

特异性蛋白 1 (SP1) 上调 FOXP4-AS1 促进结直肠癌细胞增殖

宋慧胜, 邱惠思, 吴华振, 王馨, 汤锐明, 潘辉林, 李志英, 冯正富*

(广州医科大学附属第六医院放疗科, 清远市人民医院 511518)

摘要 大量的证据表明,长链非编码 RNAs (long non-coding RNAs) 在结直肠癌发生发展中发挥重要作用。有迹象表明,lncRNA FOXP4-AS1 推动结直肠癌的进程。本文通过数据库信息分析发现,FOXP4-AS1 在结直肠癌中高表达且与患者较差的预后正相关。实时荧光定量 PCR 方法也证实,FOXP4-AS1 在结直肠癌细胞和组织中的表达量均高于正常细胞和组织。其中,FOXP4-AS1 在结直肠癌细胞 LOVO 中表达量最高,是正常结直肠细胞的 13 倍。生物信息学预测结合双荧光素酶报告基因实验和染色质沉淀研究结果表明,特异性蛋白 1 (specificity protein 1, SP1) 可直接结合在 FOXP4-AS1 启动子上,上调其活性。过表达 FOXP4-AS1,可下调 p16 和 p18 表达,同时上调 CDK4、CDK6 和细胞周期蛋白 D1 表达,最终促进结直肠癌细胞增殖。相反,敲低 FOXP4-AS1 将上调 p16 和 p18 表达,抑制 CDK4、CDK6 和细胞周期蛋白 D1,获得相反的结果。总之,特异性蛋白 1 (SP1) 上调 FOXP4-AS1,促进结直肠癌细胞增殖。

关键词 长链非编码 RNA; FOXP4-AS1; 结直肠癌; 增殖; 特异性蛋白 1 (SP1)

中图分类号 R735.3

Specificity Protein 1 (SP1) Upregulated FOXP4-AS1 to Promote the Proliferation of Colorectal Cancer Cells

SONG Hui-Sheng, QIU Hui-Si, WU Hua-Zhen, WANG Xin, TANG Rui-Ming,

PAN Hui-Lin, LI Zhi-Ying, FENG Zheng-Fu*

(Department of Radiotherapy, The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University,

Qingyuan People's Hospital 511518, China)

Abstract Increasing evidence demonstrated that long non-coding RNAs (lncRNAs) play important roles in colorectal cancer progression. It is suggested that FOXP4-AS1 might promote colorectal cancer progression. Here, we employed the GEPIA databank to show that FOXP4-AS1 was highly expressed in colorectal cancer tissues, compared with that in normal tissues. FOXP4-AS1 was positively related with poor outcomes of patients diagnosed with colorectal cancer. qRT-PCR assays also validated that FOXP4-AS1 was highly expressed in colorectal cancer tissues than in normal tissues. Bioinformatics analysis, combined with dual luciferase reporter gene assays and chromatin immunoprecipitation assays showed that specificity protein 1 (SP1) directly bound to the promoter of FOXP4-AS1 to enhance its activity. Restored FOXP4-AS1 could significantly reduce p16 and p18 expression, accelerate CDK4, CDK6 and Cyclin D1 expression, thus enhancing proliferation of colorectal cancer cells. Knocking-down FOXP4-AS1 had the opposite results. In conclusion, SP1 transcriptionally upregulated FOXP4-AS1, thus enhancing colorectal cancer cells proliferation.

Key words long non-coding RNAs (lncRNAs); FOXP4-AS1; colorectal cancer; proliferation; specificity protein 1 (SP1)

收稿日期: 2018-12-15; 修回日期: 2019-01-15; 接受日期: 2019-01-23

* 通讯作者 Tel: 0763-3312032; E-mail: qyzhf@163.com

Received: December 15, 2018; Revised: January 15, 2019; Accepted: January 23, 2019

* Corresponding author Tel: 0763-3312032; E-mail: qyzhf@163.com

结直肠癌是世界上发病率排名第3而致死率排名第4的恶性肿瘤^[1]。每年全球有100至200万结直肠癌新增病例,而由其新增死亡人数高达70万^[2]。2017年,美国预计有新增结直肠癌患者95 520例,新增结直肠癌死亡病例50 260^[3]。据统计,2012年中国有140万新增结直肠癌患者,693 900例结直肠癌死亡病例^[4]。因此,探究结直肠癌发生发展的分子机制,寻找新的结直肠癌标志物和潜在治疗靶标,是目前亟待解决的重大课题。

长链非编码RNAs(long non-coding RNAs, lncRNAs)是一类长度大于200 nt无蛋白质编码功能的RNAs^[5,6]。目前发现,lncRNAs在结直肠癌发生发展的过程中发挥重要的作用^[5,6]。本室前期研究中发现,lncRNA FOXP4-AS1在结直肠癌中显著高表达,且与患者预后正相关。FOXP4-AS1其转录本ID是ENST00000454812.1。该转录本由2个外显子组成,全长575 bp。本文拟在此基础上,探讨FOXP4-AS1在结直肠癌细胞中的作用及相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及组织收集

正常结直肠上皮细胞NCM460和结直肠癌细胞LOVO、HT29、SW480、SW620、HCT116、RKO及HCT8均由本实验室保存。将上述细胞接种于含10%胎牛血清(Gibco公司)DMEM培养液中,在37℃、5% CO₂的培养箱中培养。

自2012年5月至2017年2月,收集来本院就诊的结直肠癌患者组织39例及癌旁结直肠组织26例,其样品放于-80℃保存备用。39例结直肠癌患者中有25例男性和14例女性。年龄最小是38岁,年龄最大是73岁。26例癌旁结直肠组织捐赠者有13例男性和13例女性。年龄最小是45岁,年龄最大是81岁。所有患者均已签署知情同意书,本研究已通过清远市人民医院伦理委员会的同意。

1.2 试剂

Trizol、SYBR、逆转录试剂盒、BCA蛋白质浓度检测试剂盒,均购自美国Fermentas公司,RIPA裂解液购自碧云天,p16、p18、CDK4、CDK6、细胞周期蛋白D1和SP1抗体与染色质沉淀试剂盒均购自Cell signaling technology,β-肌动蛋白抗体购自sigma,MTS试剂与双荧光素酶报告基因试剂盒均购自美国Promega。

1.3 实时荧光定量PCR

使用Trizol提取细胞总RNAs,使用随机引物将其逆转录成cDNA。SYBR法用于检测FOXP4-AS1的表达量。GAPDH上游引物5'-ATTCCATGGCACCGTCAAGGCTGA-3',GAPDH下游引物5'-TTCTCCATGGTGGTGAAGACGCCA-3'。FOXP4-AS1上游引物5'-GCTGCCCTAACCTCAATCC-3',FOXP4-AS1下游引物5'-CACAGAAAACCAGGGCTGAACT-3'。引物由深圳华大基因合成。根据2^{-ΔΔct}方法计算各基因表达量。

1.4 Western印迹检测

冰上使用RIPA裂解目的细胞,处理20 min后离心取上清。BCA法测量蛋白质浓度。每个泳道上样30 mg蛋白质,进行SDS-PAGE,200 mA 90 min,将PAGE胶上蛋白质转移至PVDF膜,5%牛奶室温封闭该膜2 h,一抗p16、p18、CDK4、CDK6、细胞周期蛋白D1和SP1抗体稀释比例1:1 000;β-肌动蛋白抗体稀释比例1:5 000,孵育过夜,PBST洗涤,二抗孵育1 h,ECL化学发光。

1.5 细胞增殖实验

将目标细胞接种96孔板,每孔1 000个细胞。自贴壁后的0、1、2、3、4和5 d分别加入MTS,室温孵育3 h,490 nm检测各孔细胞的吸光度值。

1.6 染色质沉淀实验

将LOVO细胞接种至15 cm细胞皿中培养过夜,多聚甲醛固定细胞10 min,甘氨酸终止固定10 min,裂解细胞并超声破碎,离心后向上清分别加入兔抗IgG、聚合酶II抗体和SP1抗体,4℃孵育过夜,再用磁珠孵育抗体/细胞裂解液。蛋白酶K消化磁珠,纯化DNA,实时荧光定量PCR检测含有SP1结合位点的FOXP4-AS1启动子目标片段。扩增目标片段的上游引物5'-CCTTCAGACTTCCCCACAGC-3',下游引物5'-GCCCCCTGACCGCCAT-3'。

1.7 双荧光素酶报告基因检测

从汉恒生物购买野生型FOXP4-AS1启动子的报告基因载体(命名为pGL4-wt)、缺失SP1结合位点的FOXP4-AS1启动子报告基因载体(命名为pGL4-del)和对照pGL4-B。将LOVO细胞以8 000个细胞/孔密度接种96孔板,次日将SP1过表达质粒与pGL4-wt、pGL4-del和pGL4-B分别共转48 h,根据说明书,裂解细胞并检测各组细胞荧光素酶活性。

1.8 生物信息学及统计学方法

通过GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)网

站,统计 FOXP4-AS1 在结直肠癌组织和正常组织中的表达量,并且统计了 FOXP4-AS1 的表达量与结直肠癌患者预后的相关性。在 Ensemble genome browser 94 (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 数据库中,提取 FOXP4-AS1 转录起始位点上游 1 000 bp 作为启动子序列,通过 JASPAR (<http://jaspar.binf.ku.dk/>) 预测相关转录因子结合位点。

所有试验重复 3 次以上,数据采用 $M \pm SD$ 表示。使用 SPSS 19.0 软件包进行统计分析,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXP4-AS1 在结直肠癌中高表达且与患者较差的预后正相关

通过 GEPIA 数据库检索,发现 FOXP4-AS1 在 275 例结直肠癌组织中的表达中位数是 2.967,在 349 例正常结肠组织中的表达量是 0.784。提示 FOXP4-AS1 在结直肠癌组织中显著高表达 (Fig. 1

A)。FOXP4-AS1 高表达的结直肠癌患者预后较差,其低表达的结直肠癌患者预后较好 ($P = 0.043$),如 Fig.1B 所示。与此相一致的是,检测了 39 例结直肠癌组织和 26 例癌旁组织中 FOXP4-AS1 的表达。结果证实,FOXP4-AS1 在结直肠癌组织中高表达 (Fig. 1C)。实时荧光定量 PCR 结果提示,FOXP4-AS1 在结直肠癌细胞中的表达量远远高于其在正常结肠上皮细胞 NCM460 中的表达量。且其在 HT29 结直肠癌细胞中的表达量是正常细胞的 1.78 倍,在 LOVO 细胞中的表达量是正常结直肠细胞的 13.00 倍 (见 Fig.1D)。

2.2 FOXP4-AS1 促进结直肠癌细胞增殖

为研究 FOXP4-AS1 在结直肠癌细胞中的作用,首先在 HT-29 细胞中过表达 FOXP4-AS1。细胞增殖检测证实,FOXP4-AS1 促进 HT-29 细胞增殖。机制研究发现,FOXP4-AS1 可明显下调 p16 和 p18,同时上调 CDK4、CDK6 和细胞周期蛋白 D1 的表达 (Fig.2A)。相反,在 LOVO 细胞中,采用 shRNAs 敲

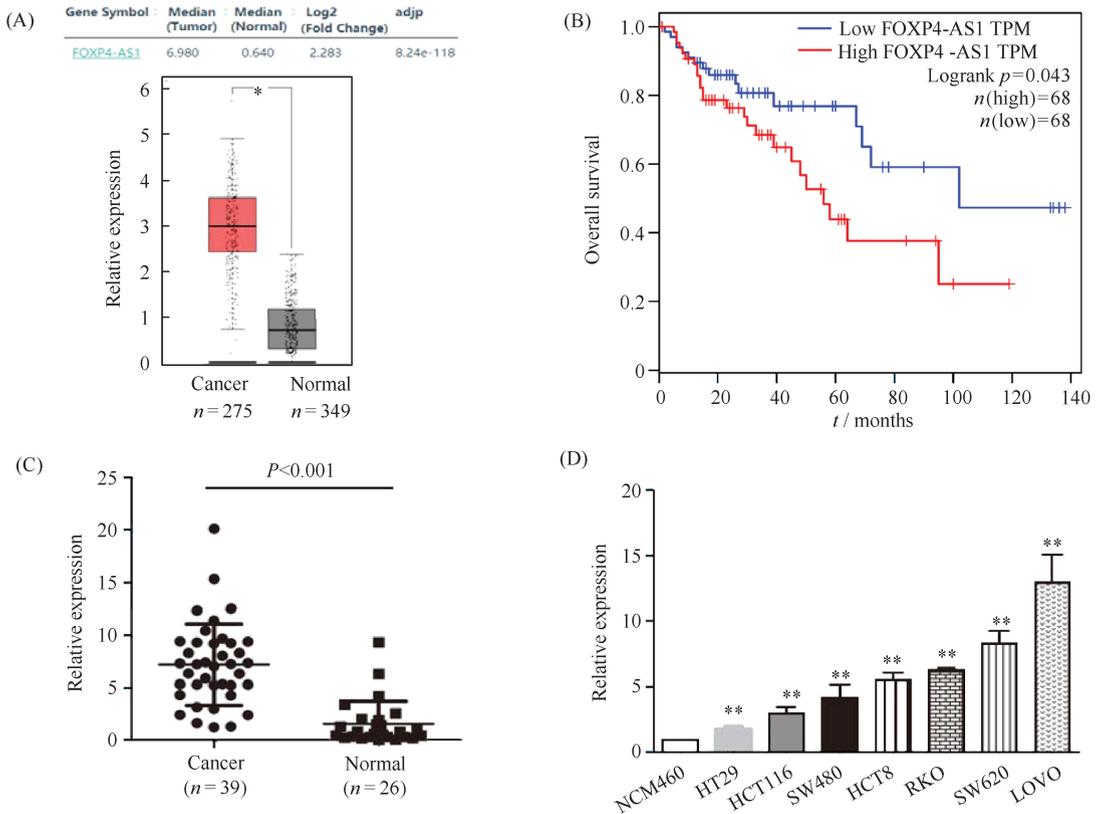


Fig.1 FOXP4-AS1 was up-regulated in colorectal cancer and negatively related with prognosis of patients with colorectal cancer

(A) The expression of FOXP4-AS1 was estimated in 275 cases of colorectal cancer tissues and 349 cases of normal tissues via GEPIA. *vs* Normal, * $P < 0.01$. (B) Kaplan-Meier analysis was performed to investigate the expression levels of FOXP4-AS1 and outcomes of colorectal cancer patients. (C) FOXP4-AS1 expression was studied in 39 cases of colorectal cancer tissues and 26 cases of normal tissues by qRT-PCR assays. (D) qRT-PCR assays were carried out to test FOXP4-AS1 expression in colorectal cancer cells. *vs* NCM460, ** $P < 0.01$

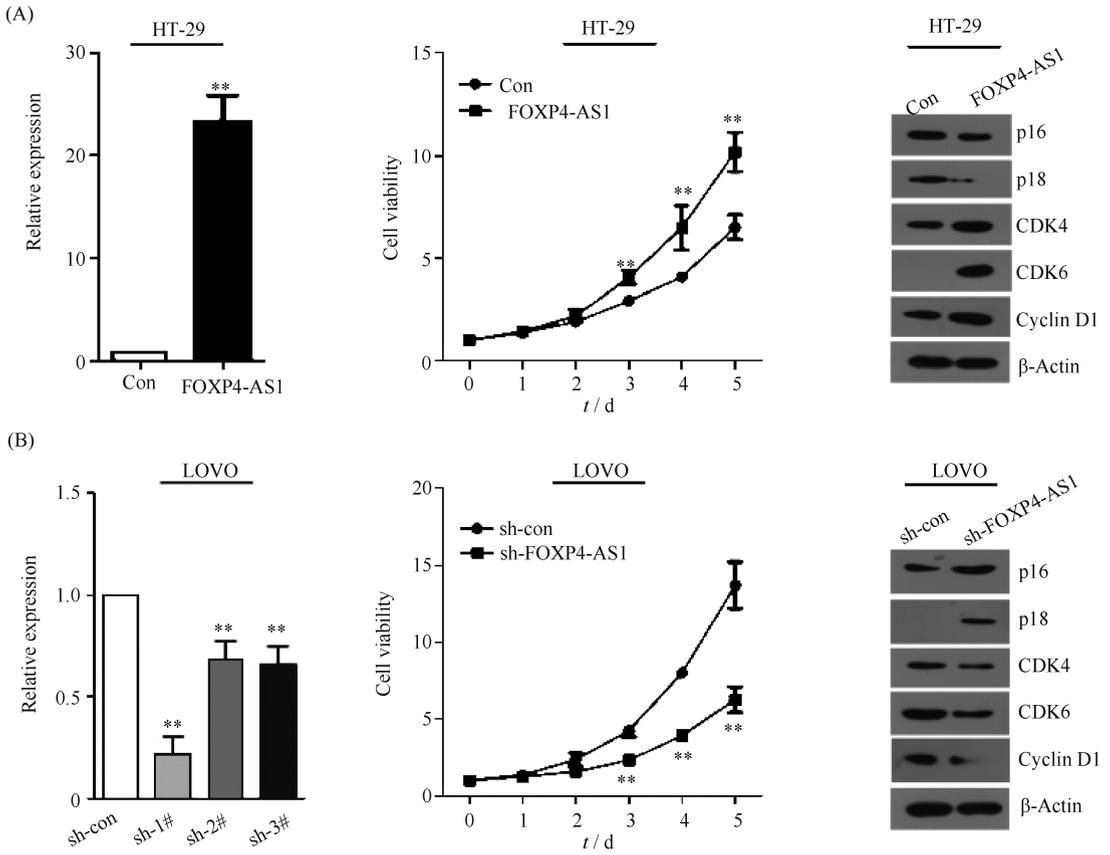


Fig.2 FOXP4-AS1 promotes colorectal cancer cell proliferation Restored FOXP4-AS1 in HT-29 cells (A) and knocking-down FOXP4-AS1 in LOVO cells (B). MTS assays were performed to estimate the cell viability, ** $P < 0.01$. The protein expression levels of cell cycle biomarkers in mentioned cells were determined via Western blotting assays ($n = 3$)

低 FOXP4-AS1。sh-1# 对 FOXP4-AS1 沉默效果最好,可用于后续研究。增殖检测提示,敲低 FOXP4-AS1 后,LOVO 细胞的增殖能力较对照组显著降低。敲低 FOXP4-AS1 时,可显著上调 p16 和 p18 蛋白的表达量,同时降低了 CDK4、CDK6 和细胞周期蛋白 D1 的表达(Fig.2B)。结果提示,FOXP4-AS1 可调控细胞周期相关蛋白质和凋亡相关蛋白质,促进细胞增殖。而一旦敲低其表达,可明显抑制结直肠癌细胞的增殖,促进细胞发生凋亡。

2.3 SP1 转录因子上调 FOXP4-AS1 表达

为了探讨 FOXP4-AS1 在结直肠癌中高表达的原因,首先预测 FOXP4-AS1 启动子区域的转录因子结合位点,发现 SP1 可能会结合在 FOXP4-AS1 启动子区域(Fig.3A)。SP1 在 36 例结直肠癌组织中的表达量显著高于其在正常组织中的表达量,且 SP1 与 FOXP4-AS1 在 36 例结直肠癌组织中表达正相关($P = 0.0145$),如 Fig.3B 所示。Western 印迹结果证实,SP1 在结直肠癌细胞中的表达量显著高于 NCM460,其在 HT29 中的表达量较低,在 LOVO 中

表达量最高(Fig.3C)。在 HT-29 中过表达 SP1,而在 LOVO 细胞中敲低其表达。结果发现,过表达 SP1 可明显增加 FOXP4-AS1 表达,敲低 SP1 后 FOXP4-AS1 表达量被降低(Fig.3D, 3E)。在 LOVO 中的染色质沉淀研究结果发现,SP1 可直接结合在 FOXP4-AS1 启动子区域(Fig.3F)。双荧光素酶报告基因检测提示,SP1 可直接增加野生型 FOXP4-AS1 启动子活性,但 SP1 对缺失其结合位点的 FOXP4-AS1 启动子活性未见影响(Fig.3G)。上述结果提示,SP1 可以直接结合到 FOXP4-AS1 启动子上并上调其表达。

3 讨论

近年来,lncRNAs 在多种肿瘤中异常表达,其表达调控机制备受关注^[7-9]。LncRNA MEG3 启动子区域高度甲基化,导致其在肝癌细胞中表达量极低。若在肝癌细胞中引入 DNA 甲基转移酶,将显著上调 MEG3 的表达^[10]。LncRNA LET 在肝癌、结直肠癌和小细胞肺癌中均显著低表达。究

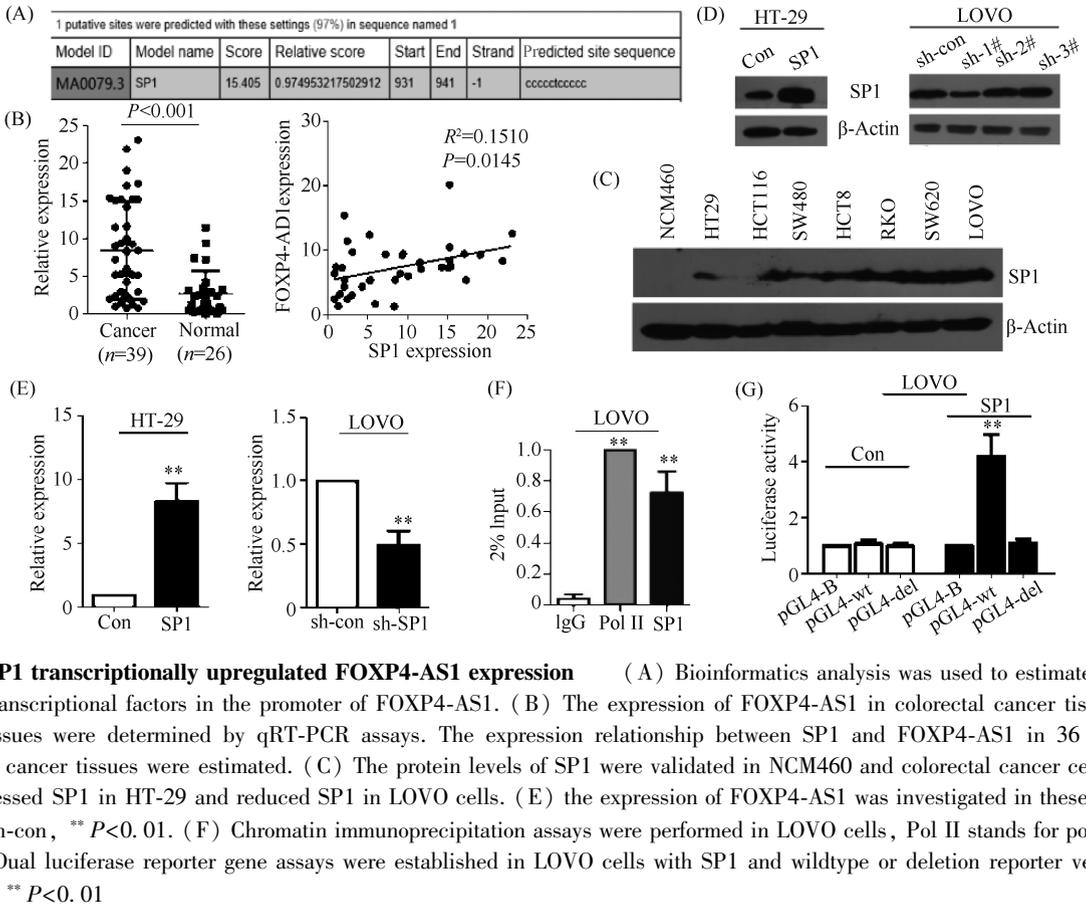


Fig.3 SP1 transcriptionally upregulated FOXP4-AS1 expression (A) Bioinformatics analysis was used to estimate binding sites of transcriptional factors in the promoter of FOXP4-AS1. (B) The expression of FOXP4-AS1 in colorectal cancer tissues and normal tissues were determined by qRT-PCR assays. The expression relationship between SP1 and FOXP4-AS1 in 36 cases of colorectal cancer tissues were estimated. (C) The protein levels of SP1 were validated in NCM460 and colorectal cancer cells. (D) Overexpressed SP1 in HT-29 and reduced SP1 in LOVO cells. (E) the expression of FOXP4-AS1 was investigated in these cells. *vs* con, *vs* sh-con, ** $P < 0.01$. (F) Chromatin immunoprecipitation assays were performed in LOVO cells, Pol II stands for polymerase II. (G) Dual luciferase reporter gene assays were established in LOVO cells with SP1 and wildtype or deletion reporter vectors. *vs* pGL4-B, ** $P < 0.01$

其原因是因为 LET 启动子区域的 H3 和 H4 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase 3, HDAC3) 乙酰化了^[11]。HOTAIR 与 miR-141 在肾癌细胞中表达负相关。miR-141 可通过序列特异性方式结合到 HOTAIR 上,并抑制其表达和促进瘤体增殖及浸润的功能。且 miR-141 与 Ago2 结合,导致 Ago2 切割 HOTAIR,下调其表达^[12]。LncRNA highly up-regulated in liver cancer (HULC) 启动子区域存在环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 结合位点。但是过表达的 miR-372 能够阻止 CREB 与 HULC 启动子的结合,导致 p300 从该启动子上解离,最终引起该启动子去乙酰化和甲基化,导致 HULC 在肿瘤中低表达^[13]。通过生物信息学预测,FOXP4-AS1 启动子区域存在 SP1 结合位点。报告基因和染色质沉淀研究证实,SP1 可直接结合在 FOXP4-AS1 启动子区域上调其表达。

LncRNAs 在结直肠癌中的作用更是研究的热点^[14-17]。TP73-AS1 在结直肠癌中显著低表达,且其表达量与 TNM 分期、预后和复发率显著负相关。深入研究发现,TP73-AS1 能够抑制结直肠癌

细胞增殖,促进其凋亡^[18]。Chen 等^[19]发现, lncRNA UICLM 在肝转移的结直肠癌组织中显著上调。干扰 UICLM 会显著抑制细胞增殖、集落形成和细胞迁移侵袭,过表达则会出现相反表型。Li 等^[20]通过挖掘组织芯片和 qRT-PCR 验证之后发现,FOXP4-AS1 在结直肠癌组织中显著高表达,且其表达量与 TNM 分期和瘤体大小显著正相关。敲低 FOXP4-AS1 促进细胞增殖和降低凋亡。流式结果显示,敲低 FOXP4-AS1 后 G_0/G_1 期细胞增多,S 期细胞减少。与此相一致的是,我们通过 GEPIA 数据库和 qRT-PCR 实验也证实,FOXP4-AS1 在结直肠癌组织中高表达,且 FOXP4-AS1 的表达量与结直肠癌患者较差的预后正相关。FOXP4-AS1 促进细胞周期推进,从而促进细胞增殖。此外,我们在 Li 等研究的基础上,从蛋白质水平而不是 mRNA 水平探讨细胞周期相关蛋白质的表达改变,对 FOXP4-AS1 作用机制的研究更有说服力。更重要的是,本文通过生物信息学预测结合染色质沉淀实验和双荧光素酶报告基因研究证实,SP1 可转录上调 FOXP4-AS1,解释了其在结直肠癌细胞和组织中过表达的具体原因。

参考文献(References)

- [1] Siegel R, Desants C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, **64**(2): 104-117
- [2] M úrmol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, *et al.* Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, **18**(1). pii: E197. doi: 10.3390/ijms18010197
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, **67** (1): 7-30
- [4] Zhang Y, Chen Z, Li J. The current status of treatment for colorectal cancer in China: A systematic review [J]. Medicine (Baltimore), 2017, **96**(40): e8242
- [5] Li Q, Dong C, Cui J, *et al.* Over-expressed lncRNA HOTAIRM1 promotes tumor growth and invasion through up-regulating HOXA1 and sequestering G9a/EZH2/Dnmts away from the HOXA1 gene in glioblastoma multiforme[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, **37**(1): 265
- [6] Delás MJ, Hannon GJ. lncRNAs in development and disease: from functions to mechanisms [J]. Open Biol, 2017, **7**(7). pii: 170121. doi: 10.1098/rsob.170121
- [7] Kita Y, Yonemori K, Osako Y, *et al.* Noncoding RNA and colorectal cancer: its epigenetic role [J]. J Hum Genet, 2017, **62**(1): 41-47
- [8] Wu J, Du M, Zhang Q, *et al.* Long noncoding RNA UCA1 promotes the proliferation, invasion, and migration of nasopharyngeal carcinoma cells via modulation of miR-145 [J]. Onco Targets Ther, 2018, **11**: 7483-7492
- [9] Chen R, Li WX, Sun Y, *et al.* Comprehensive analysis of lncRNA and mRNA expression profiles in lung cancer [J]. Clin Lab, 2017, **63**(2): 313-320
- [10] Braconi C, Kogure T, Valeri N, *et al.* microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer [J]. Oncogene, 2011, **30** (47): 4750-4756
- [11] Yang F, Huo XS, Yuan SX, *et al.* Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis [J]. Mol Cell, 2013, **49** (6): 1083-1096
- [12] Chiyomaru T, Fukuhara S, Saini S, *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR is targeted and regulated by miR-141 in human cancer cells [J]. J Biol Chem, 2014, **289**(18): 12550-12565
- [13] Wang J, Liu X, Wu H, *et al.* CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer [J]. Nucleic Acids Res, 2010, **38** (16): 5366-5383
- [14] Sun Z, Liu J, Chen C, *et al.* The biological effect and clinical application of long noncoding RNAs in colorectal cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, **46**(2): 431-441
- [15] Dai M, Li S, Qin X. Colorectal neoplasia differentially expressed: a long noncoding RNA with an imperative role in cancer [J]. Onco Targets Ther, 2018, **11**: 3755-3763
- [16] Yang S, Sun Z, Zhou Q, *et al.* MicroRNAs, long noncoding RNAs, and circular RNAs: potential tumor biomarkers and targets for colorectal cancer [J]. Cancer Manag Res, 2018, **10**: 2249-2257
- [17] Wang M, Han D, Yuan Z, *et al.* Long non-coding RNA H19 confers 5-Fu resistance in colorectal cancer by promoting SIRT1-mediated autophagy [J]. Cell Death Dis, 2018, **9**(12): 1149
- [18] Jia Z, Peng J, Yang Z, *et al.* Long non-coding RNA TP73AS1 promotes colorectal cancer proliferation by acting as a ceRNA for miR103 to regulate PTEN expression [J]. Gene, 2019, **685**: 222-229
- [19] 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
- [20] Li J, Lian Y, Yan C, *et al.* Long non-coding RNA FOXP4-AS1 is an unfavourable prognostic factor and regulates proliferation and apoptosis in colorectal cancer [J]. Cell Prolif, 2017, **50** (1). doi: 10.1111/cpr.12312