

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.12.011

· 临床研究 ·

lncRNA XIST 通过 miR-32-5p/EZH2 分子轴调控结直肠癌 HCT-8 细胞的恶性生物学行为

吴瑞平, 陈冠阳, 陈志康(中南大学湘雅医院 直肠肛门外科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的:**探讨 lncRNA XIST 通过 miR-32-5p/果蝇 Zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 分子轴调控结直肠癌 HCT-8 细胞的恶性生物学行为。**方法:**收集 2014 年 7 月至 2018 年 8 月中南大学湘雅医院直肠肛门外科资料完整的结直肠癌患者 28 例癌组织和配对的癌旁组织标本, 采用 qPCR 检测结直肠癌组织及细胞系中 lncRNA XIST 和 miR-32-5p 的表达水平, 双荧光素酶报告基因验证 lncRNA XIST、miR-32-5p 和 EZH2 的靶向关系, 并进一步通过 WB 检测 EZH2 的表达水平。CCK-8、Transwell 及 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测 HCT-8 细胞增殖、迁移及凋亡情况。**结果:**lncRNA XIST 在结直肠癌组织及细胞系中高表达, 且在 HCT-8 细胞中表达最高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。双荧光素酶报告基因证实, lncRNA XIST 靶向负调控 miR-32-5p ($P < 0.05$), 且 EZH2 是 miR-32-5p 的靶基因。敲降 lncRNA XIST 抑制 HCT-8 细胞增殖和迁移并诱导其凋亡 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 进一步实验证明, 敲降 lncRNA XIST 上调 miR-32-5p 的表达水平, 从而下调 EZH2 表达水平, 进而抑制 HCT-8 细胞增殖和迁移并诱导其凋亡。**结论:**lncRNA XIST 通过 miR-32-5p/EZH2 分子轴促进 HCT-8 细胞增殖、迁移并抑制细胞凋亡。

[关键词] 结直肠癌; lncRNA XIST; miR-32-5p; 果蝇 Zeste 基因增强子同源物 2; 增殖; 迁移; 凋亡

[中图分类号] R735.3⁺7; R730.45 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)12-1363-08

lncRNA XIST regulates the malignant biological behaviors of colorectal cancer HCT-8 cells through miR-32-5p/EZH2 molecular axis

WU Ruiping, CHEN Guanyang, CHEN Zhikang (Colorectal and Anal Surgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of lncRNA XIST (XIST) regulating the biological behaviors of colorectal cancer HCT-8 cells via miR-32-5p/EZH2 (enhancer of Zeste homolog 2) axis. **Methods:** A total of 28 pairs of cancer tissues and corresponding para-cancerous tissues from colorectal cancer patients with complete clinical data were collected from the Colorectal and Anal Surgery, Xiangya Hospital of Central South University during July 2014 and August 2018. The expression levels of lncRNA XIST and miR-32-5p in colorectal cancer tissues and cell lines were detected by qPCR. The targeted relationship between lncRNA XIST, miR-32-5p and EZH2 was verified by dual luciferase reporter gene, and the expression level of EZH2 was further detected by WB. The proliferation, migration and apoptosis of HCT-8 cells were detected by CCK-8, Transwell and flow cytometry with Annexin V-FITC/PI staining, respectively. **Results:** lncRNA XIST was highly expressed in colorectal cancer tissues and cell lines with the highest expression in HCT-8 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Dual luciferase reporter gene assay validated that lncRNA XIST negatively regulated miR-32-5p ($P < 0.05$), and EZH2 was a target gene of miR-32-5p. Knockdown of lncRNA XIST inhibited proliferation and migration and induced apoptosis of HCT-8 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Further experiments demonstrated that knockdown of lncRNA XIST up-regulated the expression of miR-32-5p and further down-regulated the expression level of EZH2, thereby inhibiting the proliferation and migration of HCT-8 cells and inducing apoptosis. **Conclusion:** lncRNA XIST promotes proliferation, migration and inhibits apoptosis of HCT-8 cells via miR-32-5p/EZH2 axis.

[Key words] colorectal cancer; lncRNA XIST; miR-32-5p; enhancer of zeste homolog 2 (EZH2); proliferation; migration; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(12): 1363-1370. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.12.011]

结直肠癌是中国最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率及病死率逐年上升^[1], 结直肠癌具有的高增殖和抗凋亡等特性是其预后较差的主要原因之一^[2-3]。研究^[4-6]发现, 长链非编码 RNA (long non-coding RNA,

[作者简介] 吴瑞平(1992-), 男, 硕士生, 主要从事结直肠肛门肿瘤治疗的研究, E-mail: zzz2483@126.com

[通信作者] 陈志康(CHEN Zhikang, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事结直肠肛门肿瘤的临床与基础研究, E-mail: chen_zk74@hotmail.com

lncRNA)对结直肠癌的发生发展具有重要的调控作用,其调控通常是通过微小RNA(microRNA,miRNA)进行的。如lncRNA RP4通过海绵吸附miR-7-5p上调SH3GLB1的表达水平,进而促进结直肠癌的恶性生物学行为^[4];lncRNA SNHG1与果蝇Zeste基因增强子同源物2(enhancer of zeste homolog 2,EZH2)竞争性结合miR-154-5p促进结直肠癌细胞的生长^[7]。近期研究发现,lncRNA XIST作为促癌基因,参与调控多种恶性肿瘤的发生发展,如lncRNA XIST通过海绵吸附miR-320b上调RAP2B的表达水平,进而促进骨肉瘤细胞的增殖好侵袭^[8];lncRNA XIST通过调节miR-124-3p/EZH2促进喉鳞状细胞癌的增殖和侵袭^[9];但是lncRNA XIST对结直肠癌细胞恶性生物学行为具体调控机制的报道尚少。此外通过生物信息学数据库Starbase和TargetScan搜索发现,lncRNA XIST与miR-32-5p及miR-32-5p与EZH2的结合位点有部分序列相同。因此,本研究拟探讨lncRNA XIST通过miR-32-5p/EZH2分子轴调控结直肠癌恶性生物学行为的机制,为结直肠癌的治疗提供更多的实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床样本、细胞株和主要试剂及仪器

收集2014年7月至2018年8月中南大学湘雅医院直肠肛门外科资料完整的结直肠癌患者28例,经手术切除的结直肠癌组织和配对癌旁组织迅速保存于液氮中。参加该研究所有患者均签署知情同意书,研究方案经伦理委员会批准。

人正常结直肠黏膜细胞FHC(货号:JK-CS0327)购于上海晶抗生物工程有限公司,人结直肠癌细胞HCT-8(货号:As100151)、LoVo(货号:os101371)及T84(货号:zs100292)购于上海子实生物科技有限公司。

sh-lncRNA XIST、miR-32-5p mimic/inhibitor、sh-EZH2购于山东维真生物科技有限公司,胎牛血清、DMEM培养基、TRIzol试剂、逆转录试剂盒、SYBR Green qPCR MasterMix试剂盒均购及Lipofectamine 2000购于Thermo Scientific公司,RAPI蛋白裂解液及BCA试剂盒购买自Invitrogen公司,CCK-8和Annexin V-FITC/PI试剂盒购于上海翊圣生物科技有限公司,Dual-Luciferase Reporter Assay Kit购买于Promega公司,Transwell小室购自康宁公司。酶标仪、荧光定量PCR仪、电泳仪和凝胶成像系统均购自美国Thermo Fisher Scientific公司,超速冷冻离心机、电泳槽均购自北京六一生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

细胞培养条件:37℃、5% CO₂、含10%胎牛血

清、青霉素100 U/ml和链霉素0.1 g/ml的DMEM。将对数期人正常结直肠黏膜细胞FHC和人结直肠癌细胞系(HCT-8、LoVo、T84)细胞用胰酶消化离心后,接种在6孔板中(10⁶个/孔),每孔加入2 ml细胞悬液,37℃、5%CO₂培养24 h待用。

1.3 细胞转染

将对数生长期的HCT-8细胞,用胰酶进行消化处理并计数后,将细胞密度调整为1×10⁵个/ml,将2 ml/孔细胞悬液接种到6孔板中,在37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h,按照Lipofectamine 2000转染试剂进行sh-lncRNA XIST、miR-32-5p mimic/inhibitor、sh-EZH2转染,转染48 h后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。

1.4 qPCR检测结直肠癌组织及细胞系中lncRNA XIST和miR-32-5p的表达水平

收集临床组织和转染细胞,用TRIzol试剂盒分别提取组织和细胞的总RNA,并用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的浓度。随后进行逆转录合成cDNA,按照SYBR GREEN试剂盒说明对lncRNA XIST和miR-32-5p表达水平进行检测,以U6作为内参。采用Primer Premier 5.0软件进行引物设计,各引物序列见表1。随后,按试剂盒说明建立终体积为20 μl的PCR反应体系[2 μl反转录产物、10 μl SYBR Green Mix、上下游引物(10 μmol/l)各0.5 μl及7 μl dH₂O]。PCR热循环参数为95℃ 5 min,然后3步反应:94℃变性30 s、60℃退火30 s,进行45个循环。检测结果采用2^{-ΔΔCt}法进行计算。

表1 qPCR引物序列
Tab.1 Primer sequence for qPCR

Gene	Primer sequence
U6	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
GAPDH	F: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' R: 5'-CAAAGTTGTTCATGGATGCACC-3'
miR-32-5p	F: 5'-GGAGAUUUGCACAUAUACUA-3' R: 5'-UUAGUGUGUGUGAUUUUUC-3'
lncRNA XIST	F: 5'-ACTACCACTGGGCAACAAC-3' R: 5'-AATGAAGAGCTTGACGTGTG-3'

1.5 WB检测HCT-8细胞中EZH2蛋白的表达水平

转染后各组细胞扩大培养后用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,再用BCA试剂盒测定提取蛋白的总浓度和纯度。添加10%聚丙烯酰胺凝胶以分离蛋白。凝胶电泳调整电流至最大,调整电压为80 V,恒压条件下进行跑胶2.5 h;之后采用电转法将蛋白转印到PVDF膜上,调整电流至最大,电压为80 V持续转膜1 h。成功转膜后,蛋白密封于5%的脱脂奶粉中维持1 h,再向其中加入按1:1 000稀释的一抗4℃过夜孵

育。次日,去除一抗,TBST清洗3次,每次5 min。随后加入按1:5 000稀释的二抗,室温封闭1 h。TBST洗膜3次后,加入ECL化学发光液置于凝胶成像系统中采集图像,用Image J对蛋白条带进行半定量分析。

1.6 双荧光素酶验证 lncRNA XIST、miR-32-5p 和 EZH2 的靶向关系

首先将 lncRNA XIST、miR-32-5p 和 EZH2 的 3'-UTR 靶序列插入到萤火虫荧光素酶基因下游。将表达载体与验证载体分别共转染到 293T 细胞,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 8 h 后换 0.5 ml 含 10% 胎牛血清,不含抗生素的正常 DMEM 培养基,在 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h,收集细胞。荧光素酶检测按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明书,采用酶标仪检测萤火虫和海肾荧光值,并以海肾荧光值作为内参。

1.7 CCK-8检测HCT-8细胞的增殖能力

实验前1 d,按照5×10³个/孔的细胞密度将转染后各组细胞种于96孔板中,置于37 ℃培养箱中培养24 h,每孔加入10 μl CCK-8溶液,37 ℃培养箱孵育2 h,于酶标仪测定波长490 nm处的光密度(D)值。设置3个重复实验,酶标仪测量重复3次。

1.8 Transwell检测HCT-8细胞的迁移能力

将转染后各组HCT-8细胞培养至对数期后消化处理,接种至Transwell小室并在上室加入200 μl细胞悬液,下室加入500 μl含10%胎牛血清的DMEM培养基,于37 ℃、5%CO₂培养24 h。随后取出小室并擦去微孔膜上室的细胞,PBS冲洗2次,用4%多聚甲醛固定侵袭并黏附到小室微孔膜下的细胞15 min,结晶紫染色15 min,PBS冲洗小室,干燥后于显微镜下观察计数。

1.9 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞仪检测 HCT-8 细胞凋亡水平

收集对数期生长的转染后各组 HCT-8 细胞,用预冷的 PBS 重悬细胞一次,2 000×g 离心 10 min,洗涤细胞。随后加入 300 μl 的 1×结合缓冲液悬浮细胞后,加入 500 μl 提前预冷缓冲液和 5 μl Annexin V-FITC,室温避光孵育 15 min,然后在上机前 5 min 再加入 2.5 μl PI 染色,最后补加 200 μl 的 1×结合缓冲液上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.10 统计学处理

qPCR、WB、CCK-8、Transwell、Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞仪等实验均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 软件进行统计数据分析,用 GraphPad Prism 7 软件绘制图片。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。以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 lncRNA XIST 在结直肠癌组织及细胞系中的表达及其与患者病理特征的关系

qPCR 检测结果显示,lncRNA XIST 在结直肠癌组织中的表达水平显著高于配对癌旁组织(*P*<0.01,图 1A),lncRNA XIST 在结直肠癌细胞系中的表达水平显著高于人正常结直肠黏膜细胞 FHC(*P*<0.05,图 1B),且在 HCT-8 细胞中表达水平最高,并将 HCT-8 细胞用于后续实验。上述结果表明,异常高表达的 lncRNA XIST 可能与结直肠癌的发展有密切联系。临床分析结果(表 2),lncRNA XIST 在 III~IV 期结直肠癌患者组织中的表达高于 I~II 期(*P*<0.01);而患者年龄、性别、肿瘤分级与 lncRNA XIST 的表达差异均无统计学意义(均 *P*>0.05)。

表2 lncRNA XIST在结直肠癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系

Tab.2 The relationship between expression of lncRNA XIST in colorectal cancer tissues and clinicopathological features of patients with colorectal cancer

Feature	N	Expression of lncRNA XIST		
		$\bar{x} \pm s$	<i>t/F</i>	<i>P</i>
Gender			0.45	0.87
Male	13	1.86±0.65		
Female	15	1.92±0.84		
Age(<i>t/a</i>)			0.95	0.41
<50	11	2.11±0.67		
≥50	17	1.91±0.72		
Grading			1.12	0.24
G1	8	2.02±0.71		
G2	10	2.08±0.64		
G3	10	1.96±0.85		
TNM stage			3.25	0.008
I+II	15	1.57±0.75		
III+IV	13	2.46±0.82		

2.2 敲降 lncRNA XIST 可抑制 HCT-8 细胞增殖、迁移并诱导细胞凋亡

qPCR 检测结果显示,与 NC 组比较,转染 lncRNA XIST 后显著下调 lncRNA XIST 在 HCT-8 细胞中的表达水平(*P*<0.01,图 2A)。CCK-8 检测结果显示,与 NC 组比较,敲降 lncRNA XIST 显著下调 HCT-8 细胞的增殖活力(*P*<0.05,图 2B)。Transwell 检测结果显示,与 NC 组比较,敲降 lncRNA XIST 显著抑制 HCT-8 细胞迁移(*P*<0.01,图 2C、D)。Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞仪检测结果显示,与 NC 组比较,敲降 lncRNA XIST 诱导 HCT-8 细胞凋亡(*P*<0.05,图 2E、F)。上述结果表明,敲降 lncRNA XIST 能够显著抑制 HCT-8 细胞增殖和迁移,并诱导 HCT-8 细胞凋亡。

2.3 lncRNA XIST 靶向结合 miR-32-5p

生物信息学数据库 Starbase 预测结果显示, lncRNA XIST 及 miR-32-5p 存在互补序列(图3A), 同时, 双荧光素酶报告基因实验结果显示, 过表达 miR-32-5p 显著抑制 lncRNA XIST-Wt 的荧光素酶活性($P<0.01$, 图

3B), 且对 lncRNA XIST-Mut 荧光素酶活性无显著性抑制作用; qPCR 检测结果显示, 敲降 lncRNA XIST 显著上调 miR-32-5p 的表达水平($P<0.01$, 图 3C)。上述结果表明, lncRNA XIST 能靶向结合 miR-32-5p 的 3'-UTR 区域, 并且负调控 miR-32-5p 的表达水平。

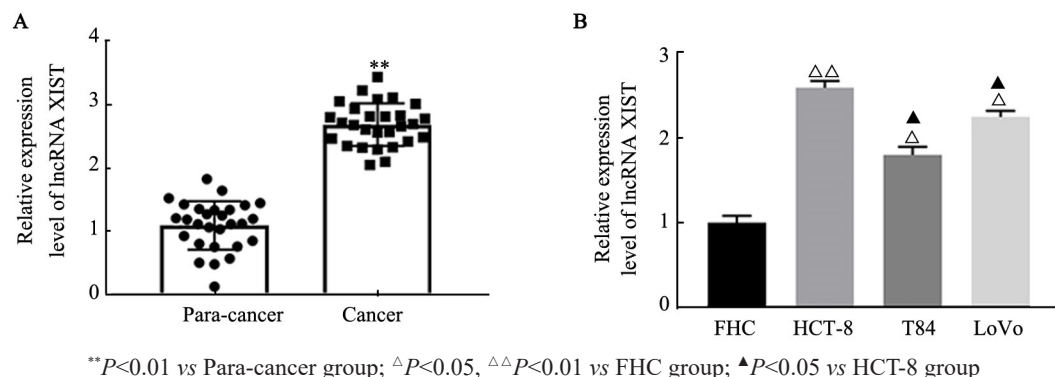
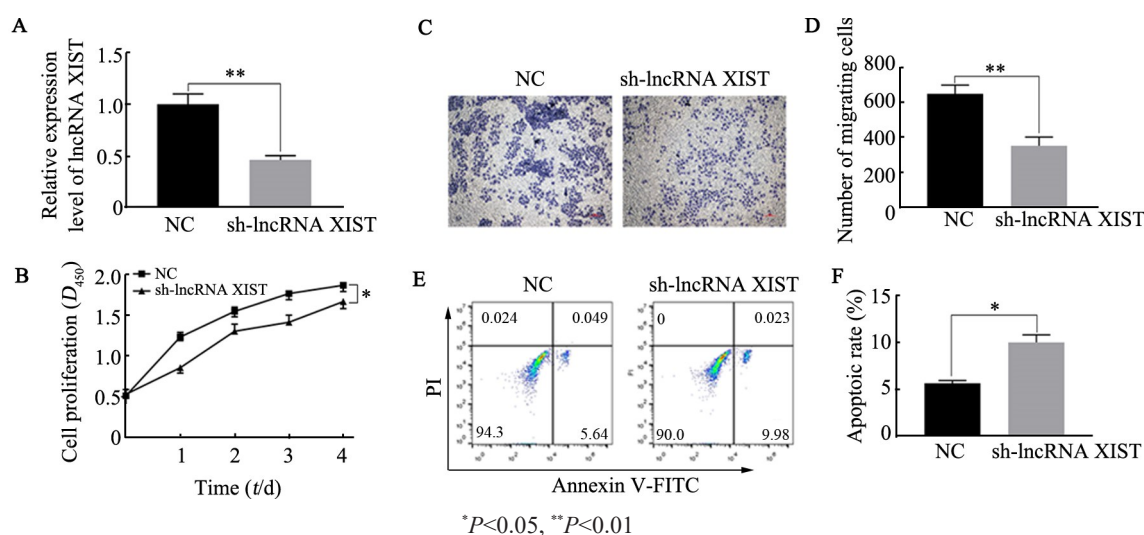


图1 lncRNA XIST 在结直肠癌组织(A)及细胞系(B)中高表达

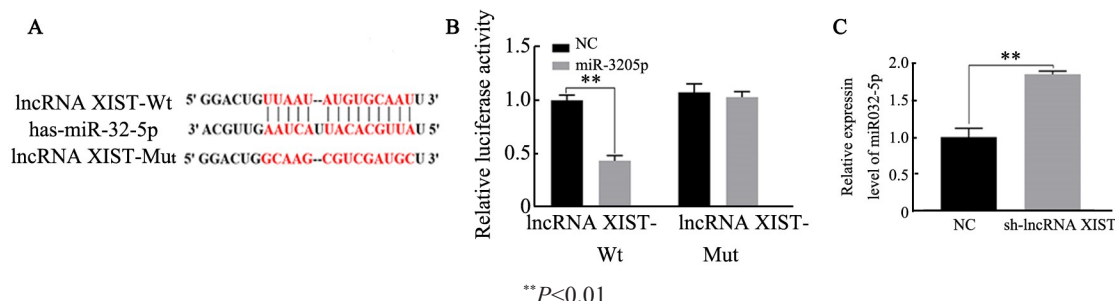
Fig.1 High expression of lncRNA XIST in colorectal cancer tissues(A) and cell lines(B)



A: The expression of lncRNA XIST of HCT-8 cells was detected by qPCR; B: The proliferation of HCT-8 cells was detected by CCK-8; C and D: The migration of HCT-8 cells was detected by Transwell assay($\times 40$); E and F: The apoptosis of HCT-8 cells was detected by Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry

图2 敲降 lncRNA XIST 可抑制 HCT-8 细胞增殖、迁移并诱导细胞凋亡

Fig.2 Knockdown of lncRNA XIST inhibited proliferation, migration and induced apoptosis of HCT-8 cells



A: Starbase was used to predict the interaction between lncRNA XIST and miR-32-5p; B: Dual-luciferase reporter gene was applied to detect the luciferase activity of 293T cells; C: qPCR was used to measure the expression of miR-32-5p in HCT-8 cells

图3 lncRNA XIST 靶向结合 miR-32-5p

Fig.3 lncRNA XIST targetedly bound with miR-32-5p

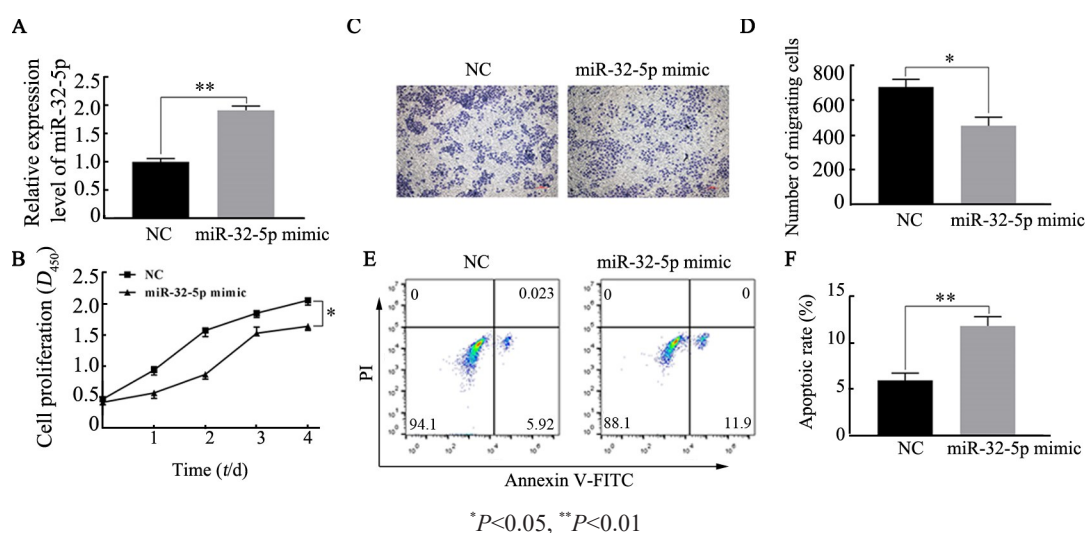
2.4 过表达 miR-32-5p 抑制 HCT-8 细胞增殖、迁移并诱导细胞凋亡

qPCR 检测结果显示, 转染 miR-32-5p mimic 后, 与 NC 组比较, 显著上调 miR-32-5p 在 HCT-8 中的表达水平 ($P < 0.01$, 图 4A)。CCK-8 检测结果显示, 与 NC 组比较, 过表达 miR-32-5p 显著下调 HCT-8 细胞的增殖活力 ($P < 0.05$, 图 2B)。Transwell 检测结果显示, 与 NC 组比较, 过表达 miR-32-5p 显著抑制 HCT-8 细胞迁移 ($P < 0.05$, 图 4C、D)。Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞仪检测结果显示, 与 NC 组比较, 过表达 miR-32-5p 诱导 HCT-8 细胞凋亡 ($P < 0.01$, 图 4E、F)。上述结果表明过表达 miR-32-5p 能够显著抑制 HCT-8

细胞增殖和迁移并诱导细胞凋亡。

2.5 miR-32-5p 靶向结合 EZH2

生物信息学数据库 TargetScan 分析结果(图 5A)显示, miR-32-5p 能结合 EZH2 的 3'-UTR 区域。同时, 两者结合序列与 lncRNA XIST 和 miR-32-5p 结合序列部分相同(图 3A、5A), 且双荧光素酶报告基因实验证实, 过表达 miR-32-5p 显著抑制 EZH2-Wt 荧光素酶活性 ($P < 0.05$, 图 5C), 且对 EZH2-Mut 荧光素酶活性无影响。进一步采用 WB 实验检测结果显示, 过表达 miR-32-5p 显著抑制 EZH2 的表达水平 ($P < 0.01$, 图 5B、D)。由此可知, miR-32-5p 靶向负调控 EZH2 的表达水平。

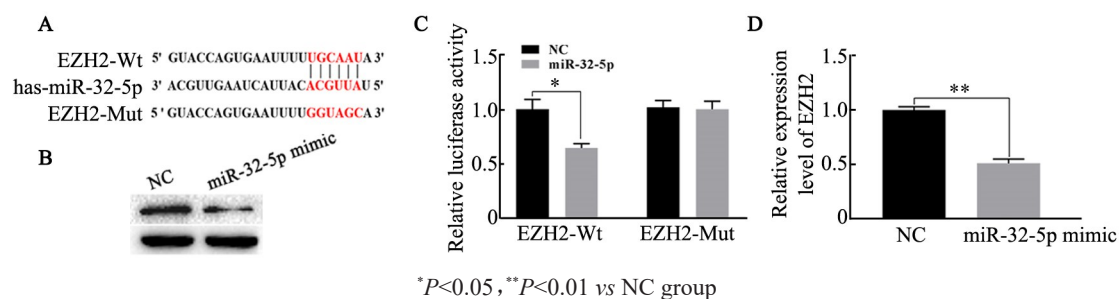


A: The expression of miR-32-5p in HCT-8 cells was detected by qPCR; B: The proliferation of HCT-8 cells was detected by CCK-8;

C and D: The migration of HCT-8 cells was detected by Transwell assay ($\times 200$); E and F: The apoptosis of HCT-8 cells was detected by Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry

图4 过表达 miR-32-5p 可抑制 HCT-8 细胞增殖、迁移并诱导细胞凋亡

Fig.4 Over-expression of miR-32-5p inhibited proliferation, migration and induced apoptosis of HCT-8 cells



A: TargetScan database was used to predict the interaction between miR-32-5p and EZH2; B: WB was used to measure the expression of EZH2 in HCT-8 cells; C and D: Dual-luciferase reporter gene was applied to detect the luciferase activity of 293T cells

图5 miR-32-5p 靶向结合 EZH2

Fig.5 miR-32-5p targetedly bound with EZH2

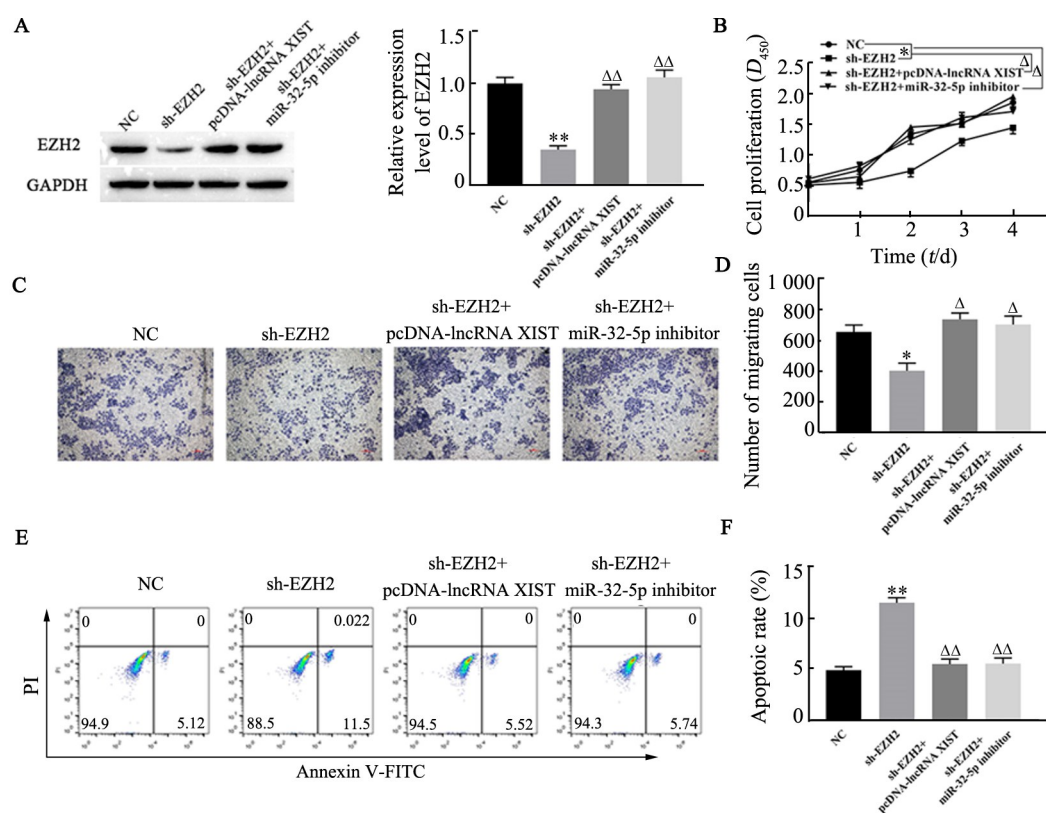
2.6 lncRNA XIST 通过 miR-32-5p/EZH2 分子轴促进 HCT-8 细胞增殖、迁移并诱导细胞凋亡

WB 检测结果显示, 与 NC 组比较, 转染 sh-EZH2

显著抑制 HCT-8 细胞中 EZH2 的表达水平 ($P < 0.01$, 图 6A), 且 sh-EZH2+pcDNA-lncRNA XIST 组及 sh-EZH2+miR-32-5p inhibitor 组中 EZH2 的表达水平与

NC 相比无显著性差异 ($P < 0.05$)。CCK-8 及 Transwell 检测结果显示, 与 NC 组比较, 敲降 EZH2 显著抑制 HCT-8 细胞增殖及迁移 (均 $P < 0.05$, 图 6B-D), 且 sh-EZH2+pcDNA-lncRNA XIST 组及 sh-EZH2+miR-32-5p inhibitor 组中 HCT-8 细胞增殖及迁移情况与 NC 相比无显著性差异。Annexin V-FITC/PI 检测结果

显示, 与 NC 组比较, 敲降 EZH2 显著上调 HCT-8 细胞凋亡水平 ($P < 0.05$, 图 6E、F), 且 sh-EZH2+pcDNA-lncRNA XIST 组及 sh-EZH2+miR-32-5p inhibitor 组中 HCT-8 细胞凋亡水平与 NC 相比无显著性差异 ($P < 0.05$)。由此可见, 敲降 lncRNA XIST 上调 miR-32-5p 的表达水平, 从而下调 EZH2, 进而抑制 HCT-8 细胞增殖和迁移并诱导其凋亡。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs sh-EZH2 group

A: The expression level of EZH2 was detected by WB; B: CCK-8 assay was applied to evaluate cells viability of HCT-8 cells; C and D: The migration of HCT-8 cells was detected by Transwell assay ($\times 40$); E and F: Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry was used to measure the apoptosis of HCT-8 cells

图6 lncRNA XIST 通过 miR-32-5p/EZH2 分子轴促进 HCT-8 细胞增殖、迁移并诱导细胞凋亡

Fig.6 lncRNA XIST promoted proliferation, migration and induced apoptosis of in HCT-8 cells via miR-32-5p/EZH2 axis

3 讨论

结直肠癌是胃肠道中最常见的恶性肿瘤, 具有高发病率、高病死率及高转移率等特点^[10]。近年来研究^[8-9]发现, lncRNA 虽普遍含有一定的保守序列, 但其调控基因表达的方式多种多样, 包括表观遗传调控, 转录调控和转录后调控等, 在恶性肿瘤的发生发展中起着重要的调控作用。如 lncRNA LUCAT1 靶向结合 miR-612 从而上调 HOXA13 的表达水平, 进一步促进卵巢癌细胞的增殖、侵袭迁移及诱导其凋亡^[11]; lncRNA TUSC7 通过海绵吸附 miR-211, 从而上调 miR-211 下游靶标 CDK6 的表达水平, 进而抑制结

直肠癌细胞的增殖^[12]; lncRNA XIST 通过与 TET1 结合下调 p53 的表达水平, 从而促进膀胱癌增殖和迁移并诱导其凋亡^[13]。本研究发现, lncRNA XIST 在结直肠癌组织及细胞系中高表达, 且敲降 lncRNA XIST 显著抑制 HCT-8 细胞增殖及迁移并诱导其凋亡。

研究^[14-16]显示, 大部分 lncRNA 调控癌症发展进程的机制是通过促进或抑制下游 miRNA 表达来影响着癌症细胞的恶性生物学行为, 如 lncRNA GAS5 通过靶向结合 miR-32-5p 上调 PTEN 的表达水平, 进而促进胰腺癌细胞的转移^[17]; lncRNA SNHG5 与 KLF4 竞争性结合 miR-32-5p, 进而促进胃癌细胞的增殖及迁移^[18]; lncRNA 319 通过靶向下调 miR-32-5p 进而上

调AURKA、SOX9和TWIST1蛋白的表达水平,从而促进肺癌细胞的增殖和侵袭并抑制肺癌细胞凋亡^[19]。本研究发现,lncRNA XIST靶向负调控miR-32-5p,过表达miR-32-5p显著抑制HCT-8细胞增殖及迁移并诱导其凋亡,且同时过表达lncRNA XIST及miR-32-5p能够恢复HCT-8细胞增殖、迁移及凋亡水平。

miRNAs主要通过下游靶蛋白调控癌细胞恶性生物学行为。EZH2催化组蛋白H3第27位赖氨酸三甲基化,调节染色体结构是其主要的功能。研究^[20]发现,EZH2在多种恶性肿瘤中高表达,并与肿瘤的恶性进程、侵袭性、转移能力有密切的联系。CHEN等^[21]研究发现,lncRNA FOXC2-AS1与EZH2竞争性结合miR-32-5p,进而促进HCT-8细胞增殖、迁移并抑制其凋亡;ZHANG等^[22]研究显示,lncRNA SNHG6通过海绵吸附miR-26a上调EZH2的表达水平,进而促进结直肠癌细胞的侵袭迁移及EMT进程;MA等^[23]研究显示,miR-26a靶向下调EZH2的表达水平,从而回复EZH2通过催化H3K27m3、H3K9m3对E-cadherin启动子活性的抑制作用,进而抑制肝癌细胞的EMT进程。本研究发现,miR-32-5p靶向负调控EZH2,敲降EZH2显著抑制HCT-8细胞增殖及迁移并诱导其凋亡,且转染sh-EZH2+pcDNA-lncRNA XIST及sh-EZH2+miR-32-5p inhibitor能够恢复HCT-8细胞增殖、迁移及凋亡水平。

综上所述,本研究发现lncRNA XIST和miR-32-5p的结合位点及miR-32-5p和EZH2的结合位点部分序列一致,进一步实验证明,lncRNA XIST与EZH2竞争性结合miR-32-5p,进而促进HCT-8细胞增殖及迁移并抑制其凋亡。

【参考文献】

- [1] HOSPITAL AUTHORITY OF NATIONAL HEALTH AND FAMILY PLANNING COMMISSION OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA, CHINESE SOCIETY OF ONCOLOGY. Chinese protocol of diagnosis and treatment of colorectal cancer[J]. Chin J Surg, 2018, 56(4): 241-258. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2018.E001.
- [2] JIN Y, YU L L, ZHANG B, et al. Circular RNA hsa_circ_0000523 regulates the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells as miRNA sponge[J/OL]. Revista Brasileira De Pesquisas Med E Biol, 2018, 51(12): e7811[2019-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6233523/>. DOI:10.1590/1414-431X20187811.
- [3] HUANG M L, CHEN Z T, XU D, et al. Adiponectin inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer HCT116 cells[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2018, 34(3): 253-259.
- [4] LIU M L, ZHANG Q, YUAN X, et al. Long noncoding RNA RP4 functions as a competing endogenous RNA through miR-7-5p sponge activity in colorectal cancer[J/OL]. World J Gastroenterol, 2018, 24(9): 1004-1012[2019-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5840465/>. DOI:10.3748/wjg.v24.i9.1004.
- [5] CHEN D, SUN Q, CHENG X F, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA (lncRNA) expression in colorectal cancer tissues from patients with liver metastasis[J/OL]. Cancer Med, 2016, 5(7): 1629-1639[2019-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4867661/>. DOI:10.1002/cam4.738.
- [6] IGUCHI T, UCHI R, NAMBARA S, et al. A long noncoding RNA, lncRNA-ATB, is involved in the progression and prognosis of colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2015, 35(3): 1385-1388.
- [7] XU M, CHEN X X, LIN K, et al. The long noncoding RNA SNHG1 regulates colorectal cancer cell growth through interactions with EZH2 and miR-154-5p[J/OL]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 141[2019-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6162892/>. DOI:10.1186/s12943-018-0894-x.
- [8] LV G Y, MIAO J, ZHANG X L. Long noncoding RNA XIST promotes osteosarcoma progression by targeting ras-related protein RAP2B via miR-320b[J]. Oncol Res, 2018, 26(6): 837-846. DOI: 10.3727/096504017X14920318811721.
- [9] XIAO D, CUI X Y, WANG X. Long noncoding RNA XIST increases the aggressiveness of laryngeal squamous cell carcinoma by regulating miR-124-3p/EZH2[J]. Exp Cell Res, 2019, 381(2): 172-178. DOI:10.1016/j.yexcr.2019.04.034.
- [10] TAKIYAMA A, TANAKA T, YAMAMOTO Y, et al. Microsatellite status of primary colorectal cancer predicts the incidence of postoperative colorectal neoplasms[J]. Anticancer Res, 2017, 37(10): 5785-5790. DOI:10.21873/anticancer.12020.
- [11] YU H, XU Y J, ZHANG D Y, et al. Long noncoding RNA LUCAT1 promotes malignancy of ovarian cancer through regulation of miR-612/HOXA13 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(3): 2095-2100. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.07.165.
- [12] XU J, ZHANG R, ZHAO J. The novel long noncoding RNA TUSC7 inhibits proliferation by sponging MiR-211 in colorectal cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(2): 635-644. DOI: 10.1159/000457938.
- [13] HU B, SHI G W, LI Q, et al. Long noncoding RNA XIST participates in bladder cancer by downregulating p53 via binding to TET1[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4): 6330-6338. DOI: 10.1002/jcb.27920.
- [14] CHEN Z P, WEI J C, WANG Q, et al. Long non-coding RNA 00152 functions as a competing endogenous RNA to regulate NRP1 expression by sponging with miRNA-206 in colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2018, 53(3): 1227-1236. DOI:10.3892/ijo.2018.4451.
- [15] HUANG F T, WEN C Y, ZHUANSUN Y X, et al. A novel long non-coding RNA OECC promotes colorectal cancer development and is negatively regulated by miR-143-3p[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 2949-2955. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.08.075.
- [16] 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[2019-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5596599/>. DOI:10.1038/cddis.2017.421.
- [17] GAO Z Q, WANG J F, CHEN D H, et al. Long non-coding RNA GAS5 suppresses pancreatic cancer metastasis through modulating miR-32-5p/PTEN axis[J/OL]. Cell Biosci, 2017, 7: 66[2019-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715988/>. DOI:

- 10.1186/s13578-017-0192-0.
- [18] ZHAO L M, HAN T T, LI Y S, et al. The lncRNA SNHG5/miR-32 axis regulates gastric cancer cell proliferation and migration by targeting KLF4[J]. FASEB J, 2017, 31(3): 893-903. DOI: 10.1096/fj.201600994R.
- [19] ZHOU B, YUAN W W, LI X P. Long intergenic noncoding RNA 319 (linc00319) promotes cell proliferation and invasion in lung cancer cells by directly downregulating the tumor suppressor miR-32[J]. Oncol Res, 2017: 2017: 54650. DOI: 10.3727/096504017X15016337254650.
- [21] CHEN Y B, GU M, LIU C, et al. Long noncoding RNA FOXC2-AS1 facilitates the proliferation and progression of prostate cancer via targeting miR-1253/EZH2[J]. Gene, 2019, 686: 37-42. DOI: 10.1016/j.gene.2018.10.085.
- [22] ZHANG M Y, DUAN W B, SUN W L. LncRNA SNHG6 promotes the migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells by miR-26a/EZH2 axis[J/OL]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 3349-3360[2019-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6504670/>. DOI:10.2147/OTT.S197433.
- [23] MA D N, CHAI Z T, ZHU X D, et al. MicroRNA-26a suppresses epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma by repressing enhancer of zeste homolog 2[J/OL]. J Hematol Oncol, 2016, 9: 1[2019-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4702409/>. DOI:10.1186/s13045-015-0229-y.
- [收稿日期] 2019-09-18 [修回日期] 2019-11-29
[本文编辑] 王映红