

外泌体源性 LncRNA ESCCAL-1/miR-874/ITGBL1 对结直肠癌细胞增殖凋亡的影响

马二民¹ 张兆宏¹ 黄晶晶¹ 刘翔¹ 赤更¹ 刘磊² 张楠¹

摘要 目的 本研究旨在探究外泌体源性长非编码 RNA (LncRNA) ESCCAL-1 调控 miR-874/整合素 β 样因子 1 (ITGBL1) 轴在结直肠癌 (CRC) 进展中的作用机制。方法 运用基因表达综合数据库 (GEO) 数据库对 CRC 中的差异表达基因进行分析。应用 qRT-PCR 检测 LncRNA ESCCAL-1、miR-874 和 ITGBL1 在 CRC 组织和细胞系 (SW480、SW620、HCT116 和 HT29) 及癌旁正常组织和 NCM460 细胞系中的表达; 3(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、克隆形成和流式细胞术分别检测细胞增殖、集落形成和凋亡情况; 双荧光素酶报告实验分别验证 miR-874 与 ESCCAL-1、ITGBL1 间的相互作用关系; 荧光原位杂交测定 LncRNA ESCCAL-1 的亚细胞定位。使用 Exosome 提取试剂盒分离血清中的外泌体。结果 ESCCAL-1 和 ITGBL1 在 CRC 组织和细胞系中的表达高于癌旁正常组织和 NCM460 细胞系, miR-874 则相反 ($P < 0.05$)。敲减 ESCCAL-1 能够抑制 CRC 细胞增殖和集落形成, 促进细胞凋亡。miR-874 和 ESCCAL-1 存在特异性结合位点, miR-874 抑制剂能够部分逆转敲减 ESCCAL-1 在 CRC 中介导的效应 ($P < 0.05$)。ESCCAL-1 吸附 miR-874 上调 ITGBL1。CRC 患者血清中的 ESCCAL-1 及 exo-ESCCAL-1 较对照组上调, 血清 exo-ESCCAL-1 可能是 CRC 治疗的一个有价值的诊断指标 ($P < 0.05$)。结论 ESCCAL-1 通过调控 miR-874/ITGBL1 轴促进 CRC 进展, ESCCAL-1 可能是 CRC 治疗的一个有效分子靶点。

关键词 长非编码 RNA ESCCAL-1; miR-874; 整合素 β 样因子 1; 结直肠癌

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0442-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.016

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是中国第三大常见癌症, 且发病率和病死率均呈上升趋势^[1]。因此, 探索有效生物标志物有助于改善 CRC 的治疗

及预后。长非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNAs) 是检测、监测和预测恶性肿瘤 (如前列腺癌、乳腺癌和胃癌等) 的候选生物标志物^[2]。LncRNA ESCCAL-1 已被报道在食管鳞癌中充当促癌因子发挥作用^[3]。但 LncRNA ESCCAL-1 在 CRC 中尚未有相关研究。推测 ESCCAL-1 可能在 CRC 中同样发挥促癌因子作用。为了进一步探究 ESCCAL-1 在 CRC 中发挥的作用, 通过在线靶向关系预测网站确定了 ESCCAL-1 的靶点 miR-874。miR-874 在 CRC 中的作用机制也得到了初步明确, miR-874 能够通过 lncRNA-miRNA-mRNA 调节网络在 CRC 进展中发挥抑癌作用^[4]。因此, 推测 ESCCAL-1 可能通过与 miR-874 特异性结合参与 CRC 进展。整合素 β 样因子 1 (integrin beta-like 1, ITGBL1) 位于细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中, 参与多种肿瘤的发生和转移。ITGBL1 在 CRC 中的作用也已得到初步明确, 敲减 ITGBL1 能够抑制 CRC 细胞增殖、迁移和侵袭^[5]。生物信息学预测网站显示 ITGBL1 和 miR-874 具有特异性结合位点, 推测 ESCCAL-1 可能通过调控 miR-874/ITGBL1 轴参与 CRC 进展。

该研究假设 ESCCAL-1 调控 miR-874/ITGBL1 轴促进 CRC 细胞增殖和集落形成, 抑制细胞凋亡, 探究 ESCCAL-1 在 CRC 进展中的作用, ESCCAL-1 可能是治疗 CRC 的一个有效作用靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 胎牛血清和 1640 培养基购自美国 Gibco 公司, LipofectamineTM 3000 试剂盒选自美国 Invitrogen 公司; CRC 细胞系 (SW480、SW620、HCT116、HT29) 和人正常结直肠上皮细胞系 NCM460 购自美国 ATCC 细胞库。双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (D0010)、MTT 试剂盒 (M1020) 和 Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (CA1020) 购自北京索莱宝生物技术有限公司; Exosome 提取试剂盒 (WEX-OQ5A-1) 购自北京博迈斯科技发展有限公司; FISH 试剂盒 (BIS-p001) 购自广州伯信生物技术有限公司; 共焦显微镜 (FV3000) 购自日本 OLYMPUS。

2022-08-28

基金项目: 河南省中医药科学研究专项基金 (编号: 2019ZY2029)

作者单位: 河南中医药大学第一附属医院¹ 普外科、² 病理科, 郑州 450099

作者简介: 马二民, 男, 硕士研究生;

张楠, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: jinglei.1999@163.com

1.2 组织采集 所有患者均来自在河南省中医药大学第一附属医院 2018 年 6 月—2020 年 6 月的就诊人员。共获得 68 例切除的肿瘤组织和癌旁正常组织(距肿瘤边缘至少 5 m)。收集年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移、远处转移等临床资料。术后病理分期以国际癌症控制联盟(UICC)肿瘤转移(TNM)分期系统第 7 版为标准进行评估。本研究经伦理委员会批准(编号:20180126)且患者均已签署了知情同意书。

所有切除的组织标本立即在液氮中速冻,然后在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。静脉血的采集和制备如前所述,并在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存,直到分析。

1.3 细胞培养、转染和分组 对人 CRC 细胞系(SW480、SW620、HCT116 和 HT29) 和人正常结肠上皮细胞系 NCM460 进行传代和保存。SW480 和 SW620 细胞在添加 10% 胎牛血清和 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 1-15 培养基中培养,NCM460、HT-29 和 HCT116 细胞在含有 10% FBS 和 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 RPMI1640 培养基中培养。除 SW480 和 SW620 (不含 CO_2) 外,所有这些细胞系均在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。

从基因公司获得了靶向 ESCCAL-1 (si-ESCCAL-1) 或其阴性对照 (si-NC)、miR-874 模拟物和抑制剂或其阴性对照物 (miR-NC) 的小干扰 RNA。按照制造商的说明,用 Lipofectamine 3000 转染 HT29 细胞。

细胞分组如下: si-ESCCAL-1 组(细胞 + si-ESCCAL-1)、si-NC 组(细胞 + si-ESCCAL-1 的阴性对照)、si-ESCCAL-1 + miR-inhibitor 组(细胞 + si-ESCCAL-1 + miR-874 抑制剂)、si-ESCCAL-1 + miR-NC 组(细胞 + si-ESCCAL-1 + miR-874 阴性对照物)。

1.4 生物信息学预测 CRC 的分子作用机制 在基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库以“colorectal cancer”为关键词检索 CRC 相关的基因表达芯片,选择 GSE136735 进行后续分析。筛选差异基因并绘制差异基因表达热图,差异基因筛选条件为 adj. P. Value < 0.05 和 $|\text{Log-FoldChange}| > 1$ 。miRactDB(<https://ccsm.uth.edu/miRactDB/>) 和 lncRNASNP2 数据库(<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/lncRNASNP#!/>) 进行靶向关系预测。

1.5 血清中的外泌体的分离与鉴定 使用 Exosome 提取试剂盒从 CRC 患者和健康志愿者的血清样本中提取外泌体。按照制造商的说明,用 PBS 悬浮含有外泌体的颗粒,进行电镜分析。

1.6 MTT 采用 MTT 法评价细胞的增殖能力。按照制造商的说明,CRC 细胞转染 24、48、72 h 后与 MTT 试剂在室温下混合 4 h。使用 $200\text{ }\mu\text{l}$ 二甲亚砜(DMSO) 溶解反应产物后弃上清液,在 490 nm 波长处测定吸光度值。

1.7 克隆形成 采用克隆形成试验评价细胞集落形成能力。将 1×10^3 个 HT29 细胞接种到 6 孔板中,并在含有 10% FBS 的 DMEM 中保存约 2 周。培养基每 3 d 天更换一次。用甲醇固定菌落,用 0.1% 结晶紫染色。计数法测定染色菌落数。

1.8 流式细胞术 采用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒进行细胞凋亡分析。收集转染 72 h 后的 CRC 细胞 (1×10^6 个/次),冷 PBS 洗涤后用 1 ml $1 \times$ Binding Buffer 悬浮细胞, 300 r/min 离心 10 min ,弃上清液。用 1 ml $1 \times$ 的 Binding Buffer 重悬浮细胞,使细胞密度达到 1×10^6 个/ml。取 $100\text{ }\mu\text{l}$ 细胞 (1×10^5 个) 与 $5\text{ }\mu\text{l}$ Annexin V-FITC 和 $5\text{ }\mu\text{l}$ PI 在室温避光条件下孵育 15 min 。加入 PBS 至 $500\text{ }\mu\text{l}$ 后轻轻混匀。最后用流式细胞仪对凋亡细胞进行检测。

1.9 荧光原位杂交 用 FISH 试剂盒测定 ESCCAL-1 的亚细胞定位。用地高辛标记的 ESCCAL-1 探针杂交液处理细胞载玻片。将载玻片在 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下杂交 16 h ,浸入 0.1% $2 \times$ SSC(柠檬酸钠生理盐水缓冲液)中,然后浸入 70% 乙醇溶液中 3 min ,并用 DAPI 染色 10 min 。使用共焦显微镜成像。

1.10 双荧光素酶报告实验 采用双荧光素酶报告法检测 miR-874 与 ESCCAL-1 或 ITGBL1 的靶向关系。将含有 miR-874 结合位点的 ESCCAL-1 或 ITGBL1 的部分序列直接扩增并插入到 pGL3 荧光素酶报告载体,称为 ESCCAL-1-wt 或 ITGBL1-wt,将 ESCCAL-1 或 ITGBL1 中与 miR-874 存在结合位点的相应序列部分进行定点突变构建 ESCCAL-1-mut 或 ITGBL1-mut 载体,之后将其插入荧光素酶报告质粒中。将这些报告者构建的质粒与 miR-NC 或 miR-874 共转染 CRC 细胞 48 h 后,双荧光素酶报告系统光度计检测荧光素酶活性。

1.11 qRT-PCR 对于外泌体 RNA 和细胞 RNA 提取,使用 miRNeasy Serum/Plasma 试剂盒和 TRIzol 溶液。cDNA 合成后,用特异性引物和 iQSYBR Green SuperMix 进行扩增反应。U6 是 miR-874 的内参,GAPDH 是 ESCCAL-1 和 ITGBL1 的内参。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行定量。引物序列如下:

1.12 统计学处理 统计分析数据采用 prism 8.3.0 软件进行分析。计量资料以 n 表示,采用卡

方检验进行检验。计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较和多组间比较分别采用独立 *t* 检验和单因素方差分析(ANOVA) 进行比较。Pearson 相关性分析对分子间的相关性进行统计,ESCCAL-1 在 CRC 中的诊断价值通过 ROC 曲线分析进行统计。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 qRT-PCR 序列

名称	序列(5'-3')
ESCCAL-1	F: CCAGACAGCAGCAAAGCAAT R: GGAAGCAGCAAATGTGTCCAT
miR-874	F: GGCCTGAGGAAGAAGACTGAG R: TGAGATCCAACAGGCCTTGAC
ITGBL1	F: GCTCTGGGAGGGGTAAATGTG R: TGCACCTCCCACAATGACAAGAA
GAPDH	F: ACCACAGTC CATGCCATCAC R: TCCACCACCT GTT GCTGTA
U6	F: GCUUCGGCAGCACAUUAUCUAAA R: CGCUUCACGAAUUUGCGUGUCAU

2 结果

2.1 生物信息学工具分析 CRC 中的分子作用机制 在 GEO 数据库找到了 CRC 相关的基因表达芯片 GSE136735。其中包括 6 例 CRC 组织和 6 例癌旁正常组织(距肿瘤边缘 5 cm 以上)。将筛选出的差异基因绘制差异基因表达热图,差异基因筛选条件为 adj. P. Value < 0.05 和 |LogFoldChange| > 1(图 1A)。注意到了 ITGBL1 在 CRC 组织中表达高于癌旁正常组织。ITGBL1 在 CRC 中的作用已得到初步明确,敲减 ITGBL1 能够抑制 CRC 细胞增殖、迁移和侵袭。通过在线靶向关系预测网站 miRactDB 得到 ITGBL1 和 miR-874 存在特异性结合位点(图 1B)。在 lncRNASNP2 数据库找到 miR-874 的上游靶点 lncRNA ESCCAL-1(图 1C),但 lncRNA ESCCAL-1 在 CRC 中尚未有相关研究。因此,本研究旨在探讨 ESCCAL-1 在 CRC 中的作用并探讨其机制。

2.2 lncRNA ESCCAL-1 在 CRC 中的表达及其与 CRC 预后的关系 lncRNASNP2 数据库显示 ESCCAL-1 在 COAD 组织中呈高表达(图 2A)。为了研究 ESCCAL-1 在 CRC 中的作用,用 qRT-PCR 检测人癌旁正常组织和 CRC 组织以及 CRC 细胞系(SW480、SW620、HCT116 和 HT29) 和人正常结肠上皮细胞系 NCM460 中的 ESCCAL-1,结果显示 ESCCAL-1 在 CRC 组织和细胞中的表达高于癌旁正常组织($t = 14.54, P < 0.001$) 和 NCM460 细胞系(均

$P < 0.05$) (图 2B、C)。此外,ESCCAL-1 的表达与 T 分期($P = 0.0433$)、TNM 分期分期($P = 0.0446$) 和远处转移($P = 0.0174$) 有相关性(表 2)。以上结果表明 ESCCAL-1 在 CRC 中表达上调,且与 CRC 预后不良有关。

表2 CRC 中 lncRNA ESCCAL-1 的表达与临床病理特征的关系(n)

临床病理特征	lncRNA ESCCAL-1 表达		P 值
	低表达	高表达	
性别			
男性	18	15	0.628
女性	16	19	
确诊年龄(岁)			
≤60	12	17	0.327
>60	22	17	
肿瘤大小(cm)			
≤5	20	16	0.467
>5	14	18	
分化程度			
高分化	9	11	0.791
低分化	25	23	
癌结节			
有	15	19	0.467
无	19	15	
T 分期			
T ₁ ~ T ₂	12	4	0.043
T ₃ ~ T ₄	22	30	
淋巴结转移			
有	13	18	0.330
无	21	16	
TNM 分期			
I ~ II	9	2	0.045
III ~ IV	25	32	
远处转移			
有	12	3	0.017
无	22	31	

2.3 敲减 ESCCAL-1 能够抑制 CRC 细胞增殖、集落形成,促进细胞凋亡 选择 HT-29 细胞系进一步分析 ESCCAL-1 在 CRC 进展中的作用,首先对 ESCCAL-1 进行敲减,结果显示相对于 si-NC 组,si-ESCCAL-1 组的 ESCCAL-1 表达降低($t = 9.01, P = 0.001$) ,提示 ESCCAL-1 敲减成功。随后 MTT 和克隆形成实验结果显示,si-ESCCAL-1 组的细胞增殖和集落形成能力较对照组降低。流式细胞术分析显示,敲减 ESCCAL-1 后细胞凋亡率较对照组上升。以上结果提示敲减 ESCCAL-1 能够抑制 CRC 细胞增殖和集落形成,促进细胞凋亡。见图 3。

2.4 ESCCAL-1 特异性结合并下调 miR-874 的表达 荧光原位杂交实验结果得出 ESCCAL-1 主要定位于细胞质(图 4A)。双荧光素酶报告实验结果显

示 miR-874 能够抑制 ESCCAL-1-wt 的荧光活性,但对 ESCCAL-1-mut 无影响(图 4B)。接下来对 CRC 组织和细胞中的 miR-874 进行检测,发现 miR-874 在 CRC 组织和细胞中的表达较癌旁正常组织($t = 11.61, P < 0.001$)和 NCM460 细胞下调(均 $P < 0.05$)

(图 4C、D)。miR-874 在 CRC 中的表达与 ESCCAL-1 呈负相关(图 4E)。图 4F 能够看出,ESCCAL-1 能够抑制 miR-874 的表达,敲减 ESCCAL-1 后,miR-874 的表达水平升高(图 4F)。这些结果表明,ESCCAL-1 能够靶向结合并下调 miR-874 的表达。

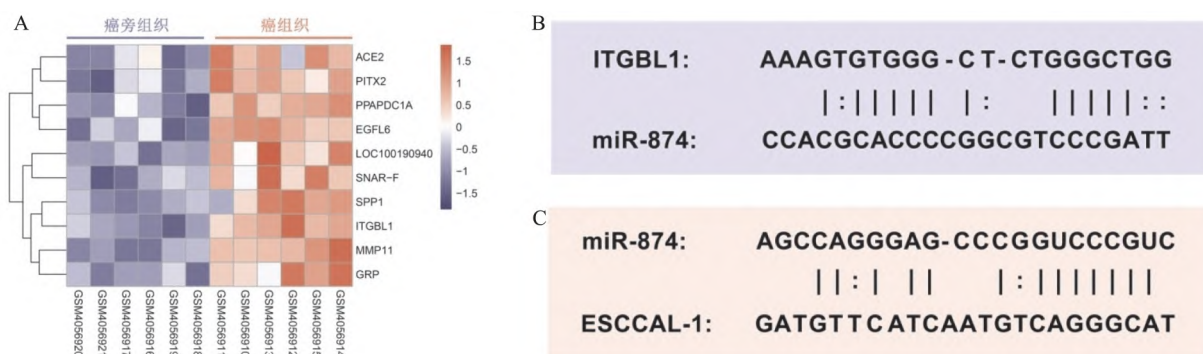


图 1 生物信息学工具预测 CRC 中的分子作用机制

A: GSE136735 芯片中的差异表达基因; B: ITGBL1 和 miR-874 的靶向结合位点; C: miR-874 和 LncRNA ESCCAL-1 的靶向结合位点

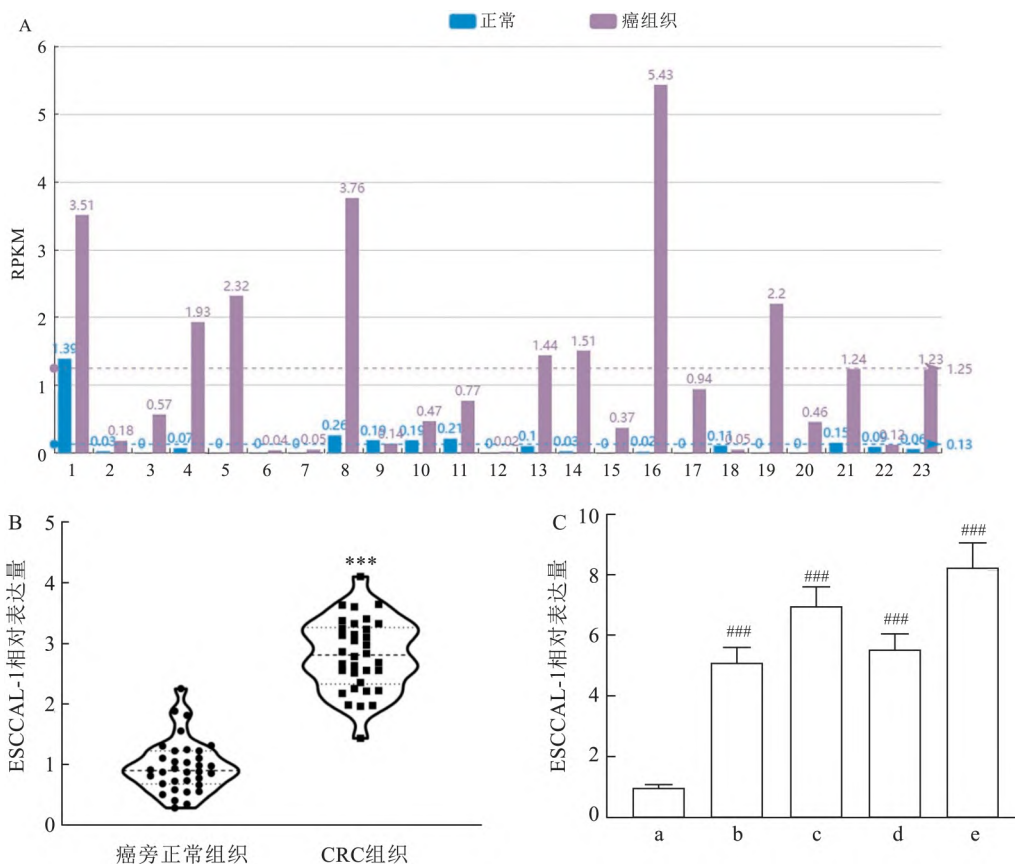


图 2 ESCCAL-1 在 CRC 中表达上调

A: lncRNASNP2 数据库查询结果; 1: BLCA; 2: BRCA; 3: CCRCC_JAPAN; 4: CESC; 5: COAD; 6: GBM; 7: GBM_CHINA; 8: HNSC; 9: KICH; 10: KIRC; 11: KIRP; 12: LGG; 13: LIHC; 14: LUAD; 15: LUAD_KOREA; 16: LUSC; 17: OV; 18: PRAD; 19: READ; 20: SKCM; 21: STAD; 22: THCA; 23: UCEC; B: qRT-PCR 检测 ESCCAL-1 在 CRC 组织及癌旁正常组织中的表达; C: qRT-PCR 检测 ESCCAL-1 在 CRC 细胞系和 NCM460 细胞系的表达; a: NCM460; b: SW480; c: SW620; d: HCT116; e: HT29; 与癌旁正常组织比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 NCM460 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

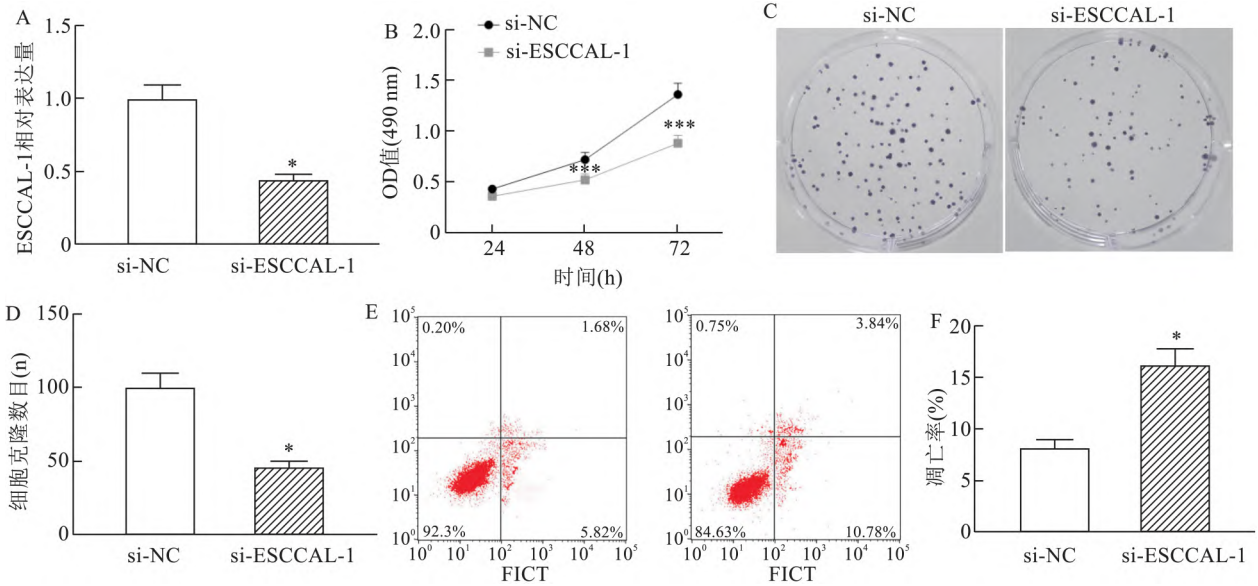


图3 敲减 ESCCAL-1 对 CRC 细胞的影响

A: qRT-PCR 检测 ESCCAL-1 敲减结果; B: MTT 检测细胞增殖结果; C: 克隆形成实验结果; D: 克隆形成数目比较; E: 流式细胞术检测细胞凋亡结果; F: 细胞凋亡率比较; 与 si-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.5 miR-874 抑制剂能够部分逆转 si-ESCCAL-1 在 CRC 细胞中介导的效应 图 5A 显示了各组细胞中 miR-874 的表达水平, miR-874 在 si-ESCCAL-1 + miR-inhibitor 组较 si-ESCCAL-1 + miR-NC 组降低。si-ESCCAL-1 组的细胞增殖和集落形成能力较

si-NC 组降低, 而 miR-inhibitor 的转染部分逆转了这一结果(图 5B-D)。以上结果表明 miR-874 抑制剂能够部分逆转 si-ESCCAL-1 在 CRC 细胞中介导的效应。

2.6 ESCCAL-1 吸附 miR-874 上调 ITGBL1 的表

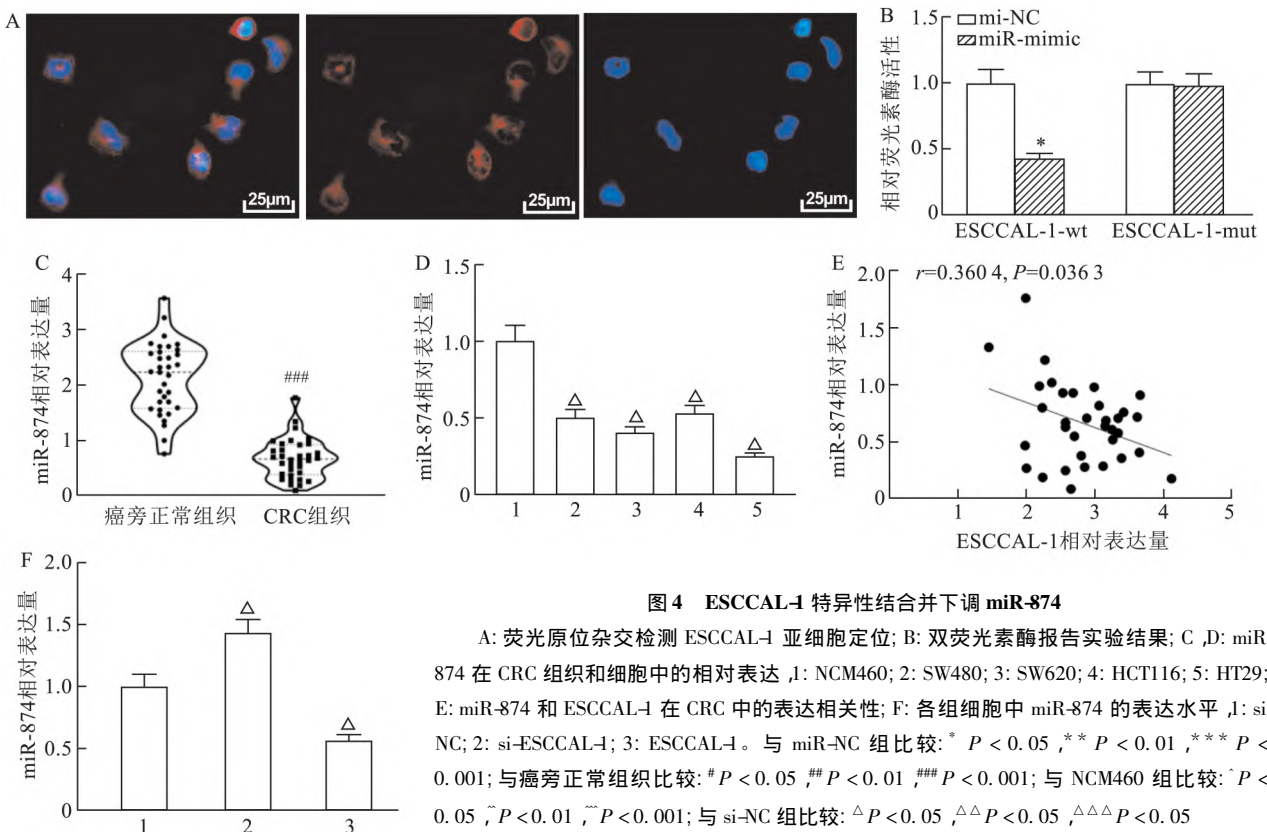


图4 ESCCAL-1 特异性结合并下调 miR-874

A: 荧光原位杂交检测 ESCCAL-1 亚细胞定位; B: 双荧光素酶报告实验结果; C, D: miR-874 在 CRC 组织和细胞中的相对表达; 1: NCM460; 2: SW480; 3: SW620; 4: HCT116; 5: HT29; E: miR-874 和 ESCCAL-1 在 CRC 中的表达相关性; F: 各组细胞中 miR-874 的表达水平; 1: si-NC; 2: si-ESCCAL-1; 3: ESCCAL-1。与 mi-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与癌旁正常组织比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 NCM460 组比较: $\sim P < 0.05$, $\sim\sim P < 0.01$, $\sim\sim\sim P < 0.001$; 与 si-NC 组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

达 采用双荧光素酶报告实验验证了 miR-874 和 ITGBL1 间的靶向结合关系(图 6A)。图 6B 显示了各组细胞中 ITGBL1 的表达,ITGBL1 在 miR-inhibitor 组的表达高于 miR-NC 组和 miR-mimic 组,而 si-ESCCAL-1 的转染降低了 miR-inhibitor 组上调的 IT-

GBL1 水平(图 6C)。qRT-PCR 检测得到 ITGBL1 在 CRC 组织($t = 10.61, P < 0.001$)和细胞中的表达(均 $P < 0.05$)高于对照组(图 6D、E),与 ESCCAL-1 在 CRC 中的表达具有正相关性,与 miR-874 负相关(图 6F、G)。

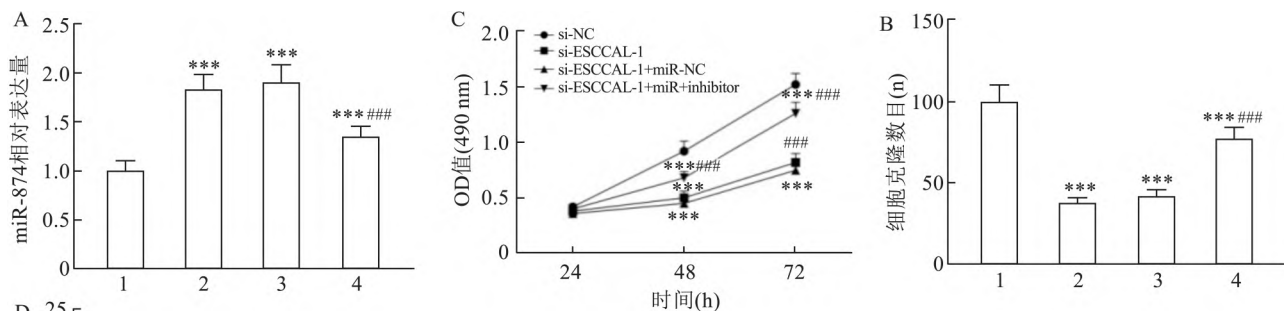


图5 敲减 ESCCAL-1 对 CRC 细胞的影响

A: qRT-PCR 检测各组细胞中 miR-874 的表达; B: MTT 检测细胞增殖结果; C, D: 克隆形成实验结果; 1: si-NC 组; 2: si-ESCCAL-1; 3: si-ESCCAL-1 + miR-NC 组; 4: si-ESCCAL-1 + miR-inhibitor 组。与 si-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 si-ESCCAL-1 + miR-NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

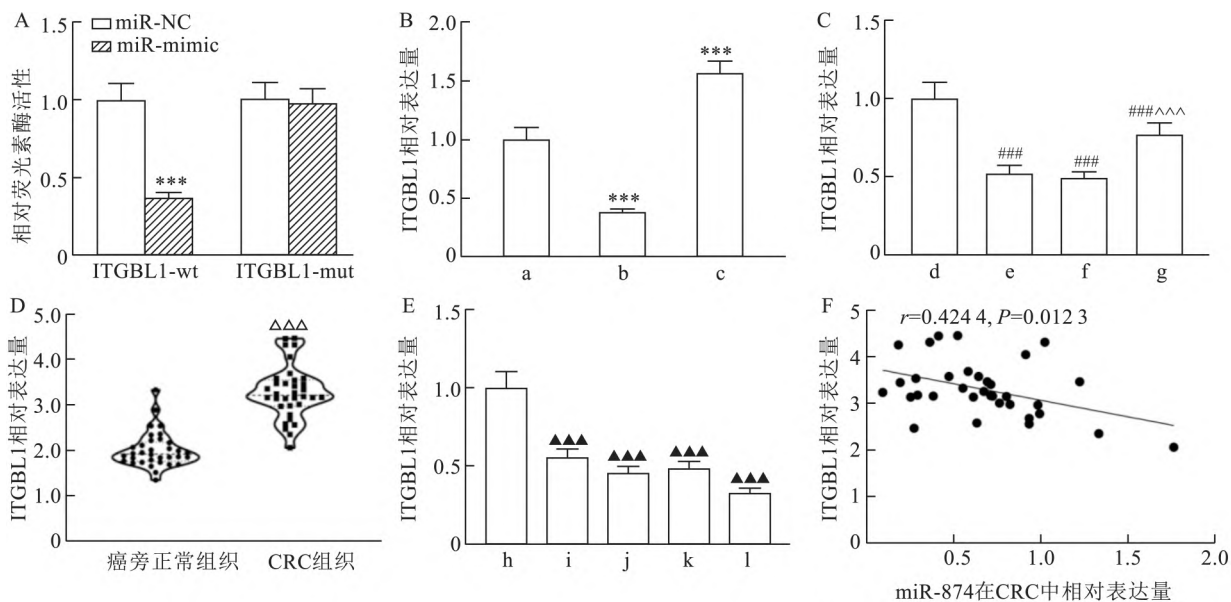
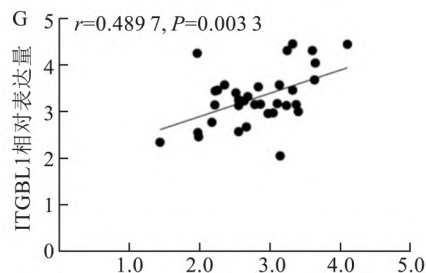


图6 ESCCAL-1 吸附 miR-874 调控 ITGBL1

A: 双荧光素酶报告实验结果; B: ITGBL1 在 miR-874 各组的表达 a: miR-NC; b: miR-mimic; c: miR-inhibitor; C: ITGBL1 在 ESCCAL-1 各组的表达 d: si-NC 组; e: si-ESCCAL-1; f: si-ESCCAL-1 + miR-NC 组; g: si-ESCCAL-1 + miR-inhibitor 组; D, E: ITGBL1 在 CRC 组织和细胞中的相对表达 h: NCM460; i: SW480; j: SW620; k: HCT116; l: HT29; F: ITGBL1 和 miR-874 在 CRC 中的表达相关性; G: ITGBL1 和 ESCCAL-1 在 CRC 中的表达相关性; 与 miR-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 si-NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 si-ESCCAL-1 + miR-NC 组比较: ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$, ^^ ^ $P < 0.001$; 与癌旁正常组织比较: Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$, ΔΔΔ $P < 0.001$; 与 NCM460 组比较: ▲▲▲ $P < 0.001$



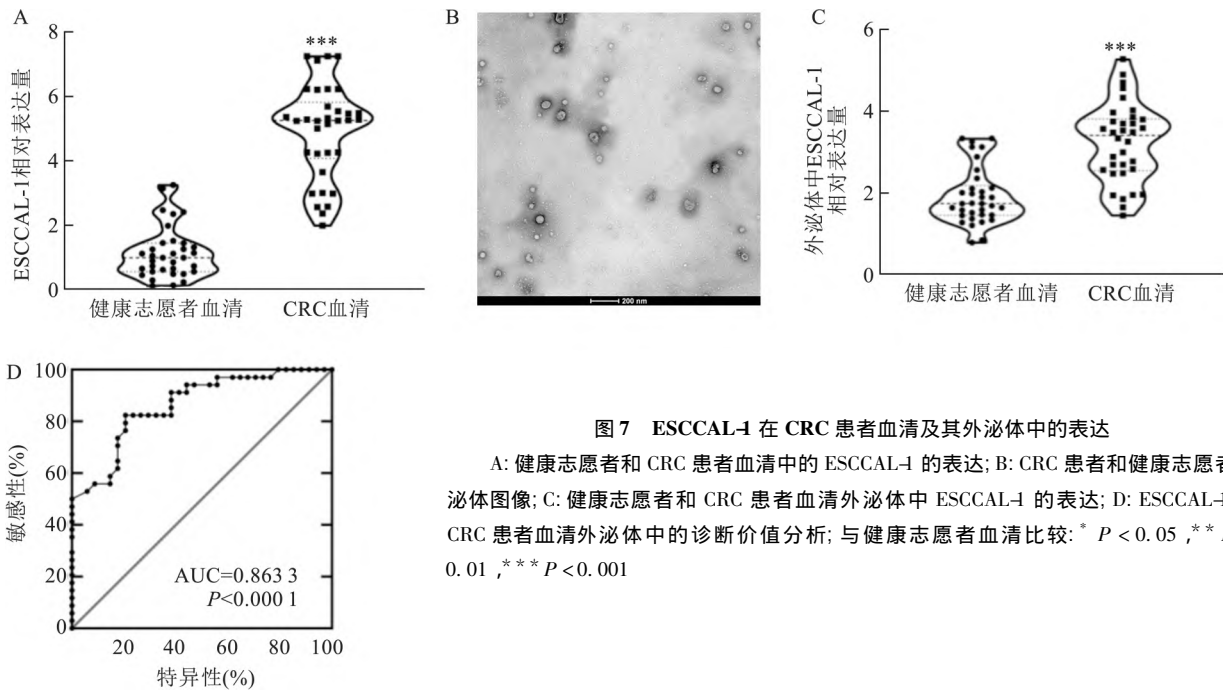


图7 ESCCAL-1 在 CRC 患者血清及其外泌体中的表达

A: 健康志愿者和 CRC 患者血清中的 ESCCAL-1 的表达; B: CRC 患者和健康志愿者外泌体图像; C: 健康志愿者和 CRC 患者血清外泌体中 ESCCAL-1 的表达; D: ESCCAL-1 在 CRC 患者血清外泌体中的诊断价值分析; 与健康志愿者血清比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.7 ESCCAL-1 在 CRC 患者血清外泌体中上调

为了探讨外泌体是否参与 ESCCAL-1 介导的 CRC 进展,首先检测了 CRC 患者 ($n = 34$) 和健康志愿者 ($n = 34$) 血清中 ESCCAL-1 表达,结果显示 ESCCAL-1 在 CRC 患者血清中的表达高于对照组 ($t = 13.18$, $P < 0.001$) (图 7A)。随后在各组血清中分离出外泌体,图 7B 显示了 CRC 患者外泌体图像。与健康志愿者相比,CRC 患者血清中产生的外泌体的含量更高 ($t = 6.39$, $P < 0.001$) (图 7C)。ROC 曲线对 ESCCAL-1 在 CRC 患者血清外泌体中的诊断价值进行分析发现曲线下面积为 0.8633 (图 7D),提示血清外泌体 ESCCAL-1 的表达可作为 CRC 的一个有效诊断指标。

3 讨论

目前,许多研究已经证实 lncRNAs 通过多种途径参与 CRC 的发生,包括细胞转移的调节、自噬和细胞凋亡等扩散^[6]。本研究选择 lncRNA ESCCAL-1 作为研究对象,探索 lncRNA ESCCAL-1 在 CRC 进展中的作用机制。

已有的研究^[3]表明,ESCCAL-1 在食管鳞癌中表达升高,沉默 ESCCAL-1 能够抑制食管鳞癌恶性发展的细胞过程,包括增殖、迁移和侵袭、凋亡抵抗性和肿瘤生长的损害。但 ESCCAL-1 在 CRC 中尚未有相关报道,lncRNASNP2 数据库检索得到 ESCCAL-1 在结肠癌组织中高于对应的非肿瘤组织,因

此推测 ESCCAL-1 在 CRC 中同样充当促癌因子发挥作用。本实验采用 qRT-PCR 检测得到 ESCCAL-1 在 CRC 组织中的表达高于癌旁正常组织,MTT、克隆形成实验和流式细胞术结果表明,敲减 ESCCAL-1 能够抑制 CRC 细胞增殖和集落形成,促进细胞凋亡。通过检测 CRC 患者和健康志愿者的血清及其外泌体发现,与健康志愿者相比,CRC 患者血清中的 ESCCAL-1 及 exo-ESCCAL-1 均表达上调。以上结果表明,ESCCAL-1 能够促进 CRC 的恶性进展,血清外泌体 ESCCAL-1 可能是 CRC 早期诊断的一个有效生物标志物。

lncRNAs 主要通过靶向相应的 miRNAs 来上调 mRNAs 的表达,从而在人类癌症和疾病中发挥作用。例如,lncRNA-PVT1 通过调节 miR-194-5p/BCLAF1 轴作为 ceRNA 来加速膀胱癌细胞的恶性表型^[7];lncRNA-PCAT18 通过与 miR-759 结合上调 SPR3 来促进 CRC 的进展^[6]。利用 lncRNASNP2 数据库,课题组发现 miR-874 是 ESCCAL-1 的候选靶点 miRNA,并通过双荧光素酶报告实验验证了这种相互作用。miR-874 在多种癌症中的生物学作用已有报道。如 miR-874 在胃癌中表达下调,过表达 miR-874 能够抑制胃癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化^[8];miR-874-3p 通过靶向 STAT3 在食管鳞癌中发挥抗肿瘤作用^[9];miR-874 在 CRC 中表达下调,过表达 miR-874 能够抑制 CRC 的恶性进展^[10]。与相关研究一致,课题组发现 miR-874 在 CRC 细胞

中具有抗肿瘤作用,抑制 CRC 细胞增殖和集落形成,促进其凋亡。此外,挽救实验显示 miR-874 抑制剂能够部分逆转敲减 ESCCAL-1 在 CRC 中介导的效应。以上结果提示 ESCCAL-1 通过吸附 miR-874 促进 CRC 细胞增殖和集落形成,抑制细胞凋亡。

用 miRactDB 在线工具预测 ITGBL1 可能是 miR-874 的靶基因,双荧光素酶报告实验证实了 ITGBL1 与 miR-874 的相互作用。ITGBL1 在许多肿瘤的恶性转移和侵袭中发挥了重要作用,且已被确定为肿瘤的潜在治疗靶点^[11]。ITGBL1 通过刺激 TGF- β 信号通路促进肝细胞癌细胞迁移和侵袭^[12]; ITGBL1 的上调可预测卵巢癌预后不良,并促进化疗耐药^[13]; ITGBL1 在 CRC 中表达升高,可能通过 β -catenin 影响细胞外 Wnt 信号促进 CRC 进展^[14]。本研究采用 qRT-PCR 检测在 CRC 细胞中 ESCCAL-1 和 miR-874 对 ITGBL1 表达的影响,发现 ESCCAL-1 可以通过靶向下调 miR-874 来上调 ITGBL1 的表达。随后将 ITGBL1 过表达载体和 si-ESCCAL-1 共转染 CRC 细胞,发现上调 ITGBL1 的表达水平能够部分逆转 si-ESCCAL-1 对 CRC 细胞增殖、集落形成和凋亡的影响。

综上所述,ESCCAL-1 通过竞争性结合 miR-874 来增强 ITGBL1 的表达,从而加速 CRC 的进展。LncRNA ESCCAL-1/miR-874/ITGBL1 轴的发现丰富了 ESCCAL-1 的调控网络,为 ESCCAL-1 作为 CRC 的治疗靶点提供了依据。

参考文献

- [1] Patel S G, Karlitz J J, Yen T, et al. The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(3): 262–74.
- [2] Zhao X, Wang Y, He J, et al. LncRNA UCA1 maintains the low-tumorigenic and nonmetastatic status by stabilizing E-cadherin in primary prostate cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(10): 1174–87.
- [3] Liu J, Mayekar M K, Wu W, et al. Long non-coding RNA ESC-

- CAL-1 promotes esophageal squamous cell carcinoma by down regulating the negative regulator of APOBEC3G [J]. *Cancer Lett*, 2020, 493(28): 217–27.
- [4] Zhang Z, Yang W, Li N, et al. LncRNA MCF2L-AS1 aggravates proliferation, invasion and glycolysis of colorectal cancer cells via the crosstalk with miR-874-3p/FOXO1 signaling axis [J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(2): 263–71.
- [5] Qiu X, Feng J R, Qiu J, et al. ITGBL1 promotes migration, invasion and predicts a poor prognosis in colorectal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104(2): 172–80.
- [6] Yang D, Li R, Xia J, et al. Long noncoding RNA PCAT18 upregulates SPRR3 to promote colorectal cancer progression by binding to miR-759 [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12(9): 11445–52.
- [7] Chen M, Zhang R, Lu L, et al. LncRNA PVT1 accelerates malignant phenotypes of bladder cancer cells by modulating miR-194-5p/BCLAF1 axis as a ceRNA [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(21): 22291–312.
- [8] Yuan F, Zhao Z T, Jia B, et al. TSN inhibits cell proliferation, migration, invasion, and EMT through regulating miR-874/HMGB2/ β -catenin pathway in gastric cancer [J]. *Neoplasma*, 2020, 67(5): 1012–21.
- [9] Yuan R B, Zhang S H, He Y, et al. MiR-874-3p is an independent prognostic factor and functions as an anti-oncomir in esophageal squamous cell carcinoma via targeting STAT3 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21): 7265–73.
- [10] Yu C, Li S, Hu X. Circ_0005576 promotes malignant progression through miR-874/CDK8 axis in colorectal cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13(5): 7793–805.
- [11] Li R, Zhuang C, Jiang S, et al. ITGBL1 predicts a poor prognosis and correlates EMT phenotype in gastric cancer [J]. *J Cancer*, 2017, 8(18): 3764–73.
- [12] Huang W, Yu D, Wang M, et al. ITGBL1 promotes cell migration and invasion through stimulating the TGF- β signalling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(7): e12836–51.
- [13] Song J, Yang P, Lu J. Upregulation of ITGBL1 predicts poor prognosis and promotes chemoresistance in ovarian cancer [J]. *Cancer Biomark*, 2020, 27(1): 51–61.
- [14] Qi L, Song F, Ding Y. Regulatory Mechanism of ITGBL1 in the Metastasis of Colorectal Cancer [J]. *Front Oncol*, 2020, 10(10): 259–64.

Effects of exosome – derived LncRNA ESCCAL – 1 / miR – 874 / ITGBL1 on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells

Ma Ermin¹, Zhang Zhaohong¹, Huang Jingjing¹, Liu Xiang¹, Chi Geng¹, Liu Lei², Zhang Nan¹
(¹General Surgery, ²Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450099)

Abstract Objective To explore the mechanism of exosome-derived LncRNA ESCCAL-1 regulating the miR-874/

纳米氧化锌诱发人心肌细胞 AC16 氧化应激损伤及转录组分析改变

鲁方梅^{1,2} 李宇杰² 郭家彬² 徐德祥¹ 刘超^{1,2}

摘要 目的 探讨纳米氧化锌(ZnO NPs)对人心肌细胞AC16的氧化应激损伤,并从转录组层面分析ZnO NPs作用机制。方法 利用动态光散射法(DLS)对ZnO NPs进行表征检测。将AC16细胞暴露于不同剂量、不同时间的ZnO NPs后,使用CCK-8法测定细胞存活率。将AC16细胞分为对照组、ZnO NPs(50、100、200 μmol/L)暴露组,处理6 h后检测细胞线粒体膜电位(MMP)及活性氧自由基(ROS)。将AC16细胞分为对照组、50 μmol/L ZnO NPs组、200 μmol/L ZnO NPs组,暴露6 h后使用TRIzol提取细胞总RNA,进行转录组分析,并对差异表达基因进行基因本体(GO)、京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析。结果 DLS法结

果显示,流体动力学直径为(192.2 ± 1.63) nm, Zeta电位为(-23.26 ± 1.05) mV。CCK-8结果显示,随着ZnO NPs暴露的剂量与时间的增加,AC16细胞存活率下降。荧光定量法观察显示,随着ZnO NPs暴露剂量的增加,MMP在100 μmol/L ZnO NPs时下降($P < 0.05$),ROS在50 μmol/L ZnO NPs时升高($P < 0.05$)。转录组分析结果显示,50 μmol/L ZnO NPs组与对照组相比共富集到1 071个基因,其中上调基因561个,下调基因510个;200 μmol/L ZnO NPs组与对照组相比共富集到7 164个基因,其中上调基因4 098个,下调基因3 066个。GO与KEGG分析结果显示,差异基因主要富集于活性氧、抗氧化活性、线粒体细胞色素C的释放、凋亡等信号通路。结论 ZnO NPs可导致AC16细胞存活率下降,诱发细胞线粒体损伤和氧化应激,其中ROS介导的氧化应激与线粒体功能改变是ZnO NPs致AC16细胞毒性的重要毒作用机制。

关键词 纳米氧化锌; 心肌毒性; 转录组学; 氧化应激; 线粒体损伤

中图分类号 R 114.99

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0450-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.017

2023-02-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82003880)

作者单位: ¹ 安徽医科大学公共卫生学院卫生毒理学系, 合肥 230032

² 中国人民解放军疾病预防控制中心, 北京 100071

作者简介: 鲁方梅, 女, 硕士研究生;

徐德祥, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xudex@126.com;

刘超, 男, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: liuchao9588@sina.com

ITGBL1 axis in the progression of colorectal cancer (CRC). **Methods** The differentially expressed genes in CRC were analyzed using the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Expressions of LncRNA ESCCAL-1, miR-874 and ITGBL1 in CRC tissues and cell lines (SW480, SW620, HCT116 and HT29) and adjacent normal tissues and NCM460 cell lines were detected by qRT-PCR; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), clone formation and flow cytometry was used to detect cell proliferation, colony formation and apoptosis; dual luciferase reporter assays were used to verify the interaction between miR-874 and ESCCAL-1, ITGBL1; fluorescence in situ hybridization was used to determine the subcellular localization of LncRNA ESCCAL-1. Exosomes were isolated from serum using the Exosome extraction kit. **Results** The expressions of ESCCAL-1 and ITGBL1 in CRC tissues and cell lines were higher than those in adjacent normal tissues and NCM460 cell lines, while the opposite was true for miR-874 ($P < 0.05$). Knockdown of ESCCAL-1 can inhibit CRC cell proliferation and colony formation and promote apoptosis. There are specific binding sites for miR-874 and ESCCAL-1, and miR-874 inhibitor could partially reverse the effect of knockdown ESCCAL-1 in CRC ($P < 0.05$). ESCCAL-1 upregulates ITGBL1 by adsorbing miR-874. The serum levels of ESCCAL-1 and exo-ESCCAL-1 in CRC patients were higher than those in the control group. Serum exo-ESCCAL-1 may be a valuable diagnostic indicator for CRC treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** ESCCAL-1 promotes CRC progression by regulating the miR-874/ITGBL1 axis, and ESCCAL-1 may be an effective molecular target for CRC therapy.

Key words LncRNA ESCCAL-1; miR-874; ITGBL1; colorectal cancer