

· 基础研究 ·

AGAP2-AS1 调控 Ras/MAPK 信号通路促进结直肠癌细胞的增殖

王庆源, 彭 稳, 李 杰, 顾奇偶, 傅 赞*

南京医科大学第一附属医院普外科, 江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**探讨长链非编码RNA(long noncoding RNA, LncRNA) AGAP2-AS1 对结直肠癌细胞增殖能力的影响及其相关机制。**方法:**采用 qRT-PCR 检测 50 例结直肠癌组织和正常肠黏膜组织中 AGAP2-AS1 的表达水平;采用 siRNA-AGAP2-AS1 小干扰序列转染至人结直肠癌细胞系 DLD-1 和 HT29 细胞中, qRT-PCR 检测细胞转染效率, CCK8 实验和平板克隆形成实验检测 AGAP2-AS1 对细胞增殖能力的影响;流式细胞仪检测细胞周期分布的变化;Western blot 检测 MAPK 通路相关蛋白(Ras、Raf-1、MEK、ERK)的表达。**结果:**与正常肠黏膜上皮组织相比, AGAP2-AS1 的 mRNA 表达水平在结直肠癌中明显上调;下调 AGAP2-AS1 表达后, DLD-1 和 HT29 细胞增殖能力降低, 细胞周期阻滞于 G0/G1 期, Ras、p-Raf-1、p-MEK 和 p-ERK 蛋白表达水平明显降低。**结论:**AGAP2-AS1 通过调控 Ras/MAPK 通路促进结直肠癌细胞的增殖。

[关键词] LncRNA; AGAP2-AS1; Ras/MAPK; 增殖

[中图分类号] R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)01-016-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190103

AGAP2 - AS1 promotes colorectal cancer proliferation through Ras/MAPK signaling pathway

Wang Qingyuan, Peng Wen, Li Jie, Gu Qiou, Fu Zan*

Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore the proliferation effect of long noncoding RNA (LncRNA) AGAP2-AS1 on colorectal cancer (CRC) cell lines and the associated signaling pathways. **Methods:** We conducted qRT-PCR to investigate mRNA levels of AGAP2-AS1 in 50 paired CRC tissues and the corresponding normal mucosa tissues. SiRNA targeting AGAP2-AS1 was transfected into DLD-1 and HT29 cell lines, qRT-PCR was performed to detect the transfection efficacy of siRNA and AGAP2-AS1 downregulated DLD-1 and HT29 cells were used for further investigating the role of AGAP2-AS1 in CRC cell proliferation through CCK8-kit and colony formation assay. Cell cycle distributions were analyzed by a flow cytometer. Western blot was conducted to explore the protein levels of MAPK signaling pathway, including Ras, Raf-1, MEK and ERK. **Results:** The mRNA levels of AGAP2-AS1 were markedly upregulated in CRC tissues rather than the corresponding normal tissues. Loss of AGAP2-AS1 greatly suppressed cell proliferation of DLD-1 and HT29 cells, increased percentage of G0/G1 phases population and downregulated the protein levels of Ras, p-Raf-1, p-MEK and p-ERK. **Conclusion:** LncRNA AGAP2-AS1 could promote colorectal cancer cell proliferation through Ras/MAPK signaling pathway.

[Key words] LncRNA; AGAP2-AS1; Ras/MAPK; proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01):016-020]

结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 目前已明确诊断的 140 万基础病例伴每年约 69 万的

新发病例被诊断^[1]。大多数结直肠癌患者被诊断时往往处于 IV 期, 其预后相对较差, 并常常伴有肝、肺转移^[2]。尽管结直肠癌的手术治疗已相对成熟, 其术前诊断、分子机制及其相应的治疗手段仍然有待探索和完善^[3]。长链非编码 RNA (long noncoding RNA) 是一类不具备蛋白编码能力、长度大于 200

[基金项目] 国家自然科学基金(81470881)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fuzan1971@njmu.edu.cn

bp的核苷酸序列。近年来,通过对LncRNA的肿瘤学研究发现,LncRNA通过cis/trans、ceRNA网络、结合蛋白等多种途径调控肿瘤相关的mRNA、蛋白的表达和定位^[4]。靶向LncRNA来调控肿瘤的发生和发展为癌症的分子治疗提供了新思路。AGAP2-AS1,位于染色体12q14.1,长度为1 567 bp,近年来被证明在多种恶性肿瘤中高表达并参与恶性肿瘤的发生与发展,如胃癌^[5]、乳腺癌^[6]、肺癌^[7]等。既往研究表明AGAP2-AS1可以通过周期、凋亡2种途径调控肿瘤细胞增殖并参与肿瘤细胞的迁移和侵袭,然而,AGAP2-AS1在结直肠癌中的表达及其相关功能仍未见报道。本文以结直肠癌细胞为研究对象,通过敲低AGAP2-AS1的表达水平探究其对结直肠癌细胞增殖能力的影响并探究其分子通路,旨在阐明AGAP2-AS1在结直肠癌发生发展中的作用,进而为临床提供新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

收集2015年9月—2016年6月南京医科大学第一附属医院结直肠外科行结直肠癌根治术的50例患者标本。所有患者术前未行放化疗,标本离体后10 min内取出放置液氮中保存,所有标本均通过病理验证为结直肠癌。取同一标本距离肿瘤边界5 cm以上的正常肠黏膜上皮组织作为阴性对照,所有标本均通过病理验证为肿瘤阴性。人结直肠癌细胞系DLD-1细胞、HT29细胞(中科院细胞库),DMEM高糖培养基和胎牛血清(Gibco公司,美国),TRIzol试剂、逆转录试剂盒和SYBR Green预混液(TaKaRa公司,日本),CCK8试剂盒(Dojindo公司,日本),细胞周期染色试剂盒(杭州联科公司),siRNA转染试剂Lipofectamine 3000(Invitrogen公司,美国),AGAP2-AS1小干扰序列siRNA-AGAP2-AS1以及阴性对照siRNA-NC(上海吉玛公司),配胶试剂盒、结晶紫染色液、GAPDH抗体、鼠二抗和兔二抗(上海碧云天公司),Ras抗体、p-Raf-1抗体、Raf-1抗体、p-MEK抗体、MEK抗体、p-ERK抗体和ERK抗体(Abcam公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

DLD-1和HT29细胞用含10%胎牛血清,100 U/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素的DMEM培养基置于37℃、5% CO₂培养箱培养,隔天换液。将5 μL稀释的干扰序列与5 μL Lipofectamine 3000在250 μL完

全培养基中混匀并孵育25 min后加入接种细胞的6孔板中,细胞密度为50%~70%。siRNA-AGAP2-AS1序列的正义链:5'-GCAUUCACUACACUCCCU-ATT-3';反义链:5'-UAGGGAGUGUAGUGAAUGC-TT-3';siRNA-NC序列的正义链:5'-UUCUCCGAAC-GUGUCACGUTT-3';反义链:5'-ACGUGACACGUU-CGGAGAATT-3'。以转染siRNA-AGAP2-AS1序列48 h并通过qRT-PCR验证敲低效率的DLD-1和HT29细胞作为干扰组,同一时期转染siRNA-NC序列的DLD-1和HT29细胞作为阴性对照组。

1.2.2 实时定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

使用TRIzol法从组织和转染小干扰序列48 h的细胞中提取RNA,按照说明书将RNA逆转录为cDNA,进而通过qRT-PCR检测AGAP2-AS1在组织和细胞中的相对表达量。AGAP2-AS1上游引物:5'-TACCTTGACCTTGCTGCTCTC-3';下游引物:5'-TGTCCTTAATGACCCCATCC-3';GAPDH上游引物:5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3';下游引物:5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

1.2.3 CCK8实验

将已转染小干扰序列48 h的DLD-1和HT29细胞用胰酶消化后,重悬于完全培养基中,调整浓度至10个/μL,以每孔200 μL加入96孔板中,每组设5个复孔。吸出培养液,每孔加入100 μL 10%的CCK8溶液置于培养箱中孵育2 h后测量其在450 nm波长处的吸光度值,连续测量5 d。

1.2.4 平板克隆实验

将已转染小干扰序列的DLD-1和HT29细胞消化重悬后以每孔500个接种于6孔板中,每5 d换1次培养液,至11~14 d显微镜下可见单个细胞团细胞数大于100时吸去培养液,甲醛固定30 min,结晶紫染色液染色30 min后干燥,拍照并计数。

1.2.5 用流式细胞仪检测周期

将6孔板中已转染小干扰序列48 h的DLD-1和HT29细胞培养基吸去,加入不含血清的DMEM培养基饥饿24 h后重新加入完全培养基中培养24 h,细胞消化重悬于4 mL 75%乙醇放置于4℃冰箱过夜。第2天PBS清洗2次后,按照周期染色试剂盒说明书对细胞进行染色并在流式细胞仪上机检测各分裂期细胞的百分比。

1.2.6 Western blot

收集各组细胞,按照蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白,并用BCA法测量蛋白浓度后加入5×SDS-

PAGE蛋白上样缓冲液并煮沸 10 min。配置 10% SDS-PAGE凝胶, 120 V 恒压电泳约 2 h, 将分离的蛋白以 250 mA 75 min 转至 PVDF 膜上, 牛奶封闭 2 h, 一抗 4 °C 冰箱孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h, 最后通过 ECL 化学发光试剂曝光显影。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析, 所有实验均重复 3 次, 结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所有图表通过 Graphpad prism 7 绘制。两组之间比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AGAP2-AS1 在 CRC 组织中的表达情况及小干扰序列在 CRC 细胞系中的干扰效率

通过比较 50 对 CRC 组织与正常肠黏膜组织中 AGAP2-AS1 mRNA 的表达量, 发现 AGAP2-AS1 的表达量在 CRC 组织中明显上调 ($n=50, P < 0.001$, 图 1A)。结直肠癌 DLD-1 和 HT29 细胞转染 siRNA-AGAP2-AS1 和 siRNA-NC 序列 24 h 后, 通过 qRT-PCR 实验发现转染了 siRNA-AGAP2-AS1 的 DLD-1 和 HT29 细胞 AGAP2-AS1 表达水平要明显低于转染 siRNA-NC 组, AGAP2-AS1 表达量下调了近 80%, 差异有统计学意义 (图 1B)。证明转染了 siRNA-AGAP2-AS1 和 siRNA-NC 序列的 DLD-1 和 HT29 细胞足以满足功能实验要求。

2.2 下调 AGAP2-AS1 抑制 DLD-1 和 HT29 细胞增殖

CCK8 实验结果显示, AGAP2-AS1 干扰组与阴性对照组吸光度在第 1 天和第 2 天并没有明显差异; 在第 3、4、5 天 AGAP2-AS1 干扰组的吸光度值要明显低于对照组, 差异有统计学意义, 并且随着时间的推移, 差异逐渐增大 (图 2A、B)。克隆形成实验结果表明 AGAP2-AS1 干扰组所形成的克隆数要远低于对照组, 进一步证明了 AGAP2-AS1 对 DLD-1 和

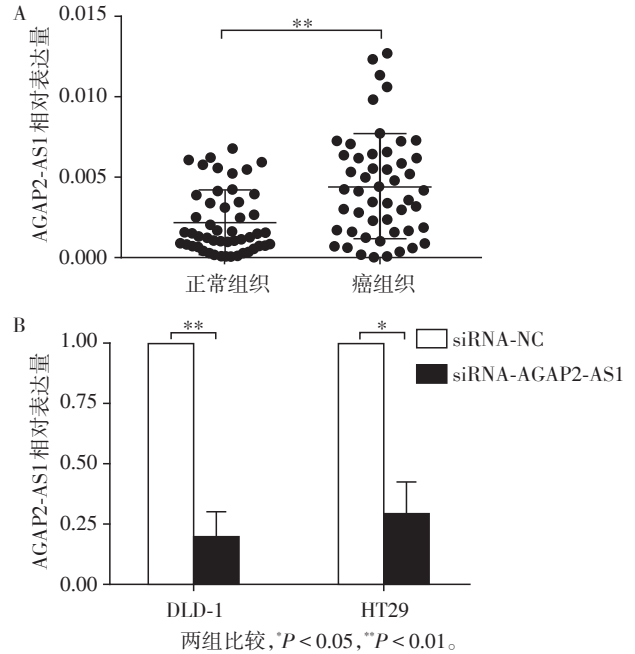


图1 AGAP2-AS1 在结直肠癌组织中的表达 (A) 和小干扰敲低效率 (B)

Figure 1 The expression of AGAP2-AS1 in colorectal cancer tissues (A) and the efficiency of siRNA - AGAP2-AS1 (B)

HT29 细胞增殖的促进作用 (图 2C)。

2.3 AGAP2-AS1 对 DLD-1 和 HT29 细胞周期分布的影响

转染 siRNA-AGAP2-AS1 的 DLD-1 和 HT29 细胞 G0/G1 期百分比要明显高于对照组, 同时 S 期百分比低于对照组 (图 3A), 差异有统计学意义, 证明了敲低 AGAP2-AS1 表达阻遏了细胞周期 G0/G1 期向 S 期转变, 进而抑制了细胞的增殖能力。

2.4 AGAP2-AS1 调控 Ras/MAPK 通路进而影响细胞周期与增殖

与对照组相比, AGAP2-AS1 干扰组的 Ras、p-Raf-1、p-MEK、p-ERK 的蛋白表达水平要明显降低,

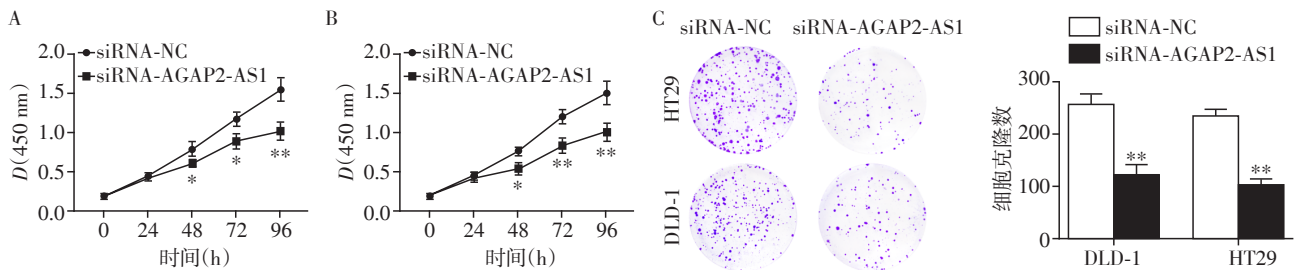
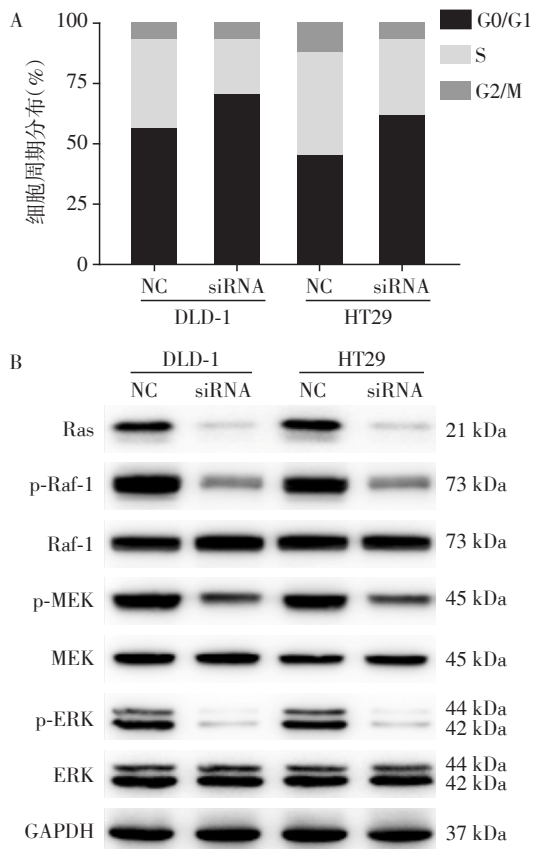


图2 AGAP2-AS1 促进结直肠癌细胞的增殖能力。与 siRNA-NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 AGAP2-AS1 促进结直肠癌细胞的增殖能力

Figure 2 AGAP2-AS1 promotes cell proliferation of CRC cells

同时,Raf-1、MEK、ERK的总蛋白表达水平并没有明显改变(图3B)。表明AGAP2-AS1通过调控Ras/Raf-1/MEK/ERK经典MAPK通路促进细胞周期的G0/G1期向S期转变,进而促进细胞增殖。



A: AGAP2-AS1 干扰对 DLD-1 和 HT29 细胞周期的影响; B: AGAP2-AS1 干扰对 DLD-1 和 HT29 细胞 Ras/MAPK 信号转导的影响。NC: 阴性对照组; siRNA: AGAP2-AS1 干扰组。

图3 AGAP2-AS1 调控细胞周期分布和 Ras/MAPK 信号转导通路

Figure 3 AGAP2-AS1 regulates the distribution of cell cycle and Ras/MAPK signaling pathway

3 讨论

近年来,由于RNA测序技术的广泛应用,数百种表达失调的LncRNA在人类肿瘤中被发现并证明在肿瘤的发生和进展中起到关键调控作用^[8-9]。部分LncRNA在特定肿瘤中的功能和作用已经被充分研究,例如:LncRNA BLACAT1通过下调P15调控结直肠癌的细胞周期并促进CRC细胞增殖^[10]。尽管LncRNA在人类癌症中表达失调,其在癌细胞中的作用方式和调控因素仍然有待研究。通常LncRNA通过激活促癌因子的转录或者抑制肿瘤抑制因子的表达来调控肿瘤细胞的表型,例如:影响靶点基因

启动子组蛋白的修饰,结合并影响蛋白质的功能和稳定性,调控RNA的降解和作为特定miRNA的ceRNA等^[11-12]。长链非编码RNA SNHG1一方面通过顺式作用形式结合Mediator complex促进SLC3A2基因的转录,另一方面通过反式作用形式与转录因子FUBP1结合阻遏其与抑制蛋白FIR结合进而促进了转录因子FUBP1对MYC基因的转录作用,最终促进了结直肠癌和肺癌细胞的增殖^[13]。

丝裂原活化蛋白激酶有3个主要家族:ERK/MAPK、JNK/SAPK和MAPK14,其ERK/MAPK(Ras/Raf-1/MEK/ERK)通路是细胞增殖最重要的通路之一,并且通常在结直肠癌中过度表达和异常激活^[14]。表皮生长因子与表皮生长因子受体结合,激活ERK/MAPK通路,诱导细胞周期蛋白cyclin D1的合成,促进细胞分裂,进而推动细胞增殖与分化,这一过程受到上游信号强度与持续时间调控^[15]。在结直肠癌中,EGFR的表达上调,KRAS、BRAF的高突变率,下游转录因子c-Jun的磷酸化和激活导致了ERK/MAPK通路在结直肠癌中的信号转导增强,促进了结直肠黏膜上皮的癌性转变^[16-19]。针对Ras、Raf-1、MEK、ERK的抑制剂被作为抗肿瘤药物而进行开发,但药物本身的不良反应,脱靶效应导致这类药物终止于临床试验,因此寻找特异性的内源性分子靶点调控Ras/MAPK信号转导通路更加迫在眉睫。

本研究发现,与正常肠黏膜上皮相比,结直肠癌中长链非编码RNA AGAP2-AS1的表达明显上调,表明AGAP2-AS1与结直肠癌的肿瘤进程相关。进一步的体外生物学功能实验表明AGAP2-AS1显著促进了结直肠癌细胞的增殖并推动了结直肠癌细胞周期由G0/G1期到S期的转变。进一步的机制探索表明这一功能表型上的改变来源于Ras/Raf-1/MEK/ERK信号转导通路的改变。综上所述,本研究证实AGAP2-AS1在结直肠癌中表达失调并通过调控Ras/MAPK通路促进CRC细胞的增殖和周期转变,为结直肠癌的预防和治疗提供了新的分子靶点。

[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] Midgley R, Kerr D. Conventional cytotoxic and novel therapeutic concepts in colorectal cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2001, 10(6): 1011-1019
- [3] Sethi N, Kang Y. Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(10): 735-748

[4] Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2018, 172(3):393-407

[5] Qi F, Liu X, Wu H, et al. Long noncoding AGAP2-AS1 is activated by SP1 and promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer[J]. J Hematol Oncol, 2017, 10(1):48

[6] Dong H, Wang W, Mo S, et al. SP1 - induced lncRNA AGAP2 - AS1 expression promotes chemoresistance of breast cancer by epigenetic regulation of MyD88 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1):202

[7] Li W, Sun M, Zang C, et al. Upregulated long non-coding RNA AGAP2 - AS1 represses LATS2 and KLF2 expression through interacting with EZH2 and LSD1 in non-small-cell lung cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(5):e2225

[8] Sahu A, Singhal U, Chinnaiyan AM. Long noncoding RNAs in cancer: from function to translation [J]. Trends Cancer, 2015, 1(2):93-109

[9] Cabanski CR, White NM, Dang HX, et al. Pan-cancer transcriptome analysis reveals long noncoding RNAs with conserved function[J]. RNA Biol, 2015, 12(6):628-642

[10] Su J, Zhang E, Han L, et al. Long noncoding RNA BLA-CAT1 indicates a poor prognosis of colorectal cancer and affects cell proliferation by epigenetically silencing of p15 [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3):e2665

[11] Ulitsky I, Bartel DP. LncRNAs: genomics, evolution, and mechanisms[J]. Cell, 2013, 154(1):26-46

[12] Huarte M. LncRNAs have a say in protein translation [J]. Cell Res, 2013, 23(4):449-451

[13] Sun Y, Wei G, Luo H, et al. The long noncoding RNA SNHG1 promotes tumor growth through regulating transcription of both local and distal genes[J]. Oncogene, 2017, 36(49):6774-6783

[14] Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(5):322-327

[15] Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, et al. Positively by the p42/p44 MAPK and cyclin D1 expression is regulated [J]. J Biol Chem, 1996, 271(34):20608-20616

[16] Deng G, Bell I, Crawley S, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1):191-195

[17] Wisdom R, Johnson RS, Moore C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms [J]. EMBO J, 1999, 18(1):188-197

[18] Johnston SR. Farnesyl transferase inhibitors: a novel targeted therapy for cancer [J]. Lancet Oncol, 2001, 2(1):18-26

[19] Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study [J]. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(9):675-684

[收稿日期] 2018-10-26

