

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.001>

· 论著 ·

长链非编码 RNA KCNQ1OT1 靶向调控 miR-218-5p 对结肠癌 细胞生物学行为的影响

张祎, 陈畅

(宜昌市第一人民医院, 三峡大学人民医院消化内科, 湖北 宜昌 443000)

[摘要] 目的: 探讨长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1(lncRNA KCNQ1OT1)调控micro RNA-218-5p(miR-218-5p)对结直肠癌细胞恶性生物学行为的影响及其可能机制。方法: 收集2019年1月至4月在宜昌市第一人民医院行根治性结肠癌切除术的30例肿瘤组织和相应的癌旁正常组织。采用实时荧光定量PCR法(qRT-PCR)检测lncRNA KCNQ1OT1, miR-218-5p在结肠癌组织、癌旁正常组织、5种结直肠癌细胞系(HCT-116, SW480, SW620, DLD-1, HT29)及正常结肠上皮细胞系CCD841中的表达水平; 干预结肠癌细胞系HCT-116和SW480中lncRNA KCNQ1OT1和miR-218-5p的表达, 采用CCK-8法检测结肠癌细胞的增殖, Transwell法检测结肠癌细胞的迁移和侵袭; 采用流式细胞术检测细胞周期分布及细胞凋亡率; 用Starbase数据库预测lncRNA KCNQ1OT1的靶向miRNA, 并用qRT-PCR、双荧光素酶报告基因法验证lncRNA KCNQ1OT1与miR-218-5p的靶向关系。结果: 与癌旁正常组织和正常结肠上皮细胞系相比, 结直肠癌组织和结直肠癌细胞系中lncRNA KCNQ1OT1的表达水平显著上调, miR-218-5p的表达显著下调($P < 0.05$); 过表达lncRNA KCNQ1OT1促进SW480细胞的增殖、迁移和侵袭, 且减少处于 G_0/G_1 期的细胞比率, 抑制细胞凋亡; 在结直肠癌组织中lncRNA KCNQ1OT1的表达水平与miR-218-5p的表达水平呈负相关($r^2 = 0.437$, $P < 0.001$); 双荧光素酶报告基因法分析证实lncRNA KCNQ1OT1能特异性结合miR-218-5p, 并能降低其表达; 过表达miR-218-5p抑制HCT-116细胞的增殖、迁移和侵袭, 增加处于 G_0/G_1 期的细胞比率, 促进细胞凋亡, 且miR-218-5p的表达可以抑制由lncRNA KCNQ1OT1过表达引起的细胞增殖、迁移和侵袭能力的增加及凋亡的减少。结论: lncRNA KCNQ1OT1通过靶向调控miR-218-5p表达影响结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 促进结直肠癌的发展。

[关键词] lncRNA KCNQ1OT1; miR-218-5p; 结直肠癌; HCT-116; 增殖; 迁移; 侵袭

Effect of long non-coding RNA KCNQ1OT1 regulating miR-218-5p on biological behaviors of colon cancer cells

ZHANG Yi, CHEN Chang

(Department of Gastroenterology, The First People's Hospital of Yichang, the People's Hospital of Three Gorges University, Yichang Hubei 443000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of long non-coding RNA KCNQ1 overlapping transcript 1 (lncRNA

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-13

通信作者 (Corresponding author): 陈畅, Email: cc20190411@sina.com

KCNQ1OT1) on malignant biological behavior of colorectal cancer cells via micro RNA-218-5p (miR-218-5p) and its underlying mechanism. **Methods:** Thirty cases of tumor tissues and corresponding adjacent normal tissues were collected from patients underwent radical resection of colorectal cancer in the First People's Hospital of Yichang from January 2019 to April 2019. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was performed to detect the expressions of lncRNA KCNQ1OT1 and miR-218-5p in colorectal cancer tissues, adjacent tissues, five colorectal cancer cell lines (HCT-116, SW480, SW620, DLD-1 and HT29) and normal colon epithelial cell line CCD841. After the interference with the expressions of lncRNA KCNQ1OT1 and miR-218-5p in HCT-116, CCK-8 assay was conducted to monitor the proliferation, and the migration and invasion were detected by Transwell assay. Cell cycle distribution and apoptosis rate were detected by flow cytometry. Starbase database predicted the targeted miRNA of lncRNA KCNQ1OT1 and the targeting relationship between lncRNA KCNQ1OT1 and miR-218-5p was verified by qRT-PCR and dual luciferase reporter gene assay. **Results:** Compared with adjacent tissues and normal colon epithelial cell lines, the expression of lncRNA KCNQ1OT1 was significantly up-regulated while the expression of miR-218-5p was down-regulated in colorectal cancer tissues and cells. Overexpressed lncRNA KCNQ1OT1 promoted the proliferation, migration and invasion of SW480 cells, and the cell ratio in the G₀/G₁ phase was reduced and apoptosis was inhibited. The expression level of lncRNA KCNQ1OT1 was negatively correlated with the expression of miR-218-5p in colorectal cancer ($r^2=0.437, P<0.001$). Dual luciferase reporter gene assay confirmed that lncRNA KCNQ1OT1 could specifically bind to miR-218-5p, and reduce its expression. Overexpressed miR-218-5p inhibited the proliferation, migration and invasion of HCT-116 cells, and the expression of miR-218-5p could impede the increase of proliferation, migration and invasion and the decrease of apoptosis of SW480 cells induced by overexpressed lncRNA KCNQ1OT1. **Conclusion:** lncRNA KCNQ1OT1 modulates the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeted regulation of miR-218-5p expression, thus promoting the progression of colorectal cancer.

Keywords lncRNA KCNQ1OT1; miR-218-5p; colorectal cancer; HCT-116; proliferation; migration; invasion

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界范围的高发肿瘤之一,在明确诊断的恶性肿瘤中结直肠癌发病率位列第三^[1]。目前CRC的治疗主要方法为手术及辅助化疗,但术后复发转移的发生率可高达40%~50%^[2-3],患者的生存率和生存质量有待提高。CRC的发生和发展涉及代谢酶基因多态性,从某种意义上说,CRC是一种基因突变导致的基因病,因此深入研究CRC的分子机制对于了解肿瘤的发生和发展有重要意义。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度超过200个核苷酸且没有蛋白质编码能力的RNA分子, microRNAs(miRs)是一类长度为21~25 nt且高度保守的非编码RNA分子,它们在细胞的分化、代谢、增殖、凋亡的过程中均有重要作用。近年来已经有大量的研究^[4-6]证实lncRNA可靶向调控miRNA,从而参与癌症的发生和发展过程。既往研究^[7-8]证实lncRNA KCNQ1重叠转录物1(long non-coding RNA KCNQ1 overlapping transcript 1, lncRNA KCNQ1OT1)在乳腺癌、非小细胞肺癌中

异常表达。既往虽有关于lncRNA KCNQ1OT1在结肠癌中的表达及功能的报道^[9-10],但其下游分子机制还需要进一步探究。MiR-218-5p作为一种抑癌基因,参与非小细胞肺癌、胶质瘤等多种恶性肿瘤疾病的发展^[11-12],但在结直肠癌中的表达及作用还需要进一步研究。通过查询Starbase库进行生物信息预测发现lncRNA KCNQ1OT1与miR-218-5p存在结合位点,因此猜想miR-218-5p可能作为lncRNA KCNQ1OT1的下游分子在CRC中发挥作用。本研究中检测lncRNA KCNQ1OT1和miR-218-5p在CRC组织和细胞中的表达水平,同时选择HCT-116和SW480细胞为研究对象,旨在探究lncRNA KCNQ1OT1和miR-218-5p在CRC中的作用及机制,为临床诊断和治疗提供可参考的分子标志物。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞株及主要试剂

本研究获得宜昌市第一人民医院医学伦理

委员会批准。收集2019年1月至4月在宜昌市第一人民医院行根治性结肠癌切除术的30例肿瘤组织和相应的癌旁正常组织标本。所有患者术前未接受过化学药物治疗(简称化疗)或放射治疗(简称放疗),经病理学确诊为结直肠癌,且癌旁组织中未发现癌细胞。人CRC细胞系HCT-116, SW480, SW620, DLD-1, HT29和正常结肠上皮细胞系CCD841均购于中国科学院(中国上海)的生物化学与细胞生物学研究所。RPMI-1640培养基、牛血清和0.25%胰蛋白酶均购自美国Gibco公司。KCNQ1OT1 shRNA, KCNQ1OT1质粒, miR-218-5p mimic, miR-218-5p inhibitor, qPCR引物序列均由美国Invitrogen公司设计合成。TRIzol试剂盒、反转录试剂盒及双荧光素报告记忆载体均购于上海GenePharma公司。SYBR Green PCR Master mix试剂盒购于日本TOYOBO公司。CCK-8试剂盒购于北京Beyotime公司。pGL3 Basic vector 购于美国麦迪逊Promega公司。

1.2 细胞培养及分组

将上述细胞置于含10%胎牛血清和100 U/mL青霉素/链霉素的RPMI-1640培养基中,在37 °C, 5% CO₂的恒温培养箱中培养,隔天换液1次,待细胞铺满培养瓶底时进行传代,用0.25%胰蛋白酶消化后传代,取对数生长期的细胞用于实验。将HCT-116和SW480细胞按照需要分为lncRNA KCNQ1OT1过表达组、lncRNA KCNQ1OT1低表达组、miR-218-5p过表达组、miR-218-5p低表达组,

并设置相应的对照组。

1.3 细胞转染

用PBS缓冲液将细胞清洗干净,重复3次,胰蛋白酶消化细胞2 min,转移至无菌15 mL的离心管,离心并计数细胞,以每孔 4×10^5 个细胞接种于6孔板中,使融合率达到约70%。使用无血清培养基按3 μ L/L稀释转染试剂,于37 °C孵育20 min,用无血清培养基分别将sh-KCNQ1OT1, KCNQ1OT1质粒, miR-218-5p mimics, miR-218-5p inhibitor和对照组浓度稀释至50 μ mol/L,常温下孵育5 min,最后与转染试剂等体积分别混匀,置37 °C培养箱继续培养。12 h后观察转染细胞的状态,并将无血清培养基更换为完全培养基,继续培养24 h后,提取细胞RNA,采用qRT-PCR法验证转染效率。

1.4 qRT-PCR 检测 CRC 组织和细胞系中 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-218-5p 的表达

根据TRIzol试剂的使用说明从组织和细胞系中提取和纯化总RNA,用反转录试剂盒合成cRNA,用PCR仪进行扩增,用SYBR Green PCR Master mix试剂盒对lncRNA KCNQ1OT1和miR-218-5p的表达进行检测。qRT-PCR条件如下:95 °C预变性10 min,95 °C 15 s,60 °C 15 s,45个循环,获取荧光信号温度为60 °C。以GAPDH和U6作为内参,用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算lncRNA KCNQ1OT1和miR-218-5p的相对表达。引物序列见表1。

表1 lncRNA KCNQ1OT1及miR-218-5p引物序列

Table 1 Primer sequence of lncRNA KCNQ1OT1 and miR-218-5p

名称	引物序列
LncRNA KCNQ1OT1	正向: 5'-CCCAGAAATCCACACCTCGG-3' 反向: 5'-TCCTCAGTGAGCAGATGGAGA-3'
MiR-218-5p	正向: 5'-CGAGTGCATTTGTGCTTGATCTA-3' 反向: 5'-TAATGGTCTGAACGCCTAACGTC-3'
GAPDH	正向: 5'-TATGATGATATCAAGAGGGTAGT-3' 反向: 5'-TGTATCCAAACTCATGTGCATAC-3'
U6	正向: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3' 反向: 5'-CGCTTCACGAATTCGCTGTGCAT-3'

1.5 CCK-8 法检测转染后结直肠癌细胞的增殖

用CCK-8测定细胞生长曲线, 在对数期收获细胞, 用胰蛋白酶(0.25%)消化, 用10%FBS制备细胞悬液置于培养基中。将各组细胞(每孔3 000个细胞)置于96孔板中, 分别孵育1, 2, 3和4 d。然后加入10 μ L增强CCK-8, 在37 $^{\circ}$ C下孵育1 h。37 $^{\circ}$ C下继续培养2 h后终止培养, 以空白对照孔调零, 酶标仪上450 nm处测定各孔吸光度值(OD值), 以相对OD比值表示细胞增殖能力的大小。各组取3孔平均值, 绘制增殖曲线, 实验重复3次。

1.6 流式细胞术检测细胞周期分布及细胞凋亡

取转染后48 h的各组细胞, 每组细胞设置3个平行实验。用胰酶消化制成细胞悬液, 收集细胞, 用4 $^{\circ}$ C离心5 min; 再用0.5 mL PBS溶液将细胞重新制成均匀的细胞悬液, 并加入预冷的70%的乙醇, 混匀, 4 $^{\circ}$ C下固定4 h后。用流式细胞术检测细胞周期分布, 参照Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒说明书步骤进行操作, 检测各组细胞的凋亡率。所有实验重复3次。

1.7 Transwell 法检测结直肠癌细胞的侵袭和迁移能力

取转染48 h的各组细胞, 消化细胞并计数, 接种细胞前1 d, 在小室底部膜的上室铺基质胶, 迁移实验则不用。在下室中加入含10%FBS RPMI-1640培养基, 上室加入各组细胞悬液。将小室置于37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂培养箱中培养24~48 h, 孵育24 h后, 将迁移失败的细胞从上房取出。用棉签擦去基质胶和上室内细胞, 用4%多聚甲醛固定10 min后, 用0.5%结晶紫染色。用自来水冲洗干净后, 于倒置显微镜下进行观察, 在5个视野进行细胞计数, 取平均值。实验重复3次。

1.8 双荧光素酶报告基因法检测 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-218-5p 的靶向结合关系

将野生型(WT)或突变型(MUT)lncRNA KCNQ1OT1克隆到pGL3 Basic vector中。然后将细胞接种(每孔5 000个细胞)于在24孔板上。用双荧光素酶系统(Promega公司, 美国威斯康辛州)测定荧光素酶活性。MiR-218-5p或对照组分别与野生型或突变型报告载体共转染细胞。转染48 h后测定荧光素酶活性, 实验重复3次。

1.9 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用Student *t*检验进行统计学分析, 采用Pearson分析lncRNA KCNQ1OT1及miR-218-5p表达的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-218-5p 在结直肠癌组织和细胞系中的异常表达

lncRNA KCNQ1OT1在结直肠癌组织和细胞系中的表达水平显著高于癌旁正常组织和正常结肠上皮细胞系(图1A, 1B; $P<0.05$), miR-218-5p表达显著低于癌旁正常组织和结肠癌细胞系(图1C, 1D; $P<0.05$)。在HCT-116细胞系中lncRNA KCNQ1OT1表达相对较高, 在SW480中表达较低; miR-218-5p的表达在HCT-116中相对较低, SW480中相对较高。选择HCT-116和SW480细胞系进行后续研究。

2.2 调控 lncRNA KCNQ1OT1 的表达对结直肠癌细胞生物学行为的影响

在HCT-116和SW480细胞中分别构建lncRNA KCNQ1OT1敲低与过表达的细胞系(图2A)。CCK-8法检测发现: 过表达lncRNA KCNQ1OT1可显著促进SW480细胞的增殖, 而敲低lncRNA KCNQ1OT1可显著抑制HCT-116细胞的增殖(图2B, 2C; $P<0.05$)。与对照组相比, 过表达lncRNA KCNQ1OT1组的G₀/G₁期细胞所占百分比显著降低, 敲低lncRNA KCNQ1OT1后G₀/G₁期细胞所占百分比显著升高(图2D, 2E; $P<0.05$)。采用Transwell实验检测细胞的迁移和侵袭能力, 结果显示: 与对照组相比, 过表达lncRNA KCNQ1OT1后细胞的迁移和侵袭能力显著升高, 而敲低lncRNA KCNQ1OT1后细胞的迁移和侵袭能力则下降(图2F, G; $P<0.05$); 过表达lncRNA KCNQ1OT1后细胞的凋亡率显著低于对照组, 而敲低lncRNA KCNQ1OT1后细胞的凋亡率则显著增加(图2H, $P<0.05$)。

2.3 LncRNA KCNQ1OT1 直接调控 miR-218-5p 的表达

生物信息学分析发现: lncRNA KCNQ1OT1 与 miR-218-5p 存在结合位点(图3A)。采用双荧光素酶报告基因法检测发现: miR-218-5p mimic 可以显著降低 lncRNA KCNQ1OT1-wt 的荧光素酶活性, 对 lncRNA KCNQ1OT1-mut 荧光素酶

活性则无明显影响(图3B)。qRT-PCR法检测发现: 30例结直肠癌组织中 lncRNA KCNQ1OT1 和 miR-218-5p 的表达呈线性负相关($r^2=0.437$, $P<0.001$, 图3C), 在 HCT-116 细胞中发现 lncRNA KCNQ1OT1 过表达后 miR-218-5p 的表达下调, 而 lncRNA KCNQ1OT1 敲低后 miR-218-5p 表达则有上调(图3D)。

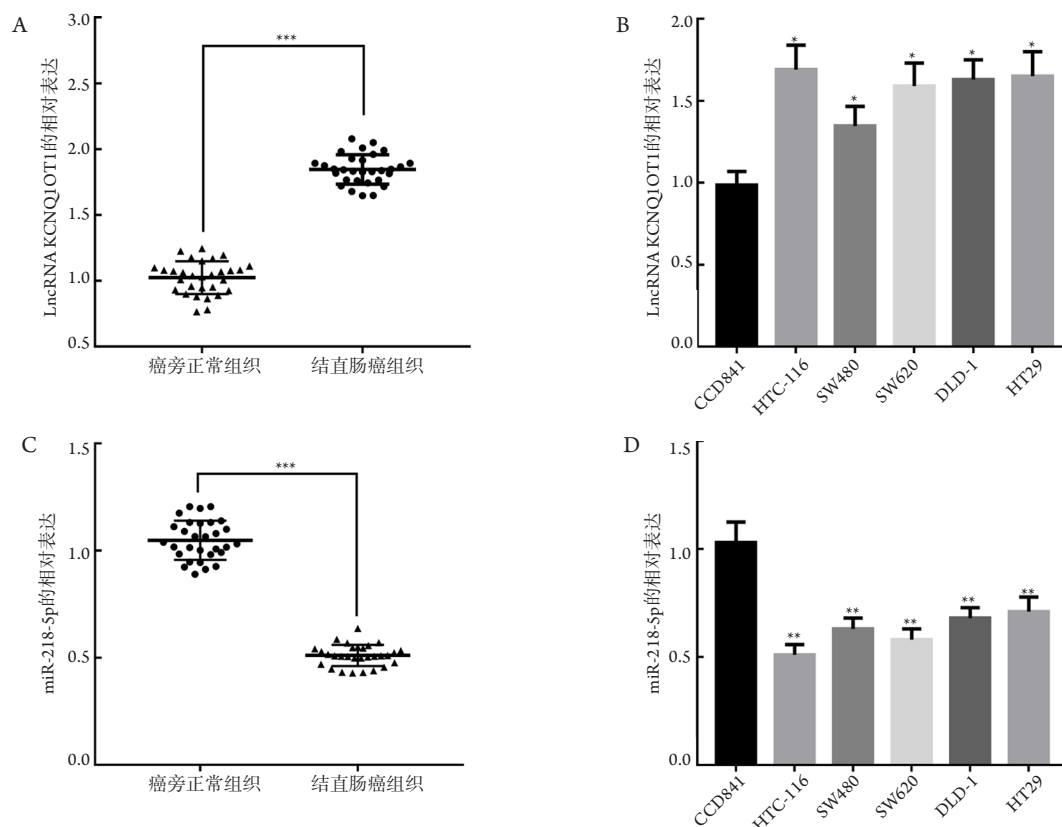


图1 lncRNA KCNQ1OT1和miR-218-5p在结直肠癌组织和细胞系中的表达

Figure 1 Expression of lncRNA KCNQ1OT1 and miR-218-5p in colorectal cancer tissues and cell lines

(A) qRT-PCR检测结直肠癌组织和癌旁正常组织中 lncRNA KCNQ1OT1 的表达(1.846 ± 0.020 vs 1.025 ± 0.023 , $t=26.85$, $***P<0.001$)。 (B) qRT-PCR检测结直肠癌细胞系和正常结肠上皮细胞中 lncRNA KCNQ1OT1 的表达。与 CCD841 比较, $*P<0.05$ 。 (C) qRT-PCR检测结直肠癌组织和癌旁正常组织中 miR-218-5p 的表达(0.511 ± 0.009 vs 1.048 ± 0.017 , $t=28.40$, $***P<0.001$)。 (D) qRT-PCR检测结直肠癌细胞系和正常结肠上皮细胞中 miR-218-5p 的表达。与 CCD841 组比较, $**P<0.01$ 。

(A) Expression of lncRNA KCNQ1OT1 in colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues detected by qRT-PCR (1.846 ± 0.020 vs 1.025 ± 0.023 , $t=26.85$, $***P<0.001$). (B) Expression of lncRNA KCNQ1OT1 in colorectal cancer cell lines and normal colorectal epithelial cells detected by qRT-PCR. Compared with CCD841, $*P<0.05$. (C) Expression of miR-218-5p in colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues detected by qRT-PCR (0.511 ± 0.009 vs 1.048 ± 0.017 , $t=28.40$, $***P<0.001$). (D) Expression of miR-218-5p in colorectal cancer cell lines and normal colorectal epithelial cells detected by qRT-PCR. Compared with CCD841 group, $**P<0.01$.

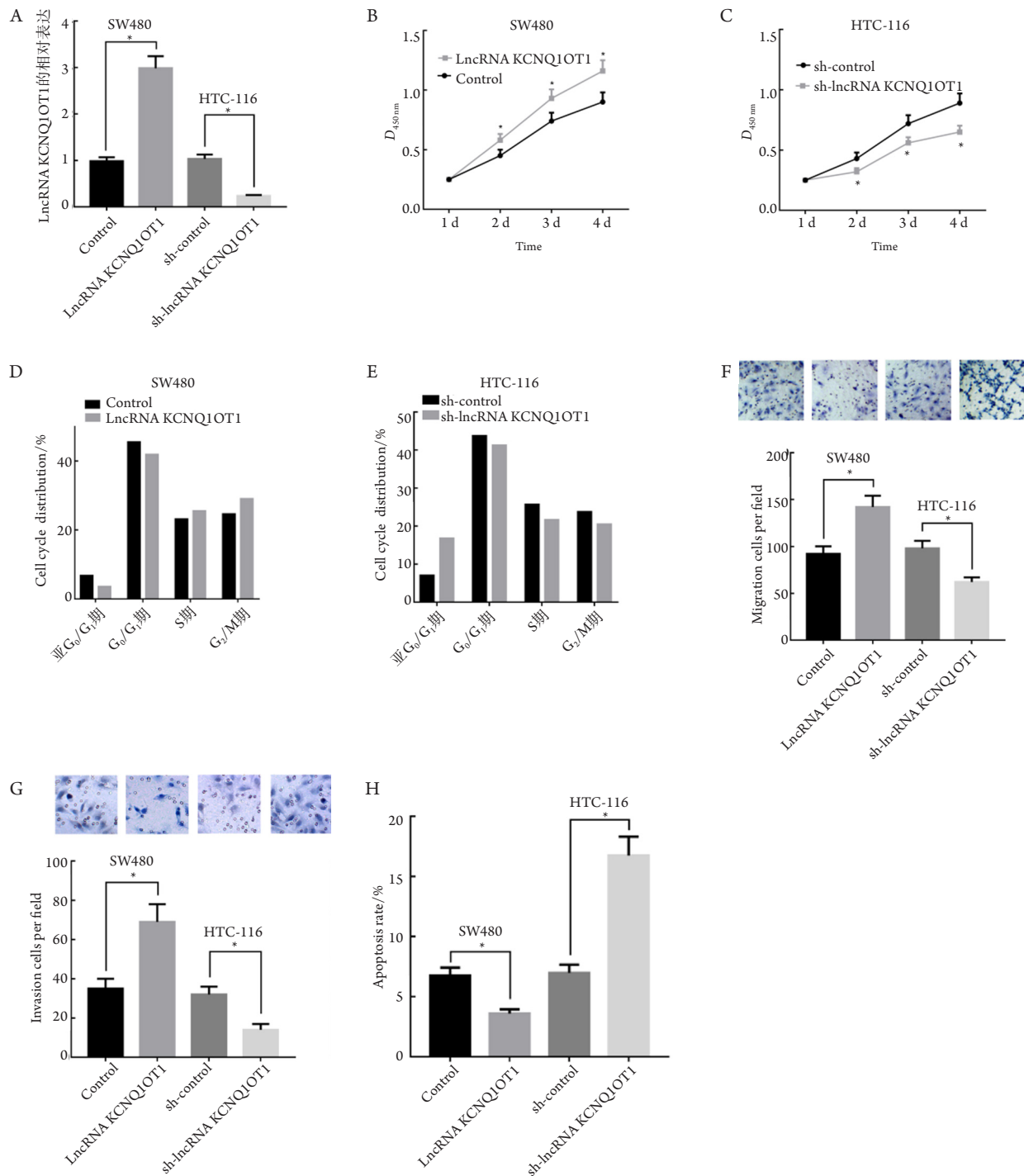


图2 调控lncRNA KCNQ1OT1的表达对结直肠癌细胞的影响

Figure 2 Effects of regulating lncRNA KCNQ1OT1 expression on colorectal cancer cells

(A) qRT-PCR检测细胞转染后lncRNA KCNQ1OT1的表达; (B, C) CCK-8法检测lncRNA KCNQ1OT1过表达和敲低后细胞增殖的情况; (D, E) 流式细胞术检测细胞周期分布; (F, G) Transwell法检测lncRNA KCNQ1OT1过表达和敲低后细胞侵袭和迁移的情况(0.5%结晶紫染色; F, $\times 150$; G, $\times 200$); (H) 流式细胞术检测各组细胞凋亡率。与control组比较, $*P < 0.05$ 。

(A) Expression of lncRNA KCNQ1OT1 after transfection detected by qRT-PCR; (B, C) Cell proliferation in overexpression and knockdown of lncRNA KCNQ1OT1 examined by CCK-8; (D, E) Cell cycle distribution detected by flow cytometry; (F, G) Cell invasion and migration in overexpression and knockdown of lncRNA KCNQ1OT1 detected by Transwell (stained with 0.5% crystal violet; F, $\times 150$; G, $\times 200$); (H) Cell apoptotic rate detected by flow cytometry. Compared with the control group, $*P < 0.05$.

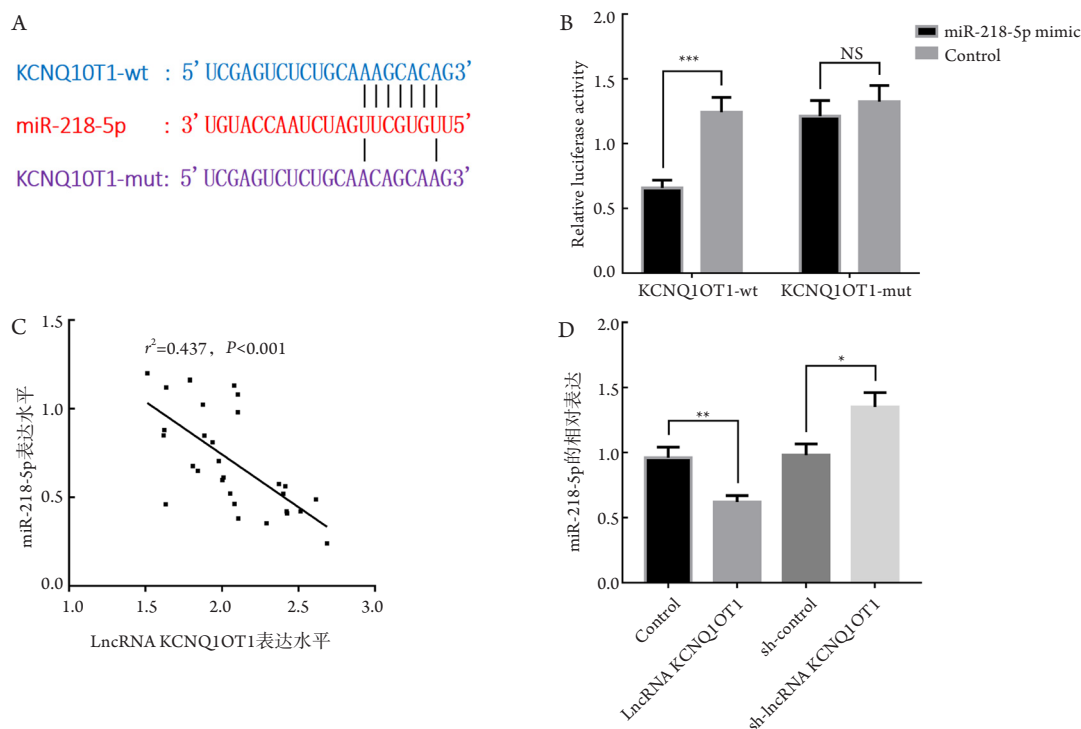


图3 LncRNA KCNQ1OT1与miR-218-5p的关系

Figure 3 Relationship between miR-218-5p and lncRNA KCNQ1OT1

(A) Starbase库中lncRNA KCNQ1OT1与miR-218-5p存在结合位点; (B) 双荧光素酶报告基因法检测lncRNA KCNQ1OT1-wt可与miR-218-5p结合; (C) qRT-PCR检测结肠直肠癌组织中lncRNA KCNQ1OT1与miR-218-5p的表达呈线性负相关($y=-0.5952x+1.932$, $r^2=0.437$, $P<0.001$); (D) qRT-PCR检测在HCT-116中过表达或敲低lncRNA KCNQ1OT1后miR-218-5p的表达。与control组比较, $*P<0.05$ 。

(A) Binding sites of lncRNA KCNQ1OT1 and miR-218-5p in Starbase. (B) LncRNA KCNQ1OT1 binding with miR-218-5p detected by Luciferase gene reporter assay. (C) LncRNA KCNQ1OT1 was negatively correlated with miR-218-5p expression in colorectal cancer tissues by qRT-PCR ($y=-0.5952x+1.932$, $r^2=0.437$, $P<0.001$). (D) Expression of miR-218-5p in HCT-116 after overexpression or knockdown of lncRNA KCNQ1OT1 by qRT-PCR. Compared with the control group, $*P<0.05$.

2.4 miR-218-5p 表达对结直肠癌细胞生物学行为的影响

在SW480和HCT-116细胞中构建miR-218-5p敲低与过表达(图4A)的细胞模型。CCK-8实验发现: 过表达miR-218-5p可抑制HCT-116细胞的增殖, 而敲低miR-218-5p可促进SW480细胞的增殖($P<0.05$; 图4B, 4C); 流式细胞术结果显示过表达miR-218-5p组处于G₀/G₁期的细胞比例增多, 而敲低miR-218-5p后处于G₀/G₁期的细胞比例减少($P<0.05$; 图4D, 4E)。Transwell实验结果也显示: 过表达miR-218-5p后细胞的迁移和侵袭能力减弱, 细胞凋亡率增加; 而敲低miR-218-5p后细胞的迁移和侵袭能力增强, 凋亡率减少($P<0.05$; 图4F,

4G, 4H)。

2.5 LncRNA KCNQ1OT1通过抑制miR-218-5p的表达而促进SW480细胞的增殖、侵袭和迁移

SW480细胞中构建KCNQ1OT1过表达和KCNQ1OT1/miR-218-5p mimic组细胞进行挽救实验($P<0.05$; 图5A, 5B)。CCK-8实验结果显示: 与对照组和lncRNA KCNQ1OT1/miR-218-5p mimic组比较, lncRNA KCNQ1OT1过表达组增殖速度显著升高($P<0.05$; 图5C)。流式细胞术检测细胞周期发现: lncRNA KCNQ1OT1过表达组处于G₀/G₁期的细胞比例显著低于对照组和lncRNA KCNQ1OT1/miR-218-5p mimic组

($P < 0.05$; 图5D)。Transwell实验和流式细胞术结果显示: lncRNA KCNQ1OT1过表达组细胞侵袭和迁移速度高于对照组和lncRNA KCNQ1OT1/

miR-218-5p mimic组, 而凋亡率则低于对照组和lncRNA KCNQ1OT1/miR-218-5p mimic组 ($P < 0.05$; 图5E, 5F, 5G)。

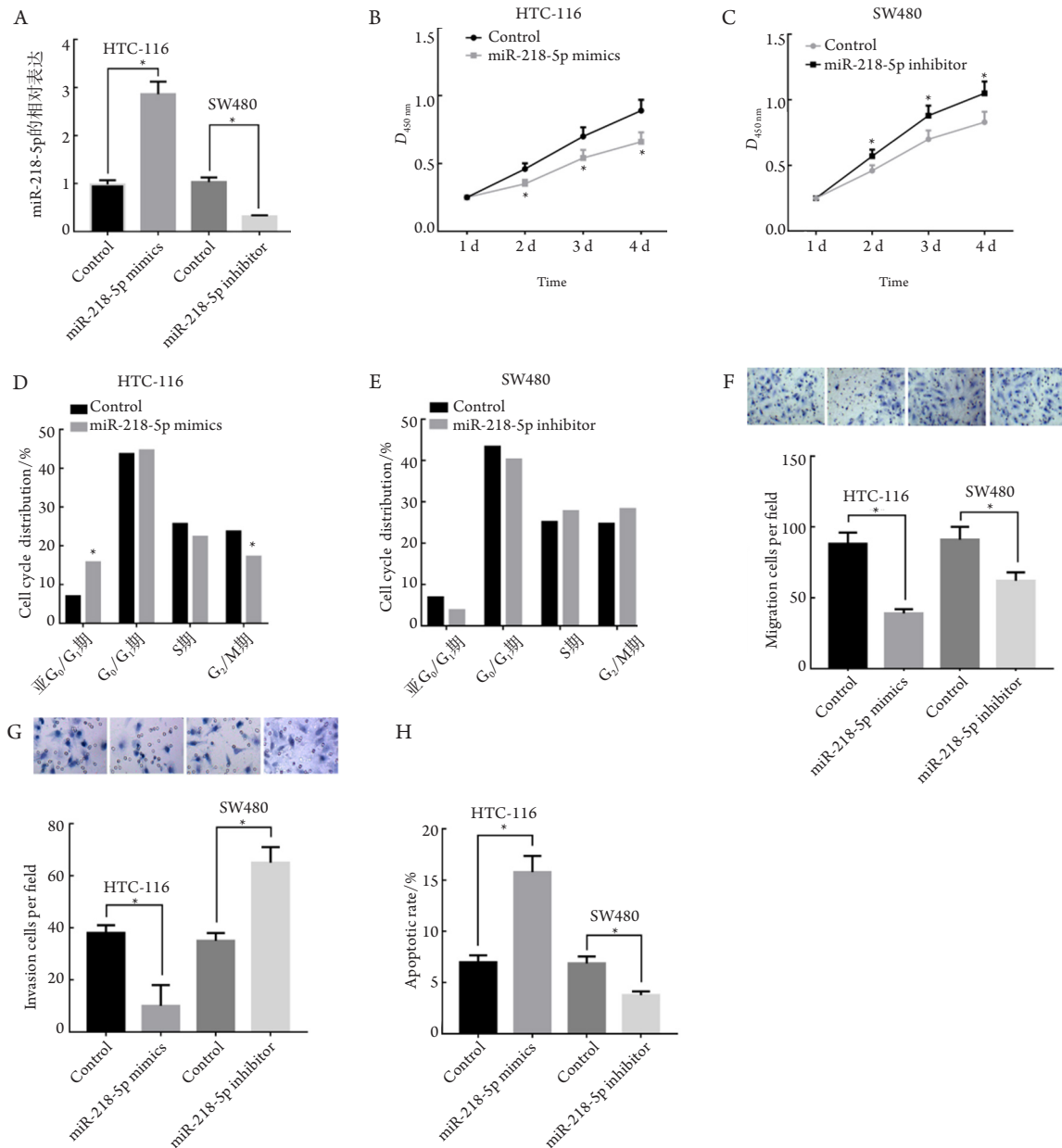


图4 调控miR-218-5p的表达对结直肠癌细胞的影响

Figure 4 Effects of regulating miR-218-5p expression on colorectal cancer cells

(A) qRT-PCR检测细胞转染后miR-218-5p的表达; (B, C) CCK-8法检测miR-218-5p过表达和敲低后细胞增殖的情况; (D, E) 流式细胞术分别检测过表达和抑制miR-218-5p后, CRC细胞的细胞周期分布; (F, G) Transwell法检测miR-218-5p过表达和敲低后细胞侵袭和迁移的情况(0.5%结晶紫染色; F, $\times 150$; G, $\times 200$); (H) 流式细胞术检测细胞凋亡率。与control组或sh-control组比较, $*P < 0.05$ 。

(A) Expression of miR-218-5p after the transfection detected by qRT-PCR; (B, C) Cell proliferation in overexpression and knockdown of miR-218-5p detected by CCK-8; (D, E) The cell cycle distributions of CRC cells after miR-218-5p overexpression and inhibition were detected by flow cytometry analysis; (F, G) Overexpression of miR-218-5p and cell invasion and migration detected by Transwell method (stained with 0.5% crystal violet; F, $\times 150$; G, $\times 200$); (H) Cell apoptotic rate detected by flow cytometry. Compared with control group or sh-control group, $*P < 0.05$.

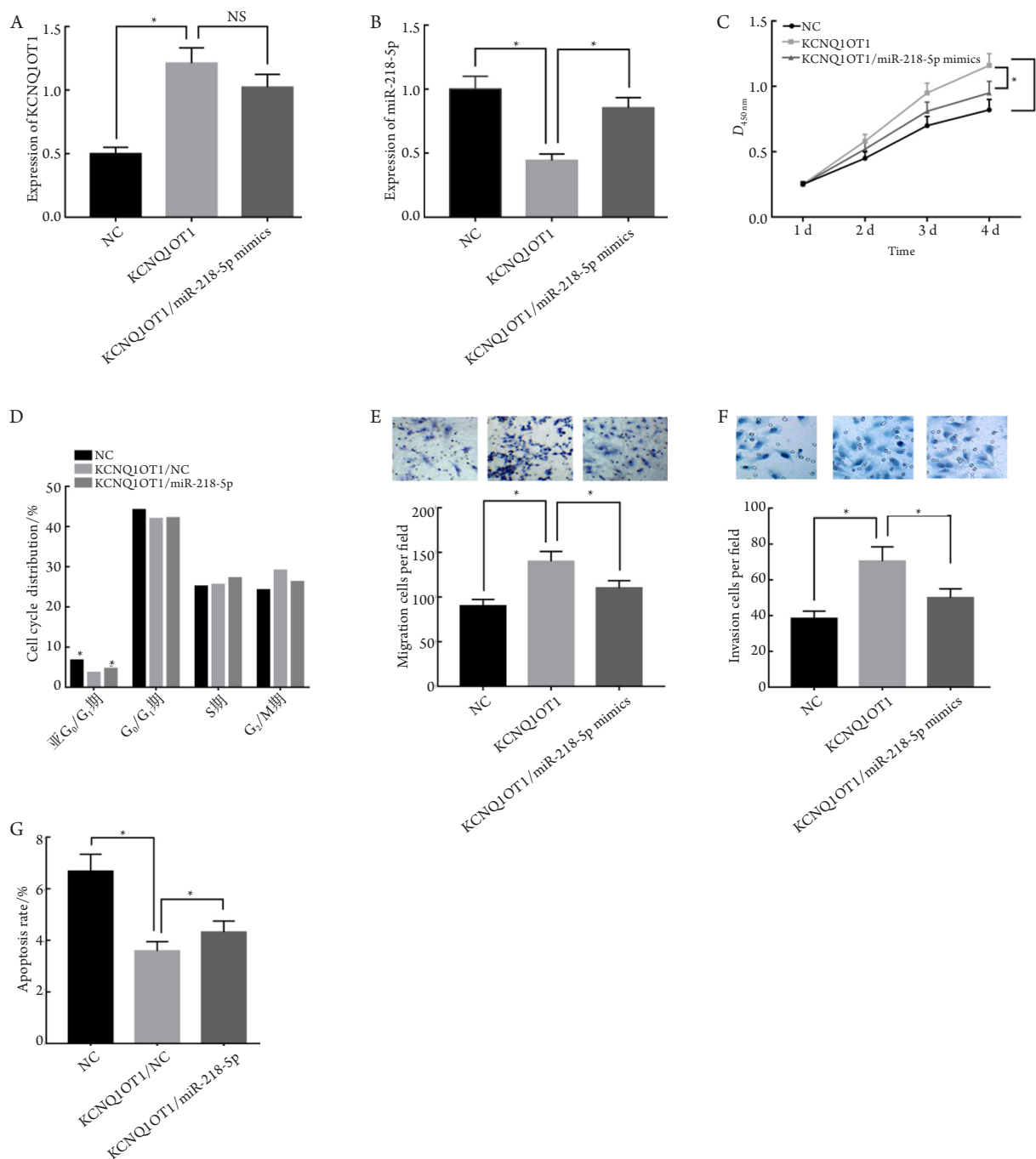


图5 lncRNA KCNQ1OT1靶向调控miR-218-5p对结直肠癌的影响

Figure 5 Effects of lncRNA KCNQ1OT1 on the targeted regulation of miR-218-5p in colorectal cancer

(A, B) qRT-PCR检测lncRNA KCNQ1OT1和miR-218-5p的表达; (C) CCK-8法检测3组细胞增殖的情况; (D) 流式细胞术检测细胞周期分布; (E, F) Transwell法检测3组细胞侵袭和迁移的情况(0.5%结晶紫染色; E, ×150; G, ×200); (G) 流式细胞术检测细胞凋亡率。与KCNQ1OT1/NC组比较, *P<0.05。

(A, B) Expression of lncRNA KCNQ1OT1 and miR-218-5p detected by qRT-PCR; (C) Cell proliferation examined by CCK-8; (D) Cell cycle distribution detected by flow cytometry; (E, F) Cell invasion and migration detected by Transwell method (stained with 0.5% crystal violet; E, ×150; G, ×200); (G) Cell apoptotic rate detected by flow cytometry. Compared with the KCNQ1OT1/NC group, *P<0.05.

3 讨论

结直肠癌是常见的恶性肿瘤,目前在西方国家中结直肠癌的发病率和病死率呈下降趋势,但是在亚洲国家尤其是中国其发病率和病死率呈显著上升趋势^[13]。且由于结直肠癌早期症状不明显,约20%患者在确诊时已经为转移性结直肠癌,失去了手术治疗的机会^[14]。因此探究结直肠癌发生的分子机制,寻找可行的分子治疗靶点对于提高患者的生存率至关重要。

已经有研究^[15]证实: lncRNA参与肿瘤细胞分化、发育等过程;研究^[16]报道lncRNA的表达异常参与了CRC的发生和发展,可能为诊断和治疗CRC提供新思路。lncRNA KCNQ1OT1是位于人染色体11p15.5上KCNQ1簇的印迹基因。lncRNA KCNQ1OT1在胆管癌组织和细胞系中高表达,且通过lncRNA KCNQ1OT1/miR-140-5p/SOX4信号通路促进癌症的发展和转移^[17];在胶质瘤中,lncRNA KCNQ1OT1通过miR-370/CCNE2轴促进胶质瘤细胞的增殖和转移^[18]。lncRNA KCNQ1OT1的高表达可作为独立预测结直肠癌预后的指标,且其高表达与患者较短的生存期有关^[19];在结直肠癌中,lncRNA KCNQ1OT1的转录和表观遗传状态存在异常,主要包括组蛋白修饰和KCNQ1簇处的DNA甲基化^[20]。这些都证明lncRNA KCNQ1OT1具有促进癌症进展的作用,且其表达与结直肠癌的发生和发展密切相关。本研究证实lncRNA KCNQ1OT1在结直肠癌组织和细胞系中高表达,其高表达可以促进结直肠癌细胞的增殖、侵袭和迁移,减少细胞凋亡,从而促进结直肠癌的恶性发展,这一研究结果也证实lncRNA KCNQ1OT1在结直肠癌中的促癌效应。

此外,研究^[21]已经证实:lncRNAs可以作为癌基因、肿瘤抑制因子靶向调节miRNA的表达水平,从而影响疾病的进展。但在结直肠癌中,关于lncRNA KCNQ1OT1下游分子机制的报道较少。目前已经有lncRNA KCNQ1OT1/miR-760/PPP1R1B信号通路与结直肠癌细胞的甲氨喋呤耐药性增加有关的报道^[9],lncRNA KCNQ1OT1/miR-217/ZEB1反馈环能促进结直肠癌细胞的增殖、迁移和上皮间质转化^[10]。为进一步研究lncRNA KCNQ1OT1的下游分子机制,查询starbase库发现lncRNA KCNQ1OT1与miR-218-5P存在结合位点。miR-218-5P是近年来研究较为普遍的

miRNA,研究^[22-23]发现在多种肿瘤中miR-218-5P表达下调,发挥抑癌的作用。MiR-218可以靶向桩蛋白(paxillin, PXN),从而抑制口腔鳞癌的进展^[24]。但也有研究^[25]报道:miR-218的低表达可以增强肌动蛋白、细胞外基质蛋白成分的过表达,从而促进癌细胞的侵袭和迁移,这一研究结果提示miR-218具有促癌的作用。目前关于miR-218-5p在结直肠癌中作用的报道较少,Liu等^[26]发现在CRC中miR-218-5p发挥抑癌基因的作用并负向调控DPH1的表达。本研究发现在结直肠癌组织和细胞系中miR-218-5p的表达显著下降,其低表达可促进结肠癌细胞的增殖、侵袭和迁移,抑制细胞凋亡,这与上述研究^[22-24]中miR-218-5p发挥抑癌作用的结果一致。此外,本研究通过荧光素酶报告证实lncRNA KCNQ1OT1与miR-218-5p的靶向结合关系,在体外细胞实验中也通过调控lncRNA KCNQ1OT1的表达验证了这一靶向结合关系。同时,通过挽救实验发现:miR-218模拟物的转染减轻了由lncRNA KCNQ1OT1过表达导致的细胞增殖、侵袭和迁移能力的增加,同时可以抑制细胞凋亡,这一研究结果证明lncRNA KCNQ1OT1/miR-218-5p信号通路在CRC中的作用。

综上所述,lncRNA KCNQ1OT1可通过靶向miR-218-5p的表达促进结肠癌细胞的生长、侵袭和迁移,抑制细胞的凋亡。这一研究结果进一步阐述了lncRNA KCNQ1OT1在结直肠癌中的作用机制,为结直肠癌的诊断和靶向治疗提供了可供参考的靶点。但本研究也存在不足,miR-129-5p的下游分子机制尚需要进一步研究。

参考文献

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
2. Zafar SY, Malin JL, Grambow SC, et al. Chemotherapy use and patient treatment preferences in advanced colorectal cancer: a prospective cohort study[J]. *Cancer*, 2013, 119(4): 854-862.
3. Altomare DE, Di Lena M, Porcelli F, et al. Exhaled volatile organic compounds identify patients with colorectal cancer[J]. *Br J Surg*, 2013, 100(1): 144-150.
4. Parsons C, Adams BD. Targeting noncoding RNAs in disease[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(3): 761-771.
5. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease[J].

- Physiol Rev, 2011, 91(3): 827-887.
6. Mao Y, Liu R, Zhou H, et al. Transcriptome analysis of miRNA-lncRNA-mRNA interactions in the malignant transformation process of gastric cancer initiation[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2017, 24(6): 267-275.
 7. Sun X, Xin Y, Wang M, et al. Overexpression of long non-coding RNA KCNQ1OT1 is related to good prognosis via inhibiting cell proliferation in non-small cell lung cancer[J]. *Thorac Cancer*, 2018, 9(5): 523-531.
 8. Feng W, Wang C, Liang C, et al. The dysregulated expression of KCNQ1OT1 and its interaction with downstream factors miR-145/CCNE2 in breast cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(2): 432-446.
 9. Xian D, Zhao Y. LncRNA KCNQ1OT1 enhanced the methotrexate resistance of colorectal cancer cells by regulating miR-760/PPP1R1B via the cAMP signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 3808-3823.
 10. Bian Y, Gao G, Zhang Q, et al. KCNQ1OT1/miR-217/ZEB1 feedback loop facilitates cell migration and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(6): 886-896.
 11. Zhu K, Ding H, Wang W, et al. Tumor-suppressive miR-218-5p inhibits cancer cell proliferation and migration via EGFR in non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 28075-28085.
 12. Li Z, Qian R, Zhang J, et al. MiR-218-5p targets LHFPL3 to regulate proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transitions of human glioma cells[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(3): BSR20180879.
 13. Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2013[J]. *Cancer Lett*, 2017, 401: 63-71.
 14. Zafar SY, Malin JL, Grambow SC, et al. Chemotherapy use and patient treatment preferences in advanced colorectal cancer: a prospective cohort study[J]. *Cancer*, 2013, 119(4): 854-862.
 15. Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 3965-3981.
 16. PAN Xuefeng, FAN Naijun, GAO Chunfang. Progress on long non-coding RNA in diagnosis and treatment of colorectal cancer[J]. *Journal of Oncology*, 2017, 23(2): 111-115.
 17. Sun H, Li Y, Kong H, et al. Dysregulation of KCNQ1OT1 promotes cholangiocarcinoma progression via miR-140-5p/SOX4 axis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 658: 7-15.
 18. Gong W, Zheng J, Liu X, et al. Knockdown of Long Non-Coding RNA KCNQ1OT1 Restrained Glioma Cells' Malignancy by Activating miR-370/CCNE2 Axis[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 84.
 19. Zhang K, Yan J, Yi B, et al. High KCNQ1OT1 expression might independently predict shorter survival of colon adenocarcinoma[J]. *Future Oncol*, 2019, 15(10): 1085-1095.
 20. Nakano S, Murakami K, Meguro M, et al. Expression profile of LIT1/KCNQ1OT1 and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(11): 1147-1154.
 21. Dykes IM, Emanuelli C. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2017, 15(3): 177-186.
 22. Yang Q, Li J, Hu Y, et al. MiR-218-5p suppresses the killing effect of natural killer cell to lung adenocarcinoma by targeting SHMT1[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(6): 500-508.
 23. 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.
 24. Wu DW, Chuang CY, Lin WL, et al. Paxillin promotes tumor progression and predicts survival and relapse in oral cavity squamous cell carcinoma by microRNA-218 targeting[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(8): 1823-1829.
 25. Kumamoto T, Seki N, Mataka H, et al. Regulation of TPD52 by antitumor microRNA-218 suppresses cancer cell migration and invasion in lung squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(5): 1870-1880.
 26. Liu M, Yin K, Guo X, et al. Diphthamide biosynthesis 1 is a novel oncogene in colorectal cancer cells and is regulated by MiR-218-5p[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(2): 505-514.

本文引用: 张祎, 陈畅. 长链非编码RNA KCNQ1OT1靶向调控 miR-218-5p对结肠癌细胞生物学行为的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(3): 529-539. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.001

Cite this article as: ZHANG Yi, CHEN Chang. Effect of long non-coding RNA KCNQ1OT1 regulating miR-218-5p on biological behaviors of colon cancer cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(3): 529-539. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.001