

稳定干扰长链非编码 RNA LINC01224 结直肠癌细胞株的建立及其对细胞凋亡的影响

李国丹, 杨勤, 李秋燕, 陈小谊, 符伟玉, 兰柳波, 林小聪

摘要 目的 建立稳定干扰长链非编码 RNA (lncRNA) LINC01224 表达的结直肠癌 LoVo 和 SW620 细胞株,并探讨下调 LINC01224 表达对结直肠癌细胞凋亡的影响。方法 使用 GEPIA2 数据库分析 LINC01224 在结直肠癌组织中的表达情况;qPCR 法检测 LINC01224 在 10 种人结直肠癌细胞中的表达水平。3 种不同的 LINC01224 siRNA 分别转染人结直肠癌 LoVo 细胞,取抑制 LINC01224 表达效果最显著的 siRNA 序列构建 LINC01224 shRNA 慢病毒载体。在 HEK293T 细胞内包装成重组慢病毒颗粒,再感染 LoVo 和 SW620 细胞,经嘌呤霉素筛选后以有限稀释法获得稳定干扰 LINC01224 的单克隆细胞。MTS 法检测细胞增殖能力,流式细胞术检测细胞凋亡率。结果 LINC01224 在结直肠癌组织中的表达高于正常结直肠组织,其在 10 种结直肠癌细胞中的表达也高于正常结直肠上皮细胞 HCOEPic。siRNA-3 对 LoVo 细胞内 LINC01224 表达的抑制率高于 siRNA-1 和 siRNA-2。故选择 siRNA-3 设计 LINC01224 shRNA。与对照组 (sh-NC 组) 相比,稳定干扰 LINC01224 组 (sh-LINC01224 组) LoVo 和 SW620 细胞内 LINC01224 的表达水平降低 ($P < 0.01$),其细胞生长速度减慢 ($P < 0.01$),凋亡率也增加 ($P < 0.01$)。结论 成功构建 LINC01224 的 shRNA 慢病毒干扰载体,该载体能够稳定感染 LoVo 和 SW620 细胞,下调 LINC01224 表达并诱导细胞凋亡。

关键词 结直肠癌;长链非编码 RNA;慢病毒;凋亡

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0908-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.012

结直肠癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,其发病机制尚未完全清楚。据统计,结直肠癌发病率和病死率在中国恶性肿瘤中分别位居第 3 和第 5 位,并呈逐年上升趋势;中国已经成为全球结直肠癌

每年新发病例数和死亡病例数最多的国家^[1]。因此,研究结直肠癌发生与发展的分子机制,寻找结直肠癌潜在的治疗靶点,具有重要临床意义。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是片段长度大于 200 个核苷酸且无编码蛋白质能力的一类 RNA 分子,可在转录或转录后水平调控基因表达。近年来研究^[2-5]表明,LINC01224 在肝癌、卵巢癌、胃癌及口腔癌中发挥促癌作用,其表达上调可能是导致上述肿瘤发生发展的重要原因。研究^[6]报道,LINC01224 在结直肠癌发病机制中也起重要作用,下调 LINC01224 表达可抑制癌细胞增殖、侵袭及移植瘤生长。但 LINC01224 与结直肠癌细胞凋亡的关系尚不明确。该研究通过构建靶向干扰 LINC01224 的重组慢病毒载体,筛选出稳定且低表达 LINC01224 的 LoVo 和 SW620 细胞,并观察 LINC01224 对结直肠癌细胞增殖和凋亡的影响,为后续的机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人结直肠癌细胞 (LoVo、SW620、Caco2、THC-8307、COLO-205、RKO、DLD-1、HCT-116、SW480、HT-29)、正常结直肠上皮 HCOEPic 细胞及人肾胚 HEK 293T 细胞均由该课题组实验室保存。胎牛血清、RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司);DH5 α 感受态细胞 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司);TRIzol 试剂、Opti-MEM 培养基 (美国 Invitrogen 公司);PrimeScript RT 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司);SYBR Green qPCR SuperMix 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司);限制性核酸内切酶 BamHI 和 MluI (上海碧云天生物技术有限公司);MTS 试剂 (美国 Promega 公司);流式凋亡试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司);Lipofectamine 3000、酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 正常结直肠上皮 HCOEPic 细胞、结直肠癌细胞 (LoVo、SW620、Caco2、COLO-205、RKO、DLD-1、SW480、HT-29) 培养于含 10% 胎牛血

2022-03-23 接收

基金项目:广东省自然科学基金(编号:2020A1515011449);湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(编号:2019A01010、2021A05043)

作者单位:广东医科大学生物化学与分子生物学研究所,湛江 524023

作者简介:李国丹,女,硕士研究生;

林小聪,男,教授,博士,责任作者,E-mail: cong-toulin750325@126.com

清(FBS)和1%青-链霉素的RPMI-1640培养基中;结直肠癌细胞(THC-8307、HCT-116)培养于含10%FBS和1%青-链霉素的高糖DMEM培养基中,所有细胞均培养于37℃、含5%CO₂的培养箱中。

1.2.2 生物信息学分析 使用GEPIA2(Gene Expression Profiling Interactive Analysis Gene Expression Profiling Interactive Analysis, <http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)数据库分析LINC01224在结直肠癌中的表达情况。

1.2.3 细胞转染 由美国Sigma公司合成3组针对LINC01224的小干扰RNA(siRNA)序列。根据Lipofectamine 3000试剂说明书进行Lovo细胞转染。转染细胞分为siRNA-1组、siRNA-2组、siRNA-3组及对照组(siRNA-NC),qPCR检测3种siRNA抑制细胞内LINC01224表达的情况。以干扰效果最显著的siRNA构建LINC01224的shRNA。下调LINC01224表达的siRNA序列如下:siRNA-1,(F)5'-TGGAATGTGTCCACATGGGdTdT-3',(R)5'-CCCATGTGGACACATTCCAdTdT-3';siRNA-2,(F)5'-TTCTCTCCTGCTTTGGTGCdTdT-3',(R)5'-GCACCAAAGCAGGAGAGAAdTdT-3';siRNA-3,(F)5'-AGCATTTAGGCCACTACCDdTdT-3',(R)5'-GGTAGTGGCCTAAATGCTdTdT-3';siRNA-NC,(F)5'-GAACUGGGGUGCGUGUGAUdTdT-3',(R)5'-AUCACACGCACCCCAGUUCdTdT-3'。

1.2.4 RT-qPCR TRIzol法提取细胞总RNA,使用PrimeScript RT试剂盒进行逆转录反应,将RNA逆转录为cDNA。按照SYBR Green qPCR SuperMix试剂盒说明书进行qPCR分析,检测LINC01224的表达水平。以GAPDH作为内参照,采用2^{-ΔΔCt}法计算LINC01224的相对表达量。引物序列:LINC01224,(F)5'-CCAGAGCTGTGCAGATGAGT-3',(R)5'-CTGCAGCTTCGTCAGCAGGC-3';GAPDH,(F)5'-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3',(R)5'-GCGGCGCAATACGAATGCCCC-3'。

1.2.5 LINC01224 shRNA慢病毒载体的构建及鉴定 选择LoVo细胞内干扰LINC01224表达效果最明显的siRNA序列,以“BamH I酶切位点+siRNA正义链+Loop环序列+siRNA反义链+MluI酶切位点”为原则对LINC01224的shRNA基因序列进行设计,苏州金唯智生物科技有限公司合成shRNA基因序列正义链和反义链。构建慢病毒载体的shRNA基因序列如下:sh-LINC01224,(F)5'-GATCCAGCATTTAGGCCACTACCTTCAAGAGAGGTAGTGGC

CTAAATGCTTTTTTA-3',(R)5'-CGCGTAAAAAAGCATTTAGGCCACTACCTCTCTTGAAGGTAGTGGCCTAAATGCTG-3'。混合等体积的正义链和反义链,金属浴煮沸5min,随后72℃保温15min,冷却至室温,所得为双链的LINC01224 shRNA基因序列。使用限制性核酸内切酶MluI和BamH I对pLent-U6-GFP-Puro载体进行双酶切,T4 DNA连接酶回收酶切产物,将其与shRNA基因序列进行连接反应(16℃,1h),获得pLent-U6-sh-LINC01224-GFP-Puro重组质粒,定义为sh-LINC01224组(对照组为pLent-U6-GFP-Puro空载质粒,定义为sh-NC组)。使用DH5α大肠埃希菌感受态细胞进行重组质粒转化,进行扩增后,将感受态细胞接种于LB琼脂培养基(含100μg/ml氨苄青霉素),37℃倒置培养16h。挑取单个抗性菌接种于LB液体培养基中,继续培养扩增,通过质粒提取进行核酸测序鉴定。

1.2.6 重组慢病毒包装及滴度测定 转染前,更换细胞培养基为无双抗完全培养基。使用Lipofectamine 3000试剂盒将病毒辅助包装质粒(pHelper 1.0及pHelper 2.0)和LINC01224的重组慢病毒质粒共转染至HEK 293T细胞,转染8~10h后更换为完全培养基。继续培养48h后进行离心,所得上清液使用0.45μm滤器过滤,再高速离心(75000r/min)进行浓缩,0.22μm过滤器过滤,即可得到高滴度重组慢病毒浓缩液。采用倍比稀释计数法进行慢病毒滴度测定。

1.2.7 慢病毒感染靶细胞及嘌呤霉素筛选 将LoVo及SW620细胞浓度调整为7×10⁴个/ml,接种于24孔板。待细胞汇合度长至30%~40%,加入重组慢病毒和终浓度为6μg/ml的聚凝胺,混匀后常规培养8h,更换为不含聚凝胺的完全培养基。培养24h后,以含4μg/ml嘌呤霉素的完全培养基连续筛选2周,获得抗性细胞克隆。

1.2.8 单克隆稳定细胞株的建立 具有嘌呤霉素抗性的LoVo及SW620细胞经胰酶消化后重悬,调整细胞浓度为2000~3000个/ml,每孔100μl接种于96孔板。有限稀释法筛选出单个且表达GFP的细胞,随后进行扩大培养。

1.2.9 MTS检测 取对数生长期的细胞消化后,调整细胞浓度为每孔1×10⁴个细胞,接种于96孔板。分别培养24、48、72和96h,每孔加入10μl CellTiter 96 AQ单溶液细胞增殖检测试剂,在37℃、5%CO₂培养箱中孵育4h,然后置于酶标仪在490nm波长处读取吸光度值。

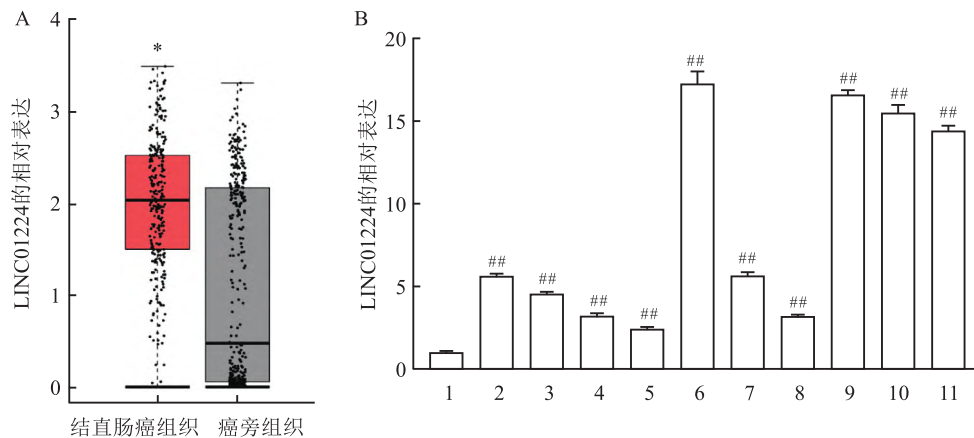


图1 LINC01224在结直肠癌组织和细胞中高表达

A: GEPIA2 分析 LINC01224 在结直肠癌组织中的表达; B: RT-qPCR 检测 LINC01224 在结直肠癌细胞中的表达; 1: HCOEPic 组; 2: COLO-205 组; 3: DLD-1 组; 4: HCT-116 组; 5: HT-29 组; 6: LoVo 组; 7: RKO 组; 8: SW480 组; 9: SW620 组; 10: Caco2 组; 11: THC-8307 组; 与癌旁组织比较: * $P < 0.05$; 与 HCOEPic 组比较: ## $P < 0.01$

1.2.10 流式细胞术 取对数生长期的细胞进行消化重悬,每个样品收集 5×10^5 个细胞, PBS 洗涤 3 次。离心弃上清液收集沉淀细胞。按照 Annexin V-PE/7-AAD 凋亡流式检测试剂盒说明书进行细胞凋亡检测,将收集的细胞重悬于结合缓冲液中,在细胞悬液中加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V PE, 室温避光孵育 5 min, 随后加入 $10 \mu\text{l}$ 7-AAD, 1 h 内使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 21.0 软件进行分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较使用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。实验均独立重复 3 次。

2 结果

2.1 结直肠癌组织和细胞中 LINC01224 的表达情况 应用 GEPIA2 数据库对 TCGA (The Cancer Genome Atlas) 和 GTEx (The Genotype Tissue Expression) 中结直肠癌组织的 LINC01224 RNA 测序数据进行了分析。结果表明, LINC01224 在结直肠癌组织中的表达 ($n = 275$) 高于正常结直肠组织 ($n = 349$) ($P < 0.05$) (图 1A)。qPCR 结果显示, 与正常结直肠上皮细胞相比, LINC01224 在 10 种结直肠癌细胞 (包括 LoVo、SW620、Caco2、THC-8307、COLO-205、RKO、DLD-1、HCT-116、SW480 和 HT-2 细胞) 中 HCOEPic 均呈高表达 ($t = 81.01, 77.34, 41.46, 47.14, 41.20, 47.73, 94.43, 112.58, 56.8, 100.24, P < 0.01$) (图 1B); 其中以 LoVo 和 SW620 细胞其 LINC01224 的表达上调最为显著。因此, 选择 LoVo

和 SW620 细胞进行后续实验。

2.2 筛选最佳干扰的 siRNA 片段 qPCR 结果显示, siRNA-1 组、siRNA-2 组和 siRNA-3 组针对 LoVo 细胞的 LINC01224 RNA 干扰效率分别为 8%、75% 和 86%。与对照组比较, siRNA-2 组和 siRNA-3 组 LINC01224 表达下调, 差异有统计学意义 ($t = 113.00, 148.96, P < 0.01$) (图 2)。其中, siRNA-3 组的 LINC01224 表达下调最为显著。因此, 选择 siRNA-3 构建 shRNA 慢病毒载体。

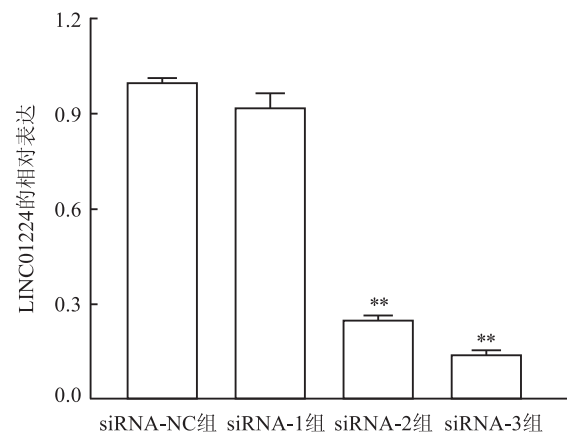


图2 qPCR 检测 3 组 siRNA 的干扰效率

与 siRNA-NC 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 LINC01224 shRNA 重组载体的鉴定 与 LINC01224 shRNA 目标序列相比, 插入序列未发生碱基插入、突变、缺失等情况, 与目标序列完全一致 (图 3), 提示 LINC01224 shRNA 慢病毒载体构建成功。

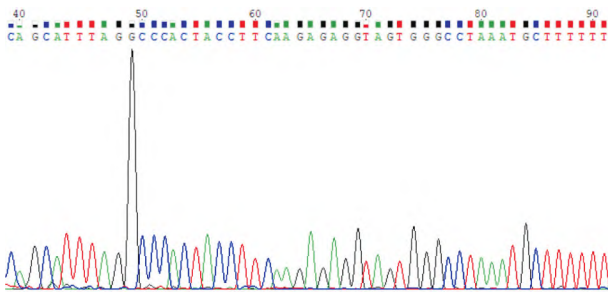


图3 LINC01224 shRNA 慢病毒载体测序结果

2.4 建立稳定靶向干扰 LINC01224 表达的 LoVo 和 SW620 结直肠癌细胞株 荧光显微镜下 sh-LINC01224 组与对照组 (sh-NC 组) LoVo 和 SW620 细胞生长状况良好,均可稳定表达绿色荧光(图 4)。qPCR 结果表明,sh-LINC01224 组 LINC01224 表达水平较对照组降低,差异有统计学意义($t = 85.21, 52.37, P < 0.01$),即成功构建稳定靶向下调 LINC01224 表达的 LoVo 和 SW620 结直肠癌细胞株。见图 5。

2.5 稳定靶向敲低 LINC01224 对结直肠癌细胞增殖、凋亡的影响 MTS 结果显示,与对照组 (sh-NC 组)相比,靶向干扰 LINC01224 表达抑制 LoVo 和 SW620 细胞增殖(图 6A、B),差异有统计学意义 (LoVo:48 h, $t = 9.21, P < 0.01$;72 h, $t = 45.84, P < 0.01$;96 h, $t = 47.42, P < 0.01$;SW620:48 h, $t = 15.27, P < 0.01$;72 h, $t = 10.98, P < 0.01$;96 h, $t = 13.21, P < 0.01$);流式细胞术结果显示,在 LoVo 细胞中,sh-NC 组细胞凋亡比例为(8.22 ± 0.41)%,低于 sh-LINC01224 组细胞凋亡率(24.66 ± 0.93)%;在 SW620 细胞中,sh-NC 组细胞凋亡比例为(6.35 ± 0.34)%,低于 sh-LINC01224 组细胞凋亡率(23.42 ± 0.63)%(图 6C、D),差异有统计学意义 (LoVo: $t = 28.05, P < 0.01$;SW620: $t = 41.53, P <$

0.01)。

3 讨论

lncRNA 是控制基因并影响多种生物学进程的重要表观遗传调控因子。lncRNA 能够在染色质水平、转录水平和转录后水平等多个层面调控基因表达,作用范围十分广泛^[7]。染色质水平的调控是最早被鉴定的 lncRNA 功能之一。lncRNA 可通过直接募集 DNA 甲基转移酶或其他复合物改变染色质的结构并调节基因的表达水平^[8-10]。其次,lncRNA 可干扰增强子和启动子的作用进而干扰转录进程,如干扰蛋白质因子结合、调节关键凋亡基因转录等^[11]。lncRNA 还可以通过识别互补序列,参与信使 RNA (mRNA) 的转录后修饰,如充当竞争性内源 RNA (ceRNA) 等^[10,12-13]。研究^[2-6,14]表明,LINC01224 在多种肿瘤的发病机制中起重要作用,可能成为潜在的肿瘤治疗靶点。在肝癌中,LINC01224 可通过竞争性结合 miR-330-5p 上调 CHEK1 表达,从而促进肝癌发展^[2]。在卵巢癌中,LINC01224 可作为竞争性 RNA 通过与 miR-485-5p 结合,上调 PAK4 表达,促进癌细胞增殖、侵袭、迁移和移植瘤生长,同时抑制细胞凋亡^[3]。在胃癌中,LINC01224 可通过靶向吸附 miR-193a-5p 上调 CDK8 表达,加速癌细胞的增殖、侵袭、迁移以及肿瘤形成,并抑制细胞凋亡^[4]。在口腔癌中,LINC01224 可通过靶向调控 miR-125b,促进癌细胞增殖并抑制其凋亡^[5]。在肾癌中,LINC01224 可通过吸附 miR-542-3p 上调 MFN2 表达,阻断 Ras-Raf1-ERK1/2 信号通路,进而抑制癌细胞增殖和迁移^[14]。在结直肠癌中,LINC01224 可直接结合具有抑癌基因活性的 miR-2467 并下调 miR-2467 表达,促进癌细胞增殖、侵袭及移植瘤生长^[6]。但 LINC01224 对结直肠癌细胞凋亡的影响,迄今尚无文献报道。

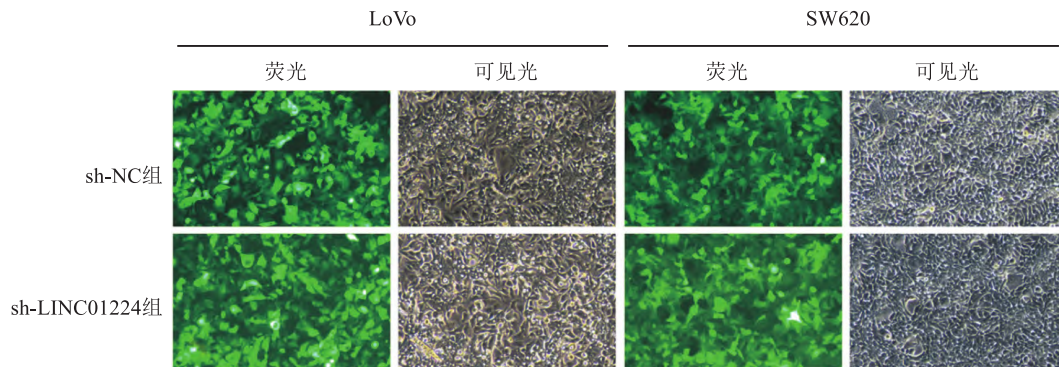


图4 荧光显微镜下观察稳定靶向干扰 LINC01224 表达的 LoVo 和 SW620 结直肠癌细胞株 ×200

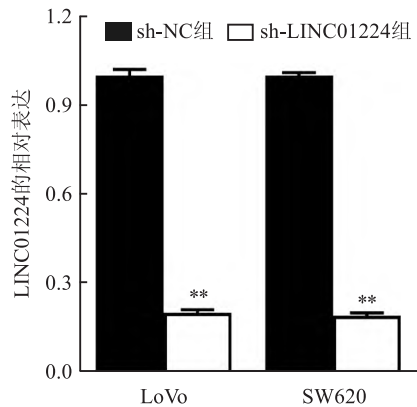


图5 qPCR检测LoVo和SW620稳定干扰细胞株中LINC01224的表达水平与sh-NC组比较:** $P < 0.01$

该研究通过 GEPIA2 数据库分析显示 LINC01224 在结直肠癌组织中的表达高于正常结直肠组织,其在 10 种结直肠癌细胞中也呈表达上调。

鉴于此,设计合成 3 组针对 LINC01224 的 siRNA,随后转染结直肠癌 LoVo 细胞并进行 qPCR 检测,由此筛选出最有效的 LINC01224 干扰片段 siRNA-3。鉴于 siRNA 在细胞内无法进行复制,随细胞的增殖和分裂易被降解及稀释,其介导的基因沉默效应持续时间短;而 shRNA 是一段具有紧密发夹环结构的 RNA 序列,在细胞内可被剪切形成 siRNA,其所构建的载体可在细胞内进行自主复制及转录,稳定性更强,促使目的基因的沉默作用可维持时间更长^[15]。因此,选择 shRNA 来构建 LINC01224 的干扰载体。该实验 shRNA 发夹结构的设计原则:①克隆到 shRNA 表达载体中的 shRNA 包括两个短反向重复序列,中间由一茎环(loop)序列分隔开,组成发夹结构,由 pol III 启动子控制,随后再连接上 5~6 个 T 作为 RNA 聚合酶 III 的转录终止子;②两个互补寡核苷酸两端须带有限制性酶切位点;③在启动子下游的酶切位点下方紧连一个或两个 C,使插入片

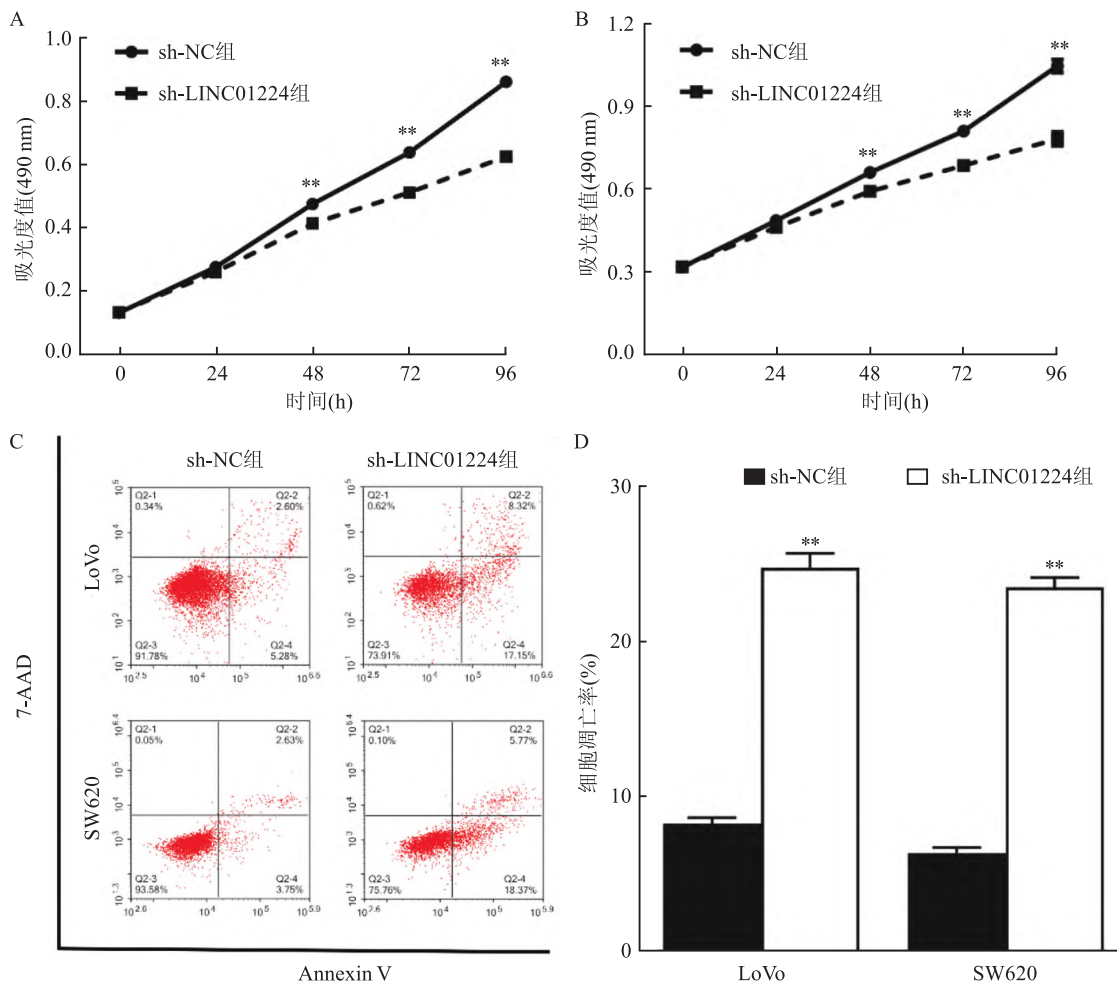


图6 下调 LINC01224 表达抑制结直肠癌细胞增殖、诱导细胞凋亡

A、B; MTS 法检测稳定下调 LINC01224 表达对 LoVo、SW620 细胞增殖的影响; C、D; 流式细胞术检测稳定下调 LINC01224 表达对 LoVo 及 SW620 细胞凋亡的影响; 与 sh-NC 组比较: ** $P < 0.01$

段和启动子有一定空间间隔确保转录发生;④ 目的序列的第1个碱基为G以确保RNA聚合酶转录,或者紧连正义链的上游为G;⑤ 插入片段中的茎环位置靠近寡核苷酸的中央;⑥ 正义链与反义链序列上不能出现连续3个以上的T。根据以上原则,利用siRNA-3来设计合成针对LINC01224的shRNA。与质粒和其他的病毒载体相比,慢病毒基因转移效率高,可感染非分裂期与分裂期细胞,免疫原性和细胞毒性低,表达产物稳定且持续时间长,为携带目的基因干扰序列的理想载体^[16-17]。因此,以慢病毒为载体来携带LINC01224 shRNA。通过重组病毒包装、靶细胞感染、嘌呤霉素处理及有限稀释法筛选,获得了稳定下调LINC01224的单克隆细胞株,qPCR实验结果显示,LoVo和SW620细胞sh-LINC01224组LINC01224表达水平较对照组分别降低80%和81%,荧光显微镜下sh-LINC01224组与对照组(sh-NC组)LoVo和SW620细胞均可稳定表达绿色荧光。MTS实验结果表明,从48h开始,靶向干扰LINC01224表达可抑制结直肠癌LoVo和SW620细胞增殖。流式细胞术结果显示,稳定下调LINC01224表达也可诱导LoVo和SW620细胞凋亡。

综上所述,该研究通过重组慢病毒包装shRNA、靶细胞感染、嘌呤霉素及有限稀释法筛选细胞等方法,成功建立了稳定靶向干扰LINC01224表达的LoVo和SW620结直肠癌细胞株,并初步探讨了LINC01224对结直肠癌的增殖及凋亡的影响,为后续进一步研究LINC01224在结直肠癌凋亡中的作用机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 中国结直肠癌诊疗规范(2020年版)[J]. 中华外科杂志, 2020, 58(8): 561-85.
- [2] Gong D, Feng P, Ke X, et al. Silencing long non-coding RNA LINC01224 inhibits hepatocellular carcinoma progression via miRNA-330-5p-induced inhibition of CHEK1[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 482-97.
- [3] Xing S, Zhang Y, Zhang J. LINC01224 exhibits cancer-promoting activity in epithelial ovarian cancer through microRNA-485-5p-mediated PAK4 upregulation[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5643-55.
- [4] Sun H, Yan J, Tian G, et al. LINC01224 accelerates malignant transformation via miR-193a-5p/CDK8 axis in gastric cancer[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(4): 1377-93.
- [5] 马立亚, 王东旭, 庞真贞. LINC01224 靶向 miR-125b 对口腔鳞癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(9): 670-5.
- [6] Chen L, Chen W, Zhao C, et al. LINC01224 promotes colorectal cancer progression by sponging miR-2467[J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 733-42.
- [7] Matsumoto A, Pasut A, Matsumoto M, et al. mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide[J]. *Nature*, 2017, 541(7636): 228-32.
- [8] Mohammad F, Mondal T, Guseva N, et al. Kcnq1ot1 noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1[J]. *Development*, 2010, 137(15): 2493-9.
- [9] Arab K, Park Y J, Lindroth A M, et al. Long noncoding RNA TARID directs demethylation and activation of the tumor suppressor TCF21 via GADD45A[J]. *Mol Cell*, 2014, 55(4): 604-14.
- [10] Siu A L, U. S. Preventive Services Task Force. Screening for breast cancer: U. S. preventive services task force recommendation statement[J]. *Ann Intern Med*, 2016, 164(4): 279-96.
- [11] Rossi M N, Antonangeli F. LncRNAs: new players in apoptosis control[J]. *Int J Cell Biol*, 2014, 2014: 473857.
- [12] Ogawa Y, Sun B K, Lee J T. Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways[J]. *Science*, 2008, 320(5881): 1336-41.
- [13] Zhang E, He X, Zhang C, et al. A novel long noncoding RNA HOXC-AS3 mediates tumorigenesis of gastric cancer by binding to YBX1[J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 154.
- [14] 沈旭, 朱文, 王广, 等. 长链非编码RNA LINC01224对肾癌细胞增殖和转移影响机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(1): 41-6.
- [15] 李晋, 覃纲. 短发夹RNA及其在头颈肿瘤研究中的应用[J]. 医学综述, 2013, 19(7): 1207-10.
- [16] 李妍, 杜红延, 李红卫. 慢病毒载体及其在RNA干扰技术中的应用与发展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(1): 55-60.
- [17] 符伟玉, 林小聪, 陈小谊, 等. LncRNA BC002811慢病毒载体构建及对胃癌细胞增殖的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(1): 46-50.

Construction of a stable target interfering long non-coding RNA LINC01224 colorectal cancer cell line and its effect on apoptosis

Li Guodan, Yang Qin, Li Qiuyan, Chen Xiaoyi, Fu Weiyu, Lan Liubo, Lin Xiaocong

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023)

Abstract Objective To establish colorectal cancer LoVo and SW620 cell lines that stably interfere with the

miR-409-3p 和 Rab10 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达和临床意义

蔡青照,艾丽梅

摘要 目的 探讨 miR-409-3p 和 Rab10 对弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)的影响。方法 qRT-PCR 检测转染 miR-409-3p 模拟物(miR-409-3p mimic)、无关序列模拟物(mimic NC)、miR-409-3p 抑制物(miR-409-3p inhibitor)、无关序列抑制物(inhibitor NC)和空白对照组(control 组)后 miR-409-3p 的表达水平,使用 Targetscan 7.2 和 miRNA 靶基因预测数据库(miRDB)预测 miR-409-3p 的下游靶基因,Western blot 检测 Rab GTP 酶 10(Rab10)的表达,细胞计数试剂盒-8(CCK-8)和流式细胞仪用来检测细胞增殖和凋亡,然后使用免疫组化(IHC)检测石蜡包埋组织中 Rab10 的表达水平并进一步分析 Rab10 与 DLBCL 患者临床特征的关系。结果 miR-409-3p 可以促进细胞凋亡,抑制细胞增殖;过表达 miR-409-

3p 后 Rab10 的表达增加;Rab10 在 DLBCL 组织中的表达水平高于淋巴结反应性增生(RHL)组织,高水平乳酸脱氢酶(LDH)、高水平 $\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2$ -MG)和淋巴瘤国际预后评分(IPI)高的患者 Rab10 的表达相对较高。结论 miR-409-3p 可以促进细胞凋亡及 Rab10 的表达,Rab10 与患者的不良预后有关。

关键词 DLBCL;miR-409-3p;Rab10;增殖;凋亡;不良预后
中图分类号 R 733.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0914-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.013

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma,DLBCL)是一种形态上中等至大的 B 细胞淋巴瘤,约占全球新诊断淋巴瘤的 1/3,是非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma,NHL)中最常见的类型^[1]。miRNA 是一种长链非编码 RNA,通过与下游基因的 3'-UTR 结合抑制转录后的翻译^[2]。研究表明 miRNA 已经成为癌症进展中的重要参与者,可以

2022-03-23 接收

基金项目:辽宁省自然科学基金(编号:20180550001)

作者单位:锦州医科大学附属第一医院血液内科,锦州 121001

作者简介:蔡青照,女,硕士研究生;

艾丽梅,女,博士,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:alm121001@163.com

expression of LINC01224, and to explore the effect of down-regulating the expression of LINC01224 on cell apoptosis. **Methods** The GEPIA2 database was used to analyze the expression of LINC01224 in colorectal cancer tissues; qPCR method was used to detect the expression of LINC01224 in 10 human colorectal cancer cells. Three different LINC01224 siRNAs were respectively transfected into human colorectal cancer LoVo cells, and the LINC01224 shRNA lentiviral vector was constructed with the siRNA sequence with the most obvious inhibitory effect of LINC01224 expression. Recombinant lentiviral particles were packaged in HEK293T cells and then infected with LoVo and SW620 cells. After selection by puromycin, the monoclonal cells that stably interfere with LINC01224 were obtained by limiting dilution method. MTS method detects cell proliferation ability, and flow cytometry detects cell apoptosis rate. **Results** The expression of LINC01224 in colorectal cancer tissues was higher than that in normal colorectal tissues, and its expression in 10 types of colorectal cancer cells was also higher than that in normal colorectal epithelial cells HCOEPic. The inhibition rate of siRNA-3 on the expression of LINC01224 in LoVo cells was higher than that of siRNA-1 and siRNA-2. Therefore, siRNA-3 was chosen to design LINC01224 shRNA. Compared with the control group (sh-NC group), the expression level of LINC01224 in the LoVo and SW620 cells of the stable interference LINC01224 group (sh-LINC01224 group) was reduced ($P < 0.01$), and the cell growth rate was slowed down ($P < 0.01$), the rate of apoptosis also increased ($P < 0.01$). **Conclusion** The shRNA lentiviral interference vector of LINC01224 is successfully constructed, which can stably infect LoVo and SW620 cells, down-regulate the expression of LINC01224 and induce cell apoptosis.

Key words colorectal cancer; long non-coding RNA; lentivirus; apoptosis