h	72 h						
si-NC	1.02±0.08	0.36±0.03	0.65±0.06	1.05±0.09	81.24±8.06	69.54±6.27	0.63±0.06	0.25±0.03	0.77±0.06	0.72±0.07
si-LINC00963	0.43±0.04 ^①	0.34±0.03	0.43±0.04 ^①	0.56±0.05 ^①	39.65±3.42 ^①	32.14±3.28 ^①	0.29±0.03 ^①	0.59±0.06 ^①	0.35±0.04 ^①	0.31±0.03 ^①
t 值	19.789	1.414	9.153	14.278	14.250	15.856	15.205	15.205	17.473	16.151
P 值	0.000	0.177	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: LINC00963 为长链基因间非编码 RNA00963, HT29 为结直肠癌细胞, CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1, p21 为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A, MMP-2 为基质金属蛋白酶 2, si-NC 为 LINC00963 抑制表达载体阴性对照, si-LINC00963 为 LINC00963 抑制表达载体。

①与 si-NC 组比较, $P<0.05$ 。

表5 miR-148b-3p 过表达对 HT29 细胞增殖、迁移和侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	miR-148b- 3p	细胞活性			迁移细胞数	侵袭细胞数	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白	MMP-2 蛋 白	MMP-9 protein
		24 h	48 h	72 h						
miR-NC	1.01±0.08	0.37±0.03	0.67±0.06	1.06±0.09	86.27±8.25	73.65±7.24	0.66±0.07	0.22±0.03	0.76±0.06	0.71±0.07
miR-148b-3p	2.79±0.26 ^①	0.36±0.03	0.49±0.04 ^①	0.62±0.06 ^①	45.32±4.28 ^①	39.54±4.03 ^①	0.33±0.03 ^①	0.53±0.05 ^①	0.38±0.04 ^①	0.36±0.03 ^①
t 值	19.630	0.707	7.489	12.203	13.218	12.350	12.999	15.949	15.809	13.787
P 值	0.000	0.490	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: LINC00963 为长链基因间非编码 RNA00963, HT29 为结直肠癌细胞, CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1, p21 为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A, MMP-2 为基质金属蛋白酶 2, miR-NC 为 miR-148b-3p 模拟物阴性对照, miR-148b-3p 为 miR-148b-3p 模拟物。

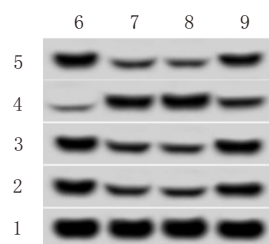
①与 miR-NC 组比较, $P<0.05$ 。

表6 抑制 miR-148b-3p 和 LINC00963 表达对 HT29 细胞增殖、迁移和侵袭的作/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复 次数	miR- 148b-3p	细胞活性			迁移细胞 数	侵袭细胞 数	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
			24 h	48 h	72 h						
si-NC	9	1.00±0.07	0.38±0.04	0.69±0.06	1.08±0.09	83.65±8.27	68.25±6.73	0.64±0.06	0.24±0.03	0.78±0.07	0.71±0.06
si-LINC00963	9	2.93± 0.28 ^①	0.36±0.03	0.47± 0.04 ^①	0.59± 0.05 ^①	38.24± 4.86 ^①	33.14± 4.03 ^①	0.28± 0.03 ^①	0.58± 0.05 ^①	0.36± 0.03 ^①	0.30± 0.03*
si-LINC00963 +anti-miR-NC	9	2.97±0.29	0.35±0.04	0.44±0.04	0.55±0.05	36.98±4.17	31.76±3.58	0.26±0.03	0.61±0.06	0.34±0.03	0.29±0.03
si-LINC00963 +anti-miR- 148b-3p	9	1.64± 0.17 ^②	0.37±0.03	0.59± 0.05 ^②	0.86± 0.07 ^②	71.25± 6.89 ^②	57.25± 5.08 ^②	0.51± 0.05 ^②	0.36± 0.03 ^②	0.67± 0.06 ^②	0.59± 0.05 ^②
F 值		174.987	1.200	51.194	123.333	127.356	117.361	154.443	143.810	171.117	202.443
P 值		0.000	0.326	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: LINC00963 为长链基因间非编码 RNA00963, HT29 为结直肠癌细胞, CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1, p21 为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A, MMP-2 为基质金属蛋白酶 2, si-NC 为 LINC00963 抑制表达载体阴性对照, si-LINC00963 为 LINC00963 抑制表达载体。

①与 si-NC 组比较, $P<0.05$ 。②与 si-LINC00963+anti-miR-NC 组比较, $P<0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—基质金属蛋白酶-9;3—基质金属蛋白酶-2;4—细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A;5—细胞周期蛋白 D1;6—LINC00963 抑制表达载体阴性对照;7—LINC00963 抑制表达载体;8—si-LINC00963 与阴性对照共转染至 HT29 细胞;9—si-LINC00963 与 miR-148b-3p 抑制剂共转染至 HT29 细胞。

图4 Cyclin D1、p21、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达

量,延长病人的生存时间^[8-9]。lncRNA 影响肿瘤进展,可作为其诊断、治疗的靶点^[10]。LINC00963 在黑色素瘤细胞中上调表达,干扰 LINC00963 通过 miR-608/NACC1 途径可抑制黑色素瘤细胞的增殖,迁移和侵袭^[11]。LINC00963 表达升高与非小细胞肺癌预后不良相关,可促进体外非小细胞肺癌细胞迁移和侵袭^[12]。本研究结果显示,结直肠癌细胞系 HT29、SW480、SW1116 中 LINC00963 表达水平升高,说明 LINC00963 在结直肠癌细胞中高表达。且本研究还发现转染 si-LINC00963 后,HT29 细胞活性降低,迁移和侵袭数量降低;表明干扰 LINC00963 抑制结直肠癌的增殖、迁移和侵袭。此外,LINC00963 还能抑制慢性肾功能衰竭大鼠肾间质纤维化和氧化应激^[13]。基质金属蛋白酶(MMP)中的 MMP-2 和 MMP-9 与肿瘤的浸润和转移密切相关,且在结直肠癌组织中呈高表达^[14]。细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)是细胞周期调控蛋白,其低表达会抑制细胞的生长,有研究发现 CyclinD1 在结肠癌中过表达,也与结肠癌淋巴结转移、肿瘤淋巴结远处转移(TNM)分期及组织学类型相关^[15]。而本研究结果显示,转染 si-LINC00963 后,结直肠癌中 Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 表达水平显著降低,表明干扰 LINC00963 可抑制 Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达,进一步证明干扰 LINC00963 可抑制结直肠癌的增殖、迁移和侵袭。

同样 miRNA 作为一类重要的基因表达调控因子,参与癌症发生与发展^[16]。有研究报道 miR-148b-3p 可通过直接靶向 HOX 转录物反义 RNA (HOTAIR)抑制胶质瘤细胞的恶性生物学行为^[17]; miR-148b-3p 通过抑制胞质分裂作用因子 6(Dock6) / Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1(Rac1) / 细胞分裂周期蛋白 42(Cdc42)轴抑制胃癌转移^[18]。miR-148b-3p 还可抑制肾癌细胞及胃肠道间质瘤 882 细胞的增殖和迁移^[19-20]。本研究结果显示,结直肠癌细胞 HT29、SW480、SW1116 中 miR-148b-3p 的表达水平

显著降低,说明 miR-148b-3p 在结肠癌中低表达。过表达 miR-148b-3 可降低 HT29 活性和迁移侵袭数量;说明过表达 miR-148b-3 可抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭。此外,本实验结果显示 miR-148b-3p 受 LINC00963 的靶向调控,抑制 miR-148b-3p 表达能逆转干扰 LINC00963 对 HT29 细胞的作用。提示,LINC00963 影响 HT29 细胞增殖、迁移和侵袭机制或与 miR-148b-3p 相关。

综上所述,干扰 LINC00963 可通过调控 miR-148b-3p 抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

参考文献

- [1] 郭文文, 茆家定. 结肠癌靶向治疗的研究进展[J]. 浙江临床医学, 2017, 19(5): 973-975.
- [2] 吴佳燕, 洪晓明. 长链非编码 RNA 与结直肠癌诊断、治疗及预后的研究进展[J]. 肿瘤, 2017, 37(3): 295-301.
- [3] WANG L, HAN S, JIN G, et al. Linc00963: a novel, long non-coding RNA involved in the transition of prostate cancer from androgen-dependence to androgen-independence [J]. Int J Oncol, 2014, 44(6): 2041-2049.
- [4] WU JH, TIAN XY, AN QM, et al. LINC00963 promotes hepatocellular carcinoma progression by activating PI3K/AKT pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(6): 1645-1652.
- [5] 郝小军, 畅智慧, 赵相轩, 等. miRNA 调控 EMT 影响结直肠癌侵袭转移的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(1): 142-145.
- [6] 李妍哲, 李朝晖, 王冠, 等. 微小 RNA miR-148b-3p 在人胶质瘤细胞中的表达及意义[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(9): 1489-1492.
- [7] HE W, HUANG L, LI M, et al. MiR-148b, MiR-152/ALCAM axis regulates the proliferation and invasion of pituitary adenoma cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(2): 792-803.
- [8] 梁慧玲, 何晓琴, 甘园园, 等. 转移性结直肠癌分子靶向治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(5): 873-878.
- [9] 陈淑珍. 结直肠癌靶向治疗的现状与未来[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(4): 307-315.
- [10] 潘雪峰, 范乃军, 高春芳. LncRNA 与结直肠癌诊断治疗的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2017, 23(2): 111-115.
- [11] JIAO H, JIANG S, WANG H, et al. Upregulation of LINC00963 facilitates melanoma progression through miR-608/NACC1 pathway and predicts poor prognosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 504(1): 34-39.
- [12] YU T, ZHAO Y, HU Z, et al. MetaLnc9 facilitates lung cancer metastasis via a PGK1-activated AKT/mTOR pathway [J]. Cancer Res, 2017, 77(21): 5782-5794.
- [13] CHEN W, ZHANG L, ZHOU ZQ, et al. Effects of long non-coding RNA LINC00963 on renal interstitial fibrosis and oxidative stress of rats with chronic renal failure via the foxo signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(2): 815-828.
- [14] 陈翔, 吴曙辉, 陆宝华, 等. MMP-2、MMP-9 在老年结直肠癌中的表达及其临床病理特征的关系[J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(12): 1779-1781.
- [15] 王大东, 韦春回. 结肠癌中 CyclinD1 蛋白的表达及临床意义 [J]. 中国社区医师, 2017, 33(22): 118-119.

- [16] 来建飞, 丁蕾, 窦晓兵. miRNA在结直肠癌中的作用研究进展[J]. 浙江临床医学, 2017, 19(2): 374-376.
- [17] WANG G, LI Z, TIAN N, et al. miR-148b-3p inhibits malignant biological behaviors of human glioma cells induced by high HOTAIR expression[J]. Oncol Lett, 2016, 12(2): 879-886.
- [18] LI X, JIANG M, CHEN D, et al. miR-148b-3p inhibits gastric cancer metastasis by inhibiting the Dock6/Rac1/Cdc42 axis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 71.
- [19] ZHANG H, YE Q, DU Z, et al. MiR-148b-3p inhibits renal carcinoma cell growth and pro-angiogenic phenotype of endothelial cell potentially by modulating FGF2[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 359-367.
- [20] WANG Y, LI J, KUANG D, et al. miR-148b-3p functions as a tumor suppressor in GISTs by directly targeting KIT[J]. Cell Commun Signal, 2018, 16(1): 16.
- (收稿日期: 2019-08-08, 修回日期: 2019-08-22)

引用本文: 谭定春, 秦惠何. 2型人类表皮生长因子受体基因对结直肠癌自然杀伤细胞92局部浸润的影响及机制[J]. 安徽医药, 2021, 25(10): 2098-2101. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.044.

◇临床医学◇



2型人类表皮生长因子受体基因对结直肠癌自然杀伤细胞92局部浸润的影响及机制

谭定春, 秦惠何

作者单位: 深圳市龙华区人民医院全科医学, 广东 深圳 518110

摘要: **目的** 探讨抑制2型人类表皮生长因子受体(HER2)基因表达对结直肠癌自然杀伤细胞92(NK92)细胞局部浸润的影响及机制。**方法** 本研究起止时间为2018年5—11月。结直肠癌细胞(SW480、SW620和HT29)细胞及人正常肠上皮细胞(NCM460)购自美国模式培养物保藏所。Western blotting检测上述细胞中HER2的蛋白表达。Western blotting及ELISA检测HER2的特异性小干扰RNA(si-HER2)转染HT29细胞效率。Transwell小室检测重组HER2及肿瘤培养上清对NK92细胞迁移指数的影响。Transwell小室检测及Western blotting检测si-HER2对NK92细胞迁移指数及 β -catenin表达影响。**结果** 3株结直肠癌细胞HER2表达均明显高于在NCM460细胞表达[(0.104±0.011)、(0.141±0.015)、(0.243±0.018)比(0.018±0.003)]。对照组HER2蛋白及HER2含量均明显高于si-HER2组[(0.467±0.046)比(0.101±0.012)], (125.3±10.1) pg/mL比(74.7±4.6) pg/mL]。重组HER2均能抑制NK92的迁移, 促进 β -catenin蛋白表达, 而转染si-HER2可提高NK92迁移, 且抑制 β -catenin蛋白表达。**结论** 抑制HER2基因表达可增强结直肠癌NK92细胞局部浸润, 机制与下调Wnt/ β -catenin信号有关。

关键词: 结直肠肿瘤; 基因, erbB-2; 受体, 自然杀伤细胞; Wnt信号通路; 趋化运动; NK细胞; β 连环素

Effect and mechanism of HER2 gene on local infiltration and Wnt/ β -catenin signal of NK cells in colorectal cancer

TAN Dingchun, QIN Huihe

Author Affiliation: General Medicine, Shenzhen Longhua District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518110, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of inhibiting the expression of human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) gene on the infiltration of Natural killer cell 92 (NK92) cells in colorectal cancer. **Methods** The start and end time of this study was from May 2018 to November 2018. Colorectal cancer cells (SW480, SW620 and HT29) and human normal intestinal epithelial cells (NCM460) were purchased from American Type Culture Collection. The expression of HER2 protein was detected by Western blotting. Western blotting and ELISA were used to detect the transfection efficiency of HER2-specific small interfering RNA (si-HER2) into HT29 cells. The effect of recombinant HER2 and tumor culture supernatant on NK92 cell migration index was detected by Transwell cell assay. Transwell chamber test and Western blotting test were used to detect the effect of si-HER2 on migration index and β -catenin expression of NK92 cells. **Results** The expression of HER2 in 3 colorectal cancer cells was significantly higher than that in NCM460 cells [(0.018±0.003) vs. (0.104±0.011), (0.141±0.015), (0.243±0.018)]. The expression of HER2 [(0.467±0.046) vs. (0.101±0.012)] and HER2 content [(125.3±10.1) pg/mL vs. (74.7±4.6) pg/mL] in si-HER2 group were significantly lower than those in control group. Recombinant HER2 could inhibit the migration of NK92 [(1.00±0.10) vs. (0.63±0.09)], and promote β -catenin protein expression. However, transfection of si-HER2 could significantly enhance the migration of NK92 and inhibit the expression of β -catenin protein. **Conclusion** Inhibition of HER2 gene expression can enhance the local invasion of colorectal cancer NK92 cells, and the mecha-