

·论 著·

长链非编码 RNA PGM5-AS1 在结直肠癌中的临床意义及功能研究

吴莉萍 高学仁 王建国

[摘要] 目的 探讨长链非编码 RNA PGM5-AS1 在结直肠癌组织中的表达情况及其对结直肠癌细胞增殖、迁移的影响。方法 通过实时荧光定量 PCR 检测 24 例结直肠癌组及癌旁组、正常人结直肠上皮细胞系 NCM460 及结直肠癌细胞系 SW480、HCT116、Lovo 中 PGM5-AS1 mRNA 的表达。体外构建 PGM5-AS1 过表达载体,转染结直肠癌细胞 SW480、HCT116,构建 PGM5-AS1 过表达细胞模型,采用荧光定量 PCR、CCK-8、细胞划痕实验检测 PGM5-AS1 水平、增殖活力、划痕愈合率。结果 相比癌旁组织,PGM5-AS1 在结直肠癌组织中表达降低($t=11.41, P<0.05$)。3 种结直肠癌细胞系(SW480、HCT116、Lovo)PGM5-AS1 的表达较 NCM460 细胞低(t 分别=6.76、7.28、9.47, P 均 <0.05)。HCT116、SW480 细胞中,过表达组的 PGM5-AS1 mRNA 相对表达量高于空载组(t 分别=5.72、3.47, P 均 <0.05)。过表达组转染 48 h、72 h、96 h 后的细胞增殖活力低于对照组和空载组(t 分别=11.72、13.64; 7.47、9.67; 9.28、7.41, P 均 <0.05);过表达组的划痕愈合率低于对照组和空载组,差异有统计学意义(t 分别=7.73、5.26, P 均 <0.05)。结论 结直肠癌细胞中 PGM5-AS1 表达降低,上调 PGM5-AS1 水平可抑制细胞增殖、迁移能力,可能通过抑制细胞增殖来发挥抑癌功能,成为结直肠癌治疗的潜在靶点。

[关键词] 结直肠癌; PGM5-AS1; 增殖; 迁移

Clinical significance and function of long non-coding RNA PGM5-AS1 in colorectal cancer WU Liping, GAO Xueren, WANG Jianguo. Department of Laboratory Medicine, Jiaxing Maternal and Child Health Hospital, Jiaxing 314000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of long non-coding RNA PGM5-AS1 in colorectal cancer tissues and its effect on the proliferation and migration of colorectal cancer cells. **Methods** The expression of PGM5-AS1 mRNA was detected by real-time quantitative PCR in 24 cases of colorectal cancer and adjacent, normal colorectal epithelial cell lines NCM460, colorectal cancer cell lines SW480, HCT116, and Lovo. PGM5-AS1 overexpression vector was constructed in vitro and transfected into colorectal cancer cells SW480 and HCT116 to construct PGM5-AS1 overexpression cell model. The level of PGM5-AS1, proliferation activity and scratch healing rate were detected by qPCR, CCK-8 and scratch assay. **Results** Compared with the tissue adjacent to carcinoma, the expression of PGM5-AS1 decreased in colorectal cancer tissues ($t=11.41, P<0.05$). The expression of PGM5-AS1 in three colorectal cancer cell lines (SW480, HCT116, Lovo) was lower than that in NCM460 cell lines ($t=6.76, 7.28, 9.47, P<0.05$). In HCT116 and SW480 cells, the expression level of PGM5-AS1 in overexpression group was higher than that in no-load group ($t=5.72, 3.47, P<0.05$). After transfection for 48h, 72h and 96h, the proliferation activity of overexpression group was lower than that of control group and no-load group ($t=11.72, 13.64, 7.47, 9.67, 9.28, 7.41, P<0.05$). The scar healing rate of the overexpression group was lower than that of the control group and the no-load group ($t=7.73, 5.26, P<0.05$). **Conclusion** The expression of PGM5-AS1 in colorectal cancer cells is decreased. Up-regulation of PGM5-AS1 level could inhibit the ability of pro-

liferation and migration of colorectal cancer cells, which may play a role in tumor suppression by inhibiting cell proliferation, and may be a potential target for the treatment of colorectal cancer.

[Key words] colorectal cancer; PGM5-AS1; proliferation; migration

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2021.006.003

基金项目:嘉兴市科技计划项目(2020AY10029、2020AD10030);浙江省自然科学基金(LQ21H160040)

作者单位:314000 浙江嘉兴,嘉兴市妇幼保健院检验科(吴莉萍),中心实验室(王建国);上海交通大学附属新华医院普外科(高学仁)

通讯作者:王建国, Email: srsywjg@163.com

结直肠癌是一种严重威胁人类健康的消化系统恶性肿瘤,近年来其发病率和死亡率呈增长趋势^[1]。结直肠癌发病率存在明显的地域差异,其中亚非地区最低^[2,3]。我国结直肠癌发病率约占全球结直肠癌发病的18.6%^[2],其中江苏、上海等高发省市的结直肠癌发病率已接近甚至超过西方发达国家^[4]。基于结直肠癌发现晚、侵袭性强、致病机制复杂等特性^[5],深入研究结直肠癌诊断标志物及其分子致病机理有重要意义,可为我国结直肠癌预防、诊断和治疗提供新的思路和方案。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于200个核苷酸的非编码RNA,并在多种癌症的发生发展中发挥关键作用^[6,7]。有报道显示,lncRNAs的异常表达与结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等恶性肿瘤的发生有关^[8-12]。PGM5-AS1是近年来新发现的lncRNA,已有研究报道该基因在食管癌、非小细胞肺癌、胃癌等多种肿瘤中表达降低^[13],然而尚未有关于PGM5-AS1在结直肠癌中的表达及具体的生物学功能研究。因此,本次研究通过对PGM5-AS1组织/细胞表达进行研究,探究其对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响,报道如下。

1 材料与方法

1.1 组织标本 结直肠癌及癌旁组织cDNA标本均由上海交通大学医学院高学仁教授惠赠。本次研究时间为2019年6月至2020年6月。

1.2 结直肠癌细胞系 人结直肠癌细胞系NCM460、SW480、HCT116、Lovo购自于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.3 主要试剂 pCDNA3.1-PGM5-AS1过表达载体由上海生物工程股份有限公司构建。CCK-8细胞增殖检测试剂盒(由上海碧云天生物技术有限公司生产);胎牛血清(由美国Gibco公司生产);DMEM、RPMI1640培养基(由美国Gibco公司生产);TRIzol[由生物工程(上海)股份有限公司生产];转染试剂Lipofectamine 2000由(Thermo公司生产);逆转录试剂盒5X PrimeScript™ RT Master Mix(由TaKaRa公司生产);Real-time PCR试剂qPCR SYBR Master Mix(No Rox)(由YEASEN公司生产);所有引物均在上海生工科技有限公司合成。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养SW480、HCT116细胞,含10%胎牛血清的

RPMI1640培养基培养Lovo细胞,用含10%马血清的DMEM/F12培养基培养NCM460并各添加0.1 U/L青霉素和0.1 U/L链霉素置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,胰酶消化传代。

1.4.2 细胞转染和分组 当细胞生长状态良好,并且细胞密度达到80%~90%时将细胞消化后按每孔 5×10^5 个细胞接种至6孔板中,待细胞生长到70%~80%融合时,将目的质粒(4 μg)稀释在250 μl无血清RPMI1640中,6 μl Lipofectamine 2000稀释在250 μl无血清RPMI1640中,然后两者混合,37℃孵育20 min转入细胞中,置于37℃、5%CO₂培养箱,培养6 h后更换新鲜的10%胎牛血清RPMI1640完全培养基。体外向HCT116、SW480细胞转染pCDNA3.1-PGM5-AS1过表达载体(过表达组)或空载体pcDNA3.1-N1(空载组),并设未转染的细胞为对照组。转染48 h后收集细胞提取总RNA用于后续荧光定量PCR检测。

1.4.3 实时荧光定量PCR 取100 mg组织或 1×10^5 个培养细胞,采用TRIzol法提取组织及细胞中总RNA,反转录反应参照PrimeScript™ RT Master Mix反转录试剂盒说明,在10 μl体系中加1 μg总RNA进行cDNA的合成。采用实时定量荧光PCR检测PGM5-AS1表达,实时定量荧光PCR选用2×SYBR Green PCR Mix,取2 μl cDNA作为模板,引物浓度0.4 μmol/L,10 μl体系进行扩增,每个待测样本设置4个平行样,根据目标基因设计合成相应上下游引物进行PCR扩增,以β-actin作为内参照。引物序列见表1。4次独立实验后得到的数据运用公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行分析。

表1 实时荧光定量PCR引物序列

目的基因	序列
PGM5-AS1	
上游	5'-TGTTGTGAGCCTGCGAAAGA-3'
下游	5'-CATTCTCTTACCCGGCCCTG-3'
β-actin	
上游	5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'
下游	5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'

1.4.4 CCK-8 将已转染pCDNA3.1-PGM5-AS1过表达载体(过表达组),空载体pcDNA3.1-N1(空载组)及未转染的细胞(对照组)培养24 h后胰酶消化计数,重悬于完全培养基中,调整浓度至20个/μl,以每孔100 μl加入96孔板中,每组设5个

复孔。每孔加入10 μ l CCK-8溶液置于培养箱中孵育2 h后测量其在450 nm波长处的吸光度值,连续测量0 h、24 h、48 h、72 h和96 h吸光度值。

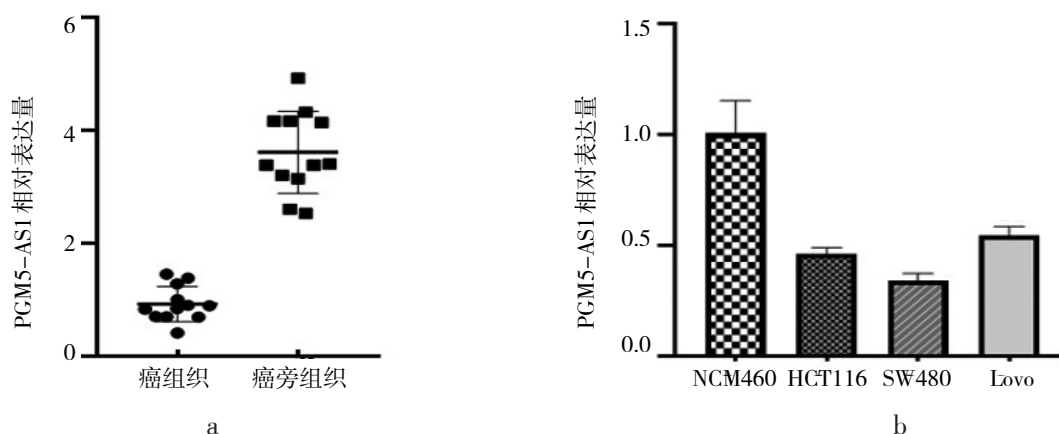
1.4.5 细胞划痕实验 细胞转染后消化吹打成细胞悬液,接种于6孔板过夜,每孔接种密度为 5×10^5 个/孔,第2天用100 μ l枪头垂直6孔板划线,磷酸盐缓冲液冲洗脱落细胞,加入2 ml无血清RPMI1640基础培养基中,24 h后倒置显微镜下拍

照并测量划痕宽度。实验重复3次。

1.5 统计学方法 采用SPSS 22.0进行统计学分析,计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,图表通过Graphpad prism 7绘制,两组之间比较采用 t 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PGM5-AS1在结直肠癌组织及细胞系中的表达见图1



注:a为PGM5-AS1在结直肠癌组织中的表达;b为PGM5-AS1在不同细胞系中的表达。

图1 PGM5-AS1在结直肠癌组织及细胞系中的表达

由图1 a可见,相比正常癌旁组织,PGM5-AS1在结直肠癌组织中表达明显降低($t=11.41, P < 0.05$)。由图1 b可见,结直肠癌细胞系(HCT116、SW480、Lovo)较正常结肠上皮细胞系(NCM460)PGM5-AS1的表达水平明显降低(t 分别=6.76、7.28、9.47, P 均 < 0.05)。本研究选取PGM5-AS1表达水平相对较低的结直肠癌细胞系SW480进行后续实验。

2.2 构建PGM5-AS1过表达结直肠癌细胞系 荧光定量PCR检测结果显示,在HCT116、SW480细胞中,过表达组的PGM5-AS1 mRNA相对表达量均高于空载组(t 分别=5.72、3.47, P 均 < 0.05)。HCT116、SW480细胞的过表达效率分别为 $(2.72 \pm 0.05)\%$ 、 $(3.27 \pm 0.06)\%$ 。说明构建PGM5-AS1过表达模型成功,可用于后续功能实验。

2.3 过表达PGM5-AS1对SW480细胞增殖的影响见图2

由图2可见,转染24 h后,过表达组与对照组吸光度没有明显差异($t=0.37, P > 0.05$);与对照组和空载组比较,过表达组转染48 h、72 h、96 h后的细胞增殖活力降低(t 分别=11.72、13.64、7.47、9.67、9.28、7.41, P 均 < 0.05),对照组和空载组转染48 h、72 h、96 h后增殖活力比较,差异均无统计学意义(t 分别

=0.65、0.42、0.71, P 均 > 0.05)。

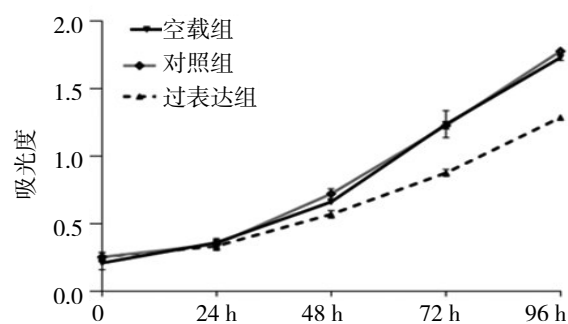


图2 过表达PGM5-AS1对SW480细胞增殖的影响

2.4 过表达PGM5-AS1对SW480细胞迁移的影响见图3

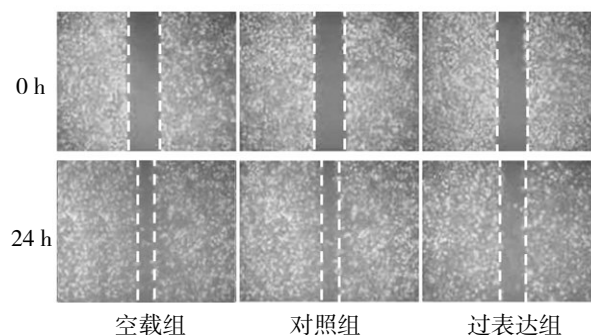


图3 过表达PGM5-AS1对SW480细胞迁移的影响

由图3可见,过表达组的划痕愈合率低于对照组和空载组(t 分别=7.73、5.26, P 均 <0.05),而对照组和空载组划痕愈合率比较,差异无统计学意义($t=0.21$, $P>0.05$)。

3 讨论

外科手术切除对于早期结直肠癌患者可以做到根治,对于中晚期患者,术后辅助应用化疗及靶向治疗等方法在一定程度上改善患者预后^[14]。目前有研究证实lncRNA在包括结直肠癌在内的多种癌症类型中参与癌症细胞转录及转录后调控等过程,在细胞增殖、凋亡、侵袭中发挥重要作用,可作为肿瘤早期诊断和预后的标志物^[15,16]。lncRNA PGM5基因被发现在肺癌、乳腺癌、食管癌、结直肠癌中显著低表达,lncRNA PGM5基因表达上调抑制了细胞增殖和凋亡,表明lncRNA PGM5基因作为肿瘤抑制因子发挥作用^[17]。PGM5-AS1是一种由位于人类第9号染色体蛋白编码基因PGM5反义链的lncRNA^[18]。有文献报道PGM5-AS1在前列腺癌中低表达^[19]。Zhang等^[20]通过TCGA数据库分析发现乳腺癌中,PGM5-AS1等7个lncRNAs出现差异表达。然而关于PGM5-AS1在结直肠癌中的作用机制不明显。

本次研究前期通过TCGA数据库发现PGM5-AS1在结直肠癌组织中呈低表达。本次研究采集临床结直肠癌组织样本利用实时定量PCR技术检测PGM5-AS1的表达,结果显示,PGM5-AS1在结直肠癌组织中的表达较癌旁组织相比显著下调(P 均 <0.05)。体外细胞检测PGM5-AS1在正常人结直肠上皮细胞(NCM460)以及不同结直肠癌细胞(HCT116、SW480、Lovo)的表达情况,结果显示,PGM5-AS1在结直肠癌细胞株中的表达较正常结直肠上皮细胞表达显著下调。本次研究为进一步探究PGM5-AS1在结直肠癌中的调控机制和生物学功能,选用PGM5-AS1表达下降最明显的SW480细胞株作为后续研究对象,通过构建pCDNA3.1-PGM5-AS1过表达载体瞬时转染SW480和HCT116细胞株,检测PGM5-AS1表达对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响。结果显示,PGM5-AS1表达上调后,SW480细胞的增殖能力显著下降,细胞划痕愈合减弱,即PGM5-AS1可能通过抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移过程,发挥其抑癌功效。

综上所述,结直肠癌细胞中PGM5-AS1表达降低并发挥抑癌基因的作用,上调PGM5-AS1水

平可抑制肿瘤细胞增殖、迁移能力,这进一步说明了PGM5-AS1在调节结直肠癌细胞的生长、组织的恶化和发展过程中的潜在靶点作用,为结直肠癌相关药物的开展及潜在治疗靶点提供理论支持。

参考文献

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. 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 Stewart BW, Wild CP. World cancer report 2014. Lyon: international agency for research on cancer, 2014. https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=dbc90044016fde378cf9dc9ab30a96a9&site=xueshu_se
- 3 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5):E359-E386.
- 4 Chen W, Zheng R, Baade PD. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- 5 Wang CN, Wang JN, Chen ZL, et al. Immunohistochemical prognostic markers of esophageal squamous cell carcinoma: A systematic review[J]. Chin J Cancer, 2017, 36(1):65.
- 6 Peng WX, Koirala P, Mo YY. lncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J]. Oncogene, 2017, 36(41):5661-5667.
- 7 Mattick JS, Rinn JL. Discovery and annotation of long noncoding RNAs[J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(1):5-7.
- 8 Sadeghpour S, Ghorbian S. Evaluation of the potential clinical prognostic value of lncRNA-BANCR gene in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(1):991-995.
- 9 Luo K, Geng J, Zhang Q, et al. lncRNA CASC9 interacts with CPSF3 to regulate TGF- β signaling in colorectal cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):249.
- 10 Arun G, Spector DL. MALAT1 long non-coding RNA and breast cancer[J]. RNA Biol, 2019, 16(6):860-863.
- 11 Li S, Mei Z, Hu HB, et al. The lncRNA MALAT1 contributes to non-small cell lung cancer development via modulating miR-124/STAT3 axis[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9):6679-6688.
- 12 Xu F, Zha G, Wu Y, et al. Overexpressing lncRNA SNHG16 inhibited HCC proliferation and chemoresistance by functionally sponging hsa-miR-93[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11:8855-8863.

(下转第505页)

- 11 Wake C, Labadorf A, Dumitriu A, et al. Novel microRNA discovery using small RNA sequencing in post-mortem human brain[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 776.
- 12 Schiranzi T, Di Lazzaro G, Sancesario GM, et al. Young-onset and late-onset Parkinson's disease exhibit a different profile of fluid biomarkers and clinical features[J]. *Neurobiol Aging*, 2020, 90(1): 119–124.
- 13 Yilmaz SG, Geyik S, Neyal AM, et al. Hypothesis: Do miRNAs targeting the leucine-rich repeat kinase 2 gene (LRRK2) influence Parkinson's disease susceptibility? [J]. *OMICS*, 2016, 20(4): 224–228.
- 14 Giudice V, Banaszak LG, Gutierrez-Rodriguez F, et al. Diagnostic and prognostic roles of circulating exosomal microRNAs in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes[J]. *Haematologica*, 2018, 103(7): 1150–1159.
- 15 Barcelo M, Mata A, Bassas L, et al. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue[J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(6): 1087–1098.
- 16 Xu Q, Zhu Q, Zhou Z, et al. MicroRNA-876-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting BCL6 corepressor like 1[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 645–652.
- 17 Sekar S, Taghibiglou C. Elevated nuclear phosphatase and tensin homolog (PTEN) and altered insulin signaling in substantia nigral region of patients with Parkinson's disease[J]. *Neurosci Lett*, 2018, 666: 139–143.
- 18 Torra A, Parent A, Cuadros T, et al. Overexpression of TFEB drives a pleiotropic neurotrophic effect and prevents parkinson's disease-related neurodegeneration[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(6): 1552–1567.
- 19 Lang AE, Espay AJ. Disease modification in Parkinson's disease: Current approaches, challenges, and future considerations[J]. *Mov Disord*, 2018, 33(5): 660–677.
- 20 Osier N, Motamedi V, Edwards K, et al. Exosomes in acquired neurological disorders: New insights into pathophysiology and treatment[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(12): 9280–9293.

(收稿日期 2020-12-08)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第492页)

- 13 Slaby O, Laga R, Sedlacek O. Therapeutic targeting of non-coding RNAs in cancer[J]. *Biochem J*, 2017, 474(24): 4219–4251.
- 14 Xu J, Cao J, Wang Y, et al. Novel preoperative nutritional assessment tool and prognostic model for ESCC patients [J]. *J Cancer*, 2019, 10(17): 3883–3892.
- 15 Wang WW, Wei CG, Li P, et al. Integrative analysis of mRNA and lncRNA profiles identified pathogenetic lncRNAs in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Gene*, 2018, 661: 169–175.
- 16 Zhao ZH, Wang WW, Niu LH, et al. P53-induced long non-coding RNA PGM5-AS1 inhibits the progression of esophageal squamous cell carcinoma through regulating miR-466/PTEN axis[J]. *UBMB Life*, 2019, 71(10): 1492–1502.
- 17 Uzozie AC, Selevsek N, Wahlander A, et al. Targeted proteomics for multiplexed verification of markers of colorectal tumorigenesis[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(3): 407–427.
- 18 Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2003, 22(39): 8031–8041.
- 19 夏前林, 单孟林, 丁滔, 等. 前列腺癌差异表达基因的筛选及相互作用的生物信息学分析[J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(3): 169–176.
- 20 Zhang X, Zhuang J, Liu L, et al. Integrative transcriptome data mining for identification of core lncRNAs in breast cancer [J/OL]. *Peer J*, 2019[2019-11-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC31608179>.

(收稿日期 2020-11-30)

(本文编辑 蔡华波)