

· 基础研究 ·

长链非编码 RNA NPPA-AS1 通过靶向 miR-372-3p 调控结直肠癌 SW480 细胞的增殖和凋亡

王晓龙¹, 陈亮^{1*}, 曹洪涛¹, 曹天生¹, 张文伟¹, 林波¹, 汤婷婷¹, 马克强¹, 杨建荣¹, 何志军², 汪彪², 张健²

1. 南方医科大学附属花都医院 胃肠外科, 广东 广州 510800

2. 湖北医药学院附属人民医院 胃肠外科, 湖北 十堰 420000

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA NPPA-AS1(lncRNA NPPA-AS1)对结直肠癌 SW480 细胞增殖和凋亡的影响及其分子机制。**方法** 选取南方医科大学附属花都医院和湖北医药学院附属人民医院 2017 年 1 月至 2019 年 1 月期间的 30 对结直肠癌组织及匹配的癌旁组织;将结直肠癌细胞(SW480 细胞)进行体外培养并单独或者联合转染 pcDNA-3.1 载体(pcDNA)、miRNA 抑制剂阴性对照(anti-miR-NC)、NPPA-AS1 过表达载体(pcDNA-NPPA-AS1)、miR-372-3p 抑制剂(anti-miR-372-3p)、miRNA 模拟物阴性对照(miR-NC)和 miR-372-3 模拟物(miR-372-3p)以构建 pcDNA 组、pcDNA-NPPA-AS1 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-372-3p 组、pcDNA-NPPA-AS1+miR-NC 组和 pcDNA-NPPA-AS1+miR-372-3p 组;实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)验证 lncRNA NPPA-AS1 和 miR-372-3p 的表达;四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)比较细胞活力;蛋白质印迹法比较蛋白表达;流式细胞术比较凋亡情况。**结果** 结直肠癌的 lncRNA NPPA-AS1 对比癌旁组织表达更低,但 miR-372-3p 对比癌旁组织表达更高($P<0.05$);过表达 lncRNA NPPA-AS1 显著降低 SW480 细胞的活力,使细胞的凋亡率增加,并降低了 B 淋巴细胞瘤/白血病-2(B-cell lymphoma-2; Bcl-2)和 cyclinD1 的表达,提高了 B 淋巴细胞瘤/白血病 2 相关 X 蛋白(BCL2-associated x protein; Bax)和 p21 的表达($P<0.05$)。lncRNA NPPA-AS1 靶向调控 miR-372-3p 表达。抑制 miR-372-3p 显著降低 SW480 细胞的活力,使细胞的凋亡率增加,并降低了 Bcl-2 和 cyclinD1 的表达,提高了 Bax 和 p21 的表达($P<0.05$)。上调 miR-372-3p 表达逆转了过表达 lncRNA NPPA-AS1 对 SW480 细胞的影响。**结论** 过表达 lncRNA NPPA-AS1 通过靶向下调 miR-372-3p 表达调控结直肠癌 SW480 细胞的增殖及凋亡。

【关键词】 lncRNA NPPA-AS1; miR-372-3p; 增殖; 凋亡

lncRNA NPPA-AS1 regulates the proliferation and apoptosis of colorectal cancer SW480 cells by targeting miR-372-3p

Wang Xiaolong¹, Chen Liang^{1*}, Cao Hongtao¹, Cao Tiansheng¹, Zhang Weiwen¹, Lin Bo¹, Tang Tingting¹, Ma Keqiang¹, Yang Jianrong¹, He Zhijun², Wang Biao², Zhang Jian²

1. Gastrointestinal Surgery, Huadu Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510800, Guangdong, China

2. Gastrointestinal Surgery, People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 420000, Hubei, China

*Corresponding author: Chen Liang, E-mail: whchenliang@163.com

【Abstract】 Objective This study aims to investigate the effects and molecular mechanism of long non-coding RNA NPPA-AS1 (lncRNA NPPA-AS1) regulating the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells (SW480 cells). **Method** Thirty pairs of colorectal cancer tissues and the matched adjacent

基金项目:广州市花都区人民医院院内重点学科(2022-2025 年)项目;南方医科大学附属花都医院院内基金项目(2020B04);广州市花都区科技计划项目(22-HDWS-018)

* 通信作者:陈亮, E-mail: whchenliang@163.com

tissues were selected from our hospital during January 2017 to January 2019. SW480 cells were cultured in vitro and transfected with pcDNA-3.1 vector (pcDNA), NPPA-AS overexpression plasmid (pcDNA-NPPA-AS), miRNA inhibitor negative control (anti-miR-NC), miR-372-3p inhibitor (anti-miR-372-3p), miRNA mimic negative control (miR-NC) and miR-372-3p mimic (miR-372-3p) alone or jointly, generating pcDNA group, pcDNA-NPPA-AS group, anti-miR-NC group, anti-miR-372-3p group, pcDNA-NPPA-AS1+miR-NC group, and pcDNA-NPPA-AS1+miR-372-3p group. Then, real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of lncRNA NPPA-AS1 and miR-372-3p. 4,5-Dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method was conducted to compare cell activity. Western blot was performed to detect protein expression. Flow cytometry was utilized to analyze cell apoptosis. **Result** Compared with adjacent tissues, lncRNA NPPA-AS1 expression was significantly decreased, while miR-372-3p expression was increased in colorectal cancer tissues ($P<0.05$). Overexpression of lncRNA NPPA-AS1 significantly reduced the cell activity and increased the apoptosis rate of SW480, accompanied by the decreases in Bcl-2 and CyclinD1 expression and increases in Bax and p21 expression ($P<0.05$). lncRNA NPPA-AS1 targets miR-372-3p, and inhibition of miR-372-3p significantly reduced the cell activity and promoted the apoptosis rate of SW480. In addition, miR-372-3p depletion decreased the expression of Bcl-2 and CyclinD1 and increased the expression of Bax and p21 ($P<0.05$). Further, up-regulation of miR-372-3p reversed the effects of lncRNA NPPA-AS1 overexpression in SW480 cells. **Conclusion** Overexpression of lncRNA NPPA-AS1 regulates proliferation and apoptosis of colorectal cancer SW480 cells through the down-regulation of miR-372-3p.

【Key words】 lncRNA NPPA-AS1; miR-372-3p; Proliferation; Apoptosis

结直肠癌作为一种胃肠道恶性肿瘤,其发病率居全球第三,死亡率居第二^[1]。且大多数患者常在中晚期被确诊,手术辅助化疗和放疗是患者的首要选择,而其预后与其病理分期有关^[2-4]。因此,探索结直肠癌的致癌机制以及新且有效的治疗策略特别重要。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 指长度超过 200 个核苷酸 RNA 分子, lncRNAs 不具备蛋白质编码能力,但可从多个方面调控基因的表达水平,如表观遗传调控、转录调控和转录后调控^[5]。研究表明, lncRNAs 在癌症的发生发展中影响很大, lncRNAs PVT1 作为一种潜在的肿瘤生物标志物,参与多种肿瘤的发生、发展^[6]。LINC01194 在肺腺癌组织和细胞中表达上调,它通过 miR-641/SET 结构域的赖氨酸甲基转移酶 7 (domain containing 7, histone lysine methyltransferase, SETD7) 轴促进肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[7]。长非编码 RNA HLA 复合体 P5 (HLA complex P5, HCP5) 在胃癌细胞系中高表达,沉默 lncRNA HCP5 抑制胃癌细胞增殖、侵袭等,加速细胞凋亡^[8]。lncRNA X (染色体)失活特异性转录物 (X inactive specific transcript, XIST) 在食管鳞癌中表达上调,沉默 XIST 可部分通过 miR-129-5 p/细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 轴抑制食管鳞癌的进展^[9]。利钠肽 (natriuretic peptide A,

NPPA) 反义 RNA-1 (NPPA-AS1) 是一种新的 lncRNA, lncRNA NPPA-AS1 在宫颈癌中低表达,上调 lncRNA NPPA-AS1 可抑制宫颈癌细胞的增殖及迁移^[10]。然而目前尚不明确 lncRNA NPPA-AS1 在结直肠癌中的作用。通过应用 StarBase 数据库分析 microRNA-372-3p (miR-372-3p) 同 lncRNA NPPA-AS1 能够通过结合位点结合。有研究证明结直肠癌患者中 miR-372-3p 表达水平显著高于正常的组织,且其高表达与肿瘤大小和分化程度密切相关^[11]。尽管已有研究确定 miR-372-3p 在结直肠癌中的作用,但目前尚不清楚 lncRNA NPPA-AS1 在结直肠癌中的作用及是否通过 miR-372-3p 发挥作用。本研究着重探讨 lncRNA NPPA-AS1 对结直肠癌的增殖和凋亡的影响及是否通过靶向调控 miR-372-3p 起作用的机制研究。

1 材料与方法

1.1 临床资料 选取南方医科大学附属花都医院和湖北医药学院附属人民医院 2017 年 1 月至 2019 年 1 月通过病理检测确诊结直肠癌的患者 30 例,分别收集结直肠癌及匹配的癌旁组织,并通过每例患者的知情和同意,经手术切除后样本立即置于 -80℃。本研究已征得医院伦理委员会批准。纳入标准:①患者病理确诊为结直肠癌,患者自愿

参加研究;②患者术前均未接受化疗或放疗。排除标准:①其他肠道疾病患者,如溃疡性结肠炎、克罗恩病等;②有其他原发癌的患者;③已知原发器官功能衰竭的患者。

1.2 材料 结直肠癌 SW480 细胞系选购自中国科学院细胞库(中国上海);于 Gibco 公司(美国)购置 RPMI-1640 培养基;于 Hyclone 公司(美国)购置胎牛血清;于歌凡生物有限公司(上海)购置四甲基偶氮唑盐比色法(4,5-Dimethylthazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)试剂;于天根生化有限公司(北京)购置实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)、反转录、TRIZOL 试剂;RIPA 裂解液、于研谨生物有限公司(上海)购置 BCA 试剂盒;于凯瑞基生物有限公司(北京)购置 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒;于索宝生物有限公司(上海)购置 pcDNA、pcDNA-NPPA-AS1;anti-miR-NC、anti-miR-372-3p、miR-NC、miR-372-3p、si-NC、si-NPPA-AS1 购自上海吉玛制药公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 细胞处理与分组 SW480 细胞用含 10%胎牛血清的罗斯维尔公园纪念研究所 1640 培养基(Roswell Park Memorial Institute-1640, RPMI-1640)在 5% CO₂ 和 37 °C 环境条件下孵育。根据 Lipofectamine 2000 试剂盒步骤说明完成以下转染:①将 pcDNA、anti-miR-NC、pcDNA-NPPA-AS1、anti-miR-372-3p 分别对 SW480 细胞进行转染并标记成 pcDNA 组、anti-miR-NC 组、pcDNA-NPPA-AS1 组和 anti-miR-372-3p 四组。②将 pcDNA-NPPA-AS1 分别与 miR-372-3p、miR-NC 对 SW480 细胞共转染,标记成 pcDNA-NPPA-AS1+miR-372-3p 组和 pcDNA-NPPA-AS1+miR-NC 组。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 提取组织和细胞总 RNA,通过反转录成 cDNA, lncRNA NPPA-AS1 和 miR-372-3p 分别用 U6 或甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算法来确定其表达量,验证转染的效率主要以验证每组 miR-372-3p 和 lncRNA NPPA-AS1 的表达量来衡量。

1.5 MTT 验证细胞的活性对实验对象 SW480 细胞进行计数并调整好细胞密度 (2.5×10^4 个/ml),按每孔 100 μ l 的量铺板至 96 孔板中,经过 48 h 的培养后,将每 20 μ l 的 MTT 溶液添加到每孔中,

等 4 h 之后,把培养基去掉,按每孔 150 μ l 的量添加二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液,在常温环境中进行震荡,接着静置数育 5 min,于 490 nm 处采用酶标仪检测每孔的吸光度(optical density, OD)值,这些数据可以作为衡量细胞活性大小的标准。

1.6 Annexin V 细胞凋亡检测 根据 Annexin V-FITC/PI 试剂盒的步骤来验证结直肠癌细胞(SW480 细胞)的凋亡情况,将该细胞进行收集,添加磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)清洗细胞并重复 1 次并去掉,再次添加试剂盒的缓冲液对细胞进行重悬,接着添加 5 μ l Annexin V-FITC 以及 5 μ l PI,混匀后,放于 37 °C 环境下 15 min,通过流式细胞仪验证这些细胞的凋亡情况。

1.7 Western 印迹法验证细胞目标蛋白表达情况 将实验中的每组细胞按照常规的蛋白提取方法进行提取总蛋白,采用二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)定量试剂盒的方法对细胞蛋白进行统一量。按照每组蛋白浓度及上样总量 60 μ g 计算出上样的体积,在做十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfonate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)进行跑电泳后再接着转膜,将电转完后的膜完成浸泡在 5%的封闭液中进行封闭,PBS 清洗后再浸泡在一抗中并置于 4 °C 中过夜,第 2 天用 PBS 洗涤过后,将膜浸泡在二抗中,约 2 h 后,PBS 重复清洗 3 次,通过曝光机对膜进行曝光,显影。计算目标蛋白的灰度值可以采用 Quantity One 软件,按照常规的计算方法计算目的蛋白的表达。

1.8 统计学方法 将所得的数据录入 SPSS 21.0 软件进行计算分析,计量资料一般呈正态分布, ($\bar{x} \pm s$) 用来表示计量资料,应用独立样本 *t* 检验作两组之间的比较,应用单因素方差分析作多组之间的比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-372-3p 与 lncRNA NPPA-AS1 在结直肠癌组织中的表达与癌旁组织比较 结直肠癌组织中 lncRNA NPPA-AS1 表达均显著降低,miR-372-3p 表达均显著升高($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 过表达 lncRNA NPPA-AS1 对 SW480 细胞增殖的影响 pcDNA-NPPA-AS1 组 NPPA-AS1 的表达明显升高(图 1A),不同时间点的细胞活性比

pcDNA 组明显降低(图 1B),cyclinD1 表达比 pcDNA 组明显更低(图 1C),p21 表达比 pcDNA 组明显更高(图 1C)($P<0.05$)。

2.3 过表达 lncRNA NPPA-AS1 对 SW480 细胞凋亡的影响 与 pcDNA 组比较,pcDNA-NPPA-AS1 组细胞的凋亡率和 Bax 表达均明显升高,Bcl-2 表达则明显降低($P<0.05$)(图 2A、B)。

2.4 lncRNA NPPA-AS1 调控 miR-372-3p 的表达 StarBase 预测显示 lncRNA NPPA-AS1 序列的一段核苷酸序列可以和 miR-372-3p 互补(图3)。双

荧光素酶实验表示,与进行了 miR-NC 转染的 WT-NPPA-AS1 比较,转染 miR-372-3p 的荧光素酶活性明显降低($P<0.05$),转染 miR-NC 和 miR-372-3p 的 MUT-NPPA-AS1 中,荧光素酶活性无明显差异(图 4A)。pcDNA-NPPA-AS1 组同 pcDNA 组相比较,其 miR-372-3p 水平明显更低($P<0.05$);si-NPPA-AS1 组同 si-NC 组相比较,其 miR-372-3p 水平明显更高(图 4B)($P<0.05$)。

2.5 抑制 miR-372-3p 对 SW480 细胞增殖及凋亡的影响 anti-miR-372-3p 组同 anti-miR-NC

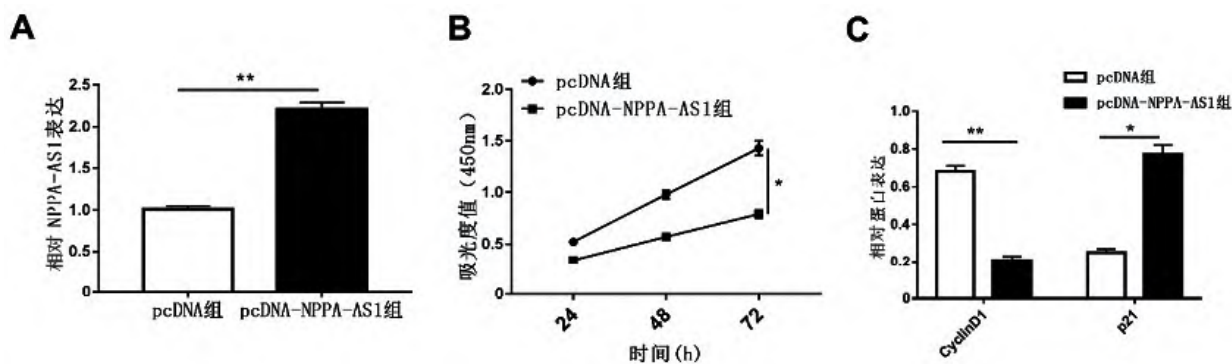


图 1 过表达 lncRNA NPPA-AS1 表达对 SW480 细胞增殖的影响($n=3$)

注:A,NPPA-AS1 过表达效率检测;B,细胞活力检测;C,cyclinD1 和 p21 蛋白表达分析。lncRNA NPPA-AS1:长链非编码 RNA NPPA 反义 RNA1;OD,光密度;pcDNA-NPPA-AS1,NPPA-AS1 过表达载体。

表 1 lncRNA NPPA-AS1 和 miR-372-3p 在结直肠癌组织中的相对表达情况比较($\bar{x}\pm s$)

项目	NPPA-AS1	miR-372-3p
癌旁组织	1.02±0.05	1.00±0.04
结直肠癌组织	0.43±0.03	3.35±0.15
<i>t</i>	11.404	15.612
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:lncRNA NPPA-AS1,长链非编码 RNA NPPA 反义 RNA1;miR-372-3p: microRNA-372-3p,微小 RNA-372-3p。

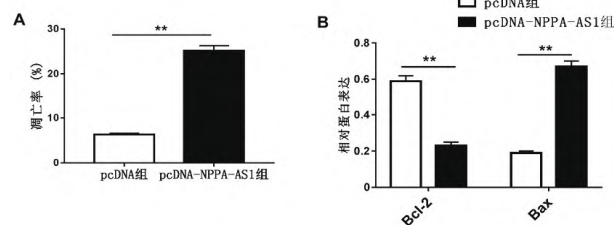


图 2 过表达 lncRNA NPPA-AS1 表达对 SW480 细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:A,NPPA-AS1 过表达对 SW480 细胞凋亡的影响;B,NPPA-AS1 过表达对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响;lncRNA NPPA-AS1,长链非编码 RNA NPPA 反义 RNA1;Bcl-2,B 淋巴细胞瘤/白血病-2;Bax,B 淋巴细胞瘤/白血病 2 相关 X 蛋白;pcDNA-NPPA-AS1,NPPA-AS1 过表达载体。

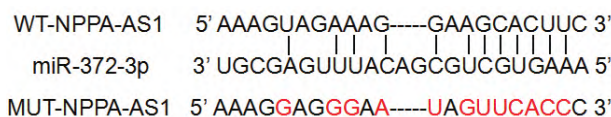


图 3 NPPA-AS1 中和 miR-372-3p 互补的相关核苷酸序列

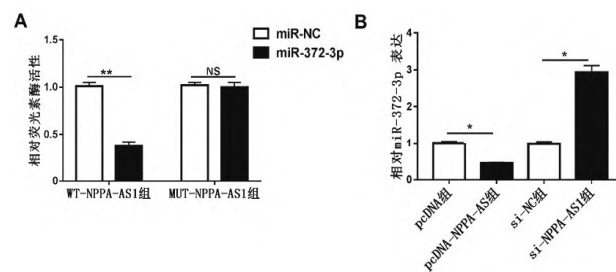


图 4 双荧光素酶实验和 qRT-PCR 实验鉴定 NPPA-AS1 和 miR-372-3p 的结合

注:A,双荧光素酶实验分析 NPPA-AS1 和 miR-372-3p 的结合关系;B,NPPA-AS1 过表达或者敲低对 miR-372-3p 表达的影响,WT,野生型;MUT,突变型;lncRNA NPPA-AS1,长链非编码 RNA NPPA 反义 RNA1;miR-372-3p, microRNA-372-3p;NS,差异无统计学意义。

组相比较,miR-372-3p的表达显著降低(图5A),细胞活性(24 h、48 h以及72 h)则明显更低(图5B),细胞凋亡率明显更高(图5C)($P<0.05$, Bcl-2和cyclinD1表达明显减少(图6),Bax和p21表达明显增加(图6)($P<0.05$)。

2.6 上调miR-372-3p表达逆转了过表达lncRNA NPPA-AS1对SW480细胞增殖及凋亡的影响
pcDNA-NPPA-AS1组miR-372-3p的表达同pcDNA组相比较,其细胞活性则明显更低,细胞凋亡率明显更高($P<0.05$);Bcl-2和cyclinD1表达明显减少,Bax和p21表达明显增加($P<0.05$)。pcDNA-

NPPA-AS1+miR-372-3p组miR-372-3p的表达同pcDNA-NPPA-AS1+mi组相比较,其细胞活性则明显更高,细胞凋亡率明显更低($P<0.05$);Bcl-2和cyclinD1表达明显增加,Bax和p21表达明显减少($P<0.05$)(表2和3)。

3 讨论

lncRNAs与miR的异常表达与人结直肠癌的发展进程有关,如lncRNA肿瘤抑制候选因子7(tumor suppressor candidate 7,TUSC7)在结直肠癌中表达下调,其低表达与高临床分级和低生存期

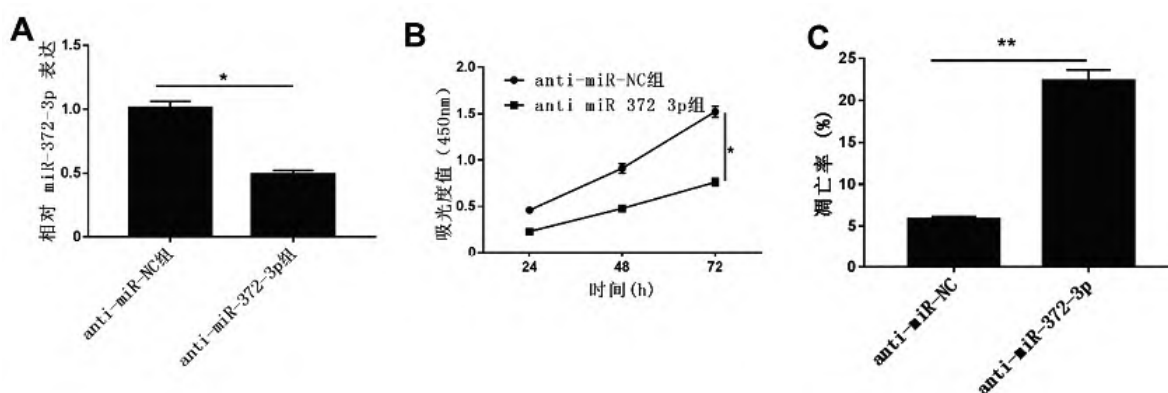


图5 抑制miR-372-3p对SW480细胞增殖和凋亡的影响($n=3$)

注:A,miR-372-3p敲低效率分析;B,miR-372-3p敲低对SW480细胞增殖的影响;C,miR-372-3p敲低对SW480细胞凋亡的影响。miR-372-3p,microRNA-372-3p;OD,光密度;anti-miR-372-3p,miR-372-3p抑制剂;anti-miR-NC,miRNA抑制剂对照。

表2 过表达lncRNA NPPA-AS1对SW480细胞凋亡及增殖的影响及miR-372-3p对此的逆转效用($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	miR-372-3p	OD值(450 nm)			凋亡率(%)
		24 h	48 h	72 h	
pcDNA组	1.01±0.04	0.49±0.04	0.94±0.04	1.43±0.06	6.55±0.52
pcDNA-NPPA-AS1组	0.36±0.03*	0.28±0.02*	0.53±0.02*	0.76±0.05*	21.67±1.30*
pcDNA-NPPA-AS1+miR-NC组	0.39±0.02	0.25±0.02	0.47±0.03	0.69±0.03	23.39±1.34
pcDNA-NPPA-AS1+miR-372-3p组	0.85±0.05#	0.42±0.02#	0.83±0.04#	1.21±0.08#	11.39±0.61#
F值	73.924	22.829	41.861	39.211	63.573
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: *与pcDNA组相比, $P<0.05$; #与pcDNA-NPPA-AS1+miR-NC组相比, $P<0.05$ 。pcDNA-NPPA-AS1,NPPA-AS1过表达载体;OD,光密度。

表3 过表达lncRNA NPPA-AS1对SW480细胞增殖及凋亡有关蛋白水平的影响及miR-372-3p对此的逆转效用($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	cyclinD1蛋白	p21蛋白	Bcl-2蛋白	Bax蛋白
pcDNA组	0.68±0.04	0.25±0.02	0.62±0.04	0.26±0.02
pcDNA-NPPA-AS1组	0.21±0.01*	0.72±0.04*	0.18±0.01*	0.67±0.04*
pcDNA-NPPA-AS1+miR-NC组	0.23±0.01	0.76±0.03	0.23±0.02	0.61±0.03
pcDNA-NPPA-AS1+miR-372-3p组	0.56±0.03#	0.37±0.03#	0.51±0.03#	0.35±0.02#
F值	77.297	72.564	60.043	46.429
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: *与pcDNA组相比, $P<0.05$; #与pcDNA-NPPA-AS1+miR-NC组相比, $P<0.05$ 。pcDNA-NPPA-AS1,NPPA-AS1过表达载体;Bcl-2,B淋巴细胞瘤/白血病-2;Bax,B淋巴细胞瘤/白血病2相关X蛋白。

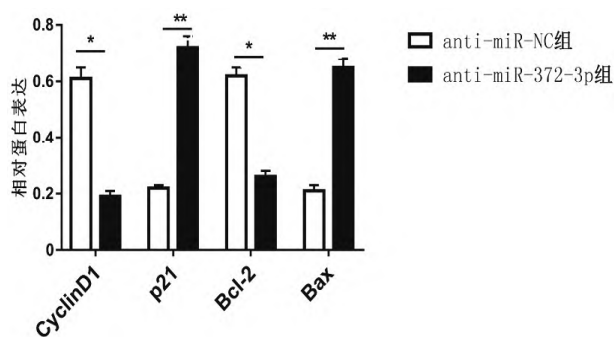


图6 抑制 miR-372-3p 对 SW480 细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响($n=3$)

注: Bcl-2, B 淋巴细胞瘤/白血病-2; Bax, B 淋巴细胞瘤/白血病 2 相关 X 蛋白; anti-miR-372-3p, miR-372-3p 抑制剂; anti-miR-NC, miRNA 抑制剂对照。

相关; 上调 lncRNA TUSC7 通过 miR-23 b/磷酸二酯酶 7 (phosphodiesterase 7A; PDE7A) 轴抑制结直肠癌进展^[12]。lncRNA RAD51 反义 RNA 1 (RAD51 antisense RNA 1, RAD51-AS1) 在结直肠癌细胞系中表达明显降低, lncRNA RAD51-AS1 通过 miR-29b/c-3p/N-myc 下游调控基因 2 (N-myc downstream regulated gene 2, NDRG2) 信号轴抑制结直肠癌细胞增殖、迁移、侵袭和糖酵解过程^[13]。lncRNA 母系表达基因 3 (maternally expressed 3, MEG3) 在结直肠癌组织与细胞中表达下调, 上调 miR-103a-3p 部分逆转了过表达 lncRNA MEG3 对结直肠癌细胞增殖、侵袭及内质网侵袭的影响^[14]。lncRNA PGM5-AS1 在结直肠癌组织和细胞中下调, 其低表达 lncRNA PGM5-AS1 通过调控 miR-100-5p/SMAD 家族成员 4 (SMAD family member 4, SMAD4) 轴促进结直肠癌细胞的增殖、迁移以及侵袭能力^[15]。过表达 lncRNA FGF14-AS2 通过 miR-1288-3p/Ras 相关雌激素调节生长抑制蛋白 (RAS like estrogen regulated growth inhibitor, RERG)/Ras/细胞外调节蛋白激酶 (extracellular-signal-regulated kinases, ERK) 信号通路抑制结直肠癌细胞增殖^[16]。lncRNA SOCS2-AS1 表达下调与结直肠癌患者预后不良有关, lncRNA SOCS2-AS1 过表达通过 miR-1264/细胞因子信号传导抑制蛋白 2 (suppressor of cytokine signaling 2, SOCS2) 轴抑制结直肠癌细胞的增殖、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 掺入、集落形成、细胞周期、迁移和侵袭能力^[17]。与上述研究结果相似, 本研究结果显示, 在结直肠癌组织中,

lncRNA NPPA-AS1 表达水平显著降低。过表达 lncRNA NPPA-AS1 使细胞的活性下降, 是细胞的总体凋亡率上升, 使细胞的 Bcl-2 和 cyclinD1 的表达量明显减少, 使细胞的 Bax 和 p21 的表达量明显增加。上述结果显示 lncRNA NPPA-AS1 的过表达能够显著减少 SW480 细胞的增殖能力, 并加速该细胞凋亡。

研究报道 lncRNAs 可作为内源竞争性 RNA 负调控 miRNA 表达抑制癌细胞恶性行为^[12-17]。本实验通过 StarBase 数据库验证 lncRNA NPPA-AS1 中有一段核苷酸序列可以和 miR-372-3p 互补, 通过双荧光素酶实验表示, miR-372-3p 组在 WT-NPPA-AS1 中含有更低的双荧光素酶活性, 通过过表达和抑制 lncRNA SNHG14 分别降低和提高 miR-372-3p 的表达, 即 lncRNA NPPA-AS1 靶向负调控 miR-372-3p 表达。研究发现, miR-372-3p 在乳腺癌组织中高表达, 其高表达与患者术后生存率、肿瘤大小及分期相关, 并通过 Wnt 途径促进细胞的增殖和侵袭^[18]。过表达 miR-372 消除了异丙酚对肺癌 A549 细胞增殖、侵袭等的抑制作用^[19]。miR-372-3p 通过抑制成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor 9, FGF9) 表达促进肺鳞癌细胞的增殖以及侵袭^[20]。与上述研究结果一致, 本实验结果显示, 在结直肠癌组织中, miR-372-3p 表达水平升高显著。抑制 miR-372-3p 降低了细胞活性, 提高了细胞凋亡率, 显著降低 cyclinD1 和 Bcl-2 的表达, 升高 p21 和 Bax 表达。提示抑制 miR-372-3p 表达可抑制 SW480 细胞增殖和加速细胞凋亡。上调 miR-372-3p 表达抵消了过表达 lncRNA NPPA-AS1 对 SW480 细胞增殖和凋亡的影响, 过表达 miR-372-3p 使细胞活性增加, 使细胞的凋亡率明显下降, 使细胞的 Bcl-2 和 cyclinD1 表达增加, 使细胞的 Bax 和 p21 表达减少。提示 lncRNA NPPA-AS1 可能通过调控 miR-372-3p 表达影响 SW480 细胞的增殖和凋亡。

综上所述, lncRNA NPPA-AS1 在结直肠癌 SW480 细胞中下调, 过表达 lncRNA NPPA-AS1 通过靶向下调 miR-372-3p 表达调控结直肠癌 SW480 细胞的增殖和凋亡。这意味着 lncRNA NPPA-AS1 很有可能成为结直肠癌治疗的一个潜在靶点, 但这些研究只局限于体外实验, 关于 lncRNA NPPA-AS1 在体内是如何作用于结直肠癌以及相关的作用机制仍有待继续研究。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] KATONA BW, WEISS JM. Chemoprevention of colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2020, 158(2):368-388.
- [3] BRENNER H, KLOOR M, POX CP. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2014, 383(9927):1490-1502.
- [4] 程康文. 长链非编码 RNA GAS5 通过 miR-182-5p 对结肠癌细胞增殖、凋亡影响的研究[D]. 南京医科大学, 2018.
- [5] CHENG C, LI HX, ZHENG JJ, et al. FENDRR Sponges miR-424-5p to Inhibit Cell Proliferation, Migration and Invasion in Colorectal Cancer [J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19: 1533033820980102.
- [6] CHEN MW, ZHANG RY, 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):22291-22312.
- [7] MENG FM, ZHOU YJ, DONG BH, et al. Long non-coding RNA LINC01194 promotes the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells by targeting miR-641/SETD7 axis[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1):588.
- [8] YIN DR, LU XH. Silencing of long non-coding RNA HCP5 inhibits proliferation, invasion, migration, and promotes apoptosis via regulation of miR-299-3p/SMAD5 axis in gastric cancer cells[J]. Bioengineered, 2021, 12(1):225-239.
- [9] WANG HR, LI HM, YU YK, et al. Long non-coding RNA XIST promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma through sponging miR-129-5p and upregulating CCND1 expression[J]. Cell Cycle, 2020, 1-15.
- [10] LUAN YN, XIE B, WEI WB. REST-repressed lncRNA NPPA-AS1 regulates cervical cancer progression by modulating miR-302e/DKK1/Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2021, 122(1):16-28.
- [11] PENG H, PAN X, SU Q, et al. MiR-372-3p promotes tumor progression by targeting LATS2 in colorectal cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(19):8332-8344.
- [12] HAO LF, YUN YF, LIANG R, et al. Long non-coding RNA TUSC7 suppressed colorectal cancer progression via regulation of miR-23b/PDE7A Axis [J]. Clin Invest Med, 2020, 43(4): E35-43.
- [13] LI CP, WANG PC, DU JB, et al. LncRNA RAD51-AS1/miR-29b/c-3p/NDRG2 crosstalk repressed proliferation, invasion and glycolysis of colorectal cancer[J]. IUBMB Life, 2020, 1-13.
- [14] WANG GQ, YE QW, NING SJ, et al. LncRNA MEG3 promotes endoplasmic reticulum stress and suppresses proliferation and invasion of colorectal carcinoma cells through the MEG3/miR-103a-3p/PDHB ceRNA pathway[J]. Neoplasma, 2020, 1-26.
- [15] ZHOU B, YI F, CHEN Y, et al. Reduced long noncoding RNA PGM5-AS1 facilitated proliferation and invasion of colorectal cancer through sponging miR-100-5p [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(15):7972-7981.
- [16] HOU RZ, LIU Y, SU YZ, et al. Overexpression of Long Non-Coding RNA FGF14-AS2 Inhibits Colorectal Cancer Proliferation Via the RERG/Ras/ERK Signaling by Sponging microRNA-1288-3p [J]. Pathol Oncol Res, 2020, 26(4): 2659-2667.
- [17] ZHENG ZH, LI XX, YOU HY, et al. LncRNA SOCS2-AS1 inhibits progression and metastasis of colorectal cancer through stabilizing SOCS2 and sponging miR-1264 [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(11):10517-10526.
- [18] FAN XD, HUANG XD, LI Z, et al. MicroRNA-372-3p promotes the epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma by activating the Wnt pathway [J]. J BUON, 2018, 23(5):1309-1315.
- [19] SUN H, GAO DY. Propofol suppresses growth, migration and invasion of A549 cells by down-regulation of miR-372 [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):1252.
- [20] WANG Q, LIU SY, ZHAO XT, et al. MiR-372-3p promotes cell growth and metastasis by targeting FGF9 in lung squamous cell carcinoma[J]. Cancer Med, 2017, 6(6):1323-1330.