

Lnc SNHG16 通过调控 miR-140-5p/wnt1 对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响

李晓燕, 张启芳, 陈卓琳, 唐澄海, 张海莲

(广西壮族自治区南溪山医院, 广西 桂林 541002)

摘要: [目的] 探讨了 Lnc SNHG16 通过 miR-140-5p/wnt1 对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响。 [方法] 选取结直肠癌肿瘤组织和癌旁组织各 102 例, 采用荧光定量 PCR 检测 Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 表达水平和两者间的关系。采用生物信息学和双荧光素酶报告基因分析 Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 之间的关系以及靶基因; 在结肠癌细胞系 SW480 建立 Lnc SNHG16 敲降和 miR-140-5p 过表达细胞系, 采用 Western blot 分析 Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 对目的蛋白的影响; 采用 CCK8 分析不同处理结肠癌细胞增殖; 采用 Transwell 分析不同处理的结肠癌细胞的迁移。 [结果] 与癌旁组织相比, 结直肠癌组织中 Lnc SNHG16 表达水平显著增加, 而 miR-140-5p 表达水平显著下调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。生物信息学研究发现 Lnc SNHG16 调控着 miR-140-5p 的表达水平, 并调控 wnt1 蛋白的表达, 调节 WNT/ β -Catenin 信号通路活性。Lnc SNHG16 敲降或过表达 miR-140-5p 可显著抑制 SW480 细胞的增殖和迁移, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。 [结论] Lnc SNHG16 通过靶向作用于 miR-140-5p/wnt1 轴进而调节着结直肠癌细胞的增殖和迁移。

关键词: Lnc SNHG16; miR-140-5p; wnt1; 结直肠肿瘤; 增殖; 迁移

中图分类号: R735.3⁺5; R735.3⁺7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)06-0506-05
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.06.B008

Effects of Lnc SNHG16 on Proliferation and Migration of Colorectal Cancer Cells through MiR-140-5p/wnt1

LI Xiao-yan, ZHANG Qi-fang, CHEN Zhuo-lin, TANG Cheng-hai, ZHANG Hai-lian
(Nanxishan Hospital, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of Lnc SNHG16 on proliferation and migration of colorectal cancer cells and its mechanism. [Methods] The expression levels of Lnc SNHG16 and microRNA-140-5p in cancer tissues and adjacent colorectal tissues from 102 patients with colorectal cancer were detected by fluorescence quantitative PCR. Bioinformatics and double luciferase reporter gene were used to analyze the relationship between Lnc SNHG16 and microRNA-140-5p and target genes. Lnc SNHG16 knockdown and microRNA-140-5p overexpression cell lines were established from colon cancer cell line SW480. The effects of Lnc SNHG16 and microRNA-140-5p on target proteins were analyzed by Western blot. CCK8 was used to analyze the proliferation of colon cancer cells with different treatments, and Transwell was used to analyze the migration of colon cancer cells with different treatments. [Results] Compared with the adjacent colorectal tissues, the expression of Lnc SNHG16 was significantly increased in colorectal cancer tissues, while the expression of miR-140-5p was significantly decreased ($P < 0.05$). Bioinformatics studies found that Lnc SNHG16 regulated the expression of microRNA-140-5p, the expression of Wnt1 protein and the activity of WNT/ β -Catenin signaling pathway. Down-regulation or overexpression of microRNA-140-5p in Lnc SNHG16 significantly inhibited the proliferation and migration of SW480 cells ($P < 0.05$). [Conclusion] Lnc SNHG16 regulates the proliferation and migration of glioma cells by targeting the microRNA-140-5p/wnt1 axis.

Subject words: Lnc SNHG16; microRNA-140-5p; wnt1; colorectal cancer; proliferation; migration

结直肠癌是临床常见的消化道肿瘤之一, 其发

病率近年呈上升趋势, 已成为严重影响人类健康的疾病类型之一^[1]。目前结直肠癌的治疗以手术为主, 辅以放疗、化疗及生物治疗等综合性治疗, 但是结肠癌 5 年生存率仍低于 50%。术后转移和复发是造成结直肠癌患者死亡的主要原因, 因此深入探讨结直

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题 (Z2011029)

通信作者: 李晓燕, 副主任医师, 硕士; 广西壮族自治区南溪山医院
消化内科, 广西壮族自治区桂林市象山区崇信路 46 号
(541002); E-mail: zhuoyuliyang@163.com

收稿日期: 2019-05-31; **修回日期:** 2019-08-16

肠癌的发病和发展机制具有重要意义。长非编码 RNA(long non-coding RNA,LncRNA)是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA^[2-3]。研究表明,LncRNA 在剂量补偿效应、表观遗传调控、细胞周期调控和细胞分化调控等众多生命活动中发挥重要作用^[4-5]。Lnc SNHG16 作为众多 LncRNA 家族成员之一,研究发现,其在多种肿瘤组织中如胃癌、结直肠癌和肺癌中呈高表达状态,并参与了肿瘤的发生、发展和转移^[6-8]。Lnc SNHG16 是否在结直肠癌中异常表达目前尚不清楚。本研究从临床和细胞生物学角度分析 Lnc SNHG16 对结直肠癌发生和发展的影响。

1 材料与方法

1.1 临床材料

选取我院 2010 年 6 月至 2018 年 6 月手术切除的 102 例结肠癌标本和癌旁组织作为研究对象。所有患者均在手术前接受过放疗和化疗,均经术后病理。102 例患者中男性 62 例,女性 40 例;年龄 35~81 岁,平均年龄 57.2 ± 10.31 岁;结肠癌 67 例,直肠癌 35 例;分化程度:高分化 33 例,中分化 52 例,低分化 17 例;肿瘤侵袭至基层 32 例,侵袭至浆膜及浆膜外 70 例;有淋巴结转移 57 例,无淋巴结转移 45 例。所有患者均签署知情同意书,本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 实验材料

SW480 结肠癌细胞系购自美国 ATCC 公司;DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶以及青链霉素均购自美国 Hyclone 生物有限公司;Transwell 购自美国 Corning 公司;plko-Lnc SNHG16 shRNA,plko-Control shRNA,plko-Control miRNA 和 plko-miR-140-5p-539 慢病毒载体构建以及病毒包装均由上海杰瑞生物有限公司完成;Wnt1 和 β -Catenin 单克隆抗体和 HRP 标记羊抗小鼠二抗均购自美国 Santa cruz 公司;miRNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒购自南京诺唯赞生物有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 稳定细胞系构建

结肠癌细胞系 SW480 采用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)复苏并培养至指数生长期,细胞采用 0.25%胰酶消化,密度调整为 2×10^6 个/ml,接种于 6 孔板中,每孔 100 μ l。待细胞贴壁后,加入 plko-Lnc

SNHG16 shRNA,plko-Control shRNA,plko-Control miRNA 和 plko-miR-140-5p 慢病毒,细胞和病毒比为 1:50,感染 12h 更换新鲜培养基,并采用慢病毒继续感染 12h,然后更换新鲜培养基培养 48h,更换含有终浓度为 1 μ g/ml 嘌呤霉素的 DMEM 培养基处理 24h,未感染的细胞被杀死,未杀死的细胞则为 Lnc SNHG16 shRNA,Control shRNA,Control miRNA 和 miR-140-5p 稳定表达细胞系,并分别命名为 sh-Control,sh-Lnc SNHG16,miR-Control 和 miR-140-5p。

1.4 荧光定量 PCR 技术

将结肠癌组织和癌旁组织,sh-Control,sh-Lnc SNHG16,miR-Control 和 miR-140-5p 细胞采用 miRNA 提取试剂盒提取 miRNA,并用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。设计 Lnc SNHG16 引物,Lnc SNHG16-F:5'-AATGGTGGTAGGAGGGAGGA-3';Lnc SNHG16:5'-CAAGGGGAATGAACACGAGG-3'; β -actin-F:5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3'; β -actin-F:5'-AATGCTATCACCTCCCCTGTGT-3';miR-140-5p-F:5'-CGGCGGGGAGAAATTATCCT-3';miR-140-5p-R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'。制备 PCR 反应体系:2 $\times$ Sybgreen 预混合物 10 μ l,cDNA 模板 8.8 μ l,上游引物各 0.6 μ l,总体积 20 μ l。PCR 程序如下:预变性,95 $^{\circ}$ C 30s;第二阶段:95 $^{\circ}$ C 10s,60 $^{\circ}$ C 30s,循环数 40 个;第三个阶段建立熔解曲线:95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 60s,95 $^{\circ}$ C 15s。然后在 PCR 结束后直接获取 LncRNA Lnc SNHG16 和 miR-140-5p mRNA 相对表达水平。

1.5 CCK8 细胞增殖分析

sh-Control,sh-Lnc SNHG16,miR-Control 和 miR-140-5p 稳定细胞系采用 0.25%胰酶消化,细胞浓度调整为 5×10^4 个/ml,每个 96 孔板加入 100 μ l,然后培养 6h 使细胞贴壁,分别在贴壁后 0、24、48 和 72h 加入 10 μ l CCK8 试剂,孵育 4h 后在波长 450nm 下检测细胞增殖。

1.6 Transwell 分析细胞迁移

sh-Control,sh-Lnc SNHG16,miR-Control 和 miR-140-5p 稳定细胞系消化后,细胞浓度调整为 1×10^5 个/ml,每个 Transwell 孔上室加入 100 μ l 细胞溶液,下室加入正常 DMEM 细胞培养基 500 μ l,培养 24h,固定细胞,用 1%结晶紫染液室温染色 10min,自来水洗去结晶紫染液,取出上室细胞,在显微镜下观察细胞迁移数量。每个处理取 10 个视野,计算平均迁

移细胞数量。

1.7 双荧光素酶报告基因

根据生物信息学预测 Lnc SNHG16 和 Wnt1 3' UTR 与 miR-140-5p 的结合位点, 设计野生型 Lnc SNHG16 (Lnc SNHG16-WT) 和野生型 Wnt1-3'-UTR (Wnt1-WT) 及缺失 miR-140-5p 结合区域的突变体 Lnc SNHG16 (Lnc SNHG16-Mut) 序列及缺失 miR-140-5p 结合区域的突变体 Wnt1-3'-UTR (SOX4-Mut) 序列, 并构建荧光素酶报告载体。分别将 Lnc SNHG16-WT、Lnc SNHG16-Mut、Wnt1-WT 和 Wnt1-Mut 荧光素酶报告载体转染对照组和实验组细胞, 转染 48 h 后采用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光素酶活性。

1.8 Western blot

收集 sh-Control、sh-Lnc SNHG16、miR-Control 和 miR-140-5p 稳定细胞系, 采用细胞裂解液 (含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂) 在冰上裂解 1h, 15 000r/min 离心 30min, 细胞上清转移至新的离心管, 加入上样缓冲液, 在水浴中煮沸 10min, 采用水平和垂直电泳将蛋白质转移至 PVDF 膜上。结束后, PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h, 采用 5% 脱脂奶粉稀释 Wnt1 小鼠单克隆抗体, 4℃ 孵育过夜, 次日用 PBST 洗涤 3 次, 再用 5% 脱脂奶粉稀释 HRP 标记的羊抗鼠二抗 (1:5000), 在室温孵育 2h, PBST 洗涤 3 次。采用 ECL 发光液, 进行显影, 观察目的蛋白的表达水平。以 Tubulin 作为内参。

1.9 统计学处理

应用 SPSS 15.0 统计软件分析数据, 计量资料采用均数±标准差 (Mean±S) 表示, 采用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 表达水平

与癌旁组织比较, 结直肠癌肿瘤组织中 Lnc SNHG16 表达水平显著增加, 差异有统计学意义 ($t=4.109, P=0.002$)。结直肠肿瘤组织中 miR-140-5p 表达水平较癌旁组织显著下降, 差异有统计学意义 ($t=2.123, P=0.021$)。见 Figure 1。

2.2 Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 对细胞增殖的影响

与 sh-Control 结直肠癌细胞相比, sh-Lnc SNHG16 细胞增殖速度显著下降 ($t=0.3290, P=0.014$)。与 miR-

Control 细胞相比, miR-140-5p 过表达结直肠癌细胞增殖能力显著下降 ($t=0.3117, P=0.012$)。见 Figure 2。

2.3 Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 对细胞迁移的影响

与 sh-Control 结直肠癌细胞相比, sh-Lnc SNHG16 结直肠癌细胞迁移能力明显下降, 差异有统计学意义 ($t=3.143, P=0.002$)。与 miR-Control 结直肠癌细胞相比, miR-140-5p 过表达结直肠癌细胞迁移能力明显下降, 差异有统计学意义 ($t=5.019, P<0.001$)。见 Figure 3。

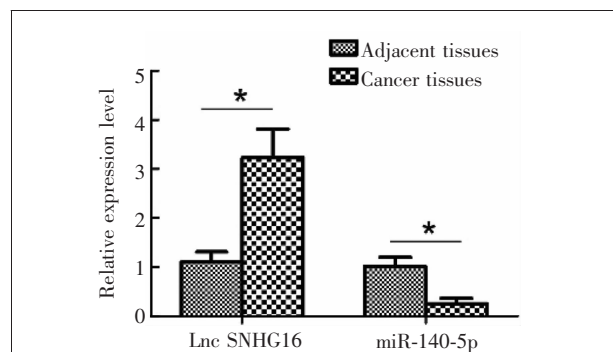


Figure 1 Lnc SNHG16 and miR-140-5p expression levels in colorectal cancer and adjacent tissues (**P*<0.05)

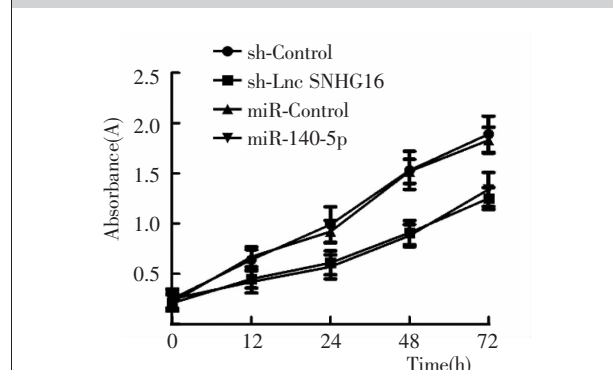


Figure 2 Effects of Lnc SNHG16 and miR-140-5p on proliferation of colon cancer cells

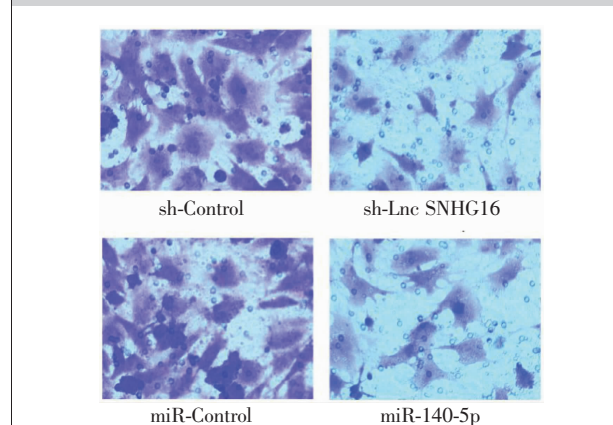


Figure 3 Effects of Lnc SNHG16 and miR-140-5p on the migration of colon cancer cells

2.4 Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 的关系

生物信息学分析显示,Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 存在 10 个互补的碱基。采用双荧光素酶报告基因检测,结果如 Figure 4 显示,miR-140-5p 过表达细胞转染 Lnc SNHG16-WT 后,细胞荧光素酶活性较 miR-Control 组细胞显著下调,差异有统计学意义 ($t=3.117$, $P=0.005$); 对于过表达 miR-Control 或 miR-140-5p 结直肠癌细胞,转染 Lnc SNHG16-Mut 后,两组细胞荧光素酶活性比较差异无统计学意义($t=0.719$, $P=0.341$)。

2.5 miR-140-5p 靶基因分析

生物信息学分析显示,miR-140-5p 与 Wnt1 3' UTR 区域存在 7 个互补碱基。双荧光素酶分析结果如 Figure 5 所示,miR-140-5p 过表达细胞转染 Wnt1-WT 后,细胞荧光素酶活性较 miR-Control 组细胞显著下调,差异有统计学意义 ($t=3.091$, $P=0.004$); 无论是 miR-Control 还是 miR-140-5p 细胞,转染 Wnt1-Mut 后,两组细胞荧光素酶活性差异无统计学意义($t=0.891$, $P=0.201$)。

2.6 Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 对 Wnt/ β -Catenin 信号通路的影响

与 sh-Control 和 miR-Control 比较,sh-Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 细胞中 Wnt1 蛋白表达水平降低。与 sh-Control 和 miR-Control 比较,sh-Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 细胞中 β -Catenin 蛋白表达水平无明显差异,而与 sh-Control 和 miR-Control 比较,sh-Lnc SNHG16 和 miR-140-5p 细胞中磷酸化 β -Catenin 蛋白表达水平显著下调。见 Figure 6。

3 讨论

结直肠癌是常见消化道肿瘤类型,其进展快,预后差。术后复发和转移是导致患者死亡的主要因素。LncRNA 已经证实在人类多种肿瘤中扮演着抑癌基

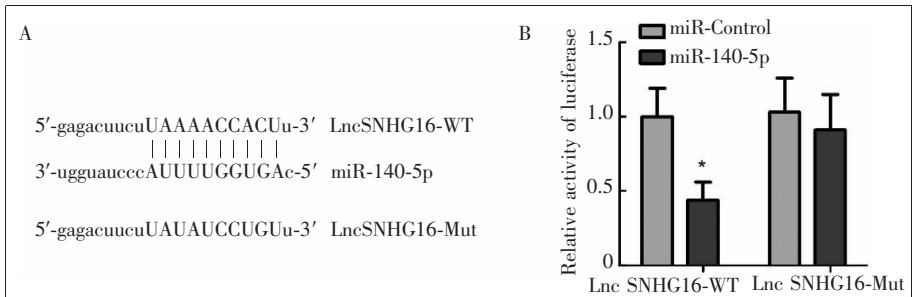


Figure 4 Luciferase analysis of the relationship between Lnc SNHG16 and miR-140-5p

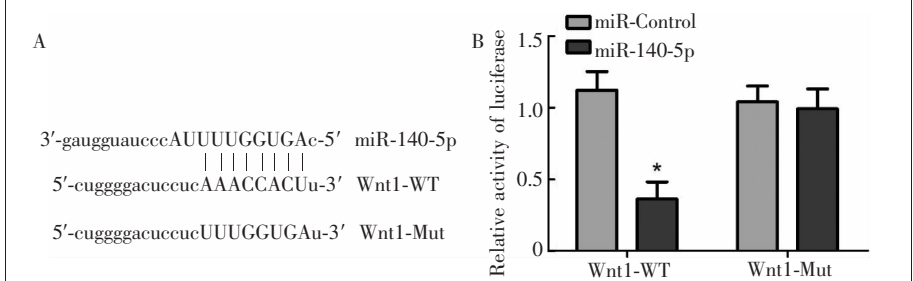


Figure 5 The effect of miR-140-5p on target gene Wnt1 by double luciferase assay

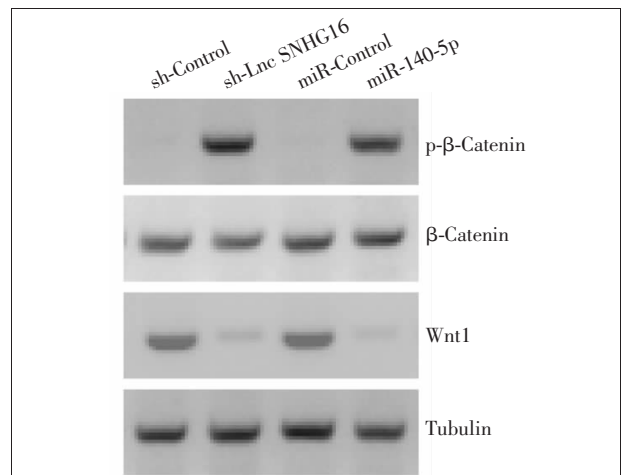


Figure 6 Effects of Lnc SNHG16 and miR-140-5p on Wnt/beta-Catenin signaling pathway

因或致癌基因的角色。LncRNA 主要作用方式是靶向 miRNA,调控 miRNA 的表达水平,进而调控下游目的基因表达^[9]。大量研究显示 LncRNA 调控结直肠癌的发生、发展和迁移^[10-11]。

研究显示 Lnc SNHG16 在多种肿瘤组织中呈现异常表达,并与患者临床病理特征和预后密切相关。机制研究显示 Lnc SNHG16 通过调控 miR-146-5p、miR-423-5p 和 miR-1031 等对肿瘤生长、发展、凋亡和迁移发挥作用^[12-14]。我们对结直肠癌和癌旁组织

进行高通量分析显示, Lnc SNHG16 表达水平显著增加, 而 miR-140-5p 表达水平显著下调, 实验进一步采用荧光定量 PCR 技术确定在结直肠癌中 Lnc SNHG16 表达水平显著上调, 而 miR-140-5p 表达水平则显著下调。进一步在细胞水平上采用 shRNA 敲降 Lnc SNHG16 或者过表达 miR-140-5p 均导致结肠癌细胞增殖和迁移能力的下降, 说明两者与结直肠癌细胞的增殖和迁移具有密切的关系。

根据 LncRNA 与 miRNA 作用模式, 生物信息学研究发现, Lnc SNHG16 与 miR-140-5p 之间存在着序列互补, 推测可能 Lnc SNHG16 调节着 miR-140-5p 的生物学功能。采用荧光素酶报告基因研究显示 Lnc SNHG16 3' UTR 可与 miR-140-5p 结合, 当 Lnc SNHG16 与 miR-140-5p 竞争性结合后, 会导致 miR-140-5p 与靶基因的结合减少, 进而导致下游基因表达异常。生物信息学研究还显示 miR-140-5p 与 Wnt1 3' UTR 7 个碱基存在互补, 提示 miR-140-5p 可能通过调节 Wnt1 的蛋白表达发挥生物学作用。Wnt1 蛋白是 Wnt/ β -Catenin 信号通路成员之一, 其在细胞增殖、分化和凋亡过程中发挥着重要的作用^[15-16]。目前研究发现 Wnt1/ β -Catenin 在多种肿瘤组织中表达上调^[17-18]。本研究发现 Lnc SNHG16 敲降或 miR-140-5p 过表达会导致 Wnt1 水平显著下调, 最终导致 Wnt1/ β -Catenin 信号通路活性下降。

综上, 本研究结果显示 Lnc SNHG16 通过竞争性结合 miR-140-5p, 导致 miR-140-5p 与 Wnt1 基因 3' UTR 的结合减少, 进而导致 Wnt1 表达上调, 激活 Wnt/ β -Catenin 信号通路, 进而促进了结肠癌的增殖和迁移。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Kondo Y, Shinjo K, Katsushima K. Long non-coding RNAs as an epigenetic regulator in human cancers [J]. Cancer Sci, 2017, 108(10): 1927-1933.
- [3] Youness RA, Gad MZ. Long non-coding RNAs: Functional regulatory players in breast cancer [J]. Noncoding RNA Res, 2019, 4(1): 36-44.
- [4] Wei JW, Huang K, Yang C, et al. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review)[J]. Oncol Rep, 2017, 37(1): 3-9.
- [5] Dey BK, Mueller AC, Dutta A. Long non-coding RNAs as

emerging regulators of differentiation, development, and disease[J]. Transcription, 2014, 5(4): e944014.

- [6] Guo Z, Zhang J, Fan L, et al. Long noncoding RNA (lncRNA) small nucleolar RNA host gene 16 (SNHG16) predicts poor prognosis and sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 2079-2086.
- [7] Liu S, Zhang W, Liu K, et al. LncRNA SNHG16 promotes tumor growth of pancreatic cancer by targeting miR-218-5p[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 114: 108862.
- [8] Li Y, Lu Y, Chen Y. Long non-coding RNA SNHG16 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer via sponging miR-200a-3p [J]. Biosci Rep, 2019, 39(5): pii: BSR20182498.
- [9] Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements[J]. Nature, 2011, 470(7333): 284-288.
- [10] Xie SD, Qin C, Jin LD, et al. Long noncoding RNA SNHG14 promotes breast cancer cell proliferation and invasion via sponging miR-193a-3p [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(6): 2461-2468.
- [11] Sun W, Yang Y, Xu C, et al. Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs on gene expression in cancers [J]. Cancer Genet[J]. 2017, 216-217: 105-110.
- [12] Zhou Z, Zhu Y, Gao G, et al. Long noncoding RNA SNHG16 targets miR-146a-5p/CCL5 to regulate LPS-induced WI-38 cell apoptosis and inflammation in acute pneumonia[J]. Life Sci, 2019, 228: 189-197.
- [13] Liu H, Chen B, Zhu Q. Long non-coding RNA SNHG16 reduces hydrogen peroxide-induced cell injury in PC-12 cells by up-regulating microRNA-423-5p [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 1444-1451.
- [14] Wang X, Hu K, Chao Y, et al. LncRNA SNHG16 promotes proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells by targeting miR-1301/BCL9 axis [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 114: 108798.
- [15] Zhang Z, Wang X, Zhang L, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway in trophoblasts and abnormal activation in preeclampsia (Review) [J]. Mol Med Rep, 2017, 16 (2): 1007-1013.
- [16] Wang X, Zhang Z, Zeng X, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway in severe preeclampsia[J]. J Mol Histol, 2018, 49(3): 317-327.
- [17] Rahmani F, Avan A, Hashemy SI, et al. Role of Wnt/ β -catenin signaling regulatory microRNAs in the pathogenesis of colorectal cancer [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(2): 811-817.
- [18] Schneider JA, Logan SK. Revisiting the role of Wnt/ β -catenin signaling in prostate cancer [J]. Mol Cell Endocrinol, 2018, 462(Pt A): 3-8.