

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.01.010

· 临床研究 ·

lncRNA SNHG16在结直肠癌组织和细胞中表达及其调控结肠癌细胞中GPAM表达的机制

周云松¹, 温小辉², 张琦³, 寇炜¹ (1. 西北民族大学医学院临床技能中心, 甘肃 兰州 730030; 2. 甘肃中医药大学临床学院, 甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃省人民医院 内分泌科, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)SNHG16在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)组织和细胞中的表达及其通过海绵吸附 miR-128-3p 调控结肠癌细胞线粒体甘油 3 磷酸酰基转移酶基因(mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAM)表达的分子机制。**方法:** 收集2014年1月至2017年1月甘肃省人民医院肛肠科手术切除的60例CRC患者的癌及癌旁组织标本, 以及结直肠癌细胞系SW480、SW620、HCT116、Caco-2、DLD-1、HT29和结肠上皮细胞CCD841, 用qPCR法检测CRC组织和细胞系中SNHG16的表达, 分析SNHG16表达与CRC患者临床病例特征的关系。分别用miR-128-3p模拟物、miR-128-3p抑制剂、SNHG16敲降载体转染SW480细胞后, 用qPCR法检测细胞中miR-128-3p及SNHG16 mRNA的表达, 用Western blotting法检测GPAM蛋白的表达, 用CCK-8法、克隆形成实验及细胞凋亡实验、Transwell小室法检测细胞的增殖、凋亡及侵袭。用双荧光素酶报告基因法和RNA免疫共沉淀实验验证SNHG16和miR-128-3p mRNA靶向结合。构建小鼠SW480细胞移植瘤模型, 观察敲降SNHG16对移植瘤生长的影响。**结果:** CRC组织及细胞系中SNHG16高表达(均 $P<0.01$), 其表达水平与CRC淋巴结转移、Duke's分期及患者生存期相关(均 $P<0.01$)。敲降SNHG16可显著抑制SW480细胞的增殖及侵袭能力, 并诱导细胞凋亡(均 $P<0.01$); 敲降SNHG16后小鼠移植瘤瘤体显著小于对照组($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因检测及RNA免疫沉淀反应结果显示, miR-128-3p与SNHG16相互作用, 且在CRC患者中miR-128-3p与SNHG16负相关($P<0.01$)。SNHG16通过内源性竞争海绵吸附miR-128-3p影响其下游靶基因GPAM的表达。**结论:** SNHG16在CRC细胞中可通过海绵吸附miR-128-3p调控GPAM表达, SNHG16及miR-128-3p可作为CRC诊断及治疗的潜在靶点。

[关键词] 结直肠癌; SW480细胞; SNHG16; miR-128-3p; 线粒体甘油 3 磷酸酰基转移酶基因; 海绵

[中图分类号] R735.3; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)01-0058-09

Expression of lncRNA SNHG16 in colorectal cancer tissues and cells and its regulation on expression of GPAM in colon cancer cells

ZHOU Yunsong¹, WEN Xiaohui², ZHANG Qi³, KOU Wei¹ (1. Clinical Skill Training Center, Medical School of Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, Gansu, China; 2. Clinical College, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China; 3. Department of Endocrinology, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of long non-coding RNA SNHG16 (lncRNA SNHG16) in colorectal cancer (CRC) tissues and cells, and to explore the mechanism of its regulation on the expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) via sponging miR-128-3p. **Methods:** Sixty pairs of colorectal cancerous tissues and para-cancerous tissues that resected from CRC patients, who underwent surgery in the Department of Anorectal Surgery, Gansu Provincial People's Hospital during Jan. 2014 and Jan. 2017, were collected for this study; In addition, CRC cell lines (SW480, SW620, HCT116, Caco-2, DLD-1, HT29) and colonic epithelial cell line CCD841 were also collected for the study. The expression of SNHG16 in collected tissues and cell lines was determined by Real-time quantitative PCR (qPCR), and its correlation to the clinicopathological features of CRC patients was also analyzed. SW480 cells were transfected with miR-128-3p mimic, miR-128-3p inhibitor, and si-SNHG16, respectively, and then the mRNA expressions of miR-128-3p and SNHG16 were detected by qPCR, the protein expression of GPAM was determined by Western blotting, and the cell proliferation, apoptosis and invasion were detected by CCK-8 assay, colony formation assay, cell apoptosis assay and Transwell chamber assay, respectively. The binding between SNHG16 and miR-128-3p was validated with dual luciferase reporter gene assay and RNA Immunoprecipitation assay. For *in vivo* experiment, mouse model of SW480 cell exnograph was constructed, and the ef-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81460677)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No.81460677)

[作者简介] 周云松(1975-),男,硕士,副教授,主要从事临床教学研究工作, E-mail: gabriellag@126.com

[通信作者] 寇炜(KOU Wei, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中西医结合抗肿瘤基础与临床研究, E-mail: yxkw@xbmu.edu.cn

fect of SNHG16 knockdown on the growth of exnograph was observed. **Results:** SNHG16 was found to highly expressed in human CRC tissues and cell lines (all $P<0.01$), and SNHG16 expression level was associated with lymph node metastasis, Duke's stage and patients' survival (all $P<0.01$). Knockdown of SNHG16 significantly inhibited CRC cell proliferation and invasion, and induced apoptosis (all $P<0.01$); After SNHG16 knockdown, the volume of exnograph was obviously reduced ($P<0.05$). Dual luciferase reporter gene assay and RNA Immunoprecipitation assay validated the interaction between miR-128-3p and SNHG16, and they were negatively correlated with each other in CRC patients ($P<0.01$). The SNHG16 regulated the expression of its down-stream gene GPAM via endogenously sponging miR-128-3p. **Conclusion:** SNHG16 regulates GPAM expression in CRC cells by sponging miR-128-3p, and SNHG16 and miR-128-3p may serve as potential targets for the diagnosis and treatment of CRC.

[Key words] colorectal cancer; SW480 cell; SNHG16; miR-128-3p; mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM); sponge

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(1): 58-66. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.01.010]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最为常见的恶性肿瘤之一,是男女性高发肿瘤中位居第3位,且男性发病率明显高于女性^[1]。研究^[2-5]表明,许多促癌及抑癌基因、微小RNA(microRNA, miRNA)及长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)与CRC的发生发展密切相关。lncRNA与miRNA通过调控肿瘤细胞增殖、侵袭、凋亡和耐药性等,在肿瘤的发展进程中发挥癌基因或抑癌基因的作用^[6-11]。miRNA-128-3p通过下调靶基因表达抑制CRC细胞的增殖及转移^[12]; lncRNA如XIST及HOTAIR参与X染色体沉默、基因组印记、染色质修饰、转录激活、转录干扰及核内运输^[13]等多种重要的调控过程,其在前列腺癌^[14]、膀胱癌^[15]、胃癌^[16]等癌症中发挥作用,多种lncRNAs与CRC的发生发展密切相关^[17];然而仍有大量lncRNAs的功能未被研究报道。线粒体甘油3磷酸酰基转移酶基因(mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAM)在脂质合成中扮演重要的角色,又名GPAT1、mtGPAT或KIAA1560,属于GPAT家族,是催化三酰基甘油和磷脂生物合成的限速酶,GPAM表达与乳腺癌患者的生存情况、激素受体状态及代谢谱密切相关^[18],然而GPAM在CRC中的研究未见报道。本研究旨在研究lncRNA SNHG16在CRC中通过海绵吸附miR-128-3p调控GPAM表达的分子机制,为CRC的诊断及治疗提供潜在靶点。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集2014年1月至2017年1月甘肃省人民医院肛肠科就诊的60例未接受化、放疗的CRC患者手术切除的癌及癌旁组织标本,患者年龄48~52岁,男、女性各30例。临床Duke's分期:A/B期33例、C/D期27例。手术前均告知患者并签署知情同意书,研究方案征得医院伦理委员会批准。

1.2 细胞系、实验动物及主要试剂

CRC细胞系SW480、SW620、HCT116、Caco-2、

DLD-1、HT29和结肠上皮细胞CCD841均购买美国ATCC公司。细胞在含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 mg/ml链霉素的RPMI-1640培养基中培养。

12只雄性BALB/c裸鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号为:SCXK(京)2009-000,4周龄,体质量16~20 g。

胎牛血清、RPMI-1640培养基购自Gibco公司,TRIzol RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒及SYBR PCR Master Mix购自Thermo Fisher Scientific公司, RNA纯化试剂盒、PARIS试剂盒、qPCR试剂盒均购于QIAGEN公司, Lipofectamine™ 2000购自Life Technologies公司, pLKO.1-Puro载体购自TaKaRa公司,表达载体pcDNA3.1(+)购自Invitrogen公司。瞬时转染实验所需miRNA模拟物(miRNA mimic)、miRNA抑制剂(miRNA inhibitor)、siRNAs由上海吉凯基因设计合成,PCR引物序列:SNHG16 F为5'-ATACTCTGTTGGAAGAGCCTAAG-3', R为5'-GCTCACACCTGTCTATCTCAGCAC-3'。CCK-8检测试剂盒购自碧云天公司,Transwell小室购自Corning公司,Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自BD公司,GPAM、GAPDH抗体均购自Abcam公司,羊血清购自碧云天公司,亚细胞蛋白分离的PARIS试剂盒购自Life Technologies公司, RNA免疫沉淀试剂盒购自Millipore公司,双荧光素酶报告基因购自Promega公司。

1.3 qPCR检测CRC组织和细胞中SNHG16的表达

用TRIzol试剂提取CRC组织中总RNA,用PARIS试剂盒提取细胞中RNA,测定RNA纯度及浓度,逆转录合成cDNA,反应条件为:40 °C 60 min, 25 °C 5 min, 75 °C 5 min。按照SYBR PCR Master Mix说明配制20 μl体系PCR反应混合液进行PCR扩增,反应条件为:95 °C预变性10 min、95 °C变性15 s、58 °C退火30 s、72 °C延伸30 s,重复30个循环,72 °C延伸7 min。组织标本以GAPDH为内参,细胞实验用GAPDH作为细胞质亚细胞表达基因的内参,U6作为细胞核亚细胞表达基因的内参,以2^{-ΔΔCt}法计算SNHG16 mRNA的相对表达量。实验重复3次。

1.4 慢病毒转染 SW480 细胞

培养 SW480 细胞至汇合度 80% 左右, 用胰蛋白酶消化并收集细胞, 使用 miR-128-3p 模拟物、miR-128-3p 抑制剂、siRNAs SNHG16 1-3 (表 1), 扩增 SNHG16 shNRA1-3 序列 (表 1) 并插入 PLKO.2-Puro 载体, 将载体与 Lipofectamine™ 2000 脂质体混合导入

SW480 细胞进行转染, 收集病毒转染 SW480 细胞进行后续实验。扩增并纯化 GPAM 基因片段并插入 pcDNA3.1 (+) 表达载体 HCT116 细胞中过表达 GPAM 基因, 通过嘌呤霉素选择稳定的细胞系, 用于后续的细胞及动物实验。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer of sequences

Name	Sequence (5'-3')
shRNA SNHG16	CACCGTGGATTTGTACCATTCTTCTGGAAGAATGGTACAAATCCAAGCGAACTTGG ATTTGTACCATTCTCCAGAAGAATGGTACAAATCCA
siRNA SNHG16 1	UGGAUUUGUACCAUUCUUCUGGAAGAAUGGUACAAAUCCAAG
siRNA SNHG16 2	ACUCAUUGGUUCCUUUAAGGGCUUAAAGGAACCAUGAGUCC
siRNA SNHG16 3	AAGUUUCGUUGAUACCUGUCCAGGUUAUCAACGAAACUUCU

1.5 CCK-8 法检测 SW480 细胞的增殖能力

开始实验 24 h 前, 将生长状态良好的 SW480 细胞以 2×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板, 根据实验分组分别处理细胞, 分别在 24、48、72、96 h 加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后用酶标仪检测波长在 450 nm 处的光密度 (D) 值。实验重复 3 次。

1.6 克隆形成实验检测 SW480 细胞的克隆形成能力

取对数生长期 SW480 细胞用胰酶消化, 1 \times PBS 重悬, 以 3×10^2 个/孔的细胞密度种于 6 孔板中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 14 d, 用 0.5 ml 的甲醇固定 30 min 后, 1% 结晶紫溶液染色 15 min, 光学显微镜下 ($\times 100$) 统计克隆形成数。实验重复 3 次。

1.7 Transwell 小室法检测 SW480 细胞的侵袭能力

使用孔径为 8 μ m 的聚碳酸酯膜的 Transwell 小室进行实验。在下室中加入 600 μ l 含有 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 将对数生长的细胞消化, 并用无血清的 RPMI 1640 培养基重悬, 按照 2×10^4 细胞/200 μ l 的量加入到上室中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后, 用棉签轻轻蘸去上室表面未穿过膜的细胞, 透过膜的上室底部的细胞用 95% 乙醇固定, 用 1% 结晶紫染色 15 min, 在光镜下 ($\times 100$) 每孔随机选 5 个区域统计穿膜细胞数。实验重复 3 次。

1.8 Annexin V FITC/PI 染色流式细胞术检测 SW480 细胞的凋亡

收集转染 48 h 后的细胞, 使用无 EDTA 的胰酶消化, 500 μ l 预冷的 PBS 重悬细胞, 并转移至流式管中, 加入 5 μ l 的 Annexin V FITC 特异性抗体和 5 μ l 的 PI 避光孵育 15~20 min, 上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.9 Western blotting 检测 SW480 细胞 GPAM 蛋白的表达

使用 RIPA 提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入按照一定比例稀释的一抗 (GPAM, 1:2 000; GAPDH, 1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。次日去除一抗, 用 TBST 洗涤 3 次, 加入相应的二抗 (稀释比例为 1:500) 室温摇床上孵育 90 min 后, 用 TBST 洗涤 3 次后, 加入 ECL 化学发光液, 放入凝胶成像系统中采集数据, 以 GAPDH 为内参, 与检测蛋白条带的灰度值之比表示蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.10 建立小鼠 SW480 移植瘤模型观察敲降 SNHG16 对移植瘤生长的影响

将 5 周龄雄性 BALB/c 小鼠分为两组, 每组 6 只, 用胰酶消化对数生长期细胞, 1 \times PBS 重悬, 每只小鼠背部皮下注射 1×10^6 个 SW480 细胞, 每周测量肿瘤的大小。肿瘤体积计算依据公式: 体积 = 长 \times 宽² \times 0.5, 观察小鼠肿瘤的生长情况。

1.11 双荧光素酶报告基因检测验证 SNHG16 与 miR-128-3p 靶向结合

扩增 SNHG16 mRNA 3'-UTR 片段序列插入 psi-CHECK 荧光素酶报告基因, SNHG16 MUT 3'-UTR 通过使用 SNHG16 序列突变引物诱导, 并通过测序结果确定构建的序列, SW480 细胞以 3×10^4 个/孔的细胞密度接种于 24 孔板, 过夜培养。次日用野生型及突变型的报告质粒及 miR-128-3p 模拟物共转染细胞, 24 h 后用双荧光素报告基因系统测定荧光素酶活性, 通过将萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性分离, 对数据进行归一化处理。实验重复 3 次。

1.12 RNA 免疫沉淀反应检测 SNHG16 与 miR-128-3p 内源性竞争结合

根据 EZ-Magan RIP Kit 试剂盒操作说明收集并

裂解细胞,加入RIP裂解液(含有偶联Ago2抗体的磁珠),样本与蛋白酶K孵育,期间不断摇晃以消化蛋白,分离出免疫沉淀RNA,使用Nano分光光度计测量RNA浓度,用生物分析器(Bioanalyzer)检测RNA(input RNA)质量,将RNA免疫共沉淀实验富集到miR-128-3p逆转录为cDNA,进行qPCR检测miR-128-3p的表达量,用Ago2的Ct值与input RNA的Ct值差值表示,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示富集水平。

1.13 统计学处理

采用SPSS18.0软件进行数据统计分析。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。淋巴结转移或晚期Duke's分期患者的SNHG16相对表达水平采用中值区间表示,非参数变量使用 χ^2 检验或者Mann-Whitney U 检验,使用Kaplan-Meier法计算生存率,并通过Log-Rank检验进行分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNHG16在CRC组织和细胞中的表达及其临床相关性分析

通过Starbase及lncRNADisease等生物信息学软件分析发现,lncRNA SNHG16在CRC中高表达。qPCR结果(图1A)发现,在60例CRC患者中,32例(53.3%)癌组织中SNHG16表达水平显著高于癌旁组织($P<0.01$),确定为高表达组;28例(46.7%)癌组织中SNHG16表达水平与癌旁组织无显著差别($P>0.05$),确定为低表达组。

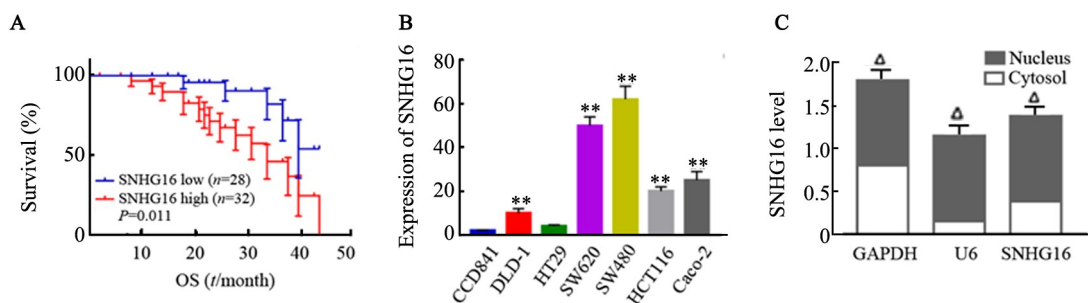
Kaplan-Meier生存分析结果(图1A)显示,高表达SNHG16的CRC患者生存率明显低于低表达SNHG16的CRC患者,SNHG16表达与CRC患者总体生存率低呈正相关($r=6.974, P<0.01$);在淋巴结转移及Duke's分期晚期CRC患者中SNHG16高表达($t=-15.11, P<0.01$;表2)。

qPCR检测结肠上皮细胞CCD841及结肠癌细胞系SW480、SW620、HCT116、Caco-2、DLD-1、HT29中SNHG16表达水平,结果显示,SNHG16在结肠癌细胞系中表达水平显著高于结肠上皮细胞CCD841($F=300.15, P<0.01$;图1B),且主要存在于细胞核中($F=40.85, P<0.05$;图1C)。结果表明,SNHG16表达与CRC的发生发展显著相关。

表2 60例CRC患者SNHG16表达与患者临床病理特征的关系(n)

Tab. 2 The relationship between SNHG16 expression and clinicopathological features in 60 CRC patients(n)

Clinicopathologic feature	N	Expression of SNHG16		P
		Low	High	
Gender				0.732
Male	30	13	17	
Female	30	15	15	
Age(t/a)		48.82±2.32	50.62±1.97	0.225
Lymph node metastases				<0.001
Yes	25	3	22	
No	35	19	16	
Distal metastasis				0.631
Yes	6	2	4	
No	54	20	34	
Duke's stage				<0.001
A/B	33	18	15	
C/D	27	3	24	



** $P<0.01$ vs CCD841 cells; $\Delta P<0.05$ vs Cytosol group

A: Kaplan-Meier curves of the survival of 60 CRC patients were evaluated by the Log-Rank test; B: SNHG16 expression in colonic epithelial cells and CRC cell lines detected by qPCR; C: Cellular localization of SNHG16 in CRC cells

图1 SNHG16在CRC组织和细胞中表达及临床相关性分析

Fig. 1 The expression of SNHG16 in CRC tissues and cells, and the clinical correlation analysis

2.2 敲低SNHG16抑制SW480细胞的增殖及侵袭

构建3个SNHG16敲降载体(si-SNHG16 1~3),分别转染SW480细胞,用qPCR法检测siRNAs的转染效率,避免脱靶效应,选择转染效率较好的si-SN-

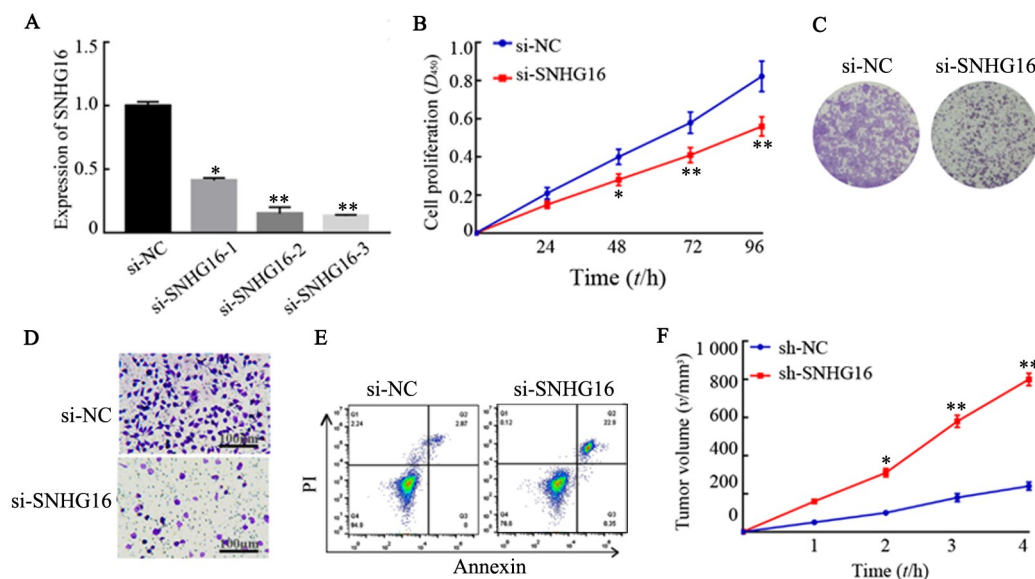
HG16 3进行后续实验(图2A)。

CCK-8法及克隆形成实验检测结果(图2B、C)显示,敲低SNHG16后,SW480细胞的增殖明显受到抑制($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Transwell小室法检测结果

(图2D)显示,敲低SNHG16后,细胞的侵袭能力显著降低($t=12.16, P<0.01$)。流式细胞术检测的结果(图2E)显示,敲低SNHG16后,SW480细胞的凋亡明显增加($t=-19.93, P<0.01$)。

SW480细胞移植瘤实验结果(图2F)也证明,与阴性对照组(移入未敲降SNHG16的SW480细胞)裸

鼠比较,敲低SNHG16的SW480细胞移植到裸鼠体内,显著抑制了肿瘤的生长。饲养4周后,敲降SNHG16裸鼠的瘤体积明显小于移植阴性对照组裸鼠($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。实验结果表明,SNHG16表达与SW480细胞的增殖及侵袭呈正相关。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs si-NC (A,B) or sh-NC group (F)

A: SNHG16 expression levels were suppressed by specific siRNAs in SW480 cells; B and C: The proliferation of SW480 cells was measured by CCK-8 assay and colony formation assay ($\times 100$); D: The invasion of SW480 cells was detected by Transwell assay ($\times 100$); E: The apoptosis of SW480 cells was detected by Annexin V/PI staining and flow cytometry;

F: Growth curves of exograft tumors in nude mice

图2 敲低SNHG16抑制SW480细胞的增殖及侵袭

Fig.2 SW480 cell proliferation and invasion were inhibited by knocking down SNHG16

2.3 SNHG16与miR-128-3p靶向结合

通过miRcode及DIANA-lncBase软件预测SNHG16与miR-128-3p结合位点序列(图3A)。

qPCR法检测结果显示,SNHG16表达显著上调的CRC,其miR-128-3p的表达反而显著下调($t=2.15, P<0.05$;图3B)。Spearman相关分析显示,SNHG16与miR-128-3p表达在CRC中呈负相关($r=-0.39, P<0.01$;图3C)。

2.4 miR-128-3p通过下调SNHG16的表达抑制SW480细胞的增殖及侵袭

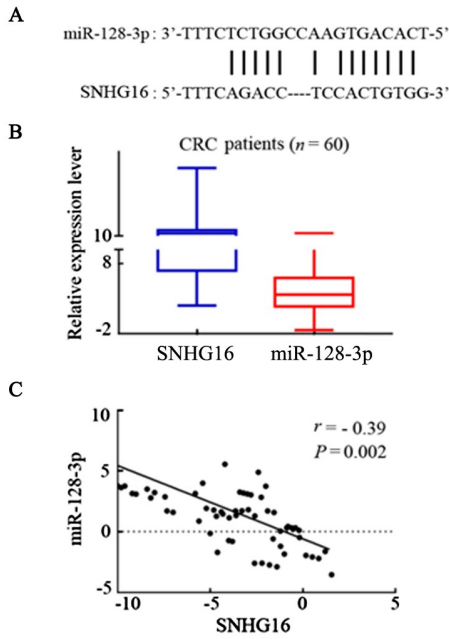
CCK-8法、克隆形成实验及流式细胞术检测结果(图4)显示,转染miR-128-3p抑制剂后,SW480细胞的增殖能力显著提高,而同时转染miR-128-3p抑制剂及si-SNHG16-3时,细胞的增殖能力显著下降($P<0.05$;图4A、B);转染miR-128-3p抑制剂后,细胞凋亡情况明显受到抑制,而同时转染miR-128-3p抑制剂及si-SNHG16-3时,细胞凋亡明显增加($P<0.05$;图4D)。

Transwell小室法检测结果(图4C)显示,单独转染miR-128-3p抑制剂的SW480细胞的侵袭能力显著高于同时转染miR-128-3p抑制剂及si-SNHG16-3的细胞($P<0.01$)。实验结果表明,miR-128-3p通过抑制SNHG16的表达负向调控SW480细胞的增殖和侵袭。

2.5 SNHG16通过内源性竞争与miR-128-3p靶向结合

将SNHG16序列及SNHG16的突变序列分别克隆到psiCHECK双荧光素酶报告载体中(即SNHG16 WT和SNHG16 MUT;图5A)。双荧光素酶报告基因检测结果显示,同时转染miR-128-3p模拟物及SNHG16 WT表达载体后荧光素酶活性显著下降($P<0.05$,图5A)。Western blotting检测结果显示,敲低miR-128-3p促进SNHG16显著表达,而敲低SNHG16对miR-128-3p表达无显著差异($P<0.01$,图5B)。然而,qPCR检测结果显示,过表达miR-128-3p能够显著降低SNHG16 mRNA表达水平($t=8.49, P<0.01$),而敲降SNHG16表达对miR-128-3p mRNA的表达水平显著影响($t=-0.27, P>0.05$)。通过使用Ago2抗体

进行RNA免疫共沉淀实验检测,结果显示与IgG比较,使用Ago2抗体RNA免疫共沉淀以后,miR-128-3p富集2.31倍($t=-33.88, P<0.01$),SNHG16富集1.98倍($t=-90.78, P<0.01$)。结果表明,SNHG16与miR-128-3p通过海绵性吸附结合。



A: Sequences of binding site between SNHG16 and miR-128-3p; B: Expression of SNHG16 and miR-128-3p; C: Spearman correlation analysis of SNHG16 and miR-128-3p

图3 SNHG16与miR-128-3p结合位序列结构图

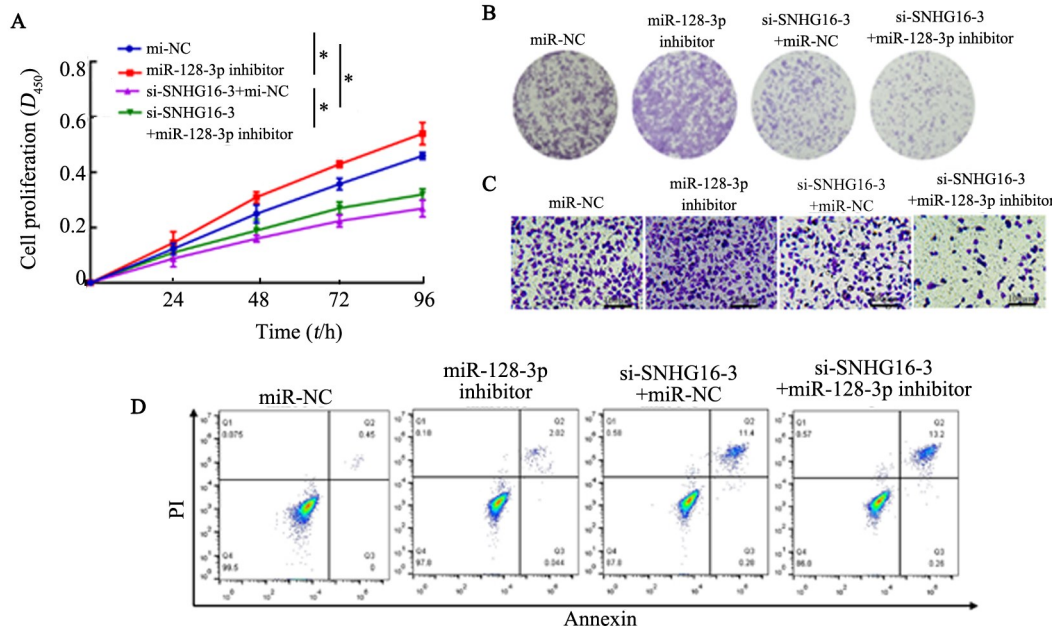
Fig.3 Sequences of binding site between miR-128-3p and SNHG16

2.6 miR-128-3p靶向GPAM抑制CRC细胞的增殖及侵袭

使用Targetscan软件预测miR-128-3p下游靶基因为GPAM(图6A)。

Western blotting检测结果显示,转染miR-128-3p模拟物后SW480细胞中GPAM的表达显著下调($P<0.01$,图6B),且转染si-SNHG16-3后SW480细胞中GPAM的表达也显著下调($P<0.01$,图6C),单独转染miR-128-3p抑制剂后细胞中GPAM表达水平显著上调,而同时转染miR-128-3p抑制剂及si-SNHG16-3后,细胞中GPAM表达水平明显受到抑制($P<0.01$,图6D)。

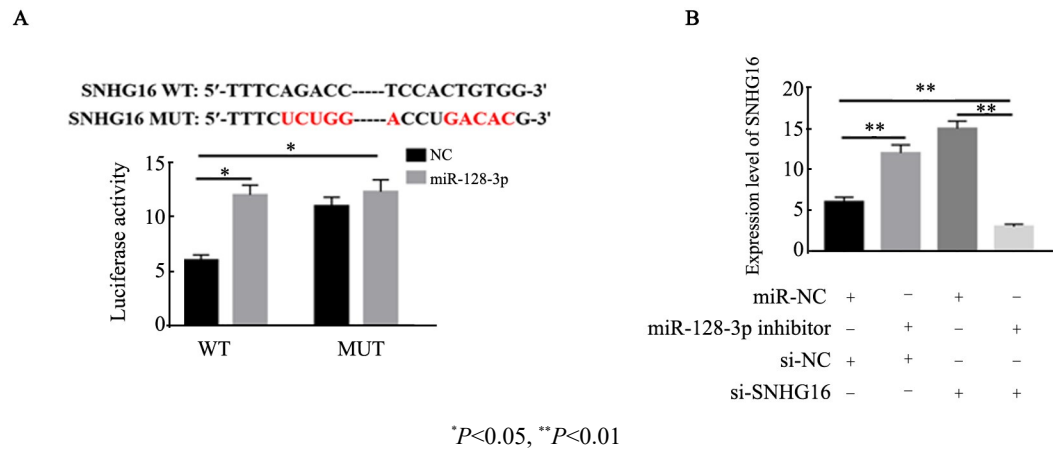
CCK-8法、克隆形成实验及流式细胞术检测结果显示,单独转染miR-128-3p抑制剂明显促进细胞的增殖能力($t=-17.89, P<0.01$),单独转染si-SNHG16-3则显著抑制细胞的增殖能力($t=11.37, P<0.01$);同时转染miR-128-3p抑制剂及si-SNHG16-3则逆转了si-SNHG16-3对细胞增殖的抑制作用及miR-128-3p抑制剂对细胞增殖的促进作用($t=-11.37, P<0.01$;图6E、F)。此外,通过凋亡实验检测结果显示,单独转染miR-128-3p抑制剂明显促进细胞的增殖能力($t=-30.55, P<0.01$),单独转染si-SNHG16-3则显著抑制细胞的增殖能力($t=-384.84, P<0.01$),同时转染miR-128-3p抑制剂及si-SNHG16-3则逆转了si-SNHG16-3对细胞增殖的抑制作用及miR-128-3p抑制剂对细胞增殖的促进作用($t=-341.66, P<0.01$;图6E、F)。



A and B: Proliferative capacity of SW480 cells were evaluated by CCK-8 assay and colony formation assay ($\times 100$); C: Invasion of SW480 cells was determined using Transwell assay ($\times 100$); D: Apoptosis of SW480 cells was detected by Annexin V/PI staining and flow cytometry

图4 miR-128-3p和SNHG16靶向结合负调控SW480细胞的增殖和侵袭

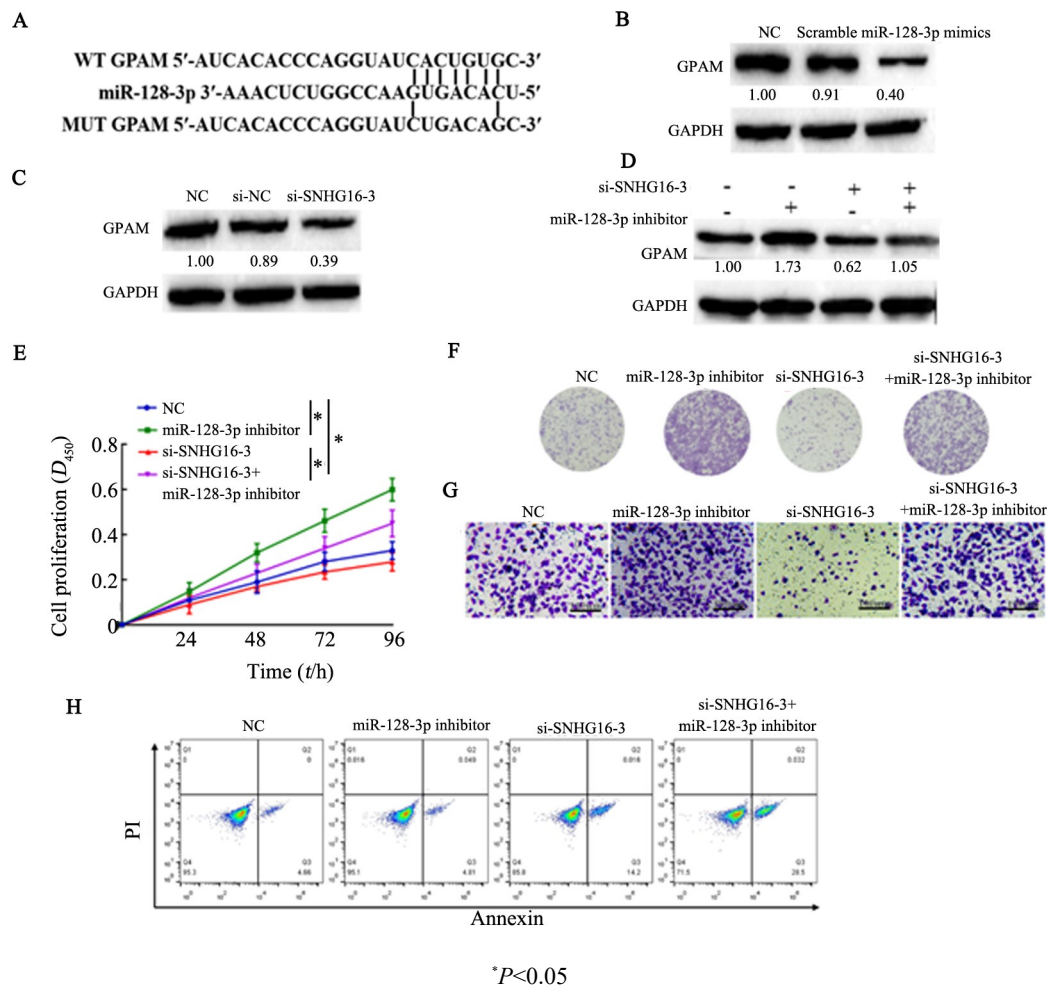
Fig.4 miR-128-3p binding with SNHG16 negatively regulates the proliferation and invasion of SW480 cells



A: Schematics of the wild-type and mutant SNHG16, and dual-luciferase assay validated the relationship between miR-128-3p and SNHG16; B: SNHG16 expression in SW480 cells detected by qPCR

图5 SNHG16通过内源性竞争与miR-128-3p靶向结合

Fig.5 SNHG16 binds with miR-128-3p via endogenous sponging



A: Prediction of miR-128-3p binding sites in GPAM sequence; B-D: GPAM expression level detected by Western blotting; E and F: Proliferation of SW480 cells detected by CCK-8 assay and colony formation ($\times 100$); G: Invasion of SW480 cells detected by Transwell assay ($\times 100$); H: Apoptosis of SW480 cells detected by Annexin V/PI staining and flow cytometry

图6 miR-128-3p通过靶向GPAM抑制SW480细胞的增殖及侵袭

Fig.6 The proliferation and invasion of SW480 cells were inhibited by miR-128-3p targeting GPAM

Transwell 小室法检测结果显示, 单独转染 miR-128-3p 抑制剂显著促进 SW-480 细胞侵袭 ($t=33.23$,

$P<0.01$), 单独转染 si-SNHG16-3 显著抑制 SW-480 细胞侵袭 ($t=29.68$, $P<0.01$); 同时转染 miR-128-3p 抑制

剂及 si-SNHG16-3 则逆转则逆转了 si-SNHG16-3 对细胞侵袭的抑制作用及 miR-128-3p 抑制剂对细胞侵袭的促进作用($t=-60.74, P<0.01$; 图 6G)。结果表明, SNHG16 通过内源性竞争结合 miR-128-3p 降低了 miR-128-3p 对靶基因 GPAM 的抑制作用, 最终调控 SW480 细胞的增殖和侵袭。

3 讨论

许多 lncRNAs 作为促癌基因或抑癌因子参与多种癌症的发生发展进程。本研究发现, SNHG16 的表达上调与 CRC 患者的肿瘤分期、淋巴转移及预后密切相关, 表明 SNHG16 可能作为促癌基因促进 CRC 的发生, 通过敲降或过表达 SNHG16 验证其在 CRC 中的作用, 敲降 SNHG16 显著抑制结直肠癌 SW480 细胞的增殖及侵袭, 并促进细胞的凋亡, 过表达 SNHG16 则得到相反的结果。

研究^[9]已证实, 许多 lncRNAs (如 HULC、H19、GAS5、MALAT1 等) 可作为 miRNAs 作用的靶基因参与癌症发展进程。通过在线软件分析预测 SNHG16 与 miR-128-3p 相互作用, 证实 miR-128-3p 在 CRC 中表达下调^[20], miR-128-3p 通过靶向 Galectin-3^[21] 抑制 CRC 细胞的增殖及迁移。本研究结果显示, miR-128-3p 在 CRC 患者组织中低表达, 且与 SNHG16 呈负相关, 过表达 miR-128-3p 显著抑制 SNHG16 在 CRC 细胞中的表达, 并证实 SNHG16 通过与 miR-128-3p 海绵吸附抑制 miR-128-3p 对下游靶基因的作用。

Ago 蛋白在 miRNA 通路中发挥重要作用^[21], 除了参与 miRNA 的装配过程, 同时还是 RISC 效应器蛋白, 介导 mRNA 降解、去稳定作用或者转录抑制。此外, Ago2 也可在转录后调控 miRNA 的丰度, 内源性 Ago2 的减少降低成熟 miRNA 的表达及活性, 成熟的 miRNA 可从细胞质转移至细胞核中, 即为 Ago2 miRNA 介导的 RNA 沉默的主要机制。所以, 最初定位于细胞核的 SNHG16 可以与 Ago2 发生相互作用, 从而降低 miR-128-3p 的表达。miR-128-3p 在多种肿瘤中发挥抑癌基因作用, 如在食管鳞状细胞癌中 miR-128-3p 通过靶向抑制 ZEB1 的表达抑制癌细胞的增殖及 EMT^[22]; 在肝细胞癌中通过调控 PIK3R1 表达抑制癌细胞的增殖^[23]; 在乳腺癌^[24]、肺癌^[25] 中则发挥促癌基因的作用。本研究发现, CRC 癌组织中 miR-128-3p 表达显著下调, 且与 SNHG16 的表达呈负相关, miR-128-3p 表达下调, GPAM 表达则显著上调, 通过 RNA 免疫共沉淀检测发现, SNHG16 通过海绵吸附 miR-128-3p 降低 miR-128-3p 对 GPAM 的抑制作用, 从而促进 CRC 细胞的增殖及侵袭。

综上所述, 本研究证实了 SNHG16 在 CRC 组织及细胞系中表达上调, 敲降 SNHG16 可抑制结直肠癌 SW480 细胞的增殖及侵袭, 并能诱导细胞凋亡, SNHG16 作为促癌基因通过内源性竞争海绵吸附 miR-128-3p 抑制 GPAM 表达。

[参考文献]

- [1] AYKUT B, OCHS M, RADHAKRISHNAN P, et al. EMX2 gene expression predicts liver metastasis and survival in colorectal cancer[J/OL]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 555[2018-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5568393/>. DOI:10.1186/s12885-017-3556-2.
- [2] OKUGAWA Y, TOIYAMA Y, TODEN S, et al. Clinical significance of SNORA42 as an oncogene and a prognostic biomarker in colorectal cancer[J]. Gut, 2017, 66(1): 107-117. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309359.
- [3] SLATTERY M L, HERRICK J S, MULLANY L E, et al. The co-regulatory networks of tumor suppressor genes, oncogenes, and miRNAs in colorectal cancer[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2017, 56(11): 769-787. DOI:10.1002/gcc.22481.
- [4] KIM S W. The role of microRNAs in colorectal cancer[J]. Korean J Gastroenterol, 2017, 69(4): 206-211. DOI:10.4166/kjg.2017.69.4.206.
- [5] CHEN D L, CHEN L Z, LU Y X, et al. Long noncoding RNA XIST expedites metastasis and modulates epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J/OL]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): e3011 [2018-08-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1437/>. DOI:10.1038/cddis.2017.421.
- [6] YAN L, YAO J, QIU J. miRNA-495 suppresses proliferation and migration of colorectal cancer cells by targeting FAM83D[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 974-981[2018-08-02]. <http://sciencedirect.com/science/journal/07533322>. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.138.
- [7] DENG B, WANG B, FANG J, et al. miRNA-203 suppresses cell proliferation, migration and invasion in colorectal cancer via targeting of EIF5A2[J/OL]. Sci Rep, 2016, 6: 28301[2018-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931903/>. DOI: 10.1038/srep28301.
- [8] SAM S, SAM M R, ESMAEILLOU M, et al. Effective targeting survivin, caspase-3 and microRNA-16-1 expression by methyl-3-pentyl-6-methoxyprodigiosene triggers apoptosis in colorectal cancer stem-like cells[J]. Pathol Oncol Res, 2016, 22(4): 715-723. DOI: 10.1007/s12253-016-0055-8.
- [9] FANG L, LI H, WANG L, et al. MicroRNA-17-5p promotes chemotherapeutic drug resistance and tumour metastasis of colorectal cancer by repressing PTEN expression[J/OL]. Oncotarget, 2014, 5(10): 2974-2987[2018-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102784/>. DOI:10.18632/oncotarget.1614.
- [10] WANG H, NIE L, WU L, et al. NR2F2 inhibits Smad7 expression and promotes TGF- β -dependent epithelial-mesenchymal transition of CRC via transactivation of miR-21[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(1): 181-188. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.02.049.
- [11] ZHOU X, XU X, WANG J, et al. Identifying miRNA/mRNA negative regulation pairs in colorectal cancer[J/OL]. Sci Rep, 2015, 5: 12995[2018-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

- PMC4534763/. DOI:10.1038/srep12995.
- [12] WU L, SHI B, HUANG K, et al. MicroRNA-128 suppresses cell growth and metastasis in colorectal carcinoma by targeting IRS1[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(5): 2797-2805. DOI:10.3892/or.2015.4251.
- [13] WEI S, FAN Q, YANG L, et al. Promotion of glycolysis by HOTAIR through GLUT1 upregulation via mTOR signaling[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1902-1908. DOI:10.3892/or.2017.5840.
- [14] MISAWA A, TAKAYAMA K, URANO T, et al. Androgen-induced long noncoding RNA (lncRNA) SOCS2-AS1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in prostate cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(34): 17861-17880. DOI:10.1074/jbc.M116.718536.
- [15] CHEN T, XIE W, XIE L, et al. Expression of long noncoding RNA lncRNA-n336928 is correlated with tumor stage and grade and overall survival in bladder cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4): 666-670. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.11.013.
- [16] ZHOU X, CHEN H, ZHU L, et al. Helicobacter pylori infection related long noncoding RNA (lncRNA) AF147447 inhibits gastric cancer proliferation and invasion by targeting MUC2 and up-regulating miR-34c[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 82770-82782[2018-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5347731/>. DOI:10.18632/oncotarget.13165.
- [17] ZHANG X, XIONG Y, TANG F, et al. Long noncoding RNA HNF1A-AS1 indicates a poor prognosis of colorectal cancer and promotes carcinogenesis via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 877-883 [2018-08-02]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332217343123>. DOI:10.1016/j.biopha.2017.10.033.
- [18] BROCKMOLLER S F, BUCHER E, MULLER B M, et al. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer-link to patient survival, hormone receptor status, and metabolic profiling[J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(2): 850-860. DOI:10.1021/pr200685r.
- [19] WU Q, MENG W Y, JIE Y, et al. lncRNA MALAT1 induces colon cancer development by regulating miR-129-5p/HMGB1 axis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6750-6757. DOI:10.1002/jcp.26383.
- [20] LU W, WANG J, YANG G, et al. Posttranscriptional regulation of Galectin-3 by miR-128 contributes to colorectal cancer progression [J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 15242-15251[2018-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5844768/>. DOI:10.18632/oncotarget.14839.
- [21] KRELL J, STEBBING J, CARISSIMI C, et al. TP53 regulates miRNA association with AGO2 to remodel the miRNA-mRNA interaction network[J]. *Genome Res*, 2016, 26(3): 331-341. DOI:10.1101/gr.191759.115.
- [22] ZHAO L, LI R, XU S, et al. Tumor suppressor miR-128-3p inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 in esophageal squamous-cell cancer[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(2): 171-180. DOI:10.1093/abbs/gmx132.
- [23] HUANG C Y, HUANG X P, ZHU J Y, et al. miR-128-3p suppresses hepatocellular carcinoma proliferation by regulating PIK3R1 and is correlated with the prognosis of HCC patients[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 2889-2898. DOI:10.3892/or.2015.3936.
- [24] BLOCK I, BURTON M, SORENSEN K P, et al. Association of miR-548c-5p, miR-7-5p, miR-210-3p, miR-128-3p with recurrence in systemically untreated breast cancer[J/OL]. *Oncotarget*, 2018, 9(10): 9030-9042[2018-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5823652/>. DOI:10.18632/oncotarget.24088.
- [25] FRIXA T, SACCONI A, CIOCE M, et al. MicroRNA-128-3p-mediated depletion of Droscha promotes lung cancer cell migration[J]. *Carcinogenesis*, 2018, 39(2): 293-304. DOI:10.1093/carcin/bgx134.

[收稿日期] 2018-08-05

[修回日期] 2018-09-13

[本文编辑] 党瑞山