

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.02.006

· 基础研究 ·

LncRNA HCG11 通过调控 miR-144-3p/ZEB1 分子轴影响直肠癌的发生及转移

熊伟, 张洪涛, 杨之斌, 余昆, 张旋(昆明医科大学第三附属医院暨云南省肿瘤医院 结直肠外科, 云南 昆明 650118)

[摘要] **目的:** 探究 lncRNA HCG11 通过调控 miR-144-3p 上调锌指蛋白 E-盒结合同源异形盒-1 (zinc finger E box binding homeobox 1, ZEB1) 基因的表达促进结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 发生及转移的分子机制。 **方法:** 收集 2013 年 1 月至 2018 年 1 月云南省肿瘤医院结直肠外科手术切除的 78 例 CRC 组织标本及其癌旁组织标本, 采用 qPCR 检测 HCG11 在 CRC 癌组织及细胞系中表达情况, 以构建的 HCG11 敲降载体、miR-144-3p 模拟物及抑制剂转染 CRC 细胞株 SW480 及 SW620, CCK-8 法及克隆形成实验检测细胞的增殖情况, Transwell 实验检测细胞的迁移及侵袭情况。通过 Wb 及免疫荧光实验检测 ZEB1 及上皮间质特异蛋白 (E-cadherin、Vimentin、 α -catenin、Sox2、Nestin、Oct4 及 Nanog) 的表达, 通过双荧光素酶报告基因检测 HCG11、miR-144-3p 及 ZEB1 的靶向调控关系。建立小鼠移植瘤模型验证敲降 HCG11 后对小鼠移植瘤生长的抑制作用。 **结果:** HCG11 在 CRC 癌组织的表达显著高于癌旁组织 ($P < 0.01$), 其在多种 CRC 细胞系中表达水平明显高于正常肠上皮细胞 (均 $P < 0.05$); HCG11 的表达与 CRC 患者肿瘤转移、临床分期及预后密切相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。敲降 HCG11 后显著抑制 CRC 细胞的增殖、迁移、侵袭、上皮间质转化及干细胞转化 (均 $P < 0.05$)。敲降 HCG11 显著上调 miR-144-3p 的表达水平 ($P < 0.05$), 过表达 miR-144-3p 可显著抑制 ZEB1 基因的表达 ($P < 0.05$) 及明显降低双荧光素酶活性 ($P < 0.05$)。 **结论:** HCG11 通过调控 miR-144-3p 上调 ZEB1 的表达, 从而促进 CRC 的发生及转移, HCG11 可作为 CRC 诊断及治疗的靶点。

[关键词] 长链非编码 RNA; HCG11; miR-144-3p; 锌指蛋白 E-盒结合同源异形盒-1; 结直肠癌; 转移

[中图分类号] R730.5; R735 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)02-0173-09

LncRNA-HCG11 affects progression and metastasis of colorectal cancer via regulating miR-144-3p/ZEB1 axis

XIONG Wei, ZHANG Hongtao, YANG Zhibin, YU Kun, ZHANG Xuan (Department of Colorectal Surgery, Cancer Hospital of Yunnan Province, Kunming 650118, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the molecular mechanism of lncRNA-HCG11 promoting progression and metastasis of colorectal cancer (CRC) via up-regulating zinc finger E box binding homeobox 1 (ZEB1) by regulating miR-144-3p expression in CRC. **Methods:** A total of 78 pairs of CRC tissues and corresponding adjacent tissues were obtained from patients in Department of Colorectal Surgery, Cancer Hospital of Yunnan Province during January 2013 and January 2018. HCG11 expression level in CRC cell lines and tissues was determined by qPCR; HCG11-knockdown vector, miR-144-3p mimic and miR-144-3p inhibitor were constructed and transfected into CRC cells lines (SW480 and SW620); and then, cell viability was detected by using CCK-8 assay and colony formation assay, while cell migration and invasion was assessed by using transwell assay; the expression levels of ZEB1 and epithelial mesenchymal markers (E-cadherin, Vimentin, α -catenin, Sox2, Nestin, Oct4 and Nanog) were detected by Wb and immunofluorescence assay; and the relationship between HCG11, miR-144-3p and ZEB1 was validated by dual-luciferase reporter gene assay. Nude mice xenograft model was constructed and the effect of HCG11 knock-down on the growth of xenograft was evaluated. **Results:** The expression of HCG11 was significantly higher in CRC cell lines (all $P < 0.05$) and tissues ($P < 0.01$) compared with that in normal colon epithelial cells and para-cancerous tissues; HCG11 expression was closely related with cancer metastasis, clinical staging and prognosis of CRC patients (all $P < 0.05$). Knockdown of HCG11 significantly inhibited cells proliferation, migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition and

[作者简介] 熊伟(1980-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事结直肠癌的临床与基础研究, E-mail: xwyb980@163.com

[通信作者] 张洪涛 (ZHANG Hongtao, corresponding author), 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事结直肠癌肝转移的临床与基础研究, E-mail: zhanghongtao_06@hotmail.com

CRC stem cell formation (all $P<0.05$). Moreover, knockdown of HCG11 significantly up-regulated miR-144-3p expression ($P<0.05$), while over-expression of miR-144-3p significantly inhibited ZEB1 expression ($P<0.05$) and reduced dual-luciferase activity ($P<0.05$). **Conclusion:** HCG11 regulates miR-144-3p to up-regulate ZEB1 expression, and further promotes CRC progression and metastasis; therefore, HCG11 could be used as a target for clinical diagnosis and treatment for CRC.

[Key words] lncRNAs; HCG11; miR-144-3p; zinc finger E box binding homeobox 1; colorectal cancer; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(2): 173-181. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.02.006]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球范围内高发及病死率较高的肿瘤之一^[1],肿瘤的生长及转移是导致CRC死亡的主要原因,肿瘤的生长及转移在晚期CRC患者中体现尤其明显^[2]。近年来CRC的治疗手段取得巨大进展,其中包括靶向治疗及免疫治疗^[3-4],但是患者预后并不令人满意。肿瘤转移是一个极其复杂的过程,肿瘤细胞获得了增强的侵袭能力,通过血液循环或淋巴系统最终定植在远处的器官中^[5-6],而这一过程中的关键事件是多种遗传和表观遗传改变的积累,导致不同基因的激活或失活。因此,急需对CRC发展及转移的分子机制进行研究。

长链非编码RNA(long noncoding RNAs, lncRNAs)在不同的疾病中大量表达,参与肿瘤发生及发展的调控过程,包括对细胞增殖、分化及染色体失活等生物过程^[7]。根据结构及功能可将lncRNAs分为转录本、反义寡核苷酸、环状RNAs、长基因间ncRNA(lincRNAs)及假基因,扮演不同的角色调节多种生物过程^[8-9]。如,LncRNA-HCG11曾被报道为前列腺癌的肿瘤抑制因子^[10],在乳腺癌^[11]中也被证实具有基因调控作用,而在肝癌中的作用研究则发现HCG11抑制肿瘤细胞的凋亡^[12],但是HCG11在CRC中的发展及转移仍不清楚。

在本研究中,通过对HCG11在CRC临床组织样本及细胞系的表达水平进行研究,再通过细胞水平及移植瘤小鼠模型验证lncRNA调控miRNA表达^[13]及其靶基因ZEB1的表达,探讨调控CRC的发生及转移的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

结肠上皮细胞CCD-112CoN1及CRC细胞系SW480、SW620、HCT116、Caco-2、DLD-1、HT29、RKO、LoVo均购自美国ATCC公司。胎牛血清及RPMI-1640培养基购自Gibco公司,TRIzol试剂、一步法逆转录试剂盒及qPCR试剂盒均购自TaKaRa公司,RAPI蛋白裂解液及BCA试剂盒购自碧云天公司,抗体ZEB1、E-cadherin、Vimentin、 α -catenin、Sox2、Nes-tin、Oct4、Nanog、GAPDH均自Abcam公司,山羊血清、ECL化学发光液购自碧云天公司,CCK-8购自索莱宝公司,Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司,

双荧光素酶报告基因表达载体及双荧光素酶报告试剂盒购自Promega公司,qPCR引物由昆明擎科生物科技有限公司合成,miR-144-3p模拟物、抑制物及阴性对照寡核苷酸由上海吉玛基因公司设计并合成。

1.2 临床标本收集

收集2013年1月至2018年1月到本院就诊的CRC患者78例,患者临床资料:男性38例,女性40例;年龄50~56岁(53.3 ± 2)。其中临床TNM分期I期12例、II期20例、III期22例、IV期24例,发生远端转移62例、未发生转移16例。所有患者术前均未接受任何放、化疗。本研究经过本院伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

1.3 细胞培养与转染

细胞于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 mg/ml链霉素的RPMI 1640培养基中常规培养。实验分组为HCG11-sh3组、miR-144-3p模拟物组、miR-144-3p抑制剂组及阴性对照组、HCG11-sh3+pcDNA3.1-ZEB1组。转染前1 d将SW480和SW620细胞种于6孔板,使用miR-144-3p模拟物、miR-144-3p抑制剂及阴性对照组寡核苷酸与终浓度为50 nmol/L的Lipofectamine™ 2000脂质体混合转染SW480和SW620细胞48 h;对于ZEB1逆转实验,使用pcDNA3.1-ZEB1表达载体及Lipofectamine™ 2000脂质体混合转染SW480和SW620细胞48 h后进行后续实验检测。

1.4 qPCR检测CRC组织和相应癌旁组织中HCG11、miR-144-3p及ZEB1的表达水平

采用TRIzol试剂提取组织或细胞总RNA,使用NanoDrop检测RNA的浓度及纯度后合成cDNA,反应条件为:40℃变性60 min,25℃ 5 min,85℃ 5 min。以cDNA为模板,按照qPCR试剂盒说明对HCG11、miR-144-3p及ZEB1表达水平进行检测,反应条件为:95℃变性15 s,55℃退火30 s,72℃延伸10 s,进行30个循环扩增。HCG11及ZEB1以GAPDH为内参对照,miR-144-3p以U6作为内参对照,实验重复3次。HCG11上游引物为:5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3',下游引物为:5'-GCCAGAAUGUUC-CUAUUUATT-3';miR-144-3p上游引物为:5'-CCTC-GCACCTGGAGGCTGGCTG-3',下游引物为:5'-TTATCAGTTGGGAAAATAGTTA-3';ZEB1上游引物为:5'-GCTTCTCACACTCTGGGTCTTA-3',下游

引物为:5'-CCTCATTCTCTGCCTCTTCTACC-3'; GAPDH上游引物为:5'-GTCACCTTCACCGTTC-CAGTTTT-3',下游引物为:5'-CTTAGTTGCGTTA-CACCCTTTCTT-3';U6上游引物为:5'-CTCGCTTC-GGCAGCACATATACT-3',下游引物为:5'-AC-GCTTCACGAATTTGCGTGTC-3',引物均由昆明擎科生物科技有限公司合成。每孔荧光信号达到阈值时所经历的循环数为Ct值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

1.5 Wb检测ZEB1及上皮间质转化相关特异蛋白表达水平

使用RAPI裂解液提取细胞总蛋白,BCA试剂盒检测蛋白浓度及纯度,SDS-PAGE分离蛋白,采用半干转移法将蛋白转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2h后,加入按一定比例稀释的一抗(ZEB1,1:1 000; E-cadherin,1:2 000; Vimentin,1:1 000; α -catenin,1:2 000; Sox2,1:1 500; Nestin,1:2 000; Oct4,1:1 000; Nanog,1:2 000; GAPDH,1:1 000)4℃过夜孵育;次日,去除一抗,TBST清洗3次后,加入相应的二抗室温封闭1h;最后加入ECL化学发光液置于凝胶成像系统中采集图像,实验重复3次,用Image J对蛋白条带进行定量分析。

1.6 载体构建及双荧光素酶报告基因检测HCG11、miR-144-3p及ZEB1的靶向调控关系

PCR分别扩增包含miR-144-3p与HCG11及ZEB1 3'UTR区结合位点的序列片段,并导入pmir-GLO luciferase表达载体中,获得HCG11/ZEB1野生型载体(pmirGLO-HCG11-WT / pmirGLO-ZEB1-WT),同样的方法获得HCG11/ZEB1突变型载体(pmirGLO-HCG11-MUT / pmirGLO-ZEB1-MUT),将pmirGLO-HCG11/ZEB1野生型载体、HCG11/ZEB1突变型载体、miR-144-3p模拟物及阴性对照组分别与Lipofectamine™ 2000脂质体混合后转染HEK 293T细胞,转染48h后,根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明检测荧光素酶活性。

1.7 CCK-8检测敲降HCG11对SW480及SW620细胞株增殖能力的影响

实验前1d,取不同分组的对数生长期的CRC细胞接种于96孔板中,每孔含 1×10^3 个/孔细胞,置于37℃培养箱中培养24h,每孔加入10 μ l CCK-8溶液,37℃培养箱孵育2h,然后使用酶标仪检测450 nm光密度(D)值。实验重复3次。

1.8 克隆形成实验检测下调HCG11表达对SW480及SW620细胞克隆形成的影响

胰酶消化不同分组CRC细胞,使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基重悬细胞,并按照300

cells/孔的细胞量种于6孔板中,置于含5% CO₂的37℃培养箱中培养14d,用PBS清洗后甲醇固定30 min,1%(1 mg/ml)结晶紫染色20 min,大于50个细胞的计为一个克隆,进行克隆计数。

1.9 Transwell实验检测CRC细胞株SW480及SW620的细胞迁移及侵袭能力

侵袭实验开始前用50 mg/L Matrigel 1:8稀释包被Transwell小室底部膜的上室面,37℃放置30 min。制备细胞悬液前细胞无血清饥饿培养12~24 h,胰酶消化细胞,终止消化后离心弃去培养液,用PBS洗1~2次,用含BSA的无血清培养基重悬,调整细胞密度为 $1 \times 10^5/100 \mu$ l。取100 μ l细胞悬液加入Transwell室,下室加入含20% FBS的RPMI 1640培养基。于37℃、5%CO₂培养箱12 h,培养结束后,用棉签擦去基质胶和上室内细胞,用1%结晶紫染色20 min,并在倒置显微镜($\times 100$)下取3~5个视野进行计数。进行迁移实验时无需使用Matrigel胶包被基底膜,其余步骤与侵袭实验相同。

1.10 异体移植瘤小鼠模型

实验所需BALB/c裸鼠购买于中国科学院昆明动物研究所,实验动物使用许可证号:SYXK(滇)K2017-0009,4周龄雌性裸鼠14只,体重为16~20 g,动物购买后于本单位SPF级动物实验室适应饲养1周,用于实验。取5周龄雌性BALB/c裸鼠分为2组,细胞移植前分别导入HCG11敲降载体或空载体,按照 1×10^6 细胞/只的量种植至小鼠右背皮下,每周对小鼠肿瘤直径进行测量,按照 $V = \text{最短直径}^2 \times \text{最长直径} \times 0.5$ 计算体积。5周后处死小鼠,测量小鼠肿瘤大小。

1.11 统计学处理

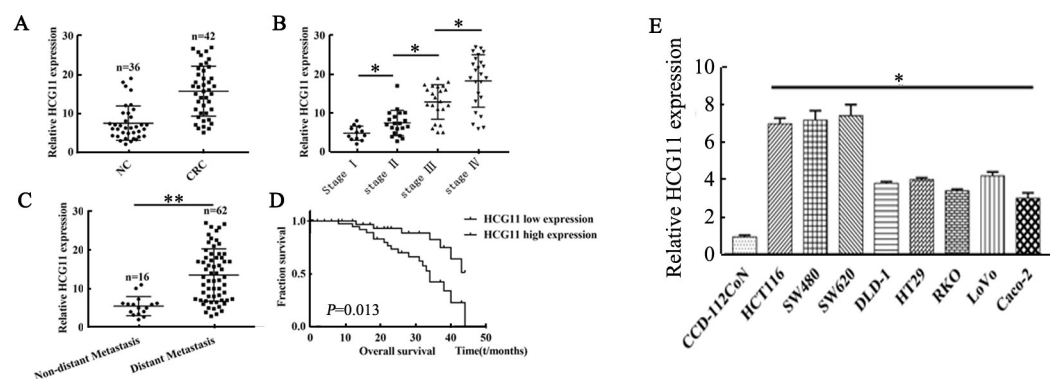
采用SPSS 19.0软件,所有数据均为重复3次的实验所得,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Kaplan-Meier作生存曲线,并通过Log-Rank检验分析;两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素ANOVA分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA-HCG11在CRC组织及细胞系中高表达
qPCR结果(图1A、B)显示,HCG11在CRC组织中的表达显著高于癌旁组织(15.70 ± 11.21 vs 7.45 ± 2.76 , $P < 0.01$),在晚期CRC组织中HCG11的表达显著高于早期患者组织(Stage II vs I: 7.43 ± 10.73 vs 4.80 ± 3.33 , III vs II: 12.86 ± 6.89 vs 4.80 ± 3.33 , IV vs III: 18.28 ± 4.59 vs 4.80 ± 3.33 ,均 $P < 0.05$),且在发生远端转移的CRC组织中表达显著高于未发生远端转移的患者(13.55 ± 4.59 vs 5.50 ± 1.63 , $P < 0.01$,图1C)。Kaplan-Meier生存曲线分析结果(图1D)显示,

HCG11 表达上调的患者预后较差, 5 年生存率显著低于 HCG11 低表达的患者 ($P=0.013$)。分别与正常肠上皮细胞比较, SW480、SW620、HCT116、Caco-2、DLD-1、HT29、RKO、LoVo 细胞系 HCG11 的表达显著

上调 (7.00 ± 0.71 、 7.21 ± 0.50 、 7.43 ± 0.62 、 3.80 ± 0.11 、 4.03 ± 0.10 、 3.40 ± 0.12 、 4.20 ± 0.20 、 3.00 ± 0.08 vs 0.94 ± 0.10 , 均 $P < 0.05$, 图 1E)。结果表明, HCG11 的表达水平与 CRC 的发展密切相关。



* $P < 0.05$ vs NC or stage I/II/III group, or Non-distant metastasis group or CCD-112CoN group

A-C: Statistical histograms of mRNA; D: Survival curve; E: Statistical histograms of mRNA

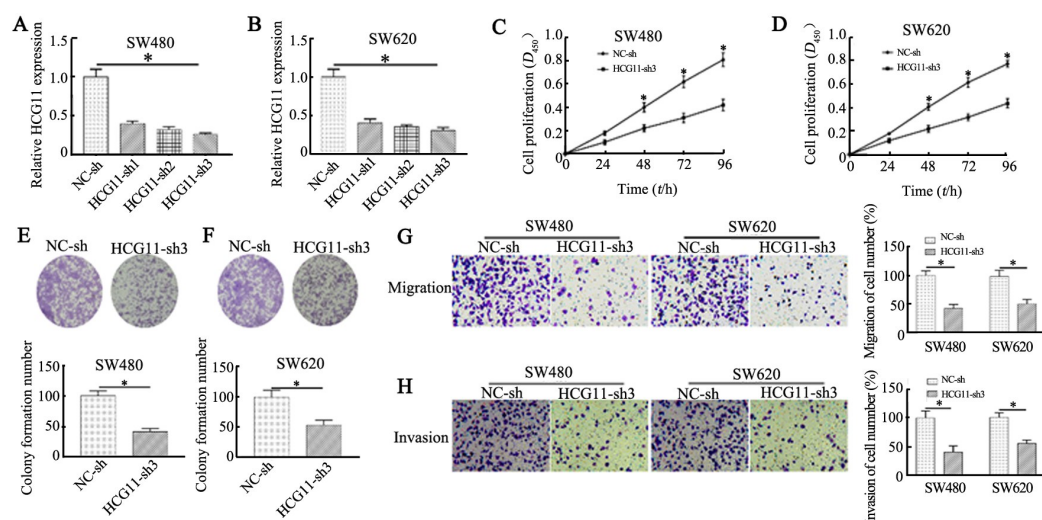
图 1 HCG11 在结直肠癌组织及细胞系中高表达

Fig.1 HCG11 was significantly upregulated in CRC cell lines and tissues

2.2 敲降 HCG11 抑制 CRC 细胞株 SW480 及 SW620 的增殖、迁移及侵袭能力

已证实 HCG11 的表达与 CRC 发展相关, 进一步探究 HCG11 的表达是否影响 CRC 细胞的表型。qPCR 检测结果 (图 2A、B) 显示, 转染后 SW480 及 SW620 细胞中 HCG11 的相对表达水平显著降低 (均 $P < 0.05$)。CCK-8 检测结果 (图 2C、D) 显示, 敲降 HCG11 后能显著抑制 SW480 及 SW620 细胞的增殖能力 (均 $P < 0.05$)。克隆形成实验结果 (图 2E、F) 也显示, 敲降 HCG11 后 SW480 及

SW620 细胞的克隆形成率明显被抑制 (SW480: 42.00 ± 5.00 vs 101.00 ± 8.00 ; SW620: 53.00 ± 8.00 vs 99.00 ± 11.00 ; 均 $P < 0.05$)。Transwell 迁移及侵袭实验结果 (图 2G、H) 显示, 敲降 HCG11 后, SW480 及 SW620 细胞的迁移及侵袭能力明显受到抑制 (迁移, SW480: 42.00 ± 7.00 vs 100.00 ± 8.00 ; SW620: 50.00 ± 8.00 vs 98.00 ± 11.00 ; 侵袭, SW480: 40.00 ± 11.00 vs 102.00 ± 12.00 ; SW620: 58.00 ± 6.00 vs 101.00 ± 8.00 ; 均 $P < 0.05$)。结果表明, HCG11 的表达水平对 CRC 细胞的增殖、迁移及侵袭具有调控作用。



* $P < 0.05$ vs NC-sh group

A,B: Statistical histograms of mRNA; C, D: Statistical graph of cells proliferation; E, F: Colony formation images and statistical histograms; G, H: Images of cell migration and invasion ($\times 100$), and the statistical histograms

图 2 敲降 HCG11 抑制细胞增殖、迁移及侵袭

Fig. 2 HCG11 knockdown inhibited proliferation, migration and invasion of CRC cells (scale bar=200 μ m)

2.3 敲降 HCG11 明显抑制 CRC 细胞上皮间质转化、肿瘤干细胞的形成及移植瘤的生长

上皮间质转化是肿瘤转移的重要步骤, 免疫荧光检测(图 3A)显示, 敲降 HCG11 能够显著上调 E-cadherin 并下调间质细胞特异性标记蛋白(Vimentin)的表达水平(均 $P < 0.05$), 结果还显示, 敲降 HCG11 明显抑制了 Sox2 及 Nestin 的表达水平(均 $P < 0.05$)。此外, Wb 检测结果(图 3B)显示, 敲降 HCG11 后显著上调 Vimentin, 相反地, 明显抑制了上皮细胞特异性标记蛋白(E-cadherin、 α -catenin)的表达(均 $P < 0.05$), 敲降 HCG11 后显著抑制了干细胞相关蛋白(Nestin、Nanog、Oct-4、Sox2)的表达, 同时, qPCR 检测结果(图 3C)显示, 敲降 HCG11 后癌症干细胞相关的表面抗原(CD24、CD44、CD133、CD155、CD166)的表达水平也受到了明显的抑制(均 $P < 0.05$)。异体移植瘤小鼠模型检测结果(图 3D、E)显示, 种植入敲降 HCG11 的 SW480 细胞的小鼠肿瘤显著小于对照组[(体积: $(111.40 \pm 6.82) \text{ mm}^3$ vs $(209.60 \pm 18.23) \text{ mm}^3$; 体重: $(780.06 \pm 21.43) \text{ mg}$ vs $(382.32 \pm 18.21) \text{ mg}$; 均 $P < 0.05$]。结果表明, 敲降 HCG11 抑制 CRC 细胞上皮间质转化及肿瘤干细胞的形成, 同时, 还明显抑制 CRC 细胞移植瘤的生长。

2.4 HCG11 通过抑制 miR-144-3p 调控 ZEB1 在 CRC 细胞中的表达水平

通过 Statbase、miRcode 及 DIANA-lncBase 软件预测的候选基因中, miRNA-144-3p 在 CRC 中发挥抑癌基因作用, 因此进一步验证 miR-144-3p 与下游候选基因的靶向结合位点(图 4A)。qPCR 检测(图 4B)显示, 敲降 HCG11 后 miR-144-3p 的表达显著上调(1.46 ± 0.04 vs 1.02 ± 0.11 , $P < 0.05$)。过表达 miR-144-3p 后 HCG11 显著受到抑制, 敲降 miR-144-3p 结果则相反(0.51 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.06 , 2.10 ± 0.21 vs 1.00 ± 0.06 , 均 $P < 0.05$, 图 4C)。进一步通过双荧光素酶报告基因检测 HCG11 与 miR-144-3p 的靶向结合关系, 结果显示, 过表达 miR-144-3p 后, 显著抑制了转染 pmir-GLO-HCG11-WT 载体的细胞荧光素酶活性(WT: 1.00 ± 0.11 vs 1.02 ± 0.08 , $P > 0.05$; MUT: 0.48 ± 0.03 vs 0.97 ± 0.07 , $P < 0.05$, 图 4D), 此外, 通过对 78 例 CRC 临床样本进行检测结果(图 4E)发现, HCG11 与 miR-144-3p 的表达呈负相关($r = -0.6659$, $P < 0.0001$)。通过 Targetscan 数据库分析发现, miR-144-3p 靶基因 HCG11 的表达与 CRC 的 EMT 相关, 重点关注与 EMT 相关的靶基因 ZEB1, 靶向结合位点显示如图 4F, 通过 qPCR 检测(图 4G)发现, 过表达 miR-144-3p 后, ZEB1 显著受到抑制, 敲降 miR-144-3p 结果则相反(0.50 ± 0.10 vs 1.00 ± 0.06 , 2.11 ± 0.22 vs $1.00 \pm$

0.06 , 均 $P < 0.05$)。通过双荧光素酶报告基因检测, 过表达/敲降 miR-144-3p 或敲降 HCG11 对荧光素酶活性的影响, 结果(图 4H)显示, 过表达 miR-144-3p 后双荧光素酶活性显著降低, 敲降 miR-144-3p 后双荧光素酶活性则显著上调(均 $P < 0.05$), 敲降 HCG11 则对荧光素酶活性无显著的影响(0.93 ± 0.07 、 0.95 ± 0.02 、 0.89 ± 0.04 、 0.97 ± 0.10 vs 1.00 ± 0.06 , $P > 0.05$)。Wb 检测结果(图 4I)显示, 过表达 miR-144-3p 或敲降 HCG11 表达都能显著抑制 ZEB1 的表达(均 $P < 0.05$, 图 4I)。结果表明, HCG11 通过抑制 miR-144-3p 调控 ZEB1 在 CRC 细胞中的表达水平。

2.5 体外实验验证 HCG11 抑制 miR-144-3p/ZEB1 分子轴促进 CRC 的发生及转移

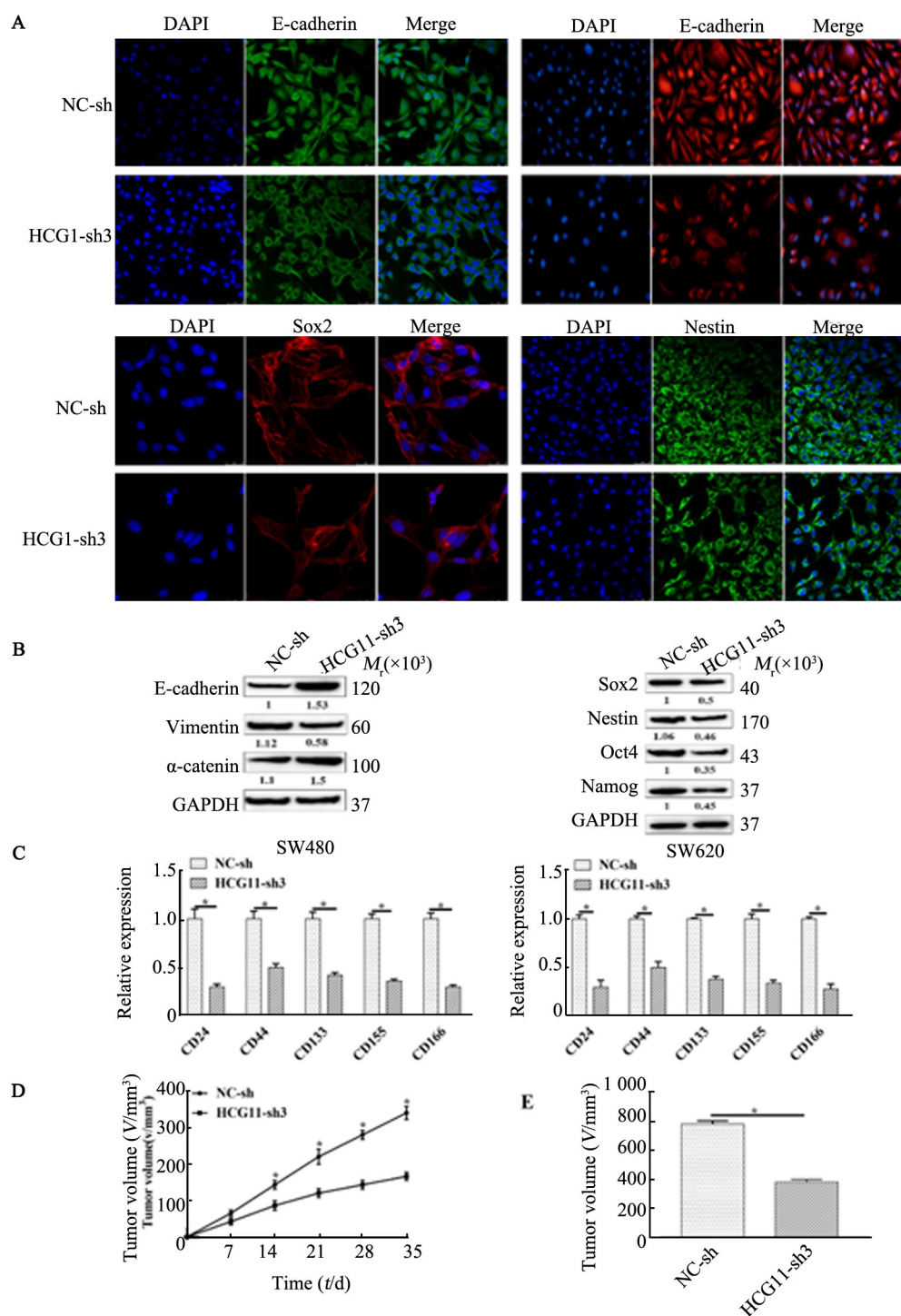
qPCR 检测(图 5A)发现, 在 CRC 细胞系 SW480 中, 敲降 HCG11 能够显著抑制 ZEB1 在 CRC 中的 mRNA 表达水平, 敲降 HCG11 的同时过表达 ZEB1 或敲降 miR-144-3p 的表达能够逆转敲降 HCG11 对 ZEB1 的抑制作用(40 ± 0.04 、 2.10 ± 0.10 、 0.97 ± 0.08 、 0.98 ± 0.05 vs 1.03 ± 0.08 , 均 $P < 0.05$)。同样的结果在克隆形成实验及 Transwell 侵袭实验中的得到验证, 敲降 HCG11 后显著抑制了 SW480 及 SW620 细胞的增殖(均 $P < 0.05$, 图 5B、C), 而同时过表达 ZEB1 或敲降 miR-144-3p 则逆转了敲降 HCG11 引起的抑制作用。Wb 检测(图 5D)结果显示, 敲降 HCG11 后, ZEB1 及 Vimentin 的表达明显受到抑制, 而 E-cadherin 及 α -catenin 的表达则明显上调, 同时过表达 ZEB1 或敲降 miR-144-3p 则逆转了敲降 HCG11 的调控作用(均 $P < 0.05$)。结果表明, HCG11 能够抑制 miR-144-3p/ZEB1 分子轴促进 CRC 的发生及转移。

3 讨论

lncRNA 通过剪接调控、lncRNA-miRNA 相互作用、lncRNA-蛋白相互作用和遗传变异等多种机制参与肿瘤进展, 可作为肿瘤诊断及治疗的靶点^[13-14], 与正常肠上皮组织相比, 大量 lncRNAs 在 CRC 中差异表达, 且这些 lncRNAs 通过调节靶基因的表达来调控 CRC 细胞增殖、凋亡和转移^[15-17]。已有报道^[11]显示, HCG11 在乳腺癌中与预后较差密切相关, HCG11 调控肝细胞癌(HCC)的凋亡情况且与 HCC 发展进程相关^[12], 然而 HCG11 在 CRC 中的作用及调控机制尚未见报道。在本研究中, 通过对临床样本的检测发现, HCG11 与 CRC 的发生发展密切相关, 在发生转移及晚期的 CRC 中, HCG11 的表达显著上调, 且 HCG11 高表达的患者预后较差, 表明 HCG11 在 CRC 的发展中扮演重要的角色。通过细胞实验验证, 敲降 HCG11 能够显著抑制 CRC 细胞的增殖及侵袭, 此外,

也证明了HCG11能够调控CRC细胞的上皮间质转化进程。本研究结果还显示,HCG11能够调控CRC细胞的肿瘤干细胞特性,与已报道的肿瘤干细胞是癌症转移和进展的关键来源,上皮间质转化是上皮

干细胞化的关键步骤。以上结果表明,HCG11调控CRC细胞的上皮间质转化及向肿瘤干细胞转化,进而调控细胞的增殖及侵袭能力,最终影响肿瘤的生长及转移。



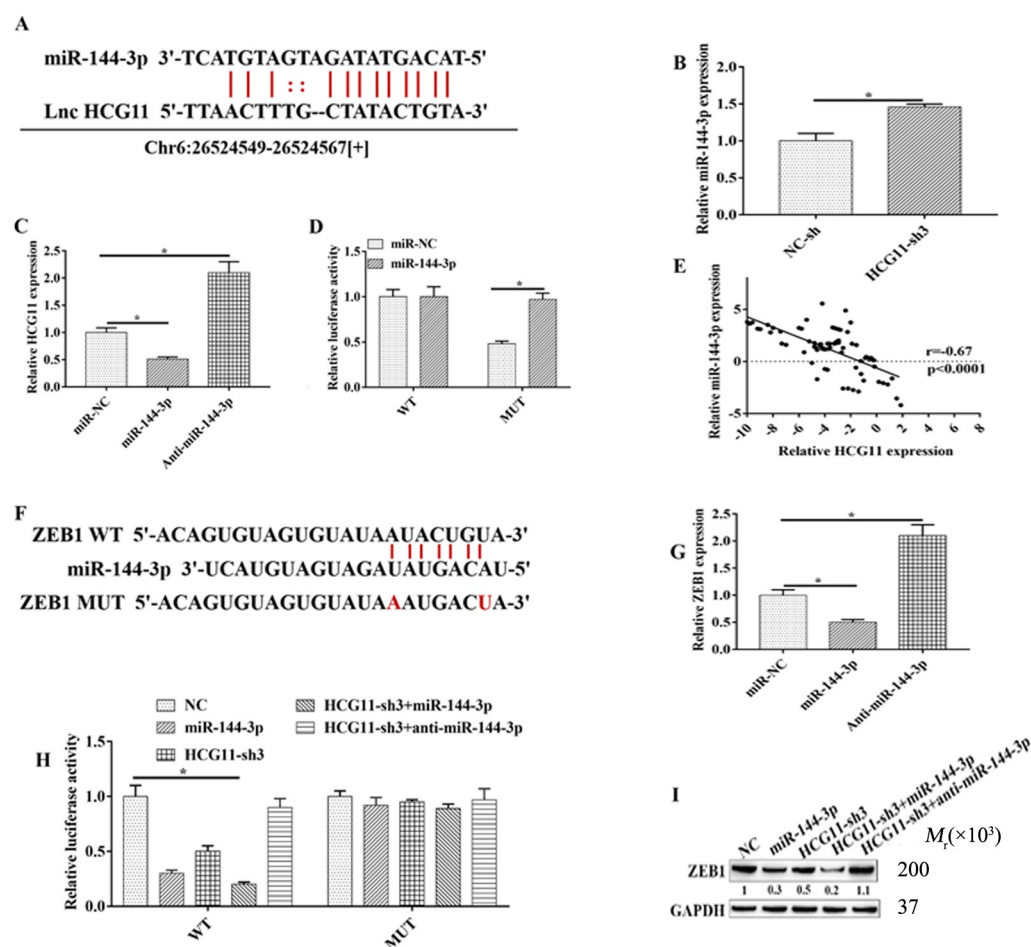
* $P < 0.05$ vs NC-sh group

A: Immunofluorescence image; B: The bands of protein in Wb images; C: Statistical histograms of mRNA;

D: Statistical graph of tumor volume; E: Statistical histograms of tumor weight

图3 敲降HCG11抑制CRC细胞上皮间质转化、肿瘤干细胞形成和移植瘤的生长

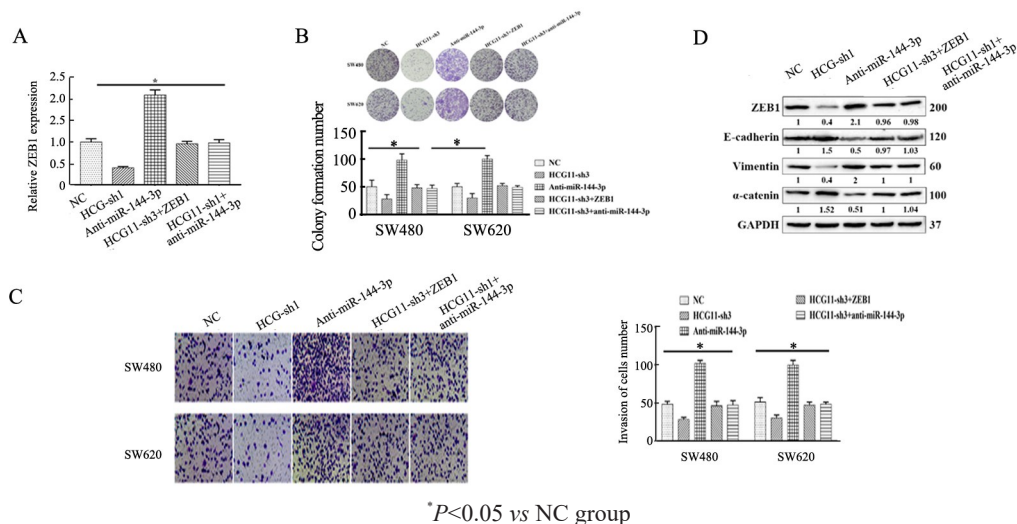
Fig. 3 HCG11 knockdown inhibited tumor growth, cancer stem cell formation and epithelial-mesenchymal transition of CRC cells (scale bar=100 μ m)

* $P < 0.05$ vs NC-sh group or miR-NC group or NC group

A: Schematic representation; B, C: Statistical histograms of mRNA; D: Statistical histograms of luciferase activity; E: Correlation analysis curve; F: Schematic representation; G: Statistical histograms of mRNA; H: Statistical histograms of luciferase activity; I: The bands of protein in western blotting images

图4 HCG11通过抑制miR-144-3p调控ZEB1在CRC细胞中的表达水平

Fig. 4 HCG11 regulated ZEB1 expression level in CRC cells via inhibiting miR-144-3p

* $P < 0.05$ vs NC group

A: Statistical histograms of mRNA; B: Colony formation images and statistical histograms($\times 200$); C: Images of Cell migration and invasion, and statistical histograms; D: The bands of protein in Wb images

图5 HCG11通过miR-144-3p/ZEB1分子轴促进结直肠癌的发生及转移

Fig. 5 HCG11 promoted CRC progression and metastasis via regulating miR-144-3p/ZEB1 axis (scale bar=200 μ m)

越来越多的研究表明, lncRNA 可通过与 miRNA 位点结合进而影响 miRNA 与其靶基因的结合从而调控靶基因的表达, 即为 ceRNAs 调控网络^[18]。例如, 在糖尿病肾病中, TUG1 通过调控 miR-337 影响 PPAR γ 的表达^[19], 在神经胶质瘤中 TP73-AS1 则通过调控 miR-124 抑制 p53 的表达进而调控细胞的增殖^[20]。本研究中, 通过 Statbase、miRcode 及 DIANA-lncBase 软件预测 miR-144-3p 可被 HCG11 调控, miR-144-3p 在 CRC 及其他肿瘤中的作用已被报道^[21-23]。通过细胞实验验证, 敲降 HCG11 后 miR-144-3p 的表达显著上调; 过表达 miR-144-3p 后 HCG11 的表达显著下调, 而敲降 miR-144-3p 后 HCG11 的表达明显上调。双荧光素酶报告基因结果也显示, 过表达 miR-144-3p 后转染 pmirGLO-HCG11-WT 载体的细胞荧光素酶活性显著降低; 临床样本检测结果显示, miR-144-3p 与 HCG11 的表达呈负相关, 表明 HCG11 与 miR-144-3p 相互作用。

转录因子 ZEB1 在肿瘤细胞上皮间质转化及侵袭过程中发挥重要作用, 能够将非侵袭性的基底乳腺癌细胞 (basal-type breast cancer cell) 转化为癌干细胞 (cancer stem cells, CSCs)^[24-25]。在本研究中, ZEB1 直接与 miR-144-3p 靶向作用, HCG11 可通过海绵吸附 miR-144-3p 直接调控 ZEB1 的表达。通过在 CRC 细胞过表达 ZEB1, 可以逆转敲降 HCG11 对肿瘤的抑制作用, 此外, 发现在 CRC 中 ZEB1 与 HCG11 的表达呈正相关, 与已报道的 ZEB1 调控肿瘤细胞上皮间质化、干细胞转化及促进肿瘤发生结果一致。本研究通过双荧光素酶报告基因检测发现, 过表达 miR-144-3p 后双荧光素酶活性显著降低, 敲降 miR-144-3p 后双荧光素酶活性则显著上调, 而敲降 HCG11 则对荧光素酶活性无影响, 说明 HCG11 可能能够调控 ZEB1 mRNA 的转录后表达, Wb 结果验证了这一结论。

总而言之, 本研究发现 HCG11 与 CRC 的发生及发展密切相关, 且在 CRC 中 HCG11 通过抑制 miR-144-3p 促进 ZEB1 的表达, 进而影响细胞的增殖及侵袭, 表明 HCG11 可作为 CRC 诊断及治疗的潜在靶点。

[参 考 文 献]

- [1] HORN BROOK M C, GOSHEN R, CHOMAN E, et al. Early colorectal cancer detected by machine learning model using gender, age, and complete blood count data[J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(10): 2719-2727. DOI:10.1007/s10620-017-4722-8.
- [2] KAWAMURA H, YAMAGUCHI T, YANO Y, et al. Characteristics and prognostic factors of bone metastasis in patients with colorectal cancer[J]. Dis Colon Rectum, 2018, 61(6): 673-678. DOI:10.1097/dcr.0000000000001071.
- [3] THOMAS J, OHTSUKA M, PICHLER M, et al. MicroRNAs: clinical relevance in colorectal cancer[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(12): 28063-28076. DOI:10.3390/ijms161226080.
- [4] CORREALE P, BOTTA C, CILIBERTO D, et al. Immunotherapy of colorectal cancer: new perspectives after a long path[J]. Immunotherapy, 2016, 8(11): 1281-1292. DOI:10.2217/imt-2016-0089.
- [5] MAISHI N, HIDA K. Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis[J]. Cancer Sci, 2017, 108(10): 1921-1926. DOI: 10.1111/cas.13336.
- [6] YUAN R, LI S, GENG H, et al. Reversing the polarization of tumor-associated macrophages inhibits tumor metastasis[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 49: 30-37. DOI:10.1016/j.intimp.2017.05.014.
- [7] DIERMEIER S D, CHANG K C, FREIER S M, et al. Mammary tumor-associated RNAs impact tumor cell proliferation, invasion, and migration[J]. Cell Rep, 2016, 17(1): 261-274. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.08.081.
- [8] WANG K C, YANG Y W, LIU B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression [J]. Nature, 2011, 472(7341): 120-124. DOI:10.1038/nature09819.
- [9] TSAI M C, MANOR O, WAN Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes[J]. Science, 2010, 329(5992): 689-693. DOI:10.1126/science.1192002.
- [10] ZHANG Y, ZHANG P, WAN X, et al. Downregulation of long non-coding RNA HCG11 predicts a poor prognosis in prostate cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 936-941. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.08.013.
- [11] LIU H, LI J, KOIRALA P, et al. Long non-coding RNAs as prognostic markers in human breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 20584-20596. DOI:10.18632/oncotarget.7828.
- [12] XU Y, ZHENG Y, LIU H, et al. Modulation of IGF2BP1 by long non-coding RNA HCG11 suppresses apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via MAPK signaling transduction[J]. Int J Oncol, 2017, 51(3): 791-800. DOI:10.3892/ijo.2017.4066.
- [13] CHEN Y, YU X, XU Y, et al. Identification of dysregulated lncRNAs profiling and metastasis-associated lncRNAs in colorectal cancer by genome-wide analysis[J]. Cancer Med, 2017, 6(10): 2321-2330. DOI:10.1002/cam4.1168.
- [14] LIU X, DAI C, JIA G, et al. Microarray analysis reveals differentially expressed lncRNAs in benign epithelial ovarian cysts and normal ovaries[J]. Oncol Rep, 2017, 38(2): 799-808. DOI: 10.3892/or.2017.5741.
- [15] PENG W, WANG Z, and FAN H. LncRNA NEAT1 impacts cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer via regulation of AKT signaling[J]. Pathol Oncol Res, 2017, 23(3): 651-656. DOI:10.1007/s12253-016-0172-4.
- [16] LIN K, JIANG H, ZHANG L L, et al. Down-regulated lncRNA-hotair suppressed colorectal cancer cell proliferation, invasion, and migration by mediating p21[J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(9): 2320-2331. DOI:10.1007/s10620-018-5127-z.
- [17] ZHANG Z, ZHOU C, CHANG Y, et al. Long non-coding RNA CASC11 interacts with hnRNP-K and activates the WNT/beta-catenin pathway to promote growth and metastasis in colorectal cancer[J]. Cancer Lett, 2016, 376(1): 62-73. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.022.

- [18] WANG Y, HOU J, HE D, et al. The emerging function and mechanism of ceRNAs in cancer[J]. Trends Genet, 2016,32(4): 211-224. DOI:10.1016/j.tig.2016.02.001.
- [19] DUAN L J, DING M, HOU L J, et al. Long noncoding RNA TUG1 alleviates extracellular matrix accumulation via mediating microRNA-377 targeting of PPARgamma in diabetic nephropathy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(3): 598-604. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.01.145.
- [20] XIAO S, WANG R, WU X, et al. The long noncoding RNA TP73-AS1 interacted with miR-124 to modulate glioma growth by targeting inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53[J]. DNA Cell Biol, 2018, 37(2): 117-125. DOI:10.1089/dna.2017.3941.
- [21] WU C W, CAO X, BERGER C K, et al. Novel approach to fecal occult blood testing by assay of erythrocyte-specific microrna markers [J]. Dig Dis Sci, 2017,62(8):1985-1994. DOI:10.1007/ s10620-017-4627-6.
- [22] LIU C, SU C, CHEN Y, et al. MiR-144-3p promotes the tumor growth and metastasis of papillary thyroid carcinoma by targeting paired box gene 8[J]. Cancer Cell Int, 2018,18: 54. DOI:10.1186/s12935-018-0550-y.
- [23] WANG Y, ZHANG Y, YANG T, et al. Long non-coding RNA MALAT1 for promoting metastasis and proliferation by acting as a ceRNA of miR-144-3p in osteosarcoma cells[J]. Oncotarget, 2017,8 (35): 59417-59434. DOI:10.18632/oncotarget.19727.
- [24] KREBS A M, MITSCHKE J, LASIERRA LOSADA M, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer[J]. Nat Cell Biol, 2017,19(5): 518-529. DOI:10.1038/ncb3513.
- [25] MA J, ZHAN Y, XU Z, et al. ZEB1 induced miR-99b/let-7e/miR-125a cluster promotes invasion and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2017, 398: 37-45. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.04.006.

[收稿日期] 2018-11-17

[修回日期] 2019-01-12

[本文编辑] 阮芳铭