



上海交通大学医学院
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE 学者介绍



洪洁 博士
HONG Jie Ph.D

研究员、博士生导师
Professor, Doctoral Supervisor

ORCID ID: 0000-0002-2962-1359



洪洁 (1980—), 上海交通大学医学院附属仁济医院研究员、博士生导师。2007 年获复旦大学生物化学与分子生物学专业博士学位。2007—2010 年赴美国布朗大学医学院消化科从事博士后研究工作。现任上海市消化病学会肿瘤学组委员、美国癌症研究协会会员。

长期从事消化系统复杂疾病发生和发展的调控机制研究。综合应用细胞生物学、生物化学、生物信息学等多种技术手段, 深入探讨消化道肿瘤信号转导和表观遗传学机制, 及肠道菌群的作用。作为项目负责人, 先后主持国家自然科学基金优秀青年科学基金及多项面上项目基金。作为子课题负责人, 参与国家自然科学基金重大研究计划纵向协作。曾入选新世纪优秀人才支持计划、上海市青年拔尖人才开发计划、上海市教育委员会高峰高原学科建设计划等多项人才计划。

HONG Jie (1980—), professor and doctoral supervisor of Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. She got her doctoral degree in Biochemistry and Molecular Biology from Fudan University in 2007. Then, she went to work in the Department of Gastroenterology, Brown University School of Medicine, USA for postdoctoral research from 2007 to 2010. Currently, she is a member of Oncology Group, Shanghai Society of Digestive Diseases and American Association for Cancer Research.

She has long been engaged in the research on the regulatory mechanism of the occurrence and development of complex diseases in digestive system. The signal transduction and epigenetic mechanism of digestive tumors, as well as the role of intestinal microbiota are deeply discussed by comprehensively applying various techniques such as cell biology, biochemistry and bioinformatics. As a project leader, she has taken charge of several projects, including Outstanding Youth Science Foundation of National Natural Science Foundation of China and various general project. As a sub-project leader, she has participated in the longitudinal collaboration of major research programs of National Natural Science Foundation of China. She was enrolled into Program for New Century Excellent Talents in University, Shanghai Youth Top Talent Development Program and Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support, etc.



论著·基础研究

lnc-MTBP-5 在结直肠癌中的表达及其对细胞侵袭能力的影响

严宇青, 沈超琴, 陈豪燕, 洪洁[#], 王震华[#]

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科, 上海市消化疾病研究所, 上海 200001

[摘要] **目的**·分析 *lnc-MTBP-5* 在结直肠癌中的表达, 并探讨其对结直肠癌细胞侵袭能力的影响及可能的作用机制。**方法**·从 SRA (Sequence ReadArchive) 数据库提取 PRJNA218851 和 PRJNA376161 数据集的生物信息学资料, 筛选与结直肠癌转移相关的 *lncRNA*。在癌症基因组图谱 (TCGA) 中分析 *lnc-MTBP-5* 在结直肠癌和正常组织中的表达差异, 与患者预后的关系, 及与转移相关因子的相关性。采用实时荧光定量 PCR 检测 *lnc-MTBP-5* 在正常肠上皮细胞和结直肠癌细胞、53 例患者的结直肠癌组织及癌旁组织中的表达量。在结直肠癌细胞中下调 *lnc-MTBP-5* 后, 行 CCK-8 实验、克隆形成实验和侵袭实验, 观察 *lnc-MTBP-5* 对结直肠癌细胞增殖和侵袭功能的影响。**结果**·*lnc-MTBP-5* 和结直肠癌转移相关, 且 *lnc-MTBP-5* 在 5 种结直肠癌细胞和结直肠癌组织中均呈高表达。与低表达患者相比, 高表达 *lnc-MTBP-5* 的结直肠癌患者年龄小、美国癌症联合委员会 (AJCC) 分期高, 且易发生转移。*lnc-MTBP-5* 与结肠癌转移相关因子 1 (metastasis associated in colon cancer 1, MACC1)、间质上皮转换因子 (mesenchymal to epithelial transition factor, MET)、钙黏着蛋白关联蛋白呈正相关。下调 *lnc-MTBP-5* 后, 结直肠癌细胞的侵袭能力减弱。**结论**·*lnc-MTBP-5* 在结直肠癌细胞系及结直肠癌组织中表达显著增高, 且与患者预后呈负相关。*lnc-MTBP-5* 增强结直肠癌细胞的侵袭能力, 该功能可能与 MACC1-HGF (hepatocyte growth factor, 肝细胞生长因子)/MET 通路有关。

[关键词] *lnc-MTBP-5*; 结直肠癌; 细胞侵袭; 细胞增殖

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.09.005 **[中图分类号]** R735.34 **[文献标志码]** A

Expression of *lnc-MTBP-5* in colorectal cancer and its effect on cell invasion

YAN Yu-qing, SHEN Chao-qin, CHEN Hao-yan, HONG Jie[#], WANG Zhen-hua[#]

Shanghai Institute of Digestive Disease, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200001, China

[Abstract] **Objective**·To analyze the expression of *lnc-MTBP-5* in colorectal cancer (CRC), and explore the effect of *lnc-MTBP-5* on the invasion of CRC cells and its potential mechanism. **Methods**·Bioinformatics data from PRJNA218851 and PRJNA376161 data sets were extracted from the Sequence ReadArchive (SRA) database to screen CRC metastasis associated *lncRNAs*. The Cancer Genome Atlas (TCGA) was used to analyze the expression of *lnc-MTBP-5* in CRC tissues and normal tissues, its relationship with the prognosis of patients, and its correlation with metastasis related factors. Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to detect the expression of *lnc-MTBP-5* in normal intestinal epithelial cells and CRC cells, as well as 53 CRC tissues and para-cancer mucosa. After *lnc-MTBP-5* was down-regulated in CRC cells, CCK-8 assay, clone formation and Transwell assay were performed to observe the effect of *lnc-MTBP-5* on the proliferation and invasion ability of CRC cells. **Results**·*lnc-MTBP-5* was associated with CRC metastasis. The expression of *lnc-MTBP-5* was significantly increased in 5 CRC cell lines and CRC tissues. Compared with patients with low expression of *lnc-MTBP-5*, CRC patients with high expression of *lnc-MTBP-5* were younger, had higher American Joint Committee on cancer (AJCC) staging, and were prone to metastasis. *lnc-MTBP-5* was positively correlated with CRC metastasis associated in colon cancer 1 (MACC1), mesenchymal to epithelial transition factor (MET) and cadherin-associated protein. After *lnc-MTBP-5* was down-regulated, the invasion ability of CRC cells decreased. **Conclusion**·*lnc-MTBP-5* is up-regulated in CRC cell lines and CRC tissues, and it is negatively correlated with the prognosis of patients. *lnc-MTBP-5* can promote the invasion ability of CRC cells, which may be related to MACC1-HGF (hepatocyte growth factor)/MET pathway.

[Key words] *lnc-MTBP-5*; colorectal cancer (CRC); cell invasion; cell proliferation

研究^[1-2]显示, 结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 的发病率及病死率分别位居恶性肿瘤的第 3、4 位, 是常见的消化系统恶性肿瘤, 也是导致癌症死亡的第二大病因。CRC 患者的死亡与病灶转移密切相关, 据统计患者因转移

而发生死亡的数量分别占初诊和确诊人数的 25% 和 50%^[3]。对于 CRC 转移的患者, 切除原发灶和转移灶是最佳的治疗方案, 但由于癌症细胞的潜伏性、播散性和抗药性, 患者于术后复发十分常见^[4]。因此, 对 CRC 转移的具体机制

[基金项目] 国家自然科学基金 (81572696); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20152512)。

[作者简介] 严宇青 (1994—), 女, 硕士生; 电子信箱: yuqing9409@163.com。

[通信作者] 洪洁, 电子信箱: jiehong97@sjtu.edu.cn。王震华, 电子信箱: zhenhuawang@126.com。[#] 为共同通信作者。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81572696); Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Support (20152512)。

[Corresponding Author] HONG Jie, E-mail: jiehong97@sjtu.edu.cn. WANG Zhen-hua, E-mail: zhenhuawang@126.com. [#]Co-corresponding authors.

及其诊治标志物的研究, 已成为当前关注的焦点。

在人类基因组中, 细胞仅利用其中的 2% 来产生具有蛋白质编码功能的转录本, 其余大部分不编码蛋白质的基因则被转录为非编码 RNA。其中, 长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是长度大于 200 个核苷酸的非编码转录本^[5]。lncRNA 可定位在胞核内或胞质中。在分子水平上, lncRNA 通过不同机制调节染色质组成、基因转录和转录后修饰^[6]。在许多肿瘤尤其是恶性肿瘤中, 如胃癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌等^[7-10], lncRNA 的表达可发生改变。

基于此, 我们假设有特定 lncRNA 参与 CRC 的转移, 通过筛选 CRC 相关的 *lnc-MTBP-5*, 就该 lncRNA 对人 CRC 细胞侵袭能力的影响进行检测, 以期对 CRC 的早期诊断及治疗提供新的靶点。

1 资料与方法

1.1 数据收集

1.1.1 数据集获取 从 SRA (Sequence ReadArchive) 数据库中提取 PRJNA218851 数据集和 PRJNA376161 数据集。前者包括 18 例 CRC 患者的正常结肠黏膜、CRC 原发灶及肝转移灶的数据, 后者包括 10 对肿瘤组织和正常结肠组织、5 对异常隐窝灶和匹配普通隐窝灶的数据。SRA 数据库信息均采用 R3.5.2 软件提取, 用以筛选与 CRC 转移相关的 lncRNA。

1.1.2 组织芯片数据获取 在癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库中提取含有 638 例 CRC 组织芯片和 51 例正常结直肠组织芯片的数据, 分析 *lnc-MTBP-5* 在正常结直肠组织和 CRC 组织中的表达差异。根据 *lnc-MTBP-5* 在 CRC 患者癌组织表达量的中位数, 将 TCGA 数据库中的 638 例患者分为 *lnc-MTBP-5* 高表达组和 *lnc-MTBP-5* 低表达组。从 TCGA 数据库中提取 CRC 患者的临床信息, 包括初次病理诊断年龄、性别、美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 临床分级、淋巴结转移、远处转移、脉管侵及、结肠息肉病史和治疗后复发, 分析 *lnc-MTBP-5* 与患者临床预后的相关性。TCGA 数据库 CRC 组织芯片信息均采用 R3.5.2

软件提取。

1.2 标本收集

选择 2016 年 1 月—2017 年 12 月于上海交通大学医学院附属仁济医院的 53 例 CRC 手术患者, 从癌组织和癌旁组织获取标本, 并于 -80 ℃ 长期保存。本研究经上海交通大学医学院附属仁济医院伦理委员会批准 (伦理审批号为 [2015]097), 所有参与者均签署了知情同意书。

1.3 细胞和主要试剂

人正常结直肠黏膜 FHC 细胞以及人 CRC 细胞 HT29、SW480、DLD1、HCT116、SW1116、Lovo、RKO 和 Caco2 均购自美国模式菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。

RPMI-1640 培养液、McCoy's 5A 培养液、OptiMEM 培养液和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, DharmaFECT 1 转染试剂购自美国 GE Healthcare 公司, RNAiso Plus、反转录试剂和实时荧光定量 PCR 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司, PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, CCK-8 检测试剂盒购自日本同仁化学研究所, Transwell 小室购自美国 Millipore 公司, Matrigel 胶购自美国 BD Bioscience 公司。

1.4 CRC 细胞培养及转染实验

分别采用含 5% 胎牛血清的 McCoy's 5A 完全培养基和 RPMI-1640 完全培养基, 于 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 HT29、SW480 细胞, 于 3 d 后传代。待细胞生长至指数生长期时, 分别以 3 × 10⁵ 个 / 孔、2 × 10⁵ 个 / 孔接种于 6 孔板中, 用于后续转染。

用 Control siRNA、*lnc-MTBP-5* siRNA 分别转染 HT29 和 SW480 细胞, 并用正常表达 *lnc-MTBP-5* 的质粒 (pcDNA3.1)、*lnc-MTBP-5* 过表达质粒 (pcDNA3.1-*lnc-MTBP-5*) 分别转染 SW480 细胞。于 6 孔板中继续分别培养上述细胞 24 h 后, 将培养液更换为无血清培养基。于 37 ℃ 培养 6 h 后将培养基更换为完全培养基, 继续培养细胞 48 h 后提取 RNA, 用于后续研究。转染实验 siRNA 序列见表 1。

表 1 siRNA 序列
Tab 1 Sequence of siRNA

siRNA	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Control siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
<i>lnc-MTBP-5</i> siRNA	CCCAAGAUUCUAGAAUGAATT	UUCAUUCUAGAAUCUUGGGTT

1.5 细胞和组织中 *lnc-MTBP-5* 的表达量检测

采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测 *lnc-MTBP-5* 的表达量。采用磷酸盐缓冲液洗涤 FHC 细胞、8 种 CRC 细胞及转染的 HT29、SW480 细胞各 2 次, 同时将 53 例结直肠癌组织和癌旁组织标本研磨成粉末后, 按照操作说明抽提总 RNA。细胞质 / 细胞核 RNA 抽提按照试剂盒说明操作。分别取 1 μ g 上述 RNA,

用 PrimeScript RT Reagent Kit 试剂盒反转录成 cDNA, 并以此为模板用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒、StepOne real-time PCR 系统进行 qPCR 检测。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值评估基因的相对表达量, 每组实验设置 3 个复孔。细胞、组织中总表达量的检测以 *GAPDH* 为相对内参, 细胞质和细胞核内表达量检测以 *U6* 为相对内参。引物序列见表 2。

表 2 PCR 引物序列
Tab 2 Primer sequences for PCR

Primer	Forward (5' \rightarrow 3')	Reverse (5' \rightarrow 3')
<i>GAPDH</i>	ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC
<i>U6</i>	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA
<i>lnc-MTBP-5</i>	GGTCCTCCTGAGCCGACTTCC	AGACAGGTAAGAACTCCGCAGAGG

1.6 细胞增殖能力检测

采用 CCK8 实验检测 CRC 细胞的增殖能力。将 HT29、SW480 细胞接种至 96 孔板中, 按 1.4 方法分别转染 Control siRNA 和 *lnc-MTBP-5* siRNA。分别在转染后的第 0、1、2、3、4 日, 向每孔加入 100 μ L 含 10% CCK8 试剂的无血清培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后, 用酶标仪测定样品在 450 nm 处的吸光度。

1.7 细胞克隆形成能力检测

采用克隆形成实验检测 CRC 细胞的增殖能力。将 HT29、SW480 细胞以 800 个 / 孔接种至 6 孔板中, 按 1.4 方法分别转染 Control siRNA 和 *lnc-MTBP-5* siRNA, 并静置于培养箱中。7 d 后弃去培养基, 经固定染色后拍照, 观察克隆形成的数量和大小。

1.8 细胞侵袭能力检测

采用侵袭实验检测 SW480 细胞的侵袭能力。将 SW480 细胞按 2×10^5 个 / 孔接种于 6 孔培养板中, 培养 24 h 后向其中分别转染 Control siRNA 和 *lnc-MTBP-5* siRNA, 以及对照质粒和 *lnc-MTBP-5* 过表达质粒。继续培养 24 h 后进行消化, 并用无血清 RPMI-1640 培养液重悬细胞。在 24 孔培养板中放入 Transwell 小室, 铺入 40 μ L Matrigel; 4 ~ 6 h 后向小室下层加入 600 μ L 含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 小室上层加入 200 μ L 上述 4 组细胞悬液。继续培养 48 h 后取出小室, 固定染色并于光学显微镜下进行观察。随机选取 4 个视野 (放大倍数为 40 倍), 计数穿过 Matrigel 的细胞数, 取平均值。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对研究数据进行统计分析, 所有实验均重复 3 次。组间比较采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SRA 数据库中与 CRC 转移相关的 lncRNA 分析

采用 *t* 检验对 PRJNA218851 数据集进行分析, 共获得 105 条 [假发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05] 在正常 - 原发灶 - 转移灶中依次表达上调的 lncRNA; 在 PRJNA376161 数据集中, 对 10 对肿瘤组织和癌旁正常组织的数据分析得到 990 条 (FDR < 0.05) 差异表达 lncRNA。对上述 lncRNA 取交集, 共得到 10 条在 2 个数据集中均有意义的 lncRNA。通过在 UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) 中比对序列, 我们将关注点放在 ENSG00000254814、ENSG00000257453 和 ENSG00000272502 这 3 条 lncRNA 上, 筛选流程如图 1A。由于前 2 条 lncRNA 的引物未能成功合成, 因此仅重点研究 ENSG00000272502。通过在 LNCipedia 数据库 (<https://lncipedia.org/>) 中对该 lncRNA 的编码潜能进行验证 (排除假阳性), 最终确认其 (*lnc-MTBP-5*) 是一种非编码 RNA (图 1B)。

在正常肠上皮细胞和 8 个结直肠癌细胞系中对 *lnc-MTBP-5* 表达量进行检测, 结果显示 *lnc-MTBP-5* 在 5 个结直肠癌细胞中的表达均显著高于 FHC 细胞 (图 1C)。通过对 HT29、SW480 细胞的胞质和胞核 RNA 进行分离发现, *lnc-MTBP-5* 在胞质、胞核中均有分布 (图 1D、E)。



Note: A. Screening process for CRC metastasis associated lncRNAs. B. Coding potential of *lnc-MTBP-5*. C. Expression levels of *lnc-MTBP-5* in FHC and 8 CRC cells. ^① $P=0.000$, compared with the FHC cells. D–E. Distribution of *lnc-MTBP-5* in the cytoplasm and nucleus of HT29 cells (D) and SW480 cells (E).

图 1 SRA 数据库中与 CRC 转移相关的 lncRNA 分析

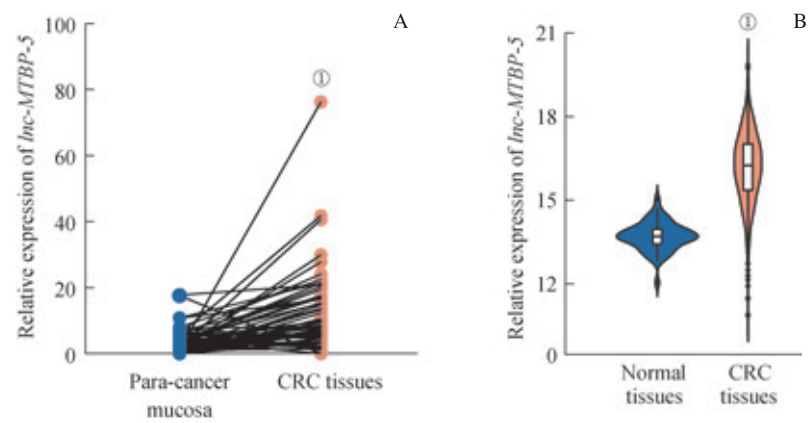
Fig 1 Analysis of lncRNAs related to CRC metastasis in SRA database

2.2 *lnc-MTBP-5* 在 CRC 患者癌组织和癌旁组织中的表达差异

为了探讨 *lnc-MTBP-5* 与 CRC 的临床相关性, 本研究对 53 例结直肠癌组织和癌旁组织标本中 *lnc-MTBP-5* 的表达进行检测, 结果 (图 2A) 显示癌组织中 *lnc-MTBP-5* 的表达显著高于癌旁组织 ($P=0.000$)。进一步针对 TCGA 数据库中 638 例癌组织和 51 例正常组织中的 *lnc-MTBP-5* 表达进行评估, 结果 (图 2B) 显示癌组织中其表达高于正常组织 ($P=0.000$)。继而提示, *lnc-MTBP-5* 的高表达可能参与了 CRC 的发生和发展。

2.3 CRC 组织中 *lnc-MTBP-5* 表达与患者临床预后的关系

为进一步验证 *lnc-MTBP-5* 与 CRC 的临床相关性, 本研究发现在 TCGA 数据库的 638 例患者中, *lnc-MTBP-5* 表达的高低与患者的初次病理诊断年龄 ($P=0.020$)、临床分期 ($P=0.006$)、淋巴结转移情况 ($P=0.017$)、远处转移情况 ($P=0.033$) 有关 (表 3); 且与低表达组相比, *lnc-MTBP-5* 高表达组中初次病理确诊年龄小于 65 岁以及临床分期为 III、IV 期的患者居多, 且易发生淋巴结转移和远处转移。



Note: A. Expression of *lnc-MTBP-5* in CRC tissues and para-cancer mucosa in Renji cohort. [ⓐ] $P=0.000$, compared with the para-cancer mucosa. B. Expression of *lnc-MTBP-5* in CRC tissues and normal tissues in TCGA database. [ⓑ] $P=0.000$, compared with the normal tissues.

图 2 *lnc-MTBP-5* 在正常结直肠组织与 CRC 组织中的表达
Fig 2 Expressions of *lnc-MTBP-5* in CRC tissues and normal colorectal tissues

表 3 CRC 患者中 *lnc-MTBP-5* 表达与临床信息的关系
Tab 3 Relationship between *lnc-MTBP-5* expression and clinical information in patients with CRC

Clinical information	Number	Expression of <i>lnc-MTBP-5</i>		<i>P</i> value
		High	Low	
Age of initial pathological diagnosis/year				0.020
<65	253	140	113	
≥ 65	381	175	206	
Gender				0.866
Male	336	168	168	
Female	298	147	151	
Clinical stage				0.006
Stage I / II	342	152	190	
Stage III / IV	271	151	120	
Lymphatic metastasis				0.017
No	361	164	197	
Yes	271	149	122	
Distant metastasis				0.033
No	468	221	247	
Yes	156	89	67	
Vascular invasion				0.573
No	418	202	216	
Yes	133	68	65	
History of colonic polyps				0.933
No	155	71	84	
Yes	84	38	46	
Recurrence after treatment				0.082
No	406	196	210	
Yes	113	65	48	

2.4 *lnc-MTBP-5* 对 CRC 细胞侵袭能力的影响

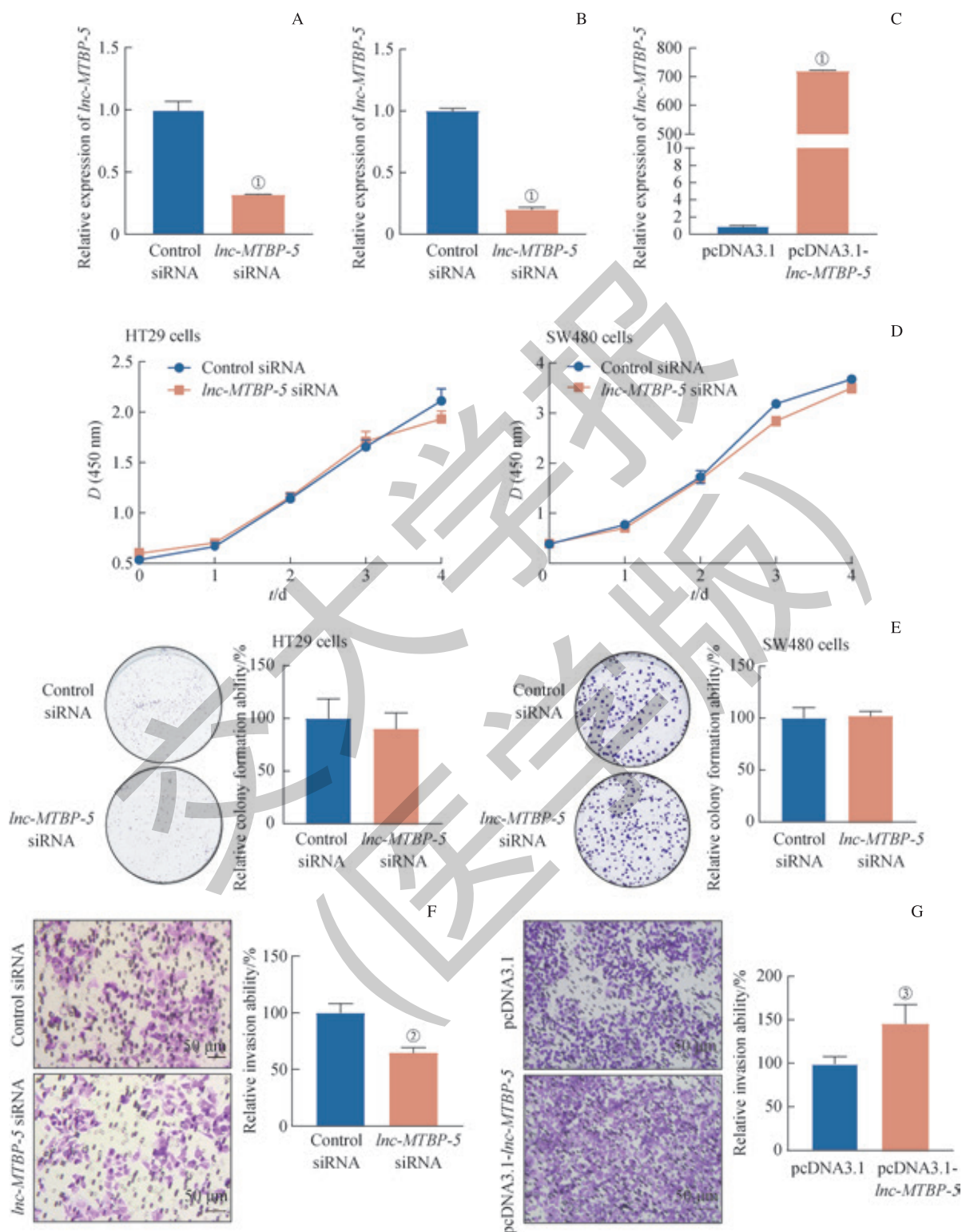
为评估 *lnc-MTBP-5* 在 CRC 发生与发展中的生物学功能, 本研究通过向 HT29、SW480 细胞中转染 *lnc-MTBP-5* siRNA 发现, *lnc-MTBP-5* 的表达量显著下降; 而在 SW480 细胞中转染 pcDNA3.1-*lnc-MTBP-5* 后发现, *lnc-MTBP-5* 的表达量显著升高 (图 3A ~ C)。随后, 进一步开展功能实验发现, 在 HT29 和 SW480 细胞中转染 *lnc-MTBP-5* siRNA 后, 与转染 Control siRNA 的细胞相比, 前者的增殖和克隆形成能力无明显差异 (图 3D、E)。因 HT29 是高分化型 CRC 细胞系, 侵袭能力较弱, 侵袭功能实验仅选择低分化的 SW480 细胞系进行。侵袭实验结果表明, 经 lncRNA siRNA 转染的 SW480 细胞穿过 Transwell 小室的数量少于经 Control siRNA 转染的细胞 (图 3F)。相反, 与转染对照质粒的 SW480 细胞相比, 上调 *lnc-MTBP-5* 后, SW480 细胞侵袭能力增强 (图 3G)。以上结果表明, *lnc-MTBP-5* 可以增强 SW480 细胞的侵袭能力, 但对 HT29 和 SW480 细胞的增殖和克隆形成能力无明显影响。

2.5 *lnc-MTBP-5* 与转移起始基因表达的相关性

转移起始基因的缺失或过表达均能促使细胞外基质的降解、细胞黏附的减少、细胞侵袭能力的增强、血管生成以及肿瘤微环境的改变^[11]。为进一步探索 *lnc-MTBP-5* 的作用机制, 本研究对 TCGA 数据库中 *lnc-MTBP-5* 的表达与转移起始基因的表达做相关性分析。结果 (图 4) 显示, *lnc-MTBP-5* 与结肠癌转移相关因子 1 (metastasis associated in colon cancer 1, MACC1) 呈正相关; 经进一步探索其下游机制发现, *lnc-MTBP-5* 与间质上皮转换因子 (mesenchymal to epithelial transition factor, MET)、钙黏着蛋白关联蛋白 (cadherin-associated protein, CTNNB1) 均呈正相关, 而与

肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/AKT) 均无明显正相关性。继

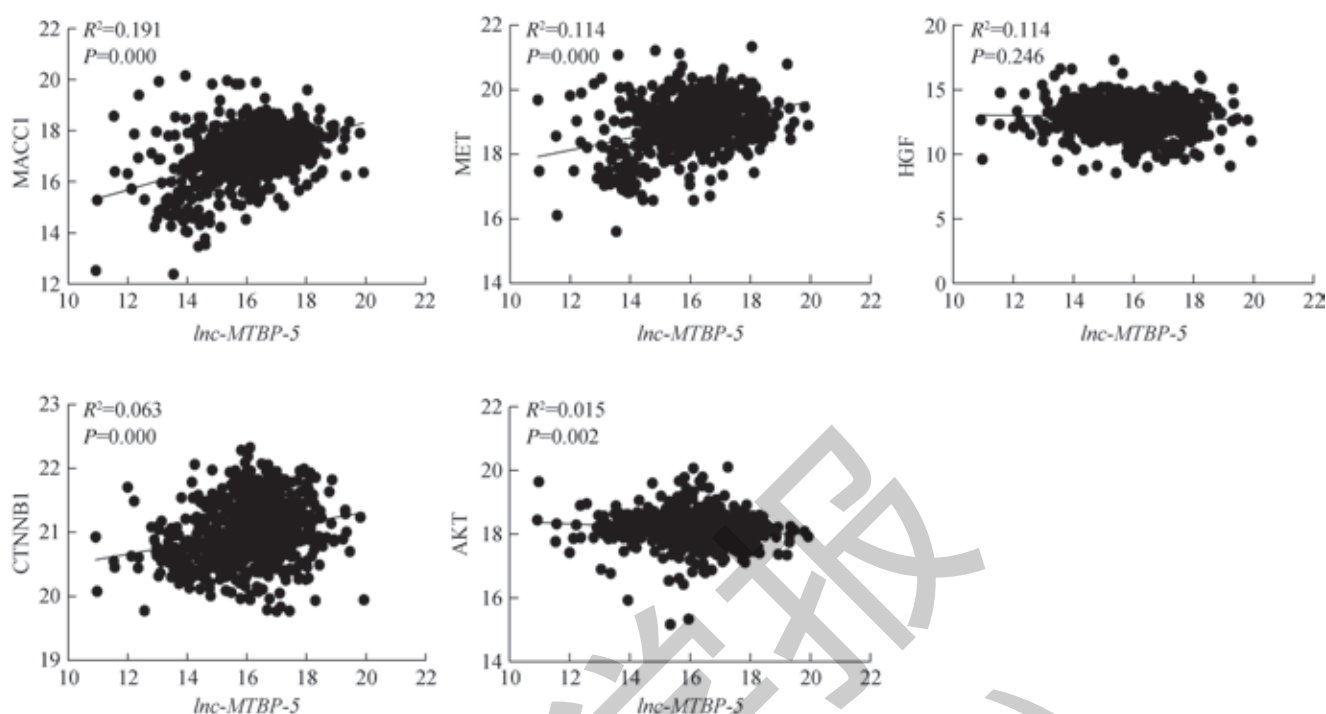
而提示, *lnc-MTBP-5* 促进 CRC 的转移可能与 MACC1 激活 HGF/MET 通路及其下游 AKT/CTNNB1 通路有关。



Note: A–B. Transfection efficiency of *lnc-MTBP-5* siRNA verified by qPCR in HT29 cells (A) and SW480 cells (B). ^① $P=0.000$, compared with the control siRNA. C. Overexpression efficiency of pcDNA3.1-*lnc-MTBP-5* verified by qPCR in SW480 cells. ^② $P=0.000$, compared with the pcDNA3.1. D–F. Effects of *lnc-MTBP-5* siRNA on the proliferation (D), clonal formation (E) and invasion ability (F) of CRC cells. ^③ $P=0.003$, compared with the control siRNA. G. Effect of pcDNA3.1-*lnc-MTBP-5* on the invasion ability of CRC cells. ^④ $P=0.027$, compared with the pcDNA3.1.

图 3 *lnc-MTBP-5* 在 CRC 发生与发展中的生物学功能

Fig 3 Biological function of *lnc-MTBP-5* in the occurrence and development of CRC

图4 *lnc-MTBP-5*与转移相关基因表达的相关性分析Fig 4 Correlation analysis of *lnc-MTBP-5* and the expression of metastasis associated genes

3 讨论

研究^[12-13]显示, CRC的发病率和死亡率呈逐年上升趋势, 且其病灶转移是CRC患者死亡的主要原因。因此, 针对CRC转移的早期检测, 并寻找有效的分子标志物成为近年来预防和治疗CRC的关键点。

已有研究报道, CRC的转移与许多分子标志物相关, 如 *JMJD2C*、*FOXC1*、*SGK1*、*RHBDD1*^[14-17]。同时, 非编码RNA也被广泛报道参与了CRC转移的发生。依据RNA长度的不同, 非编码RNA被分为两类; 其中, 小于200个核苷酸的转录本被称为microRNA, 通常在转录后调节基因的表达; 而大于200个核苷酸的转录本被称为lncRNA, 该类RNA具有较强的组织和细胞表达特异性, 参与调节多种重要的细胞活动, 如募集染色质修饰物(*HOTAIR*)^[18]、调节X染色体基因表达(*XIST*)^[19]、调节基因组表达和蛋白质活性等。此外, lncRNA还具有结构相对稳定, 易于在血液和尿液中被检测, 且定量方法灵敏、快速、成本低廉等优势^[20], 使得该类RNA可作为癌症初筛、早期诊治的分子标志物, 具有较强的应用价值。

在本研究中, 通过整合分析2个SRA数据集的数据, 筛选出在正常-原发灶-转移灶中表达依次上调的lncRNA, 通过结合文献以及细胞实验、临床标本信息的验证, 我们选择了*lnc-MTBP-5*继续研究; 结果显示, 该

lncRNA在多个CRC细胞系和CRC组织中均呈高表达。同时, 本研究通过提取TCGA数据库中CRC患者的临床信息进行研究, 结果显示*lnc-MTBP-5*的表达量与患者预后紧密相关。继而推测, *lnc-MTBP-5*或可作为早期预警和诊断CRC的分子标志物; 由于高表达*lnc-MTBP-5*的患者易发生CRC转移, 临床医师应在患者早期给予积极治疗, 手术后密切随访。

CRC的肝转移是影响患者预后的重要危险因素之一, 因此揭示CRC转移的发生机制亦是改善患者预后的关键点。本研究通过下调*lnc-MTBP-5*的表达发现, SW480细胞的侵袭能力减弱, 继而证实*lnc-MTBP-5*的高表达可提高CRC的转移能力。

先前已有研究表明lncRNA在CRC中呈现异常表达, 但有关其在CRC转移中的作用及机制仍知之甚少。目前, 基于lncRNA在序列、结构以及生物功能上的高度异质性, 存在有多种lncRNA的分类方法, 如根据亚细胞定位可将lncRNA分为细胞核lncRNA与细胞质lncRNA。lncRNA的亚细胞定位与其功能密切相关, 如在细胞质中lncRNA可作为竞争性内源RNA(competiting endogenous RNA, ceRNA)与microRNA竞争性结合, 调节miRNA抑制的靶基因表达^[21]。已有研究^[22]报道, lncRNA *UICLM*通过竞争性结合miR-215来调节其下游*ZEB2*的表达, 进而促进CRC的肝转移。lncRNA *XIST*可直接结合miR-

200b-3p, 调节其下游 *ZEB1* 的表达, 从而促进 CRC 细胞的增殖、侵袭、上皮间充质转化及小鼠模型中肿瘤的生长和转移^[23]。考虑到本研究中 *lnc-MTBP-5* 在胞质、胞核均有分布, 我们推测 *lnc-MTBP-5* 可通过竞争性结合相关 microRNA, 调节下游靶基因的表达, 促进 CRC 的转移。

癌症的转移是一个复杂的过程, 包括细胞外基质的降解、细胞黏附性的降低、癌细胞的黏附性增加和肿瘤微环境的改变等^[24-28], 是许多肿瘤发展、侵袭的重要过程^[29-30]。根据在转移中所起的作用, 与转移相关的基因可分为促癌基因、转移起始基因、转移进展基因和转移毒力基因^[11]。转移起始基因 *MACC1* 已被证实存在于恶性肿瘤组织中有较高的表达, 尤其在发生转移的恶性组织中。*MACC1* 可通过结合 *Met* 的启动子区, 激活 HGF/MET 通路, 进而促进肿瘤的增殖、上皮间质转化、血管生成、侵袭转移、调节细胞代谢和凋亡^[31-32]。HGF/MET 通路的激活可使其下游的相应信号通路被激活, 如通过 TWIST/VEGF 通路促进血管生成, 激活 Nanog 分子增强细胞干

性, 激活 *STAT1/3*、*MCL1/FAS* 调节细胞凋亡和免疫重建。其中, AKT/CTNNB1 通路是 HGF/MET 通路促进肿瘤转移的中间信号通路。本研究初步分析了 TCGA 数据库中 *lnc-MTBP-5* 与转移相关基因表达的相关性, 并发现 *lnc-MTBP-5* 促进 CRC 的转移可能与 *MACC1* 激活 HGF/MET 通路及其下游 AKT/CTNNB1 通路有关。结合 *lnc-MTBP-5* 在胞质、胞核的分布, 我们推测 *lnc-MTBP-5* 可能通过竞争性结合 microRNA 提高 *MACC1* 的表达, 进而激活下游 AKT/CTNNB1 通路。而其具体机制还有待实验进一步探究。

综上所述, *lnc-MTBP-5* 在 CRC 中表达增加, 且其高表达与患者预后呈负相关; 同时, *lnc-MTBP-5* 可促进 CRC 细胞的侵袭。因此, *lnc-MTBP-5* 或可作为临床评估 CRC 发生与发展、远处转移的新型肿瘤标志物, 其相关信号通路及分子机制亦将是我們下一步的研究重点。随着研究的不断深入, *lnc-MTBP-5* 或可为临床预防、治疗 CRC 及相关预后评估提供更加广阔的前景。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Jemal A, Ward EM, Johnson CJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2014, featuring survival[J]. J Natl Cancer Inst, 2017, 109(9). DOI: 10.1093/jnci/djx030.
- [3] Tauriello DV, Calon A, Lönardó E, et al. Determinants of metastatic competency in colorectal cancer[J]. Mol Oncol, 2017, 11(1): 97-119.
- [4] Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, et al. NCCN guidelines insights: colon cancer, version 2.2018[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2018, 16(4): 359-369.
- [5] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 629-641.
- [6] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3): 155-159.
- [7] Sun TT, He J, Liang Q, et al. LncRNA GClncl promotes gastric carcinogenesis and may act as a modular scaffold of WDR5 and KAT2A complexes to specify the histone modification pattern[J]. Cancer Discov, 2016, 6(7): 784-801.
- [8] Kim J, Piao HL, Kim BJ, et al. Long noncoding RNA *MALAT1* suppresses breast cancer metastasis[J]. Nat Genet, 2018, 50(12): 1705-1715.
- [9] Hua JT, Ahmed M, Guo HY, et al. Risk SNP-mediated promoter-enhancer switching drives prostate cancer through lncRNA *PCAT19*[J]. Cell, 2018, 174(3): 564-575. E18.
- [10] Zhang YJ, Pitchiaya S, Cieřlik M, et al. Analysis of the androgen receptor-regulated lncRNA landscape identifies a role for ARLNC1 in prostate cancer progression[J]. Nat Genet, 2018, 50(6): 814-824.
- [11] Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(5): 341-352.
- [12] Nishida T, Egashira Y, Akutagawa H, et al. Predictors of lymph node metastasis in T1 colorectal carcinoma: an immunophenotypic analysis of 265 patients[J]. Dis Colon Rectum, 2014, 57(8): 905-915.
- [13] Zhang L, Zhang SY, Yao J, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth[J]. Nature, 2015, 527(7576): 100-104.
- [14] Wu XN, Li RX, Song Q, et al. JMJD2C promotes colorectal cancer metastasis via regulating histone methylation of *MALAT1* promoter and enhancing β -catenin signaling pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 435.
- [15] Zhang Y, Liao Y, Chen CY, et al. P38-regulated *FOXO1* stability is required for colorectal cancer metastasis[J]. J Pathol, 2020, 250(2): 217-230.
- [16] Lee LYW, Woolley C, Starkey T, et al. Serum- and glucocorticoid-induced kinase *Sgk1* directly promotes the differentiation of colorectal cancer cells and restrains metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(2): 629-640.
- [17] Zhang MM, Miao F, Huang R, et al. RHBDD1 promotes colorectal cancer metastasis through the Wnt signaling pathway and its downstream target *ZEB1*[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 22.
- [18] Loewen G, Jayawickramarajah J, Zhuo Y, et al. Functions of lncRNA *HOTAIR* in lung cancer[J]. J Hematol Oncol, 2014, 7: 90.
- [19] Sahakyan A, Yang YH, Plath K. The role of *Xist* in X-chromosome dosage compensation[J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(12): 999-1013.
- [20] Yan XH, Hu ZY, Feng Y, et al. Comprehensive genomic characterization of long non-coding RNAs across human cancers[J]. Cancer Cell, 2015, 28(4): 529-540.
- [21] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?[J]. Cell, 2011, 146(3): 353-358.
- [22] Chen DL, Lu YX, Zhang JX, et al. Long non-coding RNA *UICLM* promotes colorectal cancer liver metastasis by acting as a ceRNA for microRNA-215 to regulate *ZEB2* expression[J]. Theranostics, 2017, 7(19): 4836-4849.
- [23] Chen DL, Chen LZ, Lu YX, et al. Long noncoding RNA *XIST* expedites metastasis and modulates epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): E3011.
- [24] Said AH, Raufman JP, Xie GF. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer[J]. Cancers (Basel), 2014, 6(1): 366-375.
- [25] Marei H, Carpy A, Woroniuk A, et al. Differential Rac1 signalling by guanine nucleotide exchange factors implicates FL II in regulating Rac1-driven cell migration[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10664.
- [26] Highfill SL, Cui YZ, Giles AJ, et al. Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(237): 237ra67.
- [27] Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, et al. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine[J]. Gastroenterology, 2005, 129(2): 626-638.
- [28] Xie CQ, Ji N, Tang ZG, et al. The role of extracellular vesicles from different origin in the microenvironment of head and neck cancers[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 83.
- [29] Scully OJ, Bay BH, Yip G, et al. Breast cancer metastasis[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2012, 9(5): 311-320.
- [30] Boire A, Brastianos PK, Garzia L, et al. Brain metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(1): 4-11.
- [31] Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, et al. Met, metastasis, motility and more[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(12): 915-925.
- [32] Radhakrishnan H, Walther W, Zinke F, et al. *MACC1*-the first decade of a key metastasis molecule from gene discovery to clinical translation[J]. Cancer Metastasis Rev, 2018, 37(4): 805-820.

[收稿日期] 2019-12-23

[本文编辑] 邢宇洋

