

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.06.027

长非编码 RNA LINC00941 在结直肠癌中的表达及对细胞增殖的影响

王承恩, 罗 玉, 贺正池, 肖雪薇, 李宗鑫, 兰 洋, 吴传芳

(四川大学生命科学学院功能基因组实验室, 成都 610064)

摘 要: 为了研究与细胞分化相关的长非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) LINC00941 在肿瘤发生发展中的作用, 通过实时荧光定量 PCR 技术检测 LINC00941 在 6 种不同类型的人类癌细胞和正常胚胎肾细胞 HEK-293 细胞中的表达水平, 结果表明, LINC00941 在结直肠癌细胞 HCT116 和 HCT116 p53^{-/-}、肺癌细胞 A549 和 NCI-H1299、黑色素瘤细胞 Stilling 中均有较高的表达水平, 在结直肠癌细胞中表达水平最高. 以结直肠癌患者肿瘤组织和癌旁正常组织为材料, 实时荧光定量 PCR 检测 LINC00941 的表达水平发现, 肿瘤组织中 LINC00941 RNA 的表达水平显著高于癌旁组织. 通过 shRNA (short hairpin RNA) 干扰技术降低 HCT116 细胞中的 LINC00941 RNA 水平, 导致细胞增殖速度下降, 说明 LINC00941 与结直肠癌的发生发展相关.

关键词: 长非编码 RNA LINC00941; 结直肠癌; shRNA; 细胞增殖

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)06-1301-05

The expression of long non-coding RNA LINC00941 in colorectal cancer and effect on cell proliferation

WANG Cheng-En, LUO Yu, HE Zheng-Chi, XIAO Xue-Wei,

LI Zong-Xin, LAN Yang, WU Chuan-Fang

(Department of Functional Genome, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: To explore the function of a cell differentiation-associated long non-coding RNA (lncRNA) LINC00941 in cancer progression, we detected the expression of LINC00941 in 6 types of human cancer cell lines and HEK-293 cell line by real-time quantitative PCR. LINC00941 is highly expressed in colorectal carcinoma cell lines HCT116 and HCT116 p53^{-/-}, lung carcinoma cell lines A549 and NCI-H1299, and melanoma cell line Stilling, especially in colorectal carcinoma cell lines. By detecting the RNA levels of LINC00941 in the tumor and normal tissues of colorectal cancer patients, we found that the expression levels were significantly increased in tumor compared with paired normal tissues. By shRNA (short hairpin RNA) interfering, we found LINC00941-knockdown HCT116 cells had lower proliferation rate compared with negative control cells, suggesting the correlation of LINC00941 and colorectal cancer progression.

Keywords: Long non-coding RNA LINC00941; Colorectal cancer; shRNA; Cell proliferation

收稿日期: 2016-09-23

基金项目: 国家自然科学基金(31371325)

作者简介: 王承恩(1992-), 女, 河南平顶山人, 细胞生物学硕士, 研究方向为细胞的分子生物学. E-mail: wangchengen1234@163.com

通讯作者: 吴传芳. E-mail: wuchuanfang@scu.edu.cn

1 引言

基因组测序结果表明,人类约有 20000 个蛋白编码基因,约占基因组序列的 1.2%^[1],超过 98% 的序列是不编码蛋白质的.长度大于 200 个核苷酸却不具备蛋白编码能力的 RNA 称为长非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA).研究发现, lncRNA 能够在多层次对基因表达进行调控,例如:与染色质修饰复合物结合在表观遗传学水平调控基因的转录活性^[2],与转录因子结合调控其活性和基因组定位^[3,4],或与 microRNA 和 mRNA 等结合在转录后水平对基因表达进行调控等^[5]. lncRNA 作为基因表达调控的新层面,在多种生理过程中发挥关键作用,例如, X-染色体失活,组织器官发育,体节形成和细胞分化等^[1].

除了参与正常的生理过程外, lncRNA 在癌症的发生发展中也具有重要作用,其异常表达可以作为癌症诊断和预后的标志物^[6].最近的研究发现,多种细胞分化相关的 lncRNA 与癌症密切相关.例如: Sox2ot (SOX2 overlapping transcript) 在诱导胚胎干细胞向胚体(embryoid body, EB)分化的过程中表达量明显下调^[7],而其在肺癌中的表达水平却显著提高并且与预后不良相关^[8].在动物胚胎发育过程中, HOTAIR (HOX transcript anti-sense RNA) 仅在后远端肢体的成纤维细胞中表达,而其在乳腺癌、结直肠癌和肺癌等癌症中却高水平表达,过表达 HOTAIR 能够造成癌上皮细胞在基因组范围内重新定位染色质修饰复合物 PRC2 (Polycomb repressive complex 2),其重定位模式与胚胎成纤维极为相似,提示过表达 HOTAIR 对细胞具有去分化作用^[9]. lincRNA-RoR (long intergenic non-protein coding RNA, regulator of reprogramming) 在诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)生成的去分化过程中的表达水平显著提高^[10],研究发现其在乳腺癌中也高水平表达^[11].

鉴于细胞分化相关 lncRNA 在癌症细胞中的异常表达,本研究选择在角质形成细胞(keratinocyte)、成骨细胞(osteoblast)等祖细胞终末分化的过程中表达水平显著下调的 lncRNA LINC00941^[12],对其在 6 种类型的人类癌症细胞株中的表达水平进行分析,并检测其在 17 例结直肠癌患者的肿瘤组织和癌旁正常组织样本中的表达水平,同时通过 shRNA 干扰方法下调结直肠癌

细胞株 HCT116 中 LINC00941 的表达水平,观察其对细胞增殖的影响,以期为研究 LINC00941 在结直肠癌发生发展中的作用提供一定的基础.

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 细胞株、组织样本、菌株、质粒 人胚胎肾细胞株 HEK-293, 肺癌细胞株 A549 和 NCI-H1299, 肝细胞癌细胞株 Hep3B、HepG2 和 SMMC-7721, 结直肠癌细胞株 HCT116 和 HCT116 p53^{-/-} (p53 基因敲除的 HCT116 细胞株), 乳腺癌细胞株 MCF7 和 SK-BR-3, 宫颈癌细胞株 HeLa, 黑素瘤细胞株 Stilling 和 YUSAC 均由本实验室保存. 结直肠癌患者肿瘤组织和癌旁正常组织样本由解放军第 150 中心医院提供, 样本收集时间为 2014 年 1 月~2015 年 12 月, 所有纳入患者均签署知情同意书, 本研究已经伦理委员会审核通过. 大肠杆菌 *E. coli* (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 和质粒 pLKO.1-TRC Cloning Vector 由本实验室保存.

2.1.2 主要试剂 细胞培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司; TRIzol 试剂和 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; DNase I 和 RevertAid M-MuLV 逆转录酶、T4 DNA 连接酶购自 Thermo 公司; Real Time PCR Easy-SYBR Green I mix 购自 Foregene 公司; 寡核苷酸均由 Invitrogen 公司合成.

2.2 方法

2.2.1 细胞培养和细胞转染 细胞均按照 American Type Culture Collection (ATCC) 推荐的条件在 6 孔板中进行培养. HCT116 细胞按照 LipofectamineTM 2000 说明书进行转染, 转染 24h 后用含有 1.5 μ g/mL puromycin 的培养基筛选稳定细胞系.

2.2.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成 细胞生长至密度达 70%~80% 时吸去培养基, 加入 1 mL TRIzol 试剂裂解细胞, 按照说明书提取细胞总 RNA. 组织样本切成小块, 50~100 mg 组织中加入 1 mL TRIzol 试剂, 用组织匀浆器匀浆, 使组织充分裂解, 按照试剂说明书提取组织总 RNA. 取 1 μ g 总 RNA 以 DNase I 处理, 以 6 聚体随机引物进行逆转录反应合成 cDNA.

2.2.3 实时荧光定量 PCR 通过 iCycler iQ Real-Time PCR 检测系统进行. 20 μ L PCR 体系如

下:2×PCR Easy-SYBR Green I mix 10 μL, 10 μM 基因特异性引物各 0.2 μL, 10 倍稀释的 cDNA 模板 5 μL, 以 ddH₂O 补至 20 μL. PCR 循环条件如下:95℃ 预变性 1min;95℃ 变性 10s, 62℃ 退火 10s, 72℃ 延伸 20s, 共进行 40 个循环. LINC00941 在细胞和组织样本中的表达水平以 GAPDH 作为内参基因进行均一化. 检测引物序列如下: LINC00941 引物为 5'-TCAAGAATCAGT-CAGCAAGGAGG-3' (正向) 和 5'-CTAGGGAG-GCTTCAACTAGGATG-3' (反向), GAPDH 引物为 5'-CTATAAATTGAGCCCGCAGCC-3' (正向) 和 5'-CGCCAATACGACCAATCC-3' (反向).

2.2.4 统计分析 应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 肿瘤组织和癌旁正常组织样本 lncRNA

表达水平分别采用 mean±SE 表示, 应用配对 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2.2.5 shRNA 载体的构建 pLKO.1-TRC Cloning Vector 用 *EcoR* I 和 *Age* I 双酶切, 回收, 将用于构建 shRNA 的寡核苷酸正义链和反义链 95℃ 变性 5min 后, 缓慢降至室温, 使两条寡核苷酸退火结合形成双链, 插入到酶切好的 pLKO.1 质粒中, 16℃ 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 在含有 Ampicillin 的 LB 平板上培养过夜, 挑取单菌落扩大培养, 抽提质粒, 重组质粒经酶切鉴定正确后送至 Invitrogen 公司测序^[13]. 用于构建 shRNA 的寡核苷酸正义链和反义链序列见表 1.

表 1 shRNA 寡核苷酸序列
Tab. 1 shRNA oligo sequences

Name	Sequence
shLINC00941-1 sense	5'-CCGGGGACCAACTATGCTTATAAATCAAGAGATTATAAGCATAGTTGGTCTTTTTTTG-3'
shLINC00941-1 antisense	5'-AATTCAAAAAAGGACCAACTATGCTTATAATCTCTTGAATTATAAGCATAGTTGGTCC-3'
shLINC00941-2 sense	5'-CCGGGCAGAAAGCATAGGCATACTTTCAAGAGAAGTATGCCTATGCTTCTGCTTTTTTTG-3'
shLINC00941-2 antisense	5'-AATTCAAAAAAGCAGAAGCATAGGCATACTTCTCTTGAAGTATGCCTATGCTTCTGCT-3'
Negative control (NC) sense	5'-CCGTACAACAGCCACAACGTCTATCTCGAGATAGACGTTGTGGCTGTTGTATTTTTG-3'
Negative control (NC) antisense	5'-AATTCAAAAATACAACAGCCACAACGTCTATCTCGAGATAGACGTTGTGGCTGTTGTA-3'

2.2.6 细胞生长曲线绘制 在 HCT116 细胞中分别转染 shNC、shLINC00941-1、shLINC00941-2 质粒, 24h 后用含 1.5 μg/mL puromycin 的培养基筛选 48h, 再将相同数量 (1×10^5 个/孔) 的细胞加入 6 孔板中使细胞贴壁生长, 每天每种细胞接入 3 个复孔, 于 1d、2d、3d、4d、5d 分别取 6 孔板的细胞, 进行细胞计数, 绘制细胞生长曲线. 实验组细胞的抑制率 = (对照组细胞数 - 实验组细胞数) / 对照组细胞数 × 100%.

3 结果

3.1 LINC00941 在人类癌症细胞株中的表达

LINC00941 在多种祖细胞终末分化的过程中表达水平显著下调, 暗示其可能参与对祖细胞分化潜能的维持, 而已知多种细胞分化相关 lncRNA 水平与癌症发生发展密切相关, 使我们推测 LINC00941 有可能在一些特定的癌症中异常表达. 因此, 我们检测了 LINC00941 在人类肺癌 (A549 和 NCI-H1299)、肝癌 (Hep3B、HepG2 和 SMMC-7721)、结直肠癌 (HCT116 和 HCT116

p53^{-/-})、乳腺癌 (MCF7 和 SK-BR-3)、宫颈癌 (HeLa)、黑素瘤 (Stilling 和 YUSAC) 细胞和人类正常细胞 HEK-293 中的表达水平, 如图 1. 其中, LINC00941 在结直肠癌细胞中的表达水平最高, 在 HCT116 和 HCT116 p53^{-/-} 细胞中的表达水平分别是 HEK-293 细胞的 274.5 倍和 210.6 倍; LINC00941 在肺癌细胞株 A549、NCI-H1299 和黑素瘤细胞 Stilling 中的表达水平也分别达到 HEK-293 细胞的 75.0 倍、140.0 倍和 69.7 倍.

3.2 LINC00941 在结直肠癌患者肿瘤组织中表达水平显著提高

LINC00941 在结直肠癌细胞中的高表达水平, 提示其与结直肠癌发生发展可能具有一定的关系, 因此我们选取了 17 例结直肠癌患者的组织样本, 检测 LINC00941 在肿瘤组织和癌旁正常组织中相对于 GAPDH 的表达情况, 如图 2. 在 17 例样本中, 肿瘤组织中 LINC00941 的表达平均水平 (0.4655 ± 0.1590) 是癌旁正常组织 (0.05574 ± 0.006608) 的 8.351 倍, 经配对 t 检验分析, 差异具有显著性 ($P<0.05$).

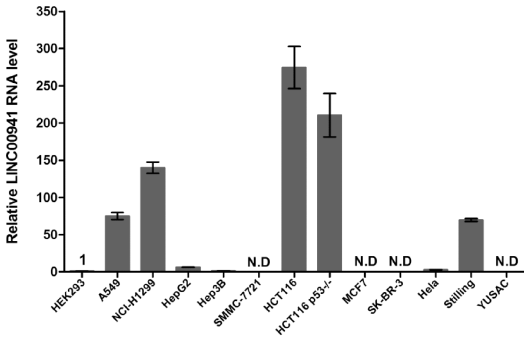


图 1 LINC00941 在 6 种不同类型人类癌症细胞中的表达水平

Fig. 1 Expression level of LINC00941 in 6 types of human cancer cell lines

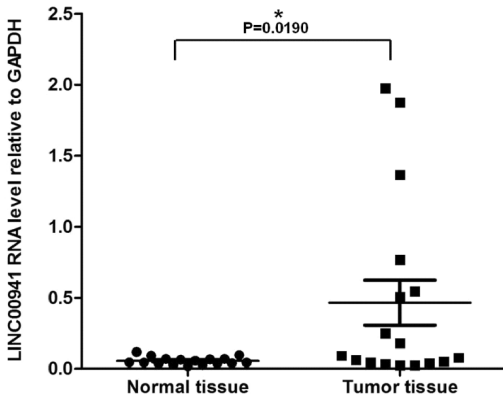


图 2 LINC00941 在结直肠癌患者肿瘤组织中的表达水平显著高于正常组织

Fig. 2 LINC00941 expression levels were significantly increased in tumor compared with paired normal tissues in colorectal cancer

3.3 shRNA 降低 HCT116 细胞中 LINC00941 RNA 水平

为了研究 LINC00941 在结直肠癌细胞中的功能,在 HCT116 细胞中分别转染 shLINC00941-1、shLINC00941-2 和 shNC 载体, puromycin 筛选 48h 后,定量 RT-PCR 检测干扰效果,如图 3. 与对照组相比,转染 shLINC00941-1 和 shLINC00941-2 的 HCT116 细胞中 LINC00941 RNA 水平分别降低至 37.8% 和 44.7%.

3.4 HCT116 细胞中下调 LINC00941 对细胞增殖的影响

shLINC00941-1、shLINC00941-2 和对照质粒 shNC 转染 HCT116 细胞,筛选后以 1×10^5 个细胞/孔接种至 6 孔板,绘制细胞 1d-5d 的生长曲线,如图 4. 结果表明,转染 LINC00941-1 和 LINC00941-2 的 HCT116 细胞增殖速度较对照组减慢,5d 后转染 LINC00941-1 和 LINC00941-2 的

HCT116 细胞相对于对照组细胞的抑制率分别为 39.4% 和 33.8%. 说明 LINC00941 对 HCT116 细胞增殖有促进作用.

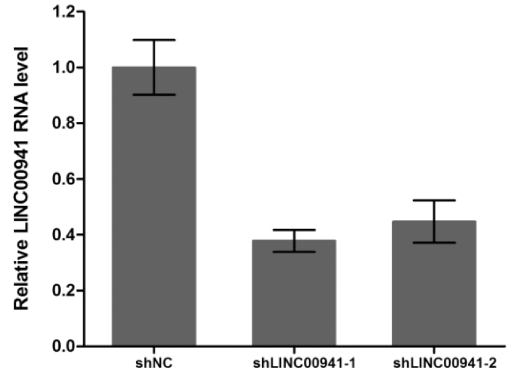


图 3 shRNA 降低 HCT116 细胞中 LINC00941 RNA 水平

Fig. 3 LINC00941 RNA level were decreased by shRNAs in HCT116 cells

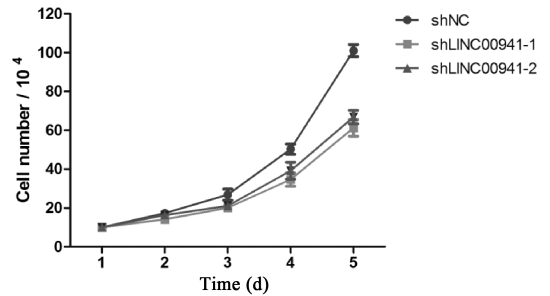


图 4 下调 LINC00941 抑制 HCT116 细胞增殖

Fig. 4 LINC00941 knockdown inhibited HCT116 cells proliferation

4 讨论

结直肠癌的发生与 PTEN (phosphatase and tensin homolog)、hMLH1 (mutL homolog 1)、PMS2 (PMS1 homolog 2, mismatch repair system component) 等基因的突变以及 p53、RAS、MAPK、PI3K、Wnt/ β -catenin 等信号通路有关^[14]. lncRNA 也参与了结肠癌的发生发展,例如 GAS5 (growth arrest specific 5)^[15]、MALAT1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1)^[16]、HOTAIR^[9] 等.

关于癌细胞的来源目前有两种假说,即干细胞的成熟受阻 (maturation arrest) 或成熟细胞的去分化^[17],两种假说均反映出癌细胞具有明显的分化潜能. 组织病理学也根据癌细胞的分化程度对癌症进行分级,癌细胞的分化程度越低其恶性程度就

越高,预后也就越差.因此可以推测,与细胞分化相关的lncRNA很可能也与癌症的发生发展相关.目前,已经发现数十种lncRNA在动物组织器官发育不同阶段的细胞分化过程中发挥重要作用^[18].

本研究选择了一种细胞分化相关lncRNA LINC00941,它在角质形成细胞、成骨细胞等祖细胞终末分化的过程中表达量显著下调^[12],暗示其可能参与维持祖细胞分化潜能,而目前有关其与肿瘤发生发展的关系尚未见报道.本研究通过实时荧光定量PCR对LINC00941在6种不同类型的人类癌症细胞株中的表达水平进行分析,结果发现其在结直肠癌、肺癌和黑素瘤细胞中高水平表达,提示其可能与上述类型癌症的发生发展相关.对结直肠癌患者正常组织和肿瘤组织中LINC00941的表达情况分析结果表明,该lncRNA在患者肿瘤组织中异常高表达.干扰LINC00941抑制结直肠癌HCT116细胞增殖,提示LINC00941对结直肠癌发生发展具有促进作用.本研究证明LINC00941与结直肠癌的发生发展具有一定的相关性,目前有关LINC00941功能的研究仍较少,进一步对LINC00941的功能、作用机制和临床意义进行研究,可能为结直肠癌的诊断和治疗提供依据.

参考文献:

- [1] Wilusz J E, Sunwoo H, Spector D L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world[J]. *Genes Dev*, 2009, 23: 1494.
- [2] Simon M D, Pinter S F, Fang R, *et al.* High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation [J]. *Nature*, 2013, 504: 465.
- [3] Song X, Sun Y and Garen A. Roles of PSF protein and VL30 RNA in reversible gene regulation [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, 102: 12189.
- [4] 兰洋,王慧娟,刘涛,等.人PSF蛋白结合长非编码RNA的筛选及鉴定[J].*四川大学学报:自然科学版*,2011,48:910.
- [5] Kretz M, Siprashvili Z, Chu C, *et al.* Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR [J]. *Nature*, 2013, 493: 231.
- [6] Gutschner T and Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view [J]. *RNA Biol*, 2012, 9: 703.
- [7] Amaral P P, Neyt C, Wilkins S J, *et al.* Complex architecture and regulated expression of the Sox2ot locus during vertebrate development [J]. *RNA*, 2009, 15: 2013.
- [8] Hou Z, Zhao W, Zhou J, *et al.* A long noncoding RNA Sox2ot regulates lung cancer cell proliferation and is a prognostic indicator of poor survival [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 53: 380.
- [9] Gupta R A, Shah N, Wang K C, *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis [J]. *Nature*, 2010, 464: 1071.
- [10] Loewer S, Cabili M N, Guttman M, *et al.* Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells [J]. *Nat Genetics*, 2010, 42: 1113.
- [11] Hou P, Zhao Y, Li Z, *et al.* LincRNA-ROR induces epithelial-to-mesenchymal transition and contributes to breast cancer tumorigenesis and metastasis [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1287.
- [12] Kretz M, Dan E W, Flockhart R J, *et al.* Suppression of progenitor differentiation requires the long noncoding RNA ANCR [J]. *Genes Dev*, 2012, 26: 338.
- [13] 衡鉴,刘涛,高江苓,等.G9a对TMS1基因表观调控作用的研究[J].*四川大学学报:自然科学版*,2015,52:1366.
- [14] Chi Y, Zhou D. MicroRNAs in colorectal carcinoma-from pathogenesis to therapy[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1):1.
- [15] Wentzensen N, Wilz B, Findeisen P, *et al.* Identification of differentially expressed genes in colorectal adenoma compared to normal tissue by suppression subtractive hybridization [J]. *Int J Oncol*, 2004, 24: 987.
- [16] Xu C, Yang M, Tian J, *et al.* MALAT-1: a long non-coding RNA and its important 3' end functional motif in colorectal cancer metastasis [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39: 169.
- [17] Sell S. Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest [J]. *Environ Health Perspect*, 1993, 101(Suppl 5): 15.
- [18] Hu W, Alvarez-Dominguez J R, Lodish H F. Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs [J]. *EMBO Reports*, 2012, 13: 971.