

# 长链非编码 RNA AC005062.1 通过调控结肠癌转移相关基因 1 的表达对结直肠癌恶性表型的影响

李志祥, 谢强, 王彬彬, 喻大军, 钱军

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.012

**摘要** **目的** 探究长链非编码 RNA (lncRNA) AC005062.1 通过调控结肠癌转移相关基因 1 (MACC1) 的表达对结直肠癌 (CRC) 恶性表型的影响。**方法** 应用 GSE84983 和 GSE104364 数据库, 分析 lncRNA AC005062.1 在结直肠癌中的表达水平。收集医院肿瘤外科进行 CRC 手术治疗患者的肿瘤组织 (肿瘤组) 及癌旁组织 (对照组), 随机抽取 8 对, 采用 qPCR 法检测两组中 lncRNA AC005062.1 的表达。运用小干扰 RNA (siRNA) 下调 CRC 细胞中 lncRNA AC005062.1 的表达后, 采用 CCK-8 法检测两组细胞增殖, 流式细胞方法检测两组细胞周期和凋亡, 伤口划痕实验检测两组细胞迁移。利用数据库比较 lncRNA AC005062.1 和 MACC1 基因在染色体上的定位, 用 qPCR 和蛋白免疫印迹方法检测两组组织中 MACC1 转录水平和蛋白水平的表达; 下调 CRC 细胞中 lncRNA AC005062.1, qPCR 和蛋白免疫印迹方法检测 MACC1 转录水平和蛋白水平的表达。**结果** GSE84983 和 GSE104364 数据库分析及两组组织检测结果提示 CRC 中 lncRNA AC005062.1 呈高表达。下调 lncRNA AC005062.1 后, CCK-8 实验结果显示, 下调组 HT29 细胞增殖速度降低; 流式细胞实验表明, 下调组 HT29 细胞的凋亡数量增加、G<sub>1</sub> 期比例增加, S 期和 G<sub>2</sub> 期比例减少; Western blot 实验显示下调组 HT29 细胞内 cleaved-caspase-3 和 Bax 表达升高, 而 Bcl-2 表达降低; 伤口划痕实验表明, 下调组 HT29 细胞迁移率低于对照组。通过 University of California Santa Cruz (UCSC) 数据库分析比较显示两者在染色体上的定位很近, MACC1 极可能是 lncRNA AC005062.1 的靶基因; 检测结直肠癌两组组织中 MACC1 mRNA 水平, 结果显示 MACC1 在 CRC 中高表达, 且下调 lncRNA AC005062.1 在 HT29 细胞中的表达, 可使 MACC1 表达降低。**结论** lncRNA AC005062.1 可通过调控 MACC1 在 CRC 中表达, 抑制结直肠癌细胞 HT29 增殖、周期及迁移, 促进其凋亡。

**关键词** 结直肠癌; lncRNA AC005062.1; MACC1; 恶性表型  
**中图分类号** R 735.3+5; R 735.3+7

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)05-0736-06

2022-02-25 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究重点项目 (编号: KJ2019A0380);  
蚌埠市科技创新指导类项目 (编号: 20200341)

作者单位: 蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科, 蚌埠 233004

作者简介: 李志祥, 男, 硕士, 主治医师;

钱军, 男, 本科, 主任医师, 教授, 责任作者, E-mail:  
13035010218@163.com

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是胃肠道中常见的恶性肿瘤, 《2020 年全球癌症统计》报告中指出, 在全部癌症中, 结直肠癌的发病率排名第三, 病死率排名第二<sup>[1]</sup>。CRC 的侵袭和迁移是导致患者死亡的主要原因。因此, 研究 CRC 发病的分子机制, 为寻找更有效的治疗策略具有重要意义。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一类非编码单链 RNA, 包含 200 多个核苷酸。lncRNA 可通过调控染色质修饰、蛋白质合成、RNA 成熟和转运等来影响基因表达<sup>[2]</sup>。近年来研究<sup>[3-4]</sup>显示, 多种 lncRNA 在 CRC 肿瘤中差异表达。如 PVT1 和 LINC00152 在 CRC 中高表达, 并可促进 CRC 的肿瘤生长<sup>[5-6]</sup>。然而, 另外一些研究<sup>[7-8]</sup>显示, lnc-zc3h7a、MEG3 在 CRC 中的表达降低。鉴于 lncRNA 在结直肠癌中的表达量存在差异, 且对肿瘤发挥不同的调控作用, 该研究旨在找到 CRC 中差异显著的 lncRNA, 并研究其在 CRC 中的作用及机制, 为 CRC 的发病机制研究提供新方向, 为 CRC 的治疗提供新策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病例资料** 收集 2018—2020 年来自蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科进行 CRC 手术治疗患者的肿瘤组织 (肿瘤组) 及癌旁组织 (肿瘤边界外约 5 mm, 对照组), 随机抽取 8 对。收集的标本均经过患者同意, 并已获得蚌埠医学院第一附属医院的伦理委员会批准。

**1.1.2 试剂及耗材** RNA 逆转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒购自湖南艾科瑞公司; 引物、三氯甲烷、异丙醇、乙醇购自上海生工生物公司; DMEM 高糖细胞培养基购自杭州吉诺公司; 胎牛血清购自以色列 BI 公司; 双抗购自美国 Hyclone 公司; TRIzol 购自南京诺唯赞公司; CCK-8、RIPA 裂解液购自上海碧云天公司; Transwell 小室购自美国康宁公司; 转染

试剂购自广州锐博公司;细胞周期试剂盒购自杭州联科公司;细胞凋亡试剂盒购自美国 BD 公司;化学发光显影液购自美国赛默飞公司;Western blot 抗体均购于美国 CST 公司。

**1.1.3 主要实验仪器** 细胞培养箱、超净工作台(美国赛默飞公司);倒置显微镜(日本尼康公司);实时荧光定量 PCR 仪器(美国 ABI 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及转染** HT29 细胞采用 DMEM 高糖细胞培养基、10% 胎牛血清和 1% 双抗完全培养基进行培养,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。在细胞对数生长期时进行铺板,之后按照转染试剂说明书进行小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的转染,继续培养 24 ~ 72 h,用于后续实验。

**1.2.2 qPCR** 将所需的组织剪合适大小,加入 TRIzol 进行匀浆(细胞样本直接加 TRIzol 即可),离心取出沉淀后加入三氯甲烷,4 °C、12 500 r/min 离心 15 min,取上清液,加入异丙醇静置 10 min,离心后用 75% 乙醇洗 1 遍,去除乙醇后晾干、溶解,得到总 RNA。逆转和 PCR 按照试剂盒中的说明书进行。引物: lncRNA AC005062.1, (F) 5'-GGATGCCAAGAAGTTCCA-3', (R) 5'-TAGGCATCCTC-CAGCTCCTT-3'; MACC1, (F) 5'-AGCAGTTGGAAG-CAGGTGAA-3', (R) 5'-ACTGTGCAACTGGTTCAC-CA-3'; GAPDH, (F) 5'-TCCACCCATGGCAAATTC-CA-3', (R) 5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'。

**1.2.3 CCK-8 实验** 将细胞铺于 96 孔板中,细胞贴壁后按上述进行转染,每隔 12 h 加入 10 μl CCK-8 试剂,孵育 1 h 后用酶标仪进行检测,最后绘制细胞的增殖曲线。

**1.2.4 流式细胞检测** 在细胞对数生长期时进行铺板,之后按照转染试剂说明书进行 siRNA 的转染,继续培养 48 h,之后按照细胞周期试剂盒或细胞凋亡试剂盒说明书进行染色,最后采用流式细胞仪对样本进行检测。

**1.2.5 伤口划痕实验** 将 HT29 细胞接种在 6 孔板中,并用按前述进行转染。48 h 后,用 P1000 移液器吸头在细胞上垂直划线。然后将细胞用 PBS 洗涤并加入新培养基。在 0 h 和 48 h 对同一视野进行拍摄。

**1.2.6 Transwell 实验** 将 HT29 细胞铺于 12 孔板中,转染 24 h 后消化离心,取适当细胞接种在带有 8 μm 孔滤膜的 Transwell 小室中。上室为无血清培养基,下室中的培养基含 10% 的血清。将细胞在培养箱中培养 36 h。之后,对细胞进行固定,并用 0.5%

的结晶紫染色 15 min。使用倒置显微镜对迁移的细胞进行计数并在 5 个不同区域拍照。

**1.2.7 Western blot 实验** 使用 RIPA 裂解缓冲液从 HT29 细胞或组织中提取蛋白质。然后使用 BCA 试剂盒对蛋白质进行浓度测定。进行 SDS-PAGE 电泳以分离蛋白质。然后将蛋白转移至 PVDF 膜。然后用 5% 牛脱脂奶粉进行封闭,室温 1 h。PBST 洗 3 遍后加入一抗,在 4 °C 下孵育过夜。接下来,去除一抗,加入二抗室温孵育 1 h。最后,通过使用化学发光 ECL 试剂显影。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。两组数据资料之间的比较用 *t* 检验,多个样本之间的比较采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 lncRNA AC005062.1 在 CRC 中的表达** 经两个数据库 GSE84983 和 GSE 104364 分析所示,lncRNA AC005062.1 在两个数据库中的肿瘤组织中均被上调( $P = 0.0029$ 、 $P = 0.0001$ ),见图 1A、B。对 CRC 患者的肿瘤组织(肿瘤组)和配对癌旁组织(对照组)进行 qPCR 检测结果显示,与对照组相比,lncRNA AC005062.1 在肿瘤组中的表达升高( $F = 1.044$ , $P < 0.01$ )。见图 1C 和表 1。

表 1 CRC 患者基本情况

患者编号	性别	年龄	癌症部位	TNM 分期
1	女	47	右半结肠	Ⅲ期
2	男	56	右半结肠	Ⅳ期
3	男	65	右半结肠	Ⅳ期
4	女	56	右半结肠	Ⅲ期
5	男	51	左半结肠	Ⅲ期
6	女	52	左半结肠	Ⅳ期
7	女	64	左半结肠	Ⅳ期
8	男	56	左半结肠	Ⅲ期

**2.2 下调 lncRNA AC005062.1 对 CRC 细胞增殖和凋亡的影响** 在 HT29 细胞中下调 lncRNA AC005062.1 (si-lncRNA AC005062.1 组),通过 qPCR 验证 siRNA 敲减效率,与对照组相比,下调效率约为 51% ( $F = 1.176$ , $P < 0.001$ ) (图 2A)。采用 CCK-8 测定细胞的增殖能力(图 2B),结果显示,与 60 h 对照组相比,si-lncRNA AC005062.1 组增殖量降低 ( $F = 2.146$ , $P < 0.001$ )。提示下调 lncRNA AC005062.1 的表达可使细胞增殖率降低。通过流式细胞技术检测细胞的凋亡,结果显示,与对照组相

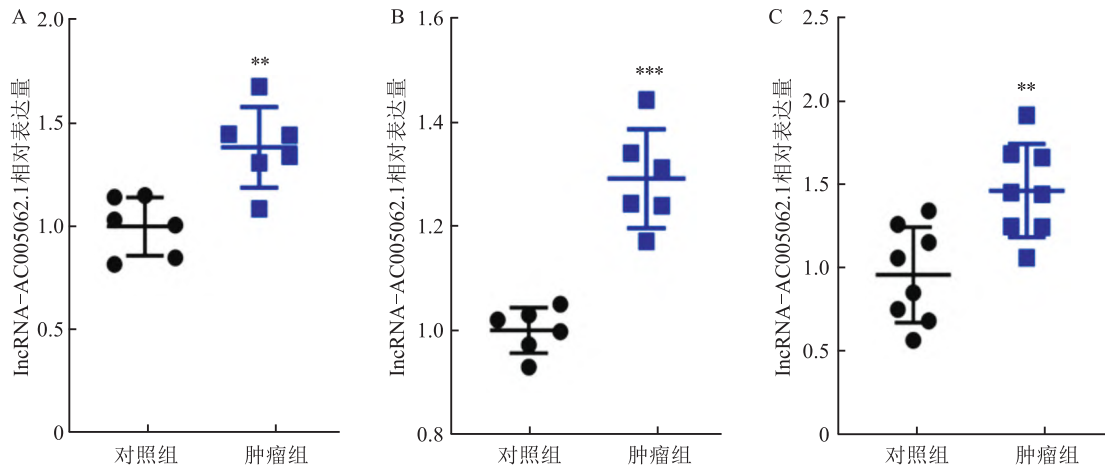


图1 lncRNA AC005062.1 在 CRC 中的表达

A:lncRNA AC005062.1 在 GSE84983 中的表达;B:lncRNA AC005062.1 在 GSE104364 中的表达;C:qPCR 检测 CRC 组织和配对癌旁组织中 lncRNA AC005062.1 的表达;与对照组相比:\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$

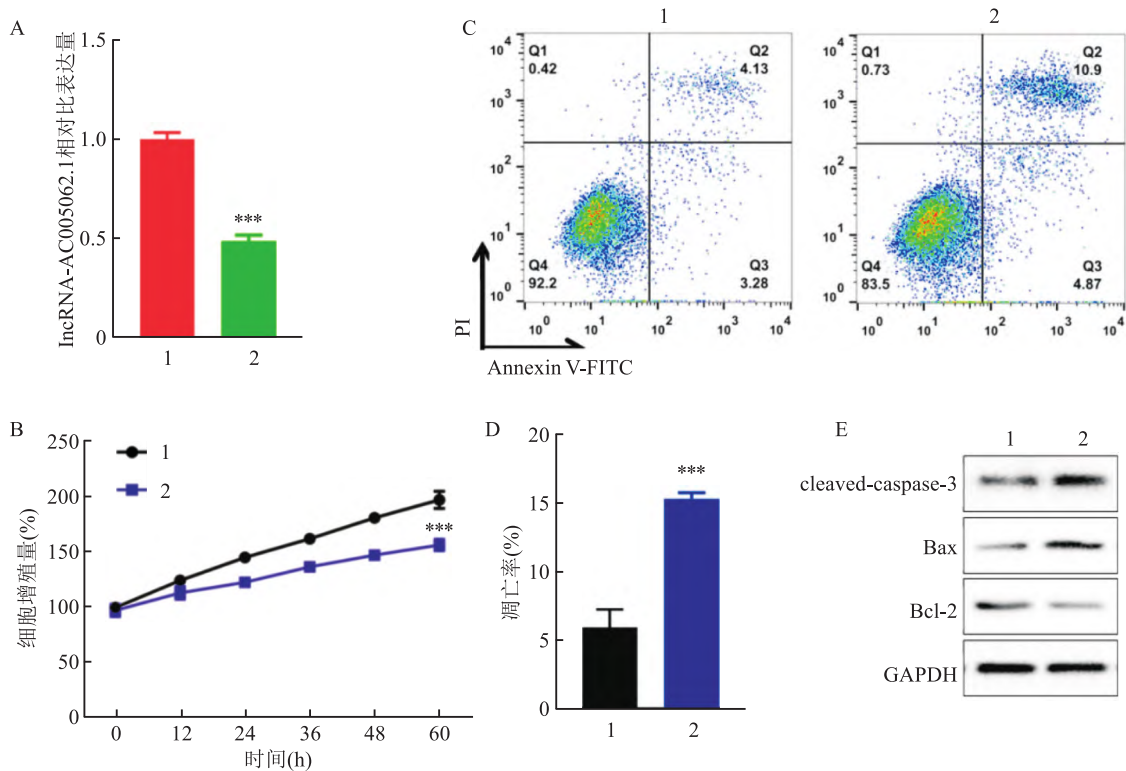


图2 下调 lncRNA AC005062.1 对 CRC 细胞增殖和凋亡的影响

A:转染效率检测;B:CCK-8 测定细胞增殖;C、D:流式检测细胞凋亡( $P = 0.0003$ );E:Western blot 检测凋亡相关蛋白;1:对照组;2:si-lncRNA AC005062.1 组;与对照组比较:\*\*\* $P < 0.001$

比,si-lncRNA AC005062.1 组细胞的凋亡增加(图 2C、D) ( $F = 8.207, P < 0.001$ )。通过 Western blot 检测凋亡相关蛋白 cleaved-caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达,结果显示,与对照组相比,下调 lncRNA AC005062.1 组细胞内的 cleaved-caspase-3 和 Bax 表达升高,而 Bcl-2 表达降低。

2.3 下调 lncRNA AC005062.1 对 CRC 细胞周期的影响 在 HT29 细胞中下调 lncRNA AC005062.1,通过流式细胞技术检测了细胞周期,结果显示,与对照组相比,si-lncRNA AC005062.1 组细胞周期  $G_1$  期比例增加,S 期和  $G_2$  期比例降低,这说明 lncRNA AC005062.1 不仅可以调控 HT29 细胞

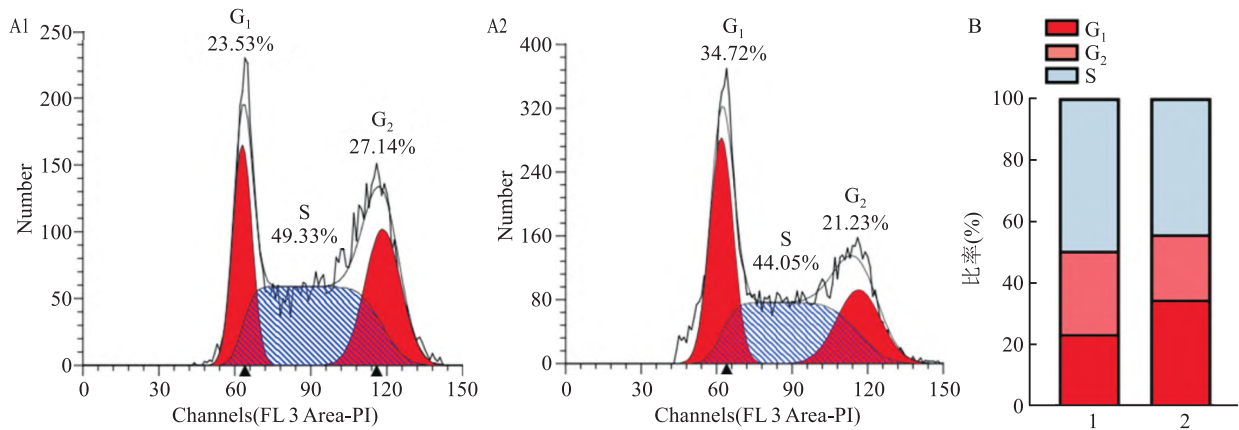


图3 下调 lncRNA AC005062.1 对 CRC 细胞周期的影响

A: 流式检测细胞周期; B: 周期分析; 1: 对照组; 2: si-lncRNA AC005062.1 组

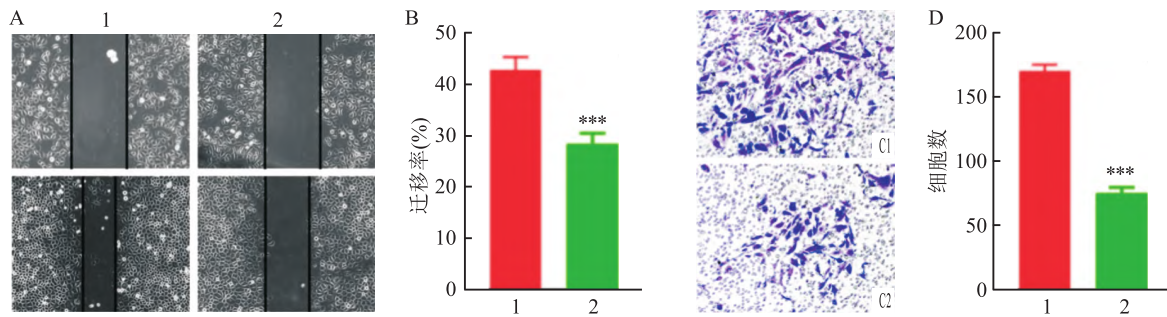


图4 下调 lncRNA AC005062.1 对 CRC 细胞迁移的影响 ×100

A、B: 伤口划痕实验; C、D: Transwell 迁移实验; 1: 对照组; 2: si-lncRNA AC005062.1 组; 与对照组比较: \*\*\*  $P < 0.001$ 

的增殖和凋亡,还能够影响细胞的周期。见图3。

**2.4 下调 lncRNA AC005062.1 对 CRC 细胞迁移的影响** 在 HT29 细胞中下调 lncRNA AC005062.1 表达,伤口划痕实验结果显示,与对照组相比,下调后 si-lncRNA AC005062.1 组细胞的愈合速度降低(图4A、B) ( $F = 1.462, P < 0.001$ ); Transwell 迁移实验也显示,与对照组相比, si-lncRNA AC005062.1 组 CRC 细胞的迁移数目减少(图4C、D) ( $F = 1.23, P < 0.001$ )。这些结果表明,下调 lncRNA AC005062.1 可明显抑制 CRC 细胞的迁移。

**2.5 在 CRC 细胞中 lncRNA AC005062.1 对调控 MACC1 的表达的影响** 通过 University of California Santa Cruz (UCSC) 数据库分析 lncRNA AC005062.1 位于 Chr7p21。MACC1 距离 lncRNA AC005062.1 仅有 50 kb(图5A)。与对照组相比, MACC1 在肿瘤组中表达增高 ( $F = 1.134, P < 0.005$ ), 见图5B、C; 下调 lncRNA AC005062.1 在 HT29 细胞中的表达, qPCR 和 Western blot 实验结果显示,与对照组相比,下调后 si-lncRNA AC005062.1 组 MACC1 的转录水平和蛋白水平表达均下降(图

5D、E), 这些研究结果表明, MACC1 极可能是 lncRNA AC005062.1 的靶基因, 即 lncRNA AC005062.1 可通过调控 MACC1 影响 CRC 细胞的恶性表型。

### 3 讨论

CRC 是消化道常见的恶性肿瘤之一, 发病率近年来呈上升趋势, 其特点是发病年龄小、分化低、恶性程度高<sup>[9]</sup>。近年来的研究<sup>[10]</sup>表明, lncRNA 不仅在癌发生过程中起着癌基因或抑癌基因的作用, 而且因其组织和细胞特异性增高而在肿瘤的诊断和治疗领域具有广阔的应用前景。如对前列腺癌患者的尿液中的 lncRNA PCA3 进行检测结果提示, 其对前列腺癌的诊断具有高敏感性和特异性, 有望取代血清的前列腺特异抗原(PSA)检测, 成为诊断前列腺癌的新一代肿瘤标志物<sup>[11]</sup>。此外, 不同的 lncRNA 可以特异性调节靶蛋白的表达。因此, 与传统的靶向蛋白治疗相比, 靶向 lncRNA 的治疗更为精确且毒性更低。如以 lncRNA H19 设计的 BC-819 (DTA-H19) 质粒可以杀死肿瘤, 该药物已进入膀胱癌和不

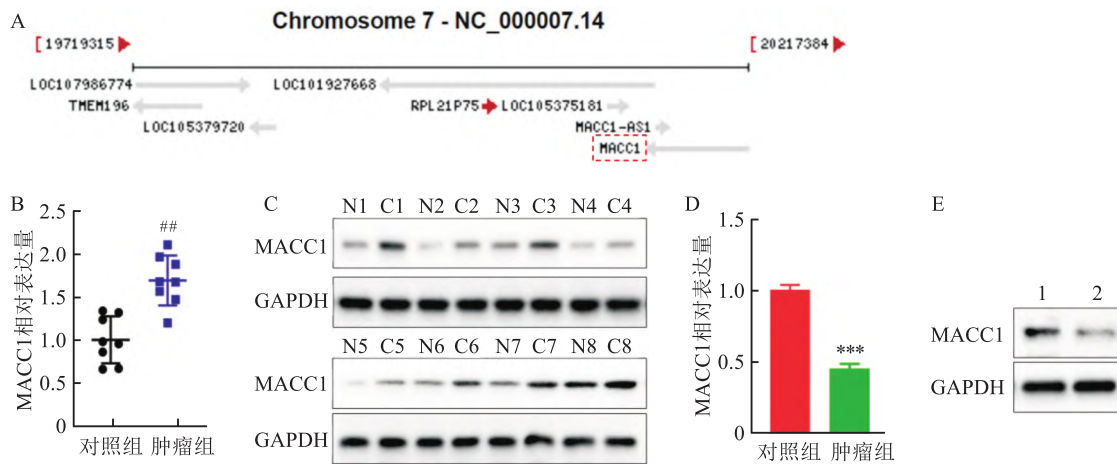


图5 在CRC细胞中lncRNA AC005062.1可调控MACC1的表达

A:lncRNA AC005062.1和MACC1的位置;B、C:qPCR及Western blot检测CRC组织中MACC1和lncRNA AC005062.1的表达;与对照组比较:## $P < 0.01$ ;D、E:下调后qPCR及Western blot检测MACC1的表达;1:对照组;2:si-lncRNA AC005062.1组;与对照组比较:\*\*\* $P < 0.001$

可切除的胰腺癌的临床试验阶段<sup>[12]</sup>。

MACC1是一种促进转移的癌基因。相关研究表明,MACC1可以促进肿瘤尤其是CRC的增殖和侵袭<sup>[13]</sup>。MACC1可以诱导cMet的表达,而cMet与HGF结合以激活HGF/Met信号通路,从而促进肿瘤生长、血管生成和转移<sup>[14]</sup>。关于MACC1上游的调控机制也有广泛的报道,Li et al<sup>[15]</sup>研究发现MACC1受lncRNA FGDS-AS1/miR-497-5p轴调控,继而加剧放疗耐受性;在CRC中,circ\_0006174通过海绵体样作用,减弱miR-138-5p对MACC1的抑制作用,继而加速CRC的进展<sup>[16]</sup>。

该研究表明,lncRNA AC005062.1在CRC肿瘤组织中上调。首先,沉默lncRNA AC005062.1在HT29细胞中的表达,结果表明下调该lncRNA的表达可以抑制HT29细胞的增殖、迁移、细胞周期并诱导其凋亡。之后,通过临床标本验证,证实了CRC中MACC1的表达与lncRNA AC005062.1正相关。最后,下调lncRNA AC005062.1在CRC细胞中的表达,可以抑制MACC1的表达。因此,lncRNA AC005062.1和MACC1可能是CRC的一种新的分子标志物和治疗靶标。该研究没有探究lncRNA AC005062.1是如何调节MACC1表达的;根据相关文献的报道,lncRNA AC005062.1很可能有海绵体样作用,通过结合抑制某个miRNA,继而促进MACC1表达,这可成为后续的研究重点。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36

cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin,2021,71(3):209-49.

[2] Wang K C, Chang H Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs[J]. Mol Cell,2011,43(6):904-14.

[3] Zhang L, Xu X, Su X. Noncoding RNAs in cancer immunity: functions, regulatory mechanisms, and clinical application[J]. Mol Cancer,2020,19(1):48.

[4] Hui S, Zhaohui H, Weiqi S, et al. Emerging roles of long non-coding RNAs in tumor metabolism[J]. J Hematol Oncol,2018,11(1):106.

[5] Martínez-Barriocanal Á, Arango D, Dopeso H. PVT1 long non-coding RNA in gastrointestinal cancer[J]. Front Oncol,2020,10:38.

[6] Ou C, Sun Z, He X, et al. Targeting YAP1/LINC00152/FSCN1 signaling axis prevents the progression of colorectal cancer[J]. Adv Sci (Weinh), 2019,7(3):1901380.

[7] 任鹏涛, 郝英豪, 阮红训, 等. Lncz3h7a对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响及其机制[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3): 391-5.

[8] Li L, Shang J, Zhang Y, et al. MEG3 is a prognostic factor for CRC and promotes chemosensitivity by enhancing oxaliplatin-induced cell apoptosis[J]. Oncol Rep,2017,38(3):1383-92.

[9] Pilleron S, Sarfati D, Janssen-Heijnen M, et al. Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: a population-based study[J]. Int J Cancer,2019,144(1):49-58.

[10] Heydarneshad Asl M, Pasban Khelejeni F, Bahojb Mahdavi S Z, et al. The various regulatory functions of long noncoding RNAs in apoptosis, cell cycle, and cellular senescence[J]. J Cell Biochem, 2022, doi: 10.1002/jcb.30221.

[11] Htoo K P P, Yamkamon V, Yainoy S, et al. Colorimetric detection of PCA3 in urine for prostate cancer diagnosis using thiol-labeled PCR primer and unmodified gold nanoparticles[J]. Clin Chim Acta,2019,488:40-9.

[12] Hanna N, Ohana P, Konikoff F M, et al. Phase 1/2a, dose-esc-

lation, safety, pharmacokinetic and preliminary efficacy study of intratumoral administration of BC-819 in patients with unresectable pancreatic cancer[J]. *Cancer Gene Therapy*,2012,19(6):374-81.

- [13] Güllü N, Kobelt D, Brim H, et al. Saffron crudes and compounds restrict MACC1-Dependent cell proliferation and migration of colorectal cancer cells[J]. *Cells*,2020,9(8):1829.
- [14] Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metas-

tasis[J]. *Nat Med*,2009,15(1):59-67.

- [15] Li J, Lei C, Chen B, et al. LncRNA FGD5-AS1 facilitates the radioresistance of breast cancer cells by enhancing MACC1 expression through competitively sponging miR-497-5p[J]. *Front Oncol*, 2021,11,671853.
- [16] Wei J, Lin Y, Wang Z, et al. Circ\_0006174 accelerates colorectal cancer progression through regulating miR-138-5p/MACC1 axis [J]. *Cancer Manag Res*,2021,13:1673-86.

## **lncRNA AC005062.1 affects the malignant phenotype of colorectal cancer by regulating the expression of MACC1**

Li Zhixiang, Xie Qiang, Wang Binbin, Yu Dajun, Qian Jun

(Dept of Tumor Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004)

**Abstract Objective** To explore the role and mechanism of long noncoding RNA(lncRNA) AC005062.1 in colorectal cancer (CRC) cell proliferation and apoptosis. **Methods** The analysis of GSE84983 and GSE 104364 was used to indicate the expression level lncRNA AC005062.1 in CRC. The tumor tissues (tumor group) and adjacent tissues (control group) of patients undergoing CRC surgery in the hospital tumor surgery department were collected. Eight pairs of tissues were randomly selected, and qPCR was used to detect the expression of lncRNA AC005062.1 in CRC tissues and paired adjacent tissues in the two groups. After using siRNA to down-regulate the expression of lncRNA AC005062.1 in CRC cells, CCK-8 assay was used to detect cell proliferation in two groups, flow cytometry was used to detect cell cycle and apoptosis in two groups, wound scratch test was used to detect cell migration in two groups, and the lncRNA was determined. The database was used to compare the localization of lncRNA AC005062.1 and MACC1 genes on staining. The expression levels of MACC1 transcription and protein levels in the control group and tumor group were detected by qPCR and Western blot, respectively. The lncRNA AC005062.1 in CRC cells was down-regulated, and the expression levels of MACC1 transcription and protein levels in the two groups of cells were detected by qPCR and Western blot, respectively. **Results** The database analysis of GSE84983 and GSE104364 and the detection results of the two groups indicated that the lncRNA AC005062.1 was highly expressed in CRC. After down-regulation of lncRNA AC005062.1, the results of CCK-8 experiments showed that the proliferation rate of HT29 cells in the down-regulation group decreased. Flow cytometry showed that the number of apoptosis of HT29 cells in the down-regulated group increased, the proportion of G1 phase increased, and the proportion of S phase and G2 phase decreased. Western blot experiments showed that the expressions of cleaved-caspase3 and Bax in the down-regulated HT29 cells increased, while the expression of Bcl-2 decreased. Wound scratch experiments showed that the migration rate of HT29 cells in the down-regulated group was lower than that in the control group. The analysis of UCSC to compare the location of lncRNA ac005062.1 and MACC1 on chromosomes showed that they were located very close together. MACC1 was highly expressed in CRC and down-regulated lncRNA AC005062.1 expression in HT29 cells could reduce the expression of MACC1. **Conclusion** lncRNA AC005062.1 can inhibit the proliferation, cycle and migration of HT29 cells, and promote its apoptosis by regulating the expression of MACC1 in CRC.

**Key words** colorectal cancer;lncRNA AC005062.1;MACC1;malignant phenotype