

• 论 著 •

LncRNA CASC19 调节 miR-490-3p/HMGA2 轴对 CRC 细胞增殖、迁移及化疗耐药性的影响^{*}

何林波¹, 周明明², 何 婷², 高 鹏^{1△}

1. 宜宾市第一人民医院检验科, 四川宜宾 644000; 2. 重庆大学附属肿瘤医院/重庆市肿瘤研究所/
重庆市肿瘤医院/肿瘤转移与个体化诊治转化研究重庆市重点实验室, 重庆 400030

摘 要:目的 探讨长链非编码核糖核酸癌症易感候选基因 19(lncRNA CASC19)调节微小 RNA(miR)-490-3p/高迁移率族蛋白 A2(HMGA2)轴对结直肠癌(CRC)细胞增殖、迁移及化疗耐药性的影响。方法 培养人正常结肠上皮细胞(FHC)和 CRC 细胞系(LOVO、HCT116、SW480), LOVO 细胞随机分为 Control 组、sh-NC 组、sh-CASC19 组、sh-CASC19+anti-NC 组和 sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组。实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 lncRNA CASC19、miR-490-3p、HMGA2 mRNA 表达; 双荧光素酶实验检测 lncRNA CASC19 与 miR-490-3p 及 miR-490-3p 与 HMGA2 之间的关系; 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)实验和克隆形成实验检测细胞增殖能力; 细胞划痕实验检测细胞迁移能力; Transwell 实验检测细胞侵袭能力; Western blot 实验检测细胞转移相关蛋白(MMP2、MMP9)、HMGA2 蛋白表达; 采用顺铂和氟尿嘧啶检测化疗耐药性。结果 CRC 细胞系中 lncRNA CASC19 和 HMGA2 mRNA 表达升高, 而 miR-490-3p 表达降低, 且 LOVO 细胞中 lncRNA CASC19、miR-490-3p 及 HMGA2 mRNA 表达差异最显著, 选择 LOVO 细胞进行后续实验。双荧光素酶实验显示, 转染 lncRNA CASC19、HMGA2 后, 与 mimic-NC 组相比, miR-490-3p mimic 组的荧光素酶活性下降($P<0.05$)。与 sh-NC 和 Control 组相比, sh-CASC19 组 LOVO 细胞的存活率、克隆数、迁移率、侵袭率、MMP2、MMP9、HMGA2 mRNA 及蛋白表达降低, miR-490-3p 表达升高($P<0.05$); 与 sh-CASC19 组、sh-CASC19+anti-NC 组相比, sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组 LOVO 细胞的存活率、克隆数、迁移率、侵袭率、MMP2、MMP9、HMGA2 mRNA 及蛋白表达升高, miR-490-3p 表达降低($P<0.05$)。化疗耐药性实验显示, 与 Control 组相比, sh-CASC19 组 LOVO 细胞的化疗耐药敏感性增加($P<0.05$); 与 sh-CASC19 组相比, sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组 LOVO 细胞的化疗耐药敏感性降低($P<0.05$); 且同一组中, 随着氟尿嘧啶、顺铂药物浓度的增加, 细胞存活率逐渐减低($P<0.05$)。结论 敲低 lncRNA CASC19 可通过调节 miR-490-3p/HMGA2 轴, 抑制 CRC 细胞增殖、迁移, 增加化疗耐药的敏感性。

关键词: 结直肠癌; 长链非编码核糖核酸癌症易感候选基因 19; 微小核糖核酸-490-3p; 高迁移率族蛋白 A2; 化疗耐药

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.19.004

中图法分类号:R735.34

文章编号:1673-4130(2025)19-2326-08

文献标志码:A

Effect of LncRNA CASC19 on the proliferation, migration and chemotherapy resistance of CRC cells by regulating miR-490-3p/HMGA2 signaling pathway^{*}

HE Linbo¹, ZHOU Mingming², HE Ting², GAO Peng^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan 644000, China; 2. Chongqing University Cancer Hospital/Chongqing Cancer Institute/Chongqing Cancer Hospital/Chongqing Key Laboratory of Translational Research for Cancer Metastasis and Individualized Treatment, Chongqing 400030, China

Abstract: Objective To investigate the effect of long non-coding ribonucleic acid cancer susceptibility candidate gene 19 (lncRNA CASC19) regulating the microRNA (miR)-490-3p/high mobility group protein A2 (HMGA2) axis on the proliferation, migration, and chemotherapy resistance of colorectal cancer (CRC) cells. **Methods** Human normal colonic epithelial cells (FHC) and CRC cell lines (LOVO, HCT116, SW480) were cultured. LOVO cells were randomly divided into Control group, sh-NC group, sh-CASC19 group, sh-CASC19+anti-NC group and sh-CASC19+anti-miR-490-3p group. The lncRNA CASC19, miR-490-3p and

^{*} 基金项目: 重庆市科学技术局(cstc2021jxjl130035); 四川省卫生健康委员会科技项目(24WSXT069)。

作者简介: 何林波, 男, 主管技师, 主要从事分子生物学方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: guli_ys@163.com。

HMGA2 mRNA expression were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The relationship between lncRNA CASC19 and miR-490-3p and between miR-490-3p and HMGA2 were detected by Dual luciferase assay. The cell proliferation ability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay and colony formation assay. The cell migration ability was detected by cell scratch assay. The cell invasion ability was detected by Transwell assay. The cell metastasis-related proteins (MMP2, MMP9) and HMGA2 protein expression were detected by Western blot assay. The chemotherapy resistance was detected by cisplatin and fluorouracil. **Results** The lncRNA CASC19 and HMGA2 mRNA expression increased in CRC cell lines, and miR-490-3p expression decreased. The lncRNA CASC19, miR-490-3p and HMGA2 mRNA expression in LOVO cells were the most significant, LOVO cells were selected for subsequent experiments. The dual luciferase assay showed that, after the transfection of lncRNA CASC19 and HMGA2, compared with mimic-NC group, the luciferase activity in miR-490-3p mimic group decreased ($P < 0.05$). Compared with sh-NC and Control groups, the survival rate, clone number, migration rate, invasion rate, MMP2, MMP9, HMGA2 mRNA and protein expression of LOVO cells in sh-CASC19 group were decreased, and the miR-490-3p expression was increased ($P < 0.05$). Compared with sh-CASC19 group and sh-CASC19 + anti-NC group, the survival rate, clone number, migration rate, invasion rate, MMP2, MMP9, HMGA2 mRNA and protein expression of LOVO cells in sh-CASC19 + anti-miR-490-3p group were increased, and the miR-490-3p expression was decreased ($P < 0.05$). The chemotherapy resistance experiment showed that, compared with Control group, the chemotherapy resistance sensitivity of LOVO cells in sh-CASC19 group increased ($P < 0.05$). Compared with sh-CASC19 group, the chemoresistance sensitivity of LOVO cells in sh-CASC19 + anti-miR-490-3p group was decreased ($P < 0.05$). In the same group, with the increase of the concentration of fluorouracil and cisplatin, the cell survival rate gradually decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Knockdown of lncRNA CASC19 can regulate miR-490-3p/HMGA2 signaling pathway, inhibit the proliferation and migration of CRC cells, and increase the sensitivity of chemotherapy resistance.

Key words: colorectal cancer; long non-coding RNA cancer susceptibility candidate gene 19; microRNA-490-3p; high mobility group protein A2; chemotherapy resistance

结直肠癌(CRC)是全球恶性程度较高的恶性肿瘤之一,其发病主要与遗传和环境因素有关,高复发转移率及耐药性是CRC患者治疗的主要难点^[1-3]。因此有必要探究CRC发病及耐药的分子机制,以改善CRC的治疗效果。长链非编码核糖核酸(lncRNA)是一类长度大于200个核苷酸的非编码RNA,无蛋白质编码能力,参与多种肿瘤疾病的发生、发展和治疗耐药过程^[4-5]。癌症易感候选基因19(CASC19)是一种新发现的lncRNA,研究发现, lncRNA CASC19在CRC组织和细胞中表达显著上调,通过增强CRC细胞的侵袭、迁移和增殖能力,促进CRC发生发展^[6-8]。目前关于lncRNA CASC19在CRC中的作用机制尚未完全阐明。微小RNA(miRNA)是lncRNA的重要调控因子,有研究显示,多种miRNA参与CRC的发生发展,其中miR-490-3p在CRC细胞中呈低表达,其高表达可减弱癌细胞的迁移和侵袭能力,抑制癌症的生长^[9]。高迁移率族蛋白A2(HMGA2)是HMGA基因家族的成员之一,是转移扩散和治疗耐药的潜在生物标志物,在CRC中表达增加,促进细胞增殖、凋亡和转移^[10]。过表达HMGA2促进CRC患者对氟尿嘧啶的化疗耐药^[11]。Starbase软件预测显示,miR-490-3p和lncRNA CASC19有共同的结合位点,与HMGA2的3'非翻译

区(3'UTR)存在互补基因序列。因此推测lncRNA CASC19可能通过调节miR-490-3p/HMGA2轴,影响CRC进展及化疗耐药性。因此,本研究旨在探讨lncRNA CASC19通过对miR-490-3p/HMGA2轴的调控,从而对CRC的增殖、迁移和化疗耐药性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 人正常结肠上皮细胞(FHC)和CRC细胞系(LOVO、HCT116和SW480)购自美国ATCC公司;RPMI-1640培养基(货号:SH30096)购自美国HyClone公司;顺铂(CAS:15663-27-1)及氟尿嘧啶(CAS:51-21-8)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;双荧光素酶检测试剂盒(货号:E1980)购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;细胞计数试剂盒-8(CCK-8)试剂盒(货号:C0037)购自上海碧云天生物技术有限公司;SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(货号:P1200)购自北京索莱宝科技有限公司;抗体MMP-2(货号:ab92536)、MMP-9(货号:ab76003)、HMGA2(货号:ab97276)、GAPDH(货号:ab9485)及二抗羊抗兔(货号:ab205718)和羊抗鼠(货号:ab205719)购自英国Abcam公司;酶标仪(型号:SpectraMax M)购自美国Molecular Devices公司;流式细胞仪(型号:ZE5 Cell Analyzer)购自美国BIO-RAD

公司;凝胶成像系统(型号: Tanon 1600)购自上海天能生命科学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 CRC 细胞中 lncRNA CASC19、miR-490-3p、HMGA2 mRNA 的表达 细胞 FHC、LOVO、HCT116、

SW480 使用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,放置于培养箱培养。提取细胞总 RNA,进行 qRT-PCR 扩增。以 GAPDH、U6 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,计算 lncRNA CASC19、miR-490-3p、HMGA2 mRNA 相对表达水平。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列(5'-3')

基因	上游引物	下游引物
lncRNA CASC19	CCTGGGTTAGAACCCTGCTG	TGGACAGCACCTTGAATGCT
miR-490-3p	CGTGGATCCTTCTTCAACCAACGGTGGTG	CCAGAATTCAAAGCAGGAAGAGTAAGACTTCC
HMGA2	ACCCAGGGGAAGACCCAAA	CCTCTTGGCCGTTTTTCTCCA
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

1.2.2 细胞转染及分组 将接种在 6 孔板培养的 LOVO 细胞随机分组处理:Control 组(正常培养)、sh-NC 组(转染 sh-NC)、sh-CASC19 组(转染 sh-CASC19)、sh-CASC19 + anti-NC 组(sh-CASC19 和 anti-NC 共转染)、sh-CASC19 + anti-miR-490-3p 组(sh-CASC19 和 anti-miR-490-3p 共转染)。按 1.2.1 中 qRT-PCR 步骤检测各组细胞中 lncRNA CASC19、miR-490-3p、HMGA2 mRNA 相对表达水平。

1.2.3 双荧光素酶实验检测 lncRNA CASC19 与 miR-490-3p、miR-490-3p 与 HMGA2 之间关系 在 6 孔板中接种 LOVO 细胞,将 lncRNA CASC19、HMGA2 的野生型报告基因载体(WT-CASC19、WT-HMGA2)、突变型报告基因载体(MUT-CASC19、MUT-HMGA2)分别与 mimic-NC 或 miR-490-3p mimic 共转染至细胞中。48 h 后根据双荧光素酶检测试剂盒测定各组细胞荧光素酶活性。

1.2.4 CCK8 和克隆形成实验检测细胞的增殖能力 CCK8:在 96 孔板中接种转染后的 LOVO 细胞,放置在 37 ℃、5% CO₂ 的湿润培养箱中培养 24 h。用 10 μL CCK8 试剂处理 2 h,用酶标仪在 450 nm 处读取吸光值。计算细胞存活率。克隆形成实验:在 12 孔板中接种转染后的 LOVO 细胞,形成可见克隆后固定及染色,统计细胞克隆数。

1.2.5 细胞划痕实验检测细胞的迁移能力 在 6 孔板中接种转染后的 LOVO 细胞,无菌枪头刮出“1”,并对 0 和 24 h 创面拍照,计算细胞迁移率=(初始划痕面积-24 h 后划痕面积)/初始划痕面积×100%。

1.2.6 Transwell 实验检测细胞的侵袭能力 预先将 Transwell 上室的底部膜用基质胶覆盖,而在下室中添加含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。将细胞悬液加入上室,常规培养 24 h 后,将侵袭的细胞用 4%多聚甲醛固定,结晶紫染色。拍照,计算细胞侵袭率。

1.2.7 Western blot 检测细胞中 MMP2、MMP9、HMGA2 蛋白表达 提取各组 LOVO 细胞的总蛋白,进行蛋白浓度测定,用 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白,并将蛋白转移到 PVDF 膜,然后进行 MMP-2(1 : 3 000)、MMP-9(1 : 5 000)、HMGA2(1 : 1 000)、GAPDH(1 : 8 000)一抗孵育。次日,二抗(1 : 5 000)孵育 1 h。最后,凝胶成像系统曝光、拍照。分析蛋白相对表达量。

1.2.8 顺铂和氟尿嘧啶检测细胞的化疗耐药性 分别以终浓度为 0、20、40、60、80 g/mL 氟尿嘧啶和 0、10、20、30、40 μmol/L 顺铂^[9]处理转染后的 LOVO 细胞,并采用 CCK8 试剂盒检测细胞存活率。其中,存活率降低表示化疗耐药的敏感性增加,并把 0 g/mL 氟尿嘧啶组和 0 μmol/L 顺铂组归一化处理。

1.3 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CRC 细胞中 lncRNA CASC19、miR-490-3p 和 HMGA2 mRNA 的表达 与 FHC 细胞相比,CRC 细胞系 LOVO、HCT116、SW480 中 lncRNA CASC19 和 HMGA2 mRNA 表达升高,miR-490-3p 表达降低(*P* < 0.05),其中 LOVO 细胞中 lncRNA CASC19、miR-490-3p 和 HMGA2 mRNA 表达差异最显著,因此,选择 LOVO 细胞进行后续实验。见表 2。

2.2 qRT-PCR 检测转染后 LOVO 细胞中 lncRNA CASC19、miR-490-3p 和 HMGA2 mRNA 及蛋白的表达 与 Control 组、sh-NC 组相比,sh-CASC19 组 LOVO 细胞中 lncRNACASC19 和 HMGA2 mRNA 及蛋白表达降低,而 miR-490-3p 表达升高(*P* < 0.05);与 sh-CASC19 组、sh-CASC19 + anti-NC 组相比,sh-CASC19 + anti-miR-490-3p 组 LOVO 细胞中

lncRNA CASC19 表达水平无明显变化, HMGA2 mRNA 及蛋白表达升高, 而 miR-490-3p 表达降低 ($P<0.05$)。见表 3、图 1。

2.3 双荧光素酶实验检测 lncRNA CASC19 与 miR-490-3p、miR-490-3p 与 HMGA2 之间的靶向关系
Starbase v2.0 软件预测显示, lncRNA CASC19 与 miR-490-3p 存在结合位点, 见图 2。HMGA2 的 3' UTR 与 miR-490-3p 存在互补核苷酸序列, 见图 3。双荧光素酶实验结果表明, 转染 lncRNA CASC19、HMGA2 后, 与 mimic-NC 组相比, miR-490-3p mimic

组的荧光素酶活性下降 ($P<0.05$)。见表 4。

表 2 qRT-PCR 检测 CRC 细胞系中 lncRNA CASC19、miR-490-3p 和 HMGA2 mRNA 的表达 ($n=6, \bar{x} \pm s$)			
项目	lncRNA CASC19	miR-490-3p	HMGA2 mRNA
FHC	1.00±0.10	1.01±0.11	0.98±0.09
LOVO	2.53±0.25 [*]	0.30±0.03 [*]	1.97±0.20 [*]
HCT116	2.01±0.20 [*]	0.41±0.04 [*]	1.44±0.14 [*]
SW480	1.46±0.15 [*]	0.68±0.07 [*]	1.29±0.13 [*]

注: 与 FHC 比较, ^{*} $P<0.05$ 。

表 3 各组细胞中 lncRNA CASC19、miR-490-3p 和 HMGA2 mRNA 及蛋白表达比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	lncRNA CASC19	miR-490-3p	HMGA2 mRNA	HMGA2 蛋白
Control 组	1.01±0.10	0.99±0.11	1.00±0.08	1.87±0.18
sh-NC 组	0.99±0.11	1.00±0.10	1.02±0.12	1.88±0.19
sh-CASC19 组	0.43±0.04 ^{*#}	2.12±0.21 ^{*#}	0.46±0.05 ^{*#}	0.96±0.10 ^{*#}
sh-CASC19+anti-NC 组	0.41±0.04	2.13±0.23	0.47±0.05	0.93±0.09
sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组	0.42±0.03	1.56±0.17 ^{△▲}	0.72±0.06 ^{△▲}	1.42±0.15 ^{△▲}

注: 与 Control 组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 sh-NC 组比较, [#] $P<0.05$; 与 sh-CASC19 组比较, [△] $P<0.05$; 与 sh-CASC19+anti-NC 组比较, [▲] $P<0.05$ 。

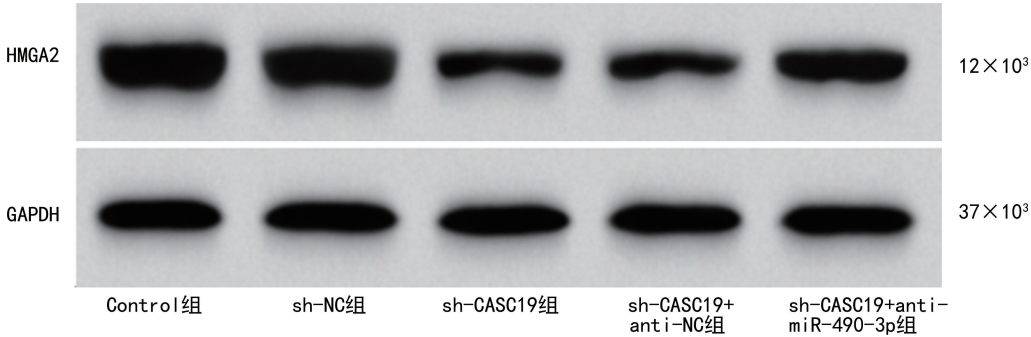


图 1 Western blot 检测 LOVO 细胞中 HMGA2 蛋白的表达

表 4 各组荧光素酶活性比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	WT-CASC19	MUT-CASC19	WT-HMGA2	MUT-HMGA2
mimic-NC 组	1.00±0.09	0.98±0.10	0.99±0.11	1.01±0.09
miR-490-3p mimic 组	0.44±0.05 [*]	0.97±0.11	0.48±0.05 [*]	1.02±0.13

注: 与 mimic-NC 组比较, ^{*} $P<0.05$ 。

2.4 lncRNA CASC19 对 LOVO 细胞增殖的影响
与 sh-NC 组、Control 组相比, sh-CASC19 组 LOVO 细胞的存活率、克隆数降低 ($P<0.05$); 与 sh-CASC19 组、sh-CASC19+anti-NC 组相比, sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组 LOVO 细胞的存活率、克隆数升高 ($P<0.05$)。见表 5、图 4。

2.5 lncRNA CASC19 对 LOVO 细胞迁移、侵袭的影响
与 sh-NC 组、Control 组相比, sh-CASC19 组 LOVO 细胞的迁移率、侵袭率和 MMP2、MMP9 蛋白水平降低 ($P<0.05$); 与 sh-CASC19 组、sh-CASC19+anti-NC 组相比, sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组 LOVO 细胞的迁移率、侵袭率和 MMP2、MMP9 蛋白

水平升高 ($P<0.05$)。见表 6、图 5~7。

表 5 各组细胞增殖比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)		
分组	存活率(%)	克隆数(个)
Control 组	100.00±0.00	139.36±9.94
sh-NC 组	99.56±0.45	140.67±10.07
sh-CASC19 组	46.32±4.63 ^{*#}	67.19±5.72 ^{*#}
sh-CASC19+anti-NC 组	47.61±4.76	65.64±5.56
sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组	70.97±7.10 ^{△▲}	104.46±6.45 ^{△▲}

注: 与 Control 组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 sh-NC 组比较, [#] $P<0.05$; 与 sh-CASC19 组比较, [△] $P<0.05$; 与 sh-CASC19+anti-NC 组比较, [▲] $P<0.05$ 。

2.6 CASC19 对 LOVO 细胞化疗耐药性的影响 与 Control 组相比,sh-CASC19 组 LOVO 细胞的化疗耐药敏感性增加($P<0.05$);与 sh-CASC19 组相比,sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组 LOVO 细胞的化疗耐

药敏感性降低($P<0.05$)。且同一组中,随着氟尿嘧啶、顺铂药物浓度的增加,LOVO 细胞存活率逐渐减低($P<0.05$)。见表 7、8。

miRNA	GeneID	GeneName	GeneType	TargetSite	Alignment
hsa-miR-490-3p	ENSG00000254166	CASC19	lncRNA	chr8:127218811-127218833[-]	Target: 5' CAGCCUGCCACUACCAGGUUG 3' : miRNA : 3' GUCGUACCUCAGGA-GGUCCAAC 5'

图 2 lncRNA CASC19 与 miR-490-3p 的结合位点

Binding Site of hsa-miR-490-3p on HMGA2:		
Show 10 entries		
TargetRegion	Type	Alignment
chr12:65963508-65963514[+]	7mer-m8	Target: 5' CCCUUCACAGUC--CCAGGUUU 3' : miRNA : 3' GUCGUACCUCAGGAGGUCCAAC 5'

图 3 miR-490-3p 与 HMGA2 的结合位点

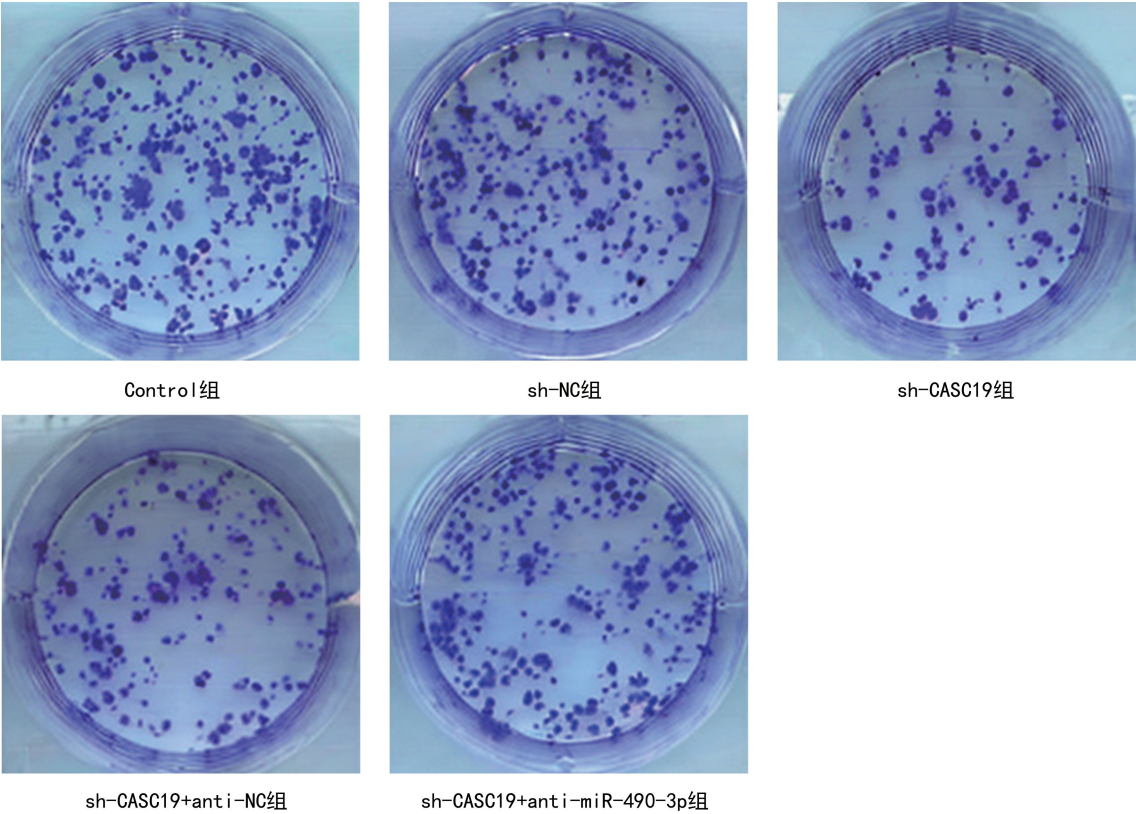


图 4 克隆形成实验检测 LOVO 细胞的增殖

表 6 各组细胞迁移率、侵袭率和相关蛋白水平比较($n=6,\bar{x}\pm s$)				
组别	迁移率(%)	侵袭率(%)	MMP2 蛋白	MMP9 蛋白
Control 组	76.54±6.65	70.16±5.24	1.54±0.15	0.98±0.11
sh-NC 组	78.12±6.88	68.56±6.44	1.52±0.14	1.00±0.10
sh-CASC19 组	35.24±3.52*#	31.21±3.02*#	0.74±0.07*#	0.45±0.05*#

续表 6 各组细胞迁移率、侵袭率和相关蛋白水平比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	迁移率(%)	侵袭率(%)	MMP2 蛋白	MMP9 蛋白
sh-CASC19+anti-NC 组	33.97±3.40	29.11±2.91	0.76±0.08	0.46±0.05
sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组	55.34±5.43 ^{△▲}	50.50±5.20 ^{△▲}	1.15±0.12 ^{△▲}	0.71±0.07 ^{△▲}

注:与 Control 组比较,* $P<0.05$;与 sh-NC 组比较,# $P<0.05$;与 sh-CASC19 组比较,[△] $P<0.05$;与 sh-CASC19+anti-NC 组比较,[▲] $P<0.05$ 。

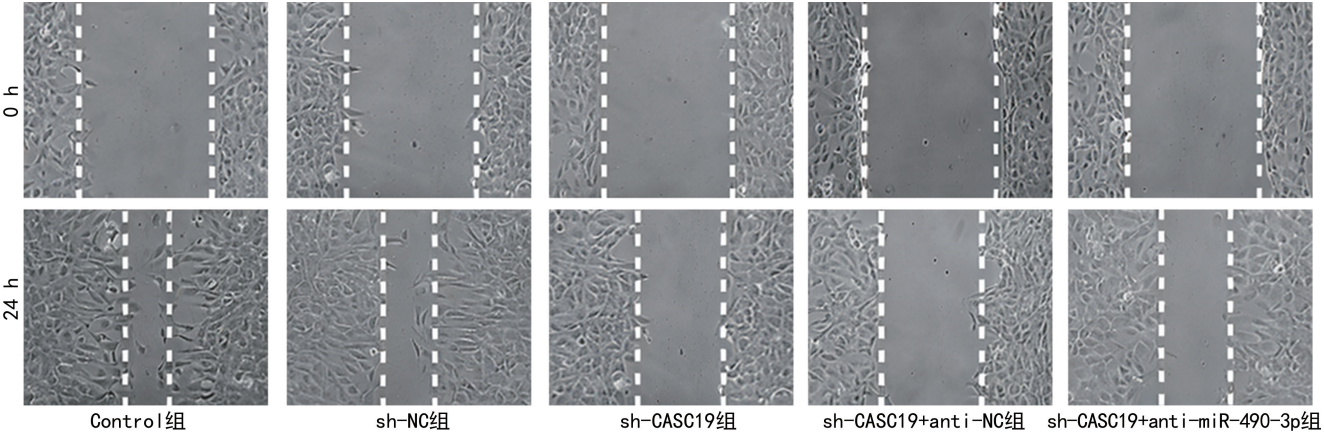


图 5 细胞划痕实验检测 LOVO 细胞的迁移能力($\times 200$)

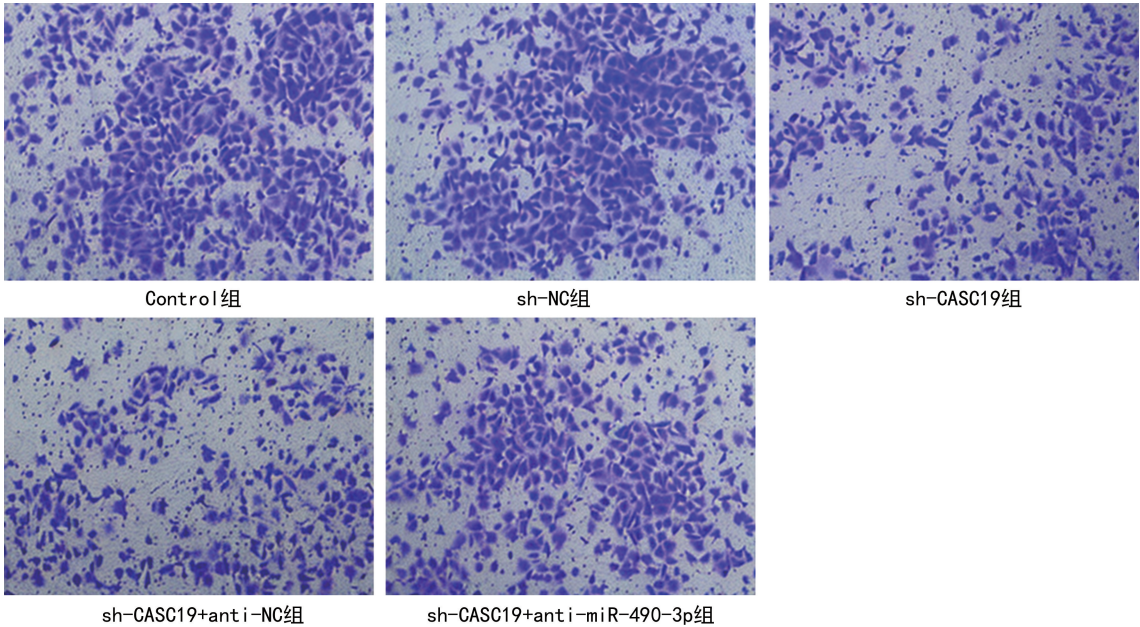


图 6 Transwell 实验检测 LOVO 细胞的侵袭($\times 200$)

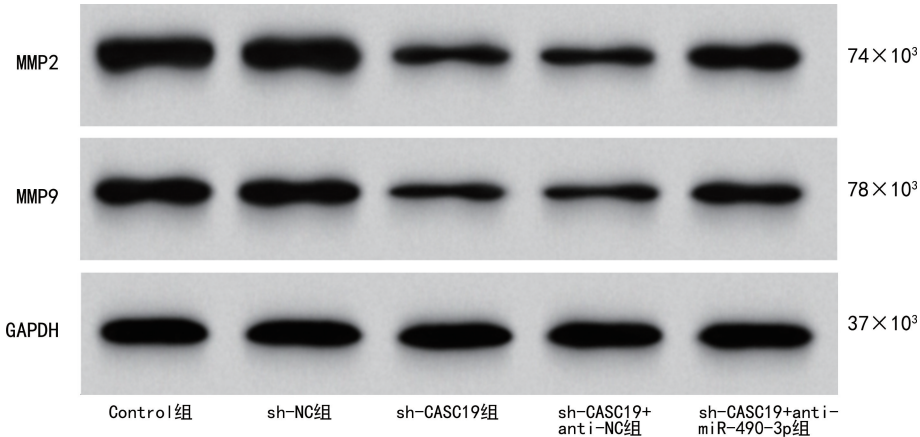


图 7 Western blot 检测 LOVO 细胞中 MMP2、MMP9 蛋白的表达

表 7 氟尿嘧啶处理后各组 LOVO 细胞的存活率($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	氟尿嘧啶浓度				
	0 g/mL	20 g/mL	40 g/mL	60 g/mL	80 g/mL
Control 组	100.00±0.00	81.32±6.13 ^a	59.42±4.94 ^b	51.55±4.16 ^c	43.64±3.85 ^d
sh-CASC19 组	100.00±0.00	43.58±3.06 ^{*a}	38.36±2.97 ^{*b}	33.42±2.34 ^{*c}	28.51±2.08 ^{*d}
sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组	100.00±0.00	56.41±4.30 ^{△a}	49.84±3.98 ^{△b}	44.36±3.44 ^{△c}	39.04±3.63 ^{△d}

注:与 Control 组比较, * $P<0.05$;与 sh-CASC19 组比较, $\Delta P<0.05$ 。同组中,与 0 g/mL 比较, ^a $P<0.05$;与同组 20 g/mL 比较, ^b $P<0.05$;与同组 40 g/mL 比较, ^c $P<0.05$;与同组 60 g/mL 比较, ^d $P<0.05$ 。

表 8 顺铂处理后各组 LOVO 细胞的存活率($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	顺铂浓度				
	0 μmol/L	10 μmol/L	20 μmol/L	30 μmol/L	40 μmol/L
Control 组	100.00±0.00	90.54±7.05 ^a	80.46±6.05 ^b	63.17±4.32 ^c	53.56±4.36 ^d
sh-CASC19 组	100.00±0.00	44.78±2.48 ^{*a}	32.31±3.23 ^{*b}	26.98±2.70 ^{*c}	21.48±2.15 ^{*d}
sh-CASC19+anti-miR-490-3p 组	100.00±0.00	72.34±5.23 ^{△a}	55.27±3.53 ^{△b}	41.52±3.15 ^{△c}	33.07±2.31 ^{△d}

注:与 Control 组比较, * $P<0.05$;与 sh-CASC19 组比较, $\Delta P<0.05$ 。同组中,与 0 μmol/L 比较, ^a $P<0.05$;与同组 10 μmol/L 比较, ^b $P<0.05$;与同组 20 μmol/L 比较, ^c $P<0.05$;与同组 30 μmol/L 比较, ^d $P<0.05$ 。

3 讨 论

目前 CRC 的发病率和病死率持续上升,现有针对 CRC 的临床诊治方法和手段有限,需要深入研究其发生发展涉及的相关机制,为 CRC 的诊治提供理论依据^[12]。在 CRC 的分子机制探索中,通常研究多聚焦于 DNA 突变、DNA 甲基化及 mRNA 表达的改变,而近年来, lncRNA 正逐渐成为诊治 CRC 新的研究热点^[13]。

lncRNA 作为一类重要的生物分子,可通过调控细胞增殖、凋亡、周期、转移、免疫、代谢、自噬、血管生成、肿瘤微环境等复杂的生物学过程参与多种疾病的发生发展,其中 lncRNA CASC19 在多种肿瘤中表达上调,可促进癌症进展^[14]。研究表明, lncRNA CASC19 在肝癌、胶质瘤、胰腺癌等多种肿瘤组织和细胞系中表达显著上调^[15-17]。这种高表达与肿瘤的恶性程度、肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期等呈正相关,且预示着患者预后较差,易复发^[15]。此外,在胶质瘤中,上调 lncRNA CASC19 可通过负调控 miR-454-3p 间接增加 RAB5A 的表达,促进胶质瘤细胞增殖和转移,从而促进胶质瘤进展^[16]。本研究进一步证实了 lncRNA CASC19 在 CRC 细胞中表达上调,且敲低 lncRNA CASC19 的表达可以降低 LOVO 细胞的存活率、迁移率和侵袭率,从而抑制 CRC 细胞的增殖、迁移、侵袭。与 LU 等^[17]研究显示一致, lncRNA CASC19 在胰腺癌组织和细胞系中表达显著升高,而沉默 lncRNA CASC19 可使 miR-148b 上调、E2F7 下调,导致胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力减弱。此外,本研究还发现敲低 lncRNA CASC19 可以减少 CRC 细胞中基质金属蛋白酶家族中的核心成员

MMP2、MMP9 蛋白表达。而 MMP-2 和 MMP-9 在 CRC 的迁移与扩散过程中发挥重要作用^[18],这进一步证明敲低 lncRNA CASC19 可抑制 CRC 细胞的增殖、迁移和侵袭。

miRNA 是一类包含 22 个核苷酸的非编码 RNA,已被证明与肿瘤的发生、发展密切相关^[19]。在 CRC 的生物信息学分析中 miR-490-3p 显著下调^[20]。进一步研究表明, miR-490-3p 在 CRC 细胞中低表达,并通过靶向负调控 TNKS2 来抑制 CRC 细胞增殖、迁移和侵袭,并增加其化疗耐药敏感性^[9]。本研通过 qRT-PCR 实验证实了 miR-490-3p 在 CRC 细胞中表达减少,并通过双荧光素酶报告实验揭示了 lncRNA CASC19 与 miR-490-3p 之间存在结合位点,且敲低 lncRNA CASC19 可上调 miR-490-3p 表达,进而抑制细胞增殖、迁移、侵袭。与周剑等^[21]研究结果相似, miR-490-3p 可被 lncRNA CASC19 靶向负调控,在骨肉瘤细胞系中低表达;而敲低 lncRNA CASC19,可上调 miR-490-3p 表达,进而抑制细胞增殖、迁移和侵袭。然而,化疗耐药是氟尿嘧啶和顺铂治疗过程中面临的主要问题之一,而本研究还发现敲低 lncRNA CASC19 可以通过上调 miR-490-3p 的表达来增加 CRC 细胞的化疗敏感性,这为解决化疗耐药问题提供了新的思路。此外,进一步研究显示,抑制 miR-490-3p 可减弱敲低 lncRNA CASC19 对 CRC 细胞 LOVO 的抑制作用,并降低耐药敏感性。这揭示了 lncRNA CASC19 可能靶向负调控 miR-490-3p,参与 CRC 发生发展,增加 CRC 细胞的化疗耐药敏感性。

HMGA2 可通过参与细胞转化、增殖、凋亡、衰老、转移、上皮间充质转化、DNA 修复和干细胞自我

更新等过程,促进 CRC 的发展^[22]。实验数据表明, HMGA2 的过表达通过上调信号转导和转录激活因子 3 介导的 CCL2 分泌,进而促进巨噬细胞在肿瘤微环境中的募集和 M2 极化,从而加速 CRC 进展,且 HMGA2 水平升高与 CRC 患者的低生存率相关^[23]。进一步研究表明, lncRNA CRART16 通过吸附 miR-193b-5p 上调 HMGA2 的表达,从而激活 MAPK 信号通路,降低 CRC 细胞对氟尿嘧啶的敏感性^[24]。本研究结果也显示, HMGA2 在 CRC 中表达上调,并且双荧光素酶实验也证实了 miR-490-3p 靶向负调控 HMGA2。通过敲低 lncRNA CASC19,可以降低 HMGA2 表达、升高 miR-490-3p 表达,从而抑制 CRC 进程,增加 CRC 的耐药敏感性。而抑制 miR-490-3p 后 HMGA2 的表达增多,逆转了上述对 CRC 的作用。提示 lncRNA CASC19 可能通过 miR-490-3p/HMGA2 轴调控 CRC 细胞的增殖、迁移、侵袭。

综上所述, lncRNA CASC19、HMGA2 在 CRC 细胞中表达上调, miR-490-3p 表达下调。敲低 CASC19 可能通过调控 miR-490-3p/HMGA2 轴,抑制 CRC 细胞的增殖、迁移和侵袭,增加 CRC 化疗耐药的敏感性,为 CRC 的预防和治疗提供新靶点。但本研究仅在细胞实验得到验证,关于其在体内的具体作用及调控机制仍需继续研究。

参考文献

- [1] PROVENZALE D, NESS RM, LLOR X, et al. NCCN guidelines insights: colorectal cancer screening, version 2. 2020[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2020, 18(10): 1312-1320.
- [2] YUAN W, CAI W, HUANG X, et al. Prognostic value of immune scores in the microenvironment of colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2020, 20(5): 256.
- [3] NG S P, CHU J, CHANDER S, et al. Results of phase II trial of intensified neoadjuvant treatment with interdigitating radiotherapy and chemotherapy with oxaliplatin, 5-fluorouracil and folinic acid in patients with locally advanced rectal cancer (PROARCT trial) [J]. Radiother Oncol, 2021, 39(2): 27-32.
- [4] 李娜, 付海燕. 长链非编码 RNA ATB 对肝癌细胞增殖、侵袭与转移能力的影响[J]. 锦州医科大学学报, 2023, 44(3): 55-59.
- [5] WANG S, QIAO C, LI J, et al. LncRNA CASC19 promotes gastric cancer progression through preventing CREB1 protein ubiquitin/proteasome-dependent degradation[J]. Carcinogenesis, 2023, 44(3): 209-220.
- [6] WANG L, LIN C, SUN N, et al. Long non-coding RNA CASC19 facilitates non-small cell lung cancer cell proliferation and metastasis by targeting the miR-301b-3p/LD-

- LR axis[J]. J Gene Med, 2020, 22(12): e3254.
- [7] WANG X D, LU J, LIN Y S, et al. Functional role of long non-coding RNA CASC19/miR-140-5p/CEMP axis in colorectal cancer progression in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(14): 1697-1714.
- [8] LIU H, ZHENG W, CHEN Q, et al. lncRNA CASC19 contributes to radioresistance of nasopharyngeal carcinoma by promoting autophagy via AMPK-mTOR pathway [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(3): 1407.
- [9] LI J, MO R, ZHENG L. MicroRNA-490-3p inhibits migration and chemoresistance of colorectal cancer cells via targeting TNKS2[J]. World J Surg Oncol, 2021, 19(1): 117.
- [10] CAMPOS GUDINO R, MCMANUS KJ, HOMBACHK-LONISCH S. Aberrant HMGA2 expression sustains genome instability that promotes metastasis and therapeutic resistance in colorectal cancer[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(6): 1735.
- [11] ZHENG H, YAN B, WU Q, et al. MicroRNA-9-5p increases the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by downregulating high mobility group A2 expression[J]. Oncol Lett, 2021, 21(3): 235.
- [12] WU Z, LI Y, ZHANG Y, et al. Colorectal cancer screening methods and molecular markers for early detection[J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19(1): 1533033820980426.
- [13] 庄晓鹏, 刘友东, 郑宾宾, 等. LncRNA SNHG4 在结直肠癌中的表达及对细胞奥沙利铂耐药性的影响[J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(2): 207-212.
- [14] WANG S, QIAO C, FANG R, et al. LncRNA CASC19: a novel oncogene involved in human cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2023, 25(10): 2841-2851.
- [15] HOU Y, TANG Y, MA C, et al. Overexpression of CASC19 contributes to tumor progression and predicts poor prognosis after radical resection in hepatocellular carcinoma [J]. Dig Liver Dis, 2023, 55(6): 799-806.
- [16] WU Y J, YANG Q S, CHEN H, et al. Long non coding RNA CASC19 promotes glioma progression by modulating the miR 454 3p/RAB5A axis and is associated with unfavorable MRI features[J]. Oncol Rep, 2021, 45(2): 728-737.
- [17] LU T, WEI G H, WANG J, et al. LncRNA CASC19 contributed to the progression of pancreatic cancer through modulating miR-148b/E2F7 axis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(20): 10462-10471.
- [18] SIDDHARTHA R, GARG M. Molecular and clinical insights of matrix metalloproteinases into cancer spread and potential therapeutic interventions[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2021, 63(18): 115593.
- [19] WANG H. MicroRNAs and apoptosis in colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5353. (下转第 2338 页)