

长链非编码 RNA *H19* 促进结直肠癌细胞株增殖的研究*

霍小蕾¹, 裴振², 李永芝³, 韩玲娜², 田向阳⁴, 张毅强^{5△}

1. 长治医学院 组织胚胎学教研室(长治 046000); 2. 长治医学院 生理学教研室(长治 046000);
3. 云南中医学院(昆明 650500); 4. 长治医学院附属和平医院(长治 046000); 5. 长治医学院 生化教研室(长治 046000)

【摘要】 目的 研究长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) 家族分子母源性印迹基因 19 转录因子(*H19*) 在结直肠癌组织及细胞株中的表达情况及其对人结直肠癌 SW620 细胞增殖的影响。**方法** 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 20 例结直肠癌组织及其癌旁组织,以及结直肠癌细胞株 SW480、HCT116、SW620 和正常结直肠上皮 NCM460 细胞中 *H19* 的表达。结直肠癌 SW620 细胞分别转染 *H19* siRNA(*si-H19* 组) 和阴性对照序列(*si-NC* 组), 分别采用流式细胞技术、细胞克隆形成实验和 CCK8 检测两组细胞的增殖情况。qRT-PCR 和 Western blot 检测两组细胞 G₁/S-特异性周期蛋白-D1(CyclinD1)和细胞周期素依赖激酶(cyclin dependent kinase 4, CDK4)的表达情况。**结果** 与癌旁组织和正常结直肠上皮 NCM460 细胞相比较,结直肠癌组织和细胞株中 *H19* 的表达水平升高($P<0.05$);*si-H19* 组细胞 *H19* 表达水平低于 *si-NC* 组,且细胞活力和细胞克隆数均低于 *si-NC* 组,以上差异均有统计学意义($P<0.05$);同时,相较于 *si-NC* 组,*si-H19* 组 CyclinD1 和 CDK4 基因和蛋白的表达受到了明显抑制($P<0.05$)。**结论** 结直肠癌组织及细胞株中 *H19* 呈高表达,沉默 *H19* 表达能明显抑制结直肠癌细胞的增殖能力,为结直肠癌的靶向治疗提供了潜在策略。

【关键词】 lncRNA 结直肠癌 细胞增殖 治疗

Effects of LncRNA *H19* on Proliferation of Human Colorectal Cancer SW620 Cells HUO Xiao-lei¹, PEI Zhen², LI Yong-zhi³, HAN Ling-na², TIAN Xiang-yang⁴, ZHANG Yi-qiang^{5△}. 1. Department of Histology and Embryology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; 2. Department of Physiology, Changzhi medical college, Changzhi 046000, China; 3. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 4. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Heping, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; 5. Biochemistry Department of Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China
△ Corresponding author, E-mail: zhangyiqiangty@163.com

【Abstract】 Objective To determine the expression level of long non-coding RNA (lncRNA) imprinted maternallyexpressed transcript (*H19*) in colorectal cancer tissues and its effect on proliferation of colorectal cancer SW620 cells. **Methods** Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was applied to detect the expression of *H19* in 20 paired tumor tissues and adjacent normal tissues, and in normal NCM460 cells and colorectal cancer SW480, HCT116 and SW620 cells. The specific small interfering RNA for *H19* (*si-H19* group) or negative control sequence (*si-NC* group) were transfected into SW620 cells. Proliferation of the transfected cells was detected using flow cytometry, CCK8 assay and clone formation experiment. The expressions of CyclinD1 and cyclin dependent kinase 4 (CDK4) were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** The expression levels of *H19* in colorectal cancer tissues and cells were higher compared with those in adjacent normal tissues and normal NCM460 cells. Lower *H19* level, cell activities and cell clone numbers were found in *si-H19* transfected cells compared with those in *si-NC* transfected cells ($P<0.05$). *si-H19* transfected cells had decreased expression of CyclinD1 and CDK4 ($P<0.05$). **Conclusion** *H19* expression in colorectal cancer is high. Knock-down *H19* expression can inhibit proliferation of colorectal cancer cells, which provides a potential strategy for targeted therapy of colorectal cancer.

【Key words】 Long non-coding RNA Colorectal cancer Cell proliferation Therapy

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,近年来我

国结直肠癌的发病率和死亡率均保持上升趋势,严重威胁着人类的身体健康,其治疗也面临着严峻的挑战^[1]。目前,结直肠癌的治疗手段仍然是以手术切除为主,随着治疗技术的日臻成熟,尽管治疗方法大有改进,但是预后(5 年生存率)仍然较差^[2-3]。

* 国家自然科学基金(No. 81600951)、长治医学院科研启动基金(No. 普及 QDZ201501)和长治医学院科技创新团队项目(No. CX201503)资助

△ 通信作者, E-mail: zhangyiqiangty@163.com

因此,结直肠癌的治疗亟需一种新的治疗靶标,以更好监测其复发和转移等病程。长链非编码 RNA (lncRNA)是一种可以定位于细胞核或细胞质或者特定亚细胞器的 RNA,而 lncRNA 定位与它的功能密切相关^[4]。定位在细胞核的 lncRNA 常常发挥调控表观遗传学的作用,如影响组蛋白修饰、结合在基因增强子区等;定位在细胞质的 lncRNA 常常与细胞质的一系列蛋白或 RNA 发挥作用,如与 miRNA 作为内源竞争 RNA (ceRNA) 发挥作用、遮蔽某蛋白的磷酸化位点阻止其被磷酸化等^[4]。lncRNA 是近年来发现的与多种疾病密切相关的分子^[4-5],大量研究显示,lncRNA 家族分子母源性印迹基因 19 转录因子 (imprinted maternally expressed transcript, *H19*) 与多种肿瘤的发生发展密切相关,如:胃癌^[6]、肝癌^[7]、肾癌^[8]和食管癌^[9]等,然而 *H19* 在结直肠癌中的研究报道还较少。本研究通过研究 lncRNA *H19* 在结直肠癌中的表达、定位及分子调控方式,初步探究 *H19* 对结直肠癌生物学行为的作用机制,为结直肠癌的分子治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料和细胞系

Trizol 试剂和逆转录试剂盒 (# 218161) 购于 QIAGEN 公司;逆转录试剂盒 (# A3500) 购于 Promega 公司; LipofectAMINE 2000 购于 Invitrogen 公司;CCK8 试剂购于碧云天生物科技公司;细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购于碧云天生物科技公司;细胞浆/核 RNA 抽提试剂盒购于 Ambion 生物公司;siRNA 片段购于广州瑞博生物有限公司;G1/S-特异性周期蛋白-D1 (CyclinD1) 和细胞周期素依赖激酶 (cyclin dependent kinase 4, CDK4) 抗体购于上海优宁维生物科技股份有限公司, β -actin 抗体购于芯科生物有限公司。

人正常结肠上皮 NCM460 细胞,人结直肠癌 SW480、SW620 和 SW620 细胞株均购于中国科学院上海生科院细胞资源中心。NCM460、SW480 和 SW620 细胞所用培养液为含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI1640 培养基,HCT116 细胞所用培养基为含 10% FBS 的 DMEM 培养基,细胞保持在 37 °C 含有体积分数 5% CO₂ 的潮湿环境中。上述细胞复苏后,培养传代,至第 3 代细胞进行细胞转染实验及后续相应实验。

1.2 实验方法

1.2.1 一般资料和样本取材 收集 20 例长治医学院附属和平医院肿瘤科自 2012 年 6 月至 2014 年 6 月行结直肠癌根治性切除术的结直肠癌患者组织,包括癌组织和癌旁组织 (癌周 5 cm 范围)。患者年龄 35~75 岁,平均 (55.23 $\pm$ 3.45) 岁。患者术前均未进行放化疗和生物治疗、未合并其他肿瘤等,并且可收集患者完整检查、治疗和手术资料,以及联系方式等。标本首先置于液氮灌中 10 min,然后取出放于 -80 °C 保存用于实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 lncRNA *H19* 的表达。

1.2.2 qRT-PCR 检测结直肠癌组织和细胞系中 lncRNA *H19* mRNA 的表达 采用 TRIzol 法提取 20 例人结直肠癌组织及其相应的癌旁正常组织的总 RNA,以及人正常结肠上皮 NCM460 细胞和人结直肠癌 SW480、SW620 和 HCT116 细胞株的总 RNA,反转录得到 cDNA,进行 qRT-PCR 检测,以 *GAPDH* 为内参。引物根据 GenBank 序列,用软件 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.22 设计,由华大基因生物科技有限公司合成。引物序列如下:lncRNA *H19*,上游:5'-GCCTTGACGTGCTGGATCT-3',下游:5'-TCCGATGCTTTACTCAAGAAGTT-3',扩增产物长度 184 bp;*GAPDH*,上游:5'-TGCACCACCAACTGCT TAGC-3',下游:5'-GGCATGGACTGTGGTCAT GAG-3',扩增产物长度 87 bp。PCR 反应条件为在 95 °C 5 min,随后为 95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s 重复 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析目的基因的相对表达量。

1.2.3 qRT-PCR 检测分析 SW620 细胞内 lncRNA *H19* 的定位

1.2.3.1 SW620 细胞的细胞核/质 RNA 分离 收集约 1 $\times$ 10⁶ 人结直肠癌 SW620 细胞,用预冷的 PBS 清洗数次,离心,重悬,再将细胞分成两份 (一份抽总 RNA,一份抽核/质 RNA),总 RNA 的抽提利用 TRIzol 法,细胞核/质 RNA 的抽提步骤参考胞浆/核 RNA 抽提试剂盒说明书。此时,这批 SW620 细胞共收集到 3 份 RNA:一份总 RNA、一份细胞质 RNA、一份细胞核 RNA。

1.2.3.2 qRT-PCR 检测 SW620 细胞 lncRNA *H19* 表达 将上述 3 份 RNA 进行逆转录得到 cDNA,进行 qRT-PCR 检测 lncRNA *H19* 表达。引物设计软件、合成公司、PCR 反应条件同前,lncRNA *H19*、*GAPDH* (细胞质的参照物)^[10] 引物序列同前。其余引物序列如下:U6 (细胞核的参照物)^[10] 上游:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下

游:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3',扩增产物长度 94 bp;18S(细胞质的参照物)上游:5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3',下游:5'-GT AACCCGTTGAACCCCAT-3',扩增产物长度 197 bp。

1.2.3.3 SW620 细胞内 lncRNA H19 的定位分析

将 qRT-PCR 测得的细胞核 RNA 样本中 lncRNA H19、U6、GAPDH、18S 基因表达量减去各基因在总 RNA 样本中的表达量,得到 ΔC_t ,然后计算 $2^{-\Delta C_t}$,最后进行 $\log_{10}(2^{-\Delta C_t})$ 转换即得到最终的表达值^[10]。当 H19 表达量 >0 时表示该分子主要分布在细胞核中,反之,当 H19 表达量 <0 时表示该分子主要分布在细胞质中。

1.2.4 细胞转染沉默 SW620 结直肠癌细胞 H19 基因 首先,将生长状态良好的 SW620 细胞接种于 6 孔板中(按 1.5×10^5 /孔),然后用 si-NC 和 si-H19 (100 nmol/L)干扰试剂进行细胞转染,分为 si-NC 组、si-H19-1 组, si-H19-2 组, si-H19-1 + si-H19-2 组。具体步骤参照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书。转染 36 h 后,收集细胞及上清进行 qRT-PCR 法检测 4 组 H19 的表达(方法同 1.2.2),并以 si-NC 组基因表达量为 1,计算其余 3 组的相对表达百分率为沉默效率。相应 siRNA 片段的序列分别为: siH19-1, 5'-CCAACAUCAAAGACACCAUdTdT-3'; siH19-2, 5'-UAAGUCAUUGCACUGGUUdTdT-3'(这两个是公司设计的针对 H19 mRNA 序列不同位置进行干扰的片段);阴性对照序列(si-NC): siN05815122147。

1.2.5 流式细胞术分析 siRNA 沉默 lncRNA H19 后 SW620 细胞的细胞周期分布 Si-NC 和 si-H19 转染处理 SW620 细胞 48h 后,收集细胞并用 70% 冷乙醇固定,4 °C 过夜。用碘化丙啶(PI, 0.05 mg/mL)和 RNA 酶(2 mg/mL)常温下进行染色 30min,用流式细胞仪分析细胞周期,细胞处于 G₀/G₁、S 和 G₂/M 期在细胞周期的百分比的评估使用 Cell Lab Quanta SC 软件。

1.2.6 克隆形成实验检测 siRNA 沉默 lncRNA H19 后 SW620 细胞的克隆形成情况 各组细胞(si-NC 组和 si-H19 组,转染 24 h)按每孔 1000 个细胞分别接种于 6 孔板中,培养约 15 d 后,肉眼可见克隆时即终止培养。PBS 清洗数次,体积分数 4% 多聚甲醛固定 30 min,再用 1% 结晶紫染液染色 10 min,晾干,拍照。每组设置 3 个重复。

1.2.7 CCK8 检测 siRNA 沉默 lncRNA H19 后

SW620 细胞的增殖情况 各组细胞(si-NC 组和 si-H19 组)设置 5 个复孔,转染 0~96 h 后,各板加入 100 μ L 混合培养液(每孔加入 90 μ L 联合培养基和 10 μ L CCK8 溶液),在 37 °C 孵育长达 2 h,并使用 SpectroMAX 190 酶标仪在 450 nm 处的光密度(OD₄₅₀)进行分析。

1.2.8 qRT-PCR 和 Western blot 分析 siRNA 沉默 lncRNA H19 后 SW620 细胞的 CyclinD1 和 CDK4 的基因和蛋白表达水平、H19 基因水平 H19 siRNA 瞬时转染结直肠癌 SW620 细胞 48 h 后收集相应的 RNA,qRT-PCR 法检测细胞 H19、CyclinD1 和 CDK4 mRNA 的表达,以 GAPDH 为内参,方法同 1.2.2。其余引物序列如下,CyclinD1 上游: 5'- TCGTTGCCCTCTGTGCCACA-3', 下游:5'- GCAGTCCGGGTCACACTTGA-3',扩增产物长度 176 bp; CDK4 上游:5'- TTGGTGTCTGGT GCCTATGGG-3',下游:5'- CCATCAGCCGGACA ACATTGGG-3',扩增产物长度 192 bp。

Si-NC 和 si-H19 转染处理 SW620 细胞 48 h 后,用 RIPA 裂解液(强)冰上裂解细胞 30 min, 20 W 超声震荡 2 min,在 4 °C 条件下,12 000 $\times g$ 离心 10 min,收集上清,测蛋白浓度。50 μ g 待测蛋白在 100 g/L SDS-PAGE 进行电泳分离,电泳条件为积层胶 80 V 40 min、分离胶 120 V 1.5 h,然后在 100 V 的条件下湿转膜 1.5 h,室温封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜(CyclinD1 和 CDK4 一抗 1 : 1 000, β -actin—抗 1 : 400),洗膜,二抗 37 °C 孵育 1 h,洗膜,显影。用 Scion Image 软件进行条带的灰度分析,以各组的 CyclinD1 和 CDK4 的条带灰度值与内参灰度值比值为目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两两比较采用 t 检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 lncRNA H19 在结直肠组织和细胞中的表达及细胞内定位

首先,qRT-PCR 法检测 20 例人结直肠癌组织及其相应的癌旁正常的组织,结果显示,相对于癌旁正常组织 (1.30 ± 0.20),H19 在结直肠癌组织 (1.97 ± 0.30) 中呈现高表达,差异有统计学意义 ($P = 0.0397$);此外,H19 的表达在正常结直肠上皮 NCM460 细胞 (1.00 ± 0.17) 低于结直肠癌 SW480 (1.84 ± 0.34)、SW620 (7.41 ± 1.57)、HCT116

(2.38 ± 0.77) 细胞, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05), 其中, SW620 结直肠癌细胞中 *H19* 的表达最高 ($P=0.0021$), 因此后续实验我们选择 SW620 进行相应实验。用 qRT-PCR 法检测相应细胞核/质指标, 结果显示 *H19* 主要定位于细胞质中 (图 1), 这提示其可能扮演调控某些基因转录后水平或翻译水平的角色。

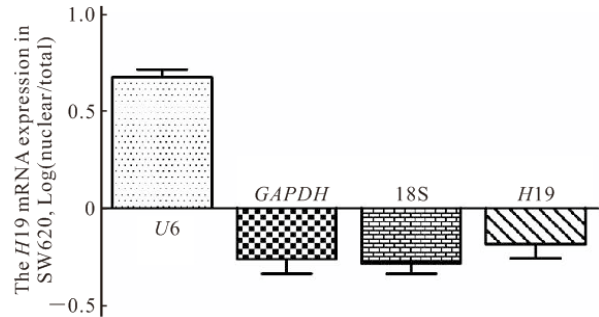


图 1 qRT-PCR 法检测 *H19* 在结直肠癌 SW620 细胞内的定位情况
Fig 1 The location of *H19* in colorectal cancer SW620 cells detected by qRT-PCR

The expression level >0 indicates that the molecule is mainly distributed in the nucleus, while the expression level <0 indicates that the molecule is mainly distributed in the cytoplasm

2.2 验证 lncRNA *H19* siRNA 在结肠癌 SW620 细胞中的沉默效率

si-NC 组、si-*H19*-1 组、si-*H19*-2 组和 si-*H19*-1+si-*H19*-2 组的 *H19* 基因表达水平分别为 $1.00 \pm$

0.08 、 0.65 ± 0.09 、 0.56 ± 0.16 和 0.38 ± 0.07 , 故 si-*H19*-1 组, si-*H19*-2 组, si-*H19*-1+si-*H19*-2 组的沉默效率分别为 35%、44%、62%, 与转染 si-NC 相比, 3 个 si-*H19* 组的 *H19* 表达均受到抑制 ($P < 0.01$), si-*H19*-1+si-*H19*-2 组 *H19* 的抑制程度尤为明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。故后续实验中的 si-*H19* 组均使用 si-*H19*-1+si-*H19*-2 进行转染。

2.3 沉默 lncRNA *H19* 表达对 SW620 细胞增殖的影响

H19 siRNA 瞬时转染结直肠癌 SW620 细胞 48 h 后, 流式细胞技术检测结果显示, 与 si-NC 组细胞相比, si-*H19* 组处于 G_0/G_1 期的细胞比例 [$(45.21 \pm 2.33)\%$ vs. $(56.01 \pm 1.44)\%$] 增多 ($P=0.0306$), 处于 S 期的细胞比例 [$(43.21 \pm 0.66)\%$ vs. $(30.93 \pm 0.86)\%$] 减少, 差异有统计学意义 ($P=0.0045$); *H19* siRNA 转染处理细胞后培养 15 d, 细胞克隆形成实验结果显示, 转染 si-*H19* 组 (64 ± 24) 相对于 si-NC 组 (315 ± 26), 细胞克隆形成受到了抑制, 且克隆数量减少, 差异有统计学意义 ($P=0.0105$) (图 2); 此外, CCK8 细胞增殖实验结果也显示, 转染 96 h 后, si-*H19* 组相对于 si-NC 组的细胞增殖活性受到抑制, 差异有统计学意义 ($P=0.0472$) (图 3)。

2.4 沉默 lncRNA *H19* 表达对 SW620 细胞的细胞周期分子表达的影响

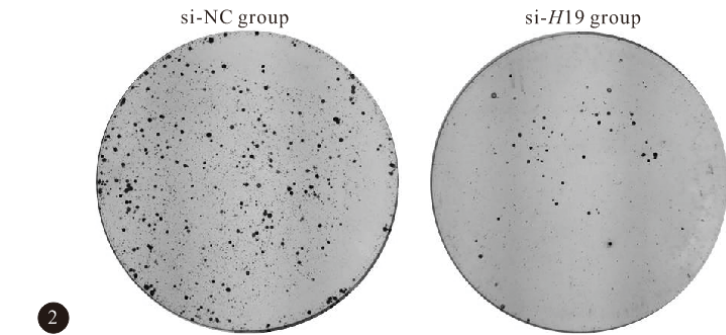


图 2 细胞克隆形成实验检测 *H19* siRNA 对 SW620 细胞克隆形成的影响
影响

Fig 2 Clone formation experiment to detect the effects of *H19* siRNA on SW620 cell clone formation
SW620 cell proliferation detected by CCK8 method

* $P < 0.05$, vs. si-NC group at the same time point

qRT-PCR 法检测结果显示, 与对照组 siNC 细胞相比, si-*H19* 细胞组中 *H19*、CyclinD1 和 CDK4 的表达水平均受到了不同程度的抑制, 差异有统计

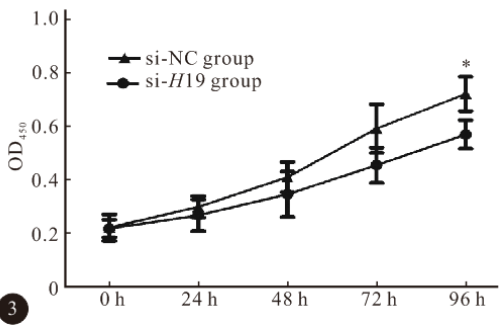


图 3 CCK8 法检测 *H19* siRNA 对 SW620 细胞增殖活性的影响

Fig 3 The effects of *H19* siRNA on

学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 4); Western blot 法检测结果也同样表明, 与 si-NC 组相比, si-*H19* 细胞组 CyclinD1 和 CDK4 的蛋白表达量减

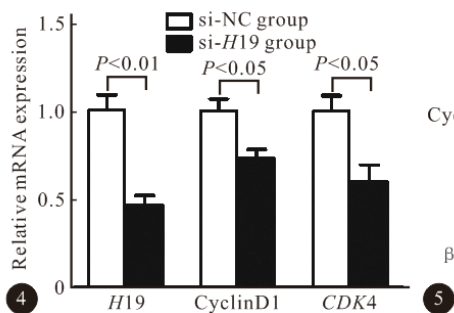


图 4 qRT-PCR 法检测 *H19* siRNA 对 SW620 细胞周期分子的影响

Fig 4 The effect of *H19* siRNA on SW620 cell CyclinD1 and CDK4 detected by qRT-PCR

CyclinD1 and CDK4 detected by Western blot

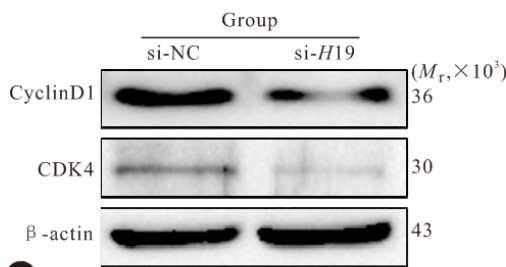


图 5 Western blot 法检测 *H19* siRNA 对 SW620 细胞周期分子的影响

Fig 5 The effect of *H19* siRNA on SW620 cell

少,差异有统计学意义(P 均 <0.05) (图 5)。

3 讨论

结直肠癌是一种常见的消化道肿瘤,其发病过程涉及多基因、多步骤、多阶段^[11]。近年来,我国结直肠癌发病率和死亡率均呈上升趋势,其治疗也面临着严峻的挑战。随着分子生物学技术在疾病的应用逐渐深入,寻找合适、有效的分子标志物和治疗靶点是当前结直肠癌治疗的新策略。

LncRNA 是在真核生物中发现的一类转录本长度在 200~100 000 nt、缺少完整功能性的开放阅读框(ORF)、仅编码少量功能性短肽的 RNA 分子^[12]。LncRNA 的异常表达或功能缺失也与多种疾病有关,如银屑病、冠心病、糖尿病、肿瘤等^[13]。LncRNA *H19* 是第一个被发现具有反式转录调控功能的 lncRNA 分子,该基因是父系印记母系表达,位于人类染色体 11p15.5 的 *H19/IGF2* 的基因簇上^[14]。近年来的研究发现,在结直肠癌组织中 *H19* 处于紊乱表达状态, HAN 等^[15]对 83 例结直肠癌患者进行预后分析发现,高表达 *H19* 的结直肠癌患者预后更差。此外, KONG 等^[16]对 51 例 IV 期的结直肠癌患者进行 qRT-PCR 检测,结果显示 *H19* 高表达与结直肠癌伴随肝转移的患者结直肠癌密切相关。本研究通过分析 20 例结直肠癌患者组织中的 *H19* 表达水平,结果显示,结直肠癌组织中 *H19* 的表达高于癌旁正常组织的表达($P < 0.05$),此外,结直肠癌 SW480、SW620、HCT116 细胞中 *H19* 的表达也高于正常结直肠上皮 NCM460 细胞($P < 0.05$),这些结果表明:结直肠癌患者的 *H19* 表达升高,可能是判断结直肠癌发生的潜在标志物。

肿瘤的发生发展常常伴随着细胞的恶性增殖,

因此,肿瘤又是一类渐进性增殖异常的疾病^[17]。研究显示,结直肠癌中 *H19* 的高表达可能与其恶性增殖、侵袭转移和化疗抵抗密切相关, LIANG 等^[18]研究报道 *H19* 可“海绵样”吸附 miR-138 和 miR-200a 发挥 ceRNA 的作用,促进 EMT 相关分子 Vimentin, ZEB1 和 ZEB2 的表达,从而抑制结直肠癌细胞的侵袭转移; HAN 等^[15]通过 siRNA 沉默及 RNA pull-down 等实验检测发现 *H19* 通过招募 eIF4A3 促进结直肠癌细胞的增殖。本研究通过流式细胞检测技术、CCK8 法和细胞克隆形成实验,检测在结直肠癌 SW620 细胞中通过 siRNA 沉默 *H19* 的表达后细胞的增殖情况,与对照组 si-NC 细胞相比,流式细胞检测技术结果显示 si-*H19* 组处于 G₁ 期的细胞比例增多($P < 0.05$),处于 S 期的细胞比例减少($P < 0.01$);细胞克隆形成实验检测结果显示 si-*H19* 细胞组细胞克隆形成受到了抑制,且克隆数量减少($P < 0.05$);CCK8 细胞增殖实验结果显示 si-*H19* 细胞组的细胞增殖活性明显受到抑制($P < 0.05$)。这些结果表明,在结直肠癌细胞中沉默 *H19* 的表达可明显抑制其恶性增殖的生物学表型。

通常,周期蛋白包括 G₁ 期、S 期和 M 期蛋白三种, CyclinD1 可与 CDK4 特异性结合,形成 CyclinD1-CDK4 复合体,推进 G₁ 期向 S 期的进程^[19]。目前, *H19* 如何影响结直肠癌的细胞增殖的分子机制还未见文献报道,我们在 lncRNA 核质定位实验中发现 *H19* 主要定位在细胞质中以及流式细胞技术检测中发现 si-*H19* 可使细胞周期 G₁ 到 S 期的进展受到阻滞,因此,我们推测 *H19* 通过在细胞质中发挥调控 CyclinD1 和 CDK4 的作用,从而影响结直肠癌细胞的增殖。本研究 qRT-PCR 和

Western blot 实验检测结果显示：与对照组 si-NC 细胞相比，si-*H19* 细胞组中 CyclinD1 和 CDK4 的表达水平均受到了不同程度的抑制($P<0.05$)，提示我们 *H19* 可能是通过调控周期相关蛋白的表达影响周期进程，进而促进了结直肠癌细胞增殖。

本研究通过结直肠癌临床样本的检测、细胞表型实验和分子技术检测等研究策略从 lncRNA *H19* 在结直肠癌中的表达、定位及分子调控方式，初步探究体外水平 *H19* 对结直肠癌生物学行为的影响。然而，本研究存在两点局限性：①本研究未涉及体内动物实验(如：裸鼠皮下成瘤实验、裸鼠尾静脉注射成瘤实验等)进行验证；②本研究仅证明 *H19* 调控细胞周期分子 CyclinD1 和 CDK4 的 mRNA 和蛋白水平，并未进一步验证具体作用机制探讨。相信通过后续不断深入和完善 *H19* 在结直肠癌的作用机制探讨，可为结直肠癌的治疗提供一个新策略。

参 考 文 献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, *et al.* Cancer statistics in China. *CA Cancer J Clin*,2016,66(2):115-132.

[2] SUNKARA V, HEBERT JR. The colorectal cancer mortality-to-incidence ratio as an indicator of global cancer screening and care. *Cancer*,2015,121(10):1563-1569.

[3] BRENNER H, KLOOR M, POX CP. Colorectal cancer. *Lancet*,2014,383(9927):1490-1502.

[4] CHEN LL. Linking long noncoding RNA localization and function. *Trends Biochem Sci*,2016,41(9):761-772.

[5] BEERMANN J, PICCOLI MT, Viereck J, *et al.* Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiol Rev*,2016,96(4):1297-1325.

[6] WU D, OZAKI T, YOSHIHARA Y, *et al.* Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) stimulates tumor suppressor p53 protein in response to DNA damage through complex formation and acetylation. *J Biol Chem*,2013,288(2):1353-1364.

[7] ZANG L, YANG F, YUAN JH, *et al.* Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to *H19*-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*,2013,34(3):577-586.
- [8] WANG L, CAI Y, ZHAO X, *et al.* Down-regulated long non-coding RNA *H19* inhibits carcinogenesis of renal cell carcinoma. *Neoplasma*,2015,62(3):412-418.

[9] HUANG C, CAO L, QIU L, *et al.* Upregulation of *H19* promotes invasion and induces epithelial-to-mesenchymal transition in esophageal cancer. *Oncol Lett*,2015,10(1):291-296.

[10] HUARTE M, GUTTMAN M, FELDSEER D, *et al.* A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*,2010,142(3):409-419.

[11] ZHANG X, AI F, LI X, *et al.* Inflammation-induced S100A8 activates Id3 and promotes colorectal tumorigenesis. *Int J Cancer*,2015,137(12):2803-2814.

[12] BAZZINI AA, JOHNSTONE TG, CHRISTIANO R, *et al.* Identification of small ORFs in vertebrates using ribosome footprinting and evolutionary conservation. *EMBO J*,2014,33(9):981-993.

[13] 杨倩,黄宏斌,龚朝建,等. lncRNAs 参与基因表达调控机制的研究进展. *中南大学学报(医学版)*,2014,39(1):91-95.

[14] 周含,孙亚男. 肿瘤相关基因 lncRNA *H19* 的研究进展. *现代肿瘤医学*,2016(11):1822-1826.

[15] HAN D, GAO X, WANG M, *et al.* Long noncoding RNA *H19* indicates a poor prognosis of colorectal cancer and promotes tumor growth by recruiting and binding to eIF4A3. *Oncotarget*,2016,7(16):22159-22173.

[16] KONG H, WU Y, ZHU M, *et al.* Long non-coding RNAs: novel prognostic biomarkers for liver metastases in patients with early stage colorectal cancer. *Oncotarget*,2016,7(31):50428-50436.

[17] BALKWILL F, MANTOVANI A. Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. *Clin Pharmacol Ther*,2010,87(4):401-406.

[18] LIANG WC, FU WM, WONG CW, *et al.* The lncRNA *H19* promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer. *Oncotarget*,2015,6(26):22513-22525.

[19] SCHWARTZ GK, SHAH MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol*,2005,23(36):9408-9421.

(2017-03-22 收稿,2017-06-27 修回)

编辑 吕熙