

长链非编码RNA OIP5-AS1促进结直肠癌细胞上皮-间质转化

孙健, 俞建康, 段妍西, 周建平

(中国医科大学附属第一医院胃肠外科/疝与腹壁外科, 沈阳 110001)

摘要 目的 探究长链非编码RNA (lncRNA) OIP5-AS1对结直肠癌转移的作用及其机制。方法 采用实时定量PCR检测结直肠癌细胞系 (SW480、HCT116、HT-29、Caco-2) 中OIP5-AS1的表达, 选择高表达细胞系进行表达沉默。结直肠癌细胞系随机转染对照序列 (NC组)、干扰序列1 (OIP5-AS1 siRNA1组) 或干扰序列2 (OIP5-AS1 siRNA2组)。用Transwell实验检测细胞迁移能力; Western blotting检测OIP5-AS1对上皮-间质转化相关蛋白E-cadherin、N-cadherin和Vimentin表达的影响; 免疫荧光分析OIP5-AS1对E-cadherin、N-cadherin蛋白表达和细胞定位的影响。结果 与低侵袭性HT-29和Caco-2细胞相比, 高侵袭性SW480和HCT116细胞中OIP5-AS1的表达显著增高 ($P < 0.05$)。OIP5-AS1表达沉默后, SW480和HCT116细胞迁移能力减弱。与对照组相比, 沉默OIP5-AS1后SW480和HCT116细胞中E-cadherin蛋白表达增加, N-cadherin和Vimentin蛋白表达减少。结论 OIP5-AS1可能通过诱导结直肠癌细胞上皮-间质转化和迁移, 促进结直肠癌的转移。

关键词 结直肠癌; OIP5-AS1; 上皮-间质转化; 转移

中图分类号 R735.3 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)10-0877-05

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20241009.1600.008>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.10.003

Long non-coding RNA OIP5-AS1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells

SUN Jian, YU Jiankang, DUAN Yanxi, ZHOU Jianping

(Department of Gastrointestinal Surgery & Hernia and Abdominal Wall Surgery, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract **Objective** To explore the effect of the long non-coding RNA, Opa interacting protein 5-antisense RNA 1 (OIP5-AS1), on colorectal cancer metastasis and elucidate the underlying mechanisms. **Methods** OIP5-AS1 expression levels were analyzed in various colorectal cancer cell lines (SW480, HCT116, HT-29, and Caco-2) via real-time polymerase chain reaction. Cell lines with high OIP5-AS1 expression levels were selected and randomly transfected with the control sequence (NC group), interference sequence 1 (OIP5-AS1 siRNA1 group), or interference sequence 2 (OIP5-AS1 siRNA2 group). Transwell assay was used to assess cell migration. Additionally, the effects of OIP5-AS1 on the expression levels of epithelial-mesenchymal transition-related proteins, including E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin, were examined via Western blotting. Immunofluorescence assay was used to evaluate the effects of OIP5-AS1 on the protein expression levels and cellular localization of E-cadherin and N-cadherin. **Results** Expression levels of OIP5-AS1 were significantly higher in the SW480 and HCT116 highly invasive cell lines than in the HT-29 and Caco-2 low invasive cell lines ($P < 0.05$). OIP5-AS1 silencing decreased cell migration, increased E-cadherin levels, and decreased N-cadherin and Vimentin levels in SW480 and HCT116 cells. **Conclusion** Our findings suggest that OIP5-AS1 promotes metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition and migration of colorectal cancer cells.

Keywords colorectal cancer; OIP5-AS1; epithelial-mesenchymal transition; metastasis

结直肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,也是全球癌症相关死亡的第3大原因,其发病率呈逐渐上升趋势^[1]。肿瘤的侵袭和远处转移是导致结直肠癌死亡率高的主要原因。目前,综合治疗手段的进

步在一定程度上延长了结直肠癌患者的生存期,但转移性结直肠癌患者的预后仍较差^[2]。长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过200个核苷酸的新型RNA转录物,可通过组蛋白修饰、染色质重塑以及DNA甲基化等方式调控细胞增殖、细胞周期和细胞迁移等多种生物过程,参与肿瘤的发生和发展^[3-5]。研究^[6]表明,异常表达的lncRNA也参与了结直肠癌的恶性进展,但其机制尚未明确。

基金项目:辽宁省科学技术应用基础研究计划(1655189294903)

作者简介:孙健(1988-),男,主治医师,博士研究生。

通信作者:周建平, E-mail: zjphama@163.com

收稿日期:2024-07-16

网络出版时间:2024-10-10 14:12:13

lncRNA Opa互作蛋白5反义转录物1(Opa interacting protein 5-antisense RNA 1, OIP5-AS1)位于人类15号染色体q15.1上^[7]。研究^[8-10]发现,OIP5-AS1在胃癌、乳腺癌、宫颈癌的发生、发展过程中发挥重要作用。本研究重点探讨了lncRNA OIP5-AS1在结直肠癌中的表达水平及其对细胞侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人结直肠癌细胞系HCT116、SW480、HT-29和Caco-2购自中国科学院上海分院细胞库。胎牛血清购自美国Gibco公司,总RNA提取试剂盒和实时荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司,逆转录试剂盒购自上海吉玛制药技术有限公司。脂质体Lipofectamine 3000购自美国Invitrogen公司,E钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、N钙黏蛋白(N-cadherin)抗体、波形蛋白(Vimentin)抗体、GAPDH多克隆抗体购自美国Proteintech公司,HRP标记山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司,BCA蛋白浓度检测试剂盒和ECL发光液购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞培养和转染

SW480、HT-29和Caco-2细胞在含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养,HCT116细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养,所有培养基中添加100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素。细胞在37℃、含5% CO₂的加湿室中培养。按照试剂说明书,用Lipofectamine 3000试剂转染细胞,将细胞分为NC组(转染无义寡核苷酸序列)、OIP5-AS1 siRNA1组(转染干扰序列OIP5-AS1 siRNA1)和OIP5-AS1 siRNA2组(转染干扰序列OIP5-AS1 siRNA2)。

1.3 RNA提取和实时荧光定量PCR

使用TRIzol试剂盒从细胞或组织中提取总RNA,按逆转录试剂盒操作步骤将提取的mRNA反转录成cDNA。为了检测OIP5-AS1的表达,合成OIP5-AS1和内参GAPDH的特异性引物。反应条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,设置35个循环。PCR引物序列:OIP5-AS1,正向5'-TGCGAAGATGGCGGAGTAAG-3',反向5'-TAGTTCCTCTCTCTGGCCG-3';GAPDH,正向5'-GACAGTCAGCCGCATCTTCT-3',反向5'-GCGCCCAATACGACCAAATC-3'。

1.4 Western blotting检测

细胞转染48 h后,用含1 mmol/L苯甲基磺酰氟和磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液从细胞中提取总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。在10% SDS-PAGE中加入20~30 μg蛋白样品进行电泳分析,然后转移到PDVF膜上。随后用5%脱脂奶粉封闭,用一抗在4℃下孵育过夜。第2天用辣根过氧化物酶偶联二抗孵育膜。采用ECL检测试剂盒检测蛋白条带。

1.5 免疫荧光染色

细胞转染48 h后,将培养板中的细胞用冰甲醇固定15 min,PBS浸洗后,细胞用0.5% TritonX-100室温通透20 min,1%山羊血清白蛋白室温封闭30 min,孵育一抗4℃过夜。第2天PBST浸洗后避光滴加荧光二抗,湿盒中孵育1 h,随后滴加DAPI,避光孵育5 min染核,浸洗后用含抗荧光淬灭的封片液封片,荧光显微镜下观察和采集图像。

1.6 细胞迁移能力分析

转染48 h后收集细胞,在无血清培养基中重悬。将 6×10^4 个细胞接种到Transwell上室,上室培养基中加入无血清培养基。将含有10%血清的培养基作为化学诱导剂加入下室。在恒温培养箱中孵育16 h后,去除Transwell膜表面的细胞,将已转移到膜下的细胞用冷甲醇固定30 min,用结晶紫染色25 min。

1.7 统计学分析

使用SPSS 21软件进行统计分析。所有实验至少重复3次,取3次结果的平均值,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,2组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌细胞中OIP5-AS1表达水平

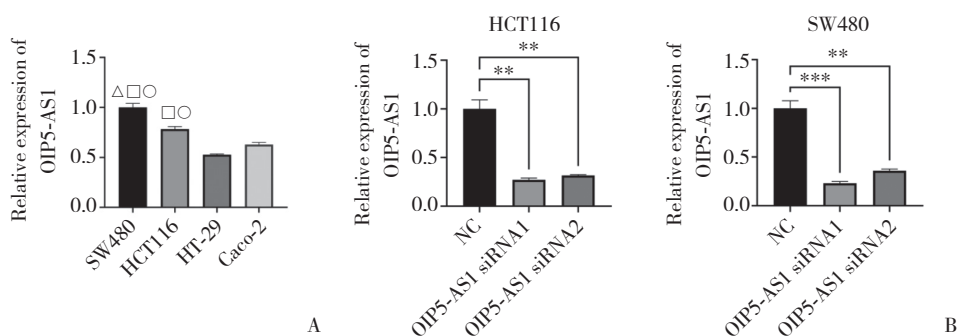
与低侵袭性HT-29、Caco-2细胞相比,高侵袭性SW480和HCT116细胞中OIP5-AS1表达水平较高(均 $P < 0.05$),SW480细胞中OIP5-AS1的表达水平显著高于HCT116、HT-29和Caco-2细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1A。本研究选取OIP5-AS1表达水平较高的SW480和HCT116细胞。SW480和HCT116细胞分别转染siRNA序列或相应的对照序列,结果显示,OIP5-AS1 siRNA1组和OIP5-AS1 siRNA2组中OIP5-AS1表达水平均显著低于NC组($P < 0.01$),见图1B。

2.2 沉默OIP5-AS1对细胞迁移的影响

Transwell结果表明,HCT116细胞中,OIP5-AS1

siRNA1组和OIP5-AS1 siRNA2组的细胞迁移能力显著低于NC组(分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);SW480细胞中,

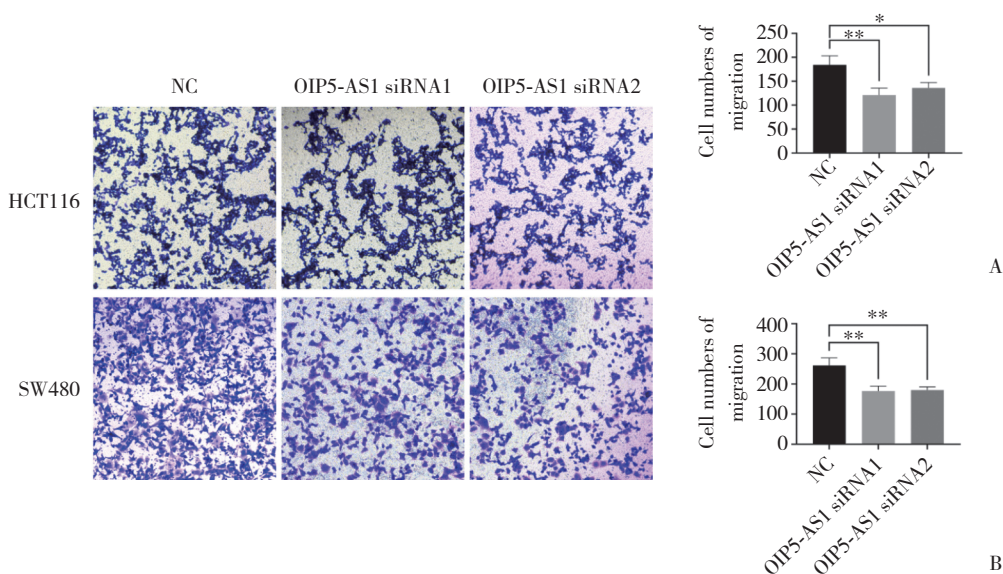
OIP5-AS1 siRNA1组和OIP5-AS1 siRNA2组的细胞迁移能力也显著低于NC组(均 $P < 0.01$)。见图2。



A, relative expression levels of OIP5-AS1 in SW480, HCT116, HT-29, and Caco-2 cells; B, relative expression levels of OIP5-AS1 in silenced (OIP5-AS1 siRNA1 and OIP5-AS1 siRNA2) and normal control (NC) groups. $\Delta P < 0.05$ vs. HCT116 cells; $\square P < 0.05$ vs. HT-29 cells; $\circ P < 0.05$ vs. Caco-2 cells. $** P < 0.01$; $*** P < 0.001$.

图1 OIP5-AS1在结直肠癌细胞中的表达水平

Fig.1 Expression levels of OIP5-AS1 in colorectal cancer cells



A, HCT116 cells; B, SW480 cells. $* P < 0.05$; $** P < 0.01$.

图2 HCT116和SW480细胞迁移实验 $\times 200$

Fig.2 Migration of HCT116 and SW480 cells $\times 200$

2.3 沉默OIP5-AS1对上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 标志物的影响

Western blotting结果显示,SW480和HCT116细胞中,与NC组比较,OIP5-AS1 siRNA1组和OIP5-AS1 siRNA2组中E-cadherin蛋白表达增加,N-cadherin和Vimentin蛋白表达减少($P < 0.05$),见图3。免疫荧光染色结果显示,SW480细胞中,与NC组相比,OIP5-AS1 siRNA1组和OIP5-AS1 siRNA2组中E-cadherin蛋白在细胞膜和细胞质中的表达增加,N-cadherin蛋白在细胞膜和

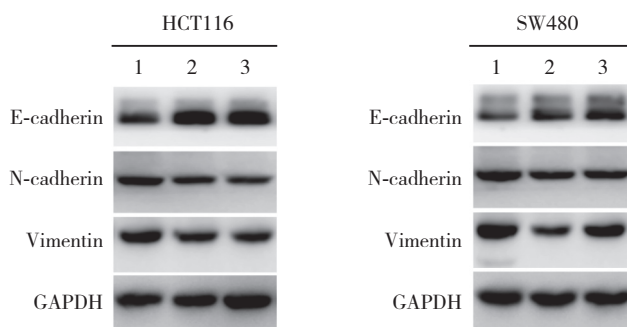
细胞质中的表达减少,见图4。

3 讨论

近年来,人们对lncRNA的作用机制进行了大量研究,越来越多的证据表明,lncRNA的异常表达在肿瘤生物学进展中具有重要的作用,如肿瘤发生、肿瘤进展和转移,贯穿肿瘤进展的全过程^[11-12]。因此,明确lncRNA的潜在机制将有助于开发癌症诊断和治疗的新策略。lncRNA OIP5-AS1已被证实在不同类型的

癌症中作为癌基因或抑癌基因,如在肝癌和肺癌中促进肿瘤的增殖、迁移、侵袭和EMT^[13-15];在宫颈癌中,

OIP5-AS1作为HuR的海绵或竞争性内源性RNA,抑制HuR引发的增殖表型,表现为抑癌作用^[16]。



1, NC group; 2, OIP5-AS1 siRNA1 group; 3, OIP5-AS1 siRNA2 group.

图3 HCT116和SW480细胞中EMT相关蛋白表达水平

Fig.3 Expression levels of epithelial-mesenchymal transition-related proteins in HCT116 and SW480 cells

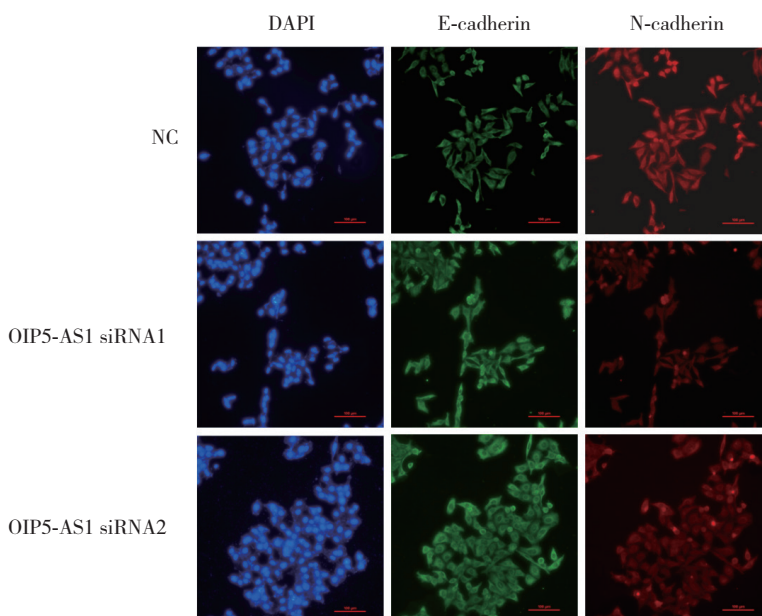


图4 OIP5-AS1沉默对SW480细胞中EMT相关蛋白定位的影响 ×200

Fig.4 Effect of OIP5-AS1 silencing on localization of epithelial-mesenchymal transition-related proteins in SW480 cells ×200

研究^[17]表明,OIP5-AS1可以增强结直肠癌细胞的放疗敏感性,因此有望成为结直肠癌放疗的一种基因增敏剂。然而,OIP5-AS1在结直肠癌中作用的研究报道很少。本研究发现,OIP5-AS1在高侵袭性SW480和HCT116细胞中表达水平较高,而在低侵袭性HT-29和Caco-2细胞中表达水平较低。体外实验结果显示,OIP5-AS1沉默抑制了结直肠癌SW480和HCT116细胞的迁移,促进肿瘤细胞的恶性进程。笔者认为,OIP5-AS1在结直肠癌中的促侵袭作用和放疗增敏作用并不矛盾,因为同一分子可能通过调控不同的通路,影响不同的生物学行为。

在EMT过程中,上皮细胞向间质状态的转变过程中伴随着细胞表达的黏附分子改变,使其获得迁移和侵袭能力。其特点是上皮标志物(如E-cadherin)的表达减少,间质标志物(如N-cadherin和Vimentin)的表达增加^[18-19]。本研究发现,在SW480和HCT116细胞中OIP5-AS1沉默均能明显上调E-cadherin的表达,下调N-cadherin和Vimentin的表达。本研究还发现,OIP5-AS1表达减少后,E-cadherin蛋白在SW480细胞的细胞膜和细胞质中分布显著增加,而N-cadherin蛋白在细胞膜和细胞质中分布显著减少,这导致肿瘤细胞间形成的黏附连接增加,使细胞间的接触增

加,为相邻细胞间提供更强的机械附着,细胞极性降低,肿瘤的迁移和转移能力减弱^[20]。因此,OIP5-AS1可能通过促进EMT的发生来促进细胞迁移,在结直肠癌转移中发挥促癌作用。

综上所述,OIP5-AS1促进结直肠癌细胞的EMT过程,从而促进肿瘤的恶性进展。这为结直肠癌的治疗提供了新的方向。然而,本研究尚未明确OIP5-AS1是通过何种机制促进了EMT的发生,其具体的作用机制和调控方式有待进一步论证。

参考文献:

- [1] 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. DOI: 10.1002/ijc.29210.
- [2] SONG M, GARRETT WS, CHAN AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148 (6) : 1244-1260. e16. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.12.035.
- [3] SCHMITZ SU, GROTE P, HERRMANN BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73 (13) : 2491-2509. DOI: 10.1007/s00018-016-2174-5.
- [4] JIANG C, LI X, ZHAO H, et al. Long non-coding RNAs: potential new biomarkers for predicting tumor invasion and metastasis [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15 (1) : 62. DOI: 10.1186/s12943-016-0545-z.
- [5] WU C, ZHU XT, XIA L, et al. High expression of long noncoding RNA PCNA-AS1 promotes non-small-cell lung cancer cell proliferation and oncogenic activity via upregulating CCND1 [J]. *J Cancer*, 2020, 11 (7) : 1959-1967. DOI: 10.7150/jca.39087.
- [6] LIN X, ZHUANG S, CHEN X, et al. lncRNA ITGB8-AS1 functions as a ceRNA to promote colorectal cancer growth and migration through integrin-mediated focal adhesion signaling [J]. *Mol Ther*, 2022, 30 (2) : 688-702. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.08.011.
- [7] NAEMURA M, KUROKI M, TSUNODA T, et al. The long noncoding RNA OIP5-AS1 is involved in the regulation of cell proliferation [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38 (1) : 77-81. DOI: 10.21873/anticancer.12194.
- [8] HUANG J, HOU S, XU J, et al. Long non-coding RNA OIP5-AS1 promotes cell proliferation and aerobic glycolysis in gastric cancer through sponging miR-186 [J]. *Arch Med Sci*, 2019, 17 (6) : 1742-1751. DOI: 10.5114/aoms.2019.87213.
- [9] ZENG H, WANG J, CHEN T, et al. Downregulation of long non-coding RNA Opa interacting protein 5-antisense RNA 1 inhibits breast cancer progression by targeting sex-determining region Y-box 2 by microRNA-129-5p upregulation [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110 (1) : 289-302. DOI: 10.1111/cas.13879.
- [10] YANG J, JIANG B, HAI J, et al. Long noncoding RNA opa-interacting protein 5 antisense transcript 1 promotes proliferation and invasion through elevating integrin $\alpha 6$ expression by sponging miR-143-3p in cervical cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (1) : 907-916. DOI: 10.1002/jcb.27454.
- [11] MESEURE D, DRAK ALSIBAI K, NICOLAS A, et al. Long non-coding RNAs as new architects in cancer epigenetics, prognostic biomarkers, and potential therapeutic targets [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015 : 320214. DOI: 10.1155/2015/320214.
- [12] PANDEY GK, KANDURI C. Long noncoding RNAs and neuroblastoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (21) : 18265-18275. DOI: 10.18632/oncotarget.4251.
- [13] ZHANG Z, LIU F, YANG F, et al. Knockdown of OIP5-AS1 expression inhibits proliferation, metastasis and EMT progress in hepatoblastoma cells through up-regulating miR-186a-5p and down-regulating ZEB1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101 : 14-23. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.026.
- [14] DENG J, DENG H, LIU C, et al. Long non-coding RNA OIP5-AS1 functions as an oncogene in lung adenocarcinoma through targeting miR-448/Bcl-2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98 : 102-110. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.031.
- [15] WANG M, SUN X, YANG Y, et al. Long non-coding RNA OIP5-AS1 promotes proliferation of lung cancer cells and leads to poor prognosis by targeting miR-378a-3p [J]. *Thorac Cancer*, 2018, 9 (8) : 939-949. DOI: 10.1111/1759-7714.12767.
- [16] KIM J, ABDELMOHSEN K, YANG X, et al. LncRNA OIP5-AS1/cyano sponges RNA-binding protein HuR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44 (5) : 2378-2392. DOI: 10.1093/nar/gkw017.
- [17] ZOU Y, YAO S, CHEN X, et al. LncRNA OIP5-AS1 regulates radio-resistance by targeting DYRK1A through miR-369-3p in colorectal cancer cells [J]. *Eur J Cell Biol*, 2018, 97 (5) : 369-378. DOI: 10.1016/j.ejcb.2018.04.005.
- [18] KALLURI R, WEINBERG RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119 (6) : 1420-1428. DOI: 10.1172/JCI39104.
- [19] MIETTINEN PJ, EBNER R, LOPEZ AR, et al. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors [J]. *J Cell Biol*, 1994, 127 (6 Pt 2) : 2021-2036. DOI: 10.1083/jcb.127.6.2021.
- [20] VAN ROY F, BERX G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65 (23) : 3756-3788. DOI: 10.1007/s00018-008-8281-1.

(编辑 陈 姜)