

过表达人结肠癌细胞SW480中lncRNA CASC2a后的生物学行为影响

马煜¹ 张洁¹ 王岚玉¹ 李振兴¹ 田炜² 张国志¹ 陈建立^{1*}

(¹华北理工大学附属医院普通外科, 唐山 063000; ²华北理工大学医学实验研究中心, 唐山 063000)

摘要 该文主要探究过表达lncRNA CASC2a后对人结肠癌细胞SW480在细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡方面的影响。选取人结肠癌细胞系SW480, 构建lncRNA CASC2a过表达质粒模型, 并通过qRT-PCR检测细胞中的lncRNA CASC2a含量。CCK-8、细胞划痕实验、Transwell、Caspase-3活性检测、TUNEL实验分别比较细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡情况, Western blot检测凋亡抗体Cleaved Caspase-3、Caspase-3、BCL-2、Bax的表达情况。结果显示, 过表达lncRNA CASC2a后, SW480人结肠癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力均减弱, 凋亡能力增强, Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Bax蛋白表达增加, BCL-2表达减少。该研究得出, 过表达lncRNA CASC2a后可抑制人结肠癌细胞SW480的增殖、迁移、侵袭能力以及诱导凋亡能力。

关键词 结肠癌; lncRNA CASC2a; 细胞增殖; 细胞凋亡

The Biological Behavior Effect of Overexpression of lncRNA CASC2a in Human Colon Cancer Cell SW480

MA Yu¹, ZHANG Jie¹, WANG Lanyu¹, LI Zhenxing¹, TIAN Wei², ZHANG Guozhi¹, CHEN Jianli^{1*}

(¹Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Department of General Surgery, Tangshan 063000, China;

²Medical Experimental Research Center, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

Abstract This study was to investigate the effect of overexpression of lncRNA CASC2a in human colon cancer cell SW480 on cell proliferation, migration, invasion and apoptosis. The human colon cancer cell line SW480 was selected to construct the lncRNA CASC2a overexpression plasmid model, and the content of lncRNA CASC2a in the cells was detected by qRT-PCR. Cell proliferation, migration, invasion and apoptosis were compared by CCK-8, scratch test, Transwell, Caspase-3 activity test and TUNEL test. The expression of apoptotic antibodies Cleaved Caspase-3, Caspase-3, BCL-2 and Bax was detected by Western blot. The results showed that after overexpression of lncRNA CASC2a, the proliferation, migration, and invasion capacity of SW480 human colon cancer cells all reduced and the apoptosis ability enhanced. The expression of Cleaved Caspase-3, Caspase-3, and Bax protein increased, and the expression of BCL-2 decreased. The study concludes that overexpression of lncRNA CASC2a can inhibit the proliferation, migration and invasion of human colon cancer cell SW480, and induce apoptosis.

Keywords colon cancer; lncRNA CASC2a; cell proliferation; apoptosis

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类本身不编码蛋白质, 碱基数目大于200核苷酸

的RNA分子^[1]。研究发现, 由于lncRNA的二级结构复杂多样, 机理作用多变, 在细胞增殖、凋亡、周期及

收稿日期: 2019-12-30 接受日期: 2020-04-03

*通讯作者。Tel: 18633960088, E-mail: mychenjanli@126.com

Received: December 30, 2019 Accepted: April 3, 2020

*Corresponding author. Tel: +86-18633960088, E-mail: mychenjanli@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5248>

代谢等方面可发挥重要作用,故逐渐成为当前研究热点^[2-5]。癌易感性候选基因2(cancer susceptibility candidate 2, CASC2)属于lncRNA,其最初在子宫内膜癌中被发现,是子宫内膜癌患者的染色体10q26中一个跨越了*D10S190*基因座的等位基因缺失160 Kb最小等位基因缺失区。很多学者已证实,CASC2在诸多如肝癌^[6]、前列腺癌^[7]、胃癌^[8]、神经胶质瘤^[9]等肿瘤组织中呈现低表达,发挥抑癌作用,LI等^[10]也证实,CASC2可在体内和体外通过调节MAPK信号通路来抑制胃癌细胞。此外也有研究报道,CASC2的表达与患者的临床病理特征,如肿瘤大小及预后等相关^[11]。

CASC2基因有3个mRNA转录产物,分别是CASC2a、CASC2b和CASC2c。与正常组织相比,肿瘤组织和细胞系中CASC2a的mRNA表达下降,失活后会发瘤变,所以CASC2a有抑癌作用^[12]。如有研究证实,CASC2a在膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma, BUC)中呈现低表达,且具有早期筛查诊断价值^[13]。但总的来说,目前对CASC2a在肿瘤方面的很多研究仍处于空白阶段,对肿瘤的调控机理、作用靶点及其是否控制信号通路等这些方面尚不完全清楚,其在结直肠癌的发生发展中是否发挥一定作用,相应的机制及途径也需我们进一步深入探索^[14]。故本实验结合CASC2a的抑癌特性,拟过表达人结肠癌细胞SW480中的lncRNA CASC2a水平来研究其对细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡等生物学行为的影响,为结直肠癌在分子生物学方面的研究填补一定空缺,为结直肠癌的发病过程、治疗及诊断提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人结肠癌细胞系SW480购于美国细胞库(ATCC),细胞培养使用补充有10%胎牛血清(FBS,美国Gibco公司)、1%含10 000 U/mL青霉素和10 000 μ g/mL链霉素(美国Gibco公司)的DMEM(美国Gibco公司)培养基并置于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中培养,依据细胞生长情况每1~2天更换培养基或者进行细胞传代、冻存等。

1.2 实验方法

1.2.1 过表达质粒构建与转染 lncRNA CASC2a过表达质粒pcDNA3.1(+)-CASC2a购于上海中乔

新舟生物科技公司。待细胞度融合达70%~90%,于转染前12 h更换为基础DMEM培养基(不含血清及双抗),使用脂质体转染试剂Lipofectamine 2000(美国Thermo Fisher公司)分别转染过表达质粒pcDNA3.1(+)-CASC2a及等摩尔质量的pcDNA3.1(+)-空载质粒,转染后6 h更换为完全DMEM培养基(含有血清及双抗)。通过qRT-PCR检测转染效率,比较实验组(转染过表达质粒pcDNA3.1(+)-CASC2a)、对照组(转染空载质粒)两组细胞lncRNA CASC2a含量,确认转染效果及为后续实验建立模型。

1.2.2 总RNA的提取及qRT-PCR 转染后24 h,采用RNA pure(中国庄盟国际生物公司)分别提取实验组、对照组及空白组(未进行任何处理)细胞的总RNA,使用分光光度计(美国Thermo Fisher公司)检测RNA的浓度以及纯度。使用ABScript II Reverse Transcriptase(美国ABclonal公司)将总RNA反转录为cDNA,以cDNA为模板,使用2 \times SYBR Green Fast qPCR Mix with Low Rox II,以*GADPH*为内参基因进行qRT-PCR,*GADPH*引物序列:*GADPH*-F: 5'-TCA AGA AGG TGG TGA AGC A-3',*GADPH*-R: 5'-AGG TGG AGG AGT GGG TGT-3'。CASC2a引物序列:*CASC2(a/b)*-F: 5'-TAC AGG ACA GTC AGT GGT GGT A-3',*CASC2(a/b)*-R: 5'-ACA TCT AGC TTA GGA ATG TGG C-3'。所有实验结果重复3次,结果计算2^{- $\Delta\Delta$ Ct}并进行统计学分析。

1.2.3 CCK-8检测细胞增殖能力 选取转染后生长稳定、状态良好的各组细胞,胰酶消化后细胞计数,控制约1 000个细胞/孔,均匀接种于96孔板上,每组设置6个复孔,在37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中培养24 h、48 h、72 h、96 h,于检测前更换新的完全DMEM培养基100 μ L/孔,并加入10 μ L/孔的CCK-8试剂,再次置于细胞培养箱中,之后每隔30 min使用Multiskan FC酶标仪(美国Thermo Fisher公司)检测细胞在450 nm波长处的吸光度(*D*)值,所有实验重复3次,每次结果取6个复孔平均值,结果取平均值并进行统计学分析。

1.2.4 细胞划痕实验 选取转染后生长稳定、状态良好的各组细胞,胰酶消化后均匀接种于6孔板上,每组设置3个复孔(可于接种前使用marker笔在6孔板背面划横线标记),置于37 °C、5% CO₂的细胞恒温培养箱中培养,待每孔中细胞密度约达100%后,用同一200 μ L移液枪枪头沿垂直于marker笔线分别

在培养孔内划痕, 划痕后使用PBS冲洗3次, 至漂浮细胞冲洗干净后更换为基础DMEM培养基, 立即使用显微镜观察划痕情况并拍照、标号、纪录。后继续置于37 °C、5% CO₂的恒温细胞培养箱中培养48 h, 在显微镜下观察之前同一编号位置下细胞划痕的愈合情况并拍照记录。使用ImageJ软件计算迁移区面积, 结果用迁移率[迁移率(%)=48 h迁移面积(0 h迁移面积-48 h迁移面积)/0 h迁移面积×100%]表示并进行统计学分析。

1.2.5 Transwell 首先于使用前在Transwell小室(美国Corning公司)上层小室中加入300 μL的基础DMEM培养基, 置于37 °C、5% CO₂的恒温细胞培养箱中亲水化1 h, 然后选取转染后生长稳定、状态良好的各组细胞, 胰酶消化后细胞计数, 取大约2×10⁴个细胞接种于上层小室, 同时更换上层小室内基础DMEM培养基为含1%胎牛血清的完全DMEM培养基, 小室下层中加入500 μL含10%胎牛血清的完全DMEM培养基, 每组设3个复孔。将Transwell小室置于培养箱中培养24 h, 取出小室, 4%多聚甲醛固定后, 使用结晶紫进行染色10 min, 染色后纯水清洗, 在200×显微镜下观察、拍照、记录, 使用ImageJ软件计数每个小室上、下、左、右、中5个视野中迁移的细胞数, 求平均数进行比较及统计学分析。

1.2.6 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)活性检测 选取转染后生长稳定、状态良好的各组细胞, 胰酶消化、离心、吸除上清, 收集细胞, 按照Caspase-3活性检测试剂盒(中国上海碧云天生物技术有限公司)提供的步骤操作。同时用Bradford法检测待测样品中蛋白浓度, 测定pNA曲线, 最后使用酶标仪在405 nm波长处测定吸光度(D)值, 实验组的D₄₀₅数值减去对照组的D₄₀₅数值, 即为实验组Caspase-3催化产生的pNA产生的吸光度(D)值。实验至少重复3次。

1.2.7 TUNEL 选取转染后生长状态良好的各组细胞, 通过TUNEL检测法试剂盒(中国上海碧云天生物技术有限公司)检测各组细胞的凋亡情况: 将各组细胞爬片用4%多基聚甲醛固定30 min后PBS缓冲液冲洗5 min, 然后加入到含0.1% Triton X-100的PBS冰浴孵育2 min, 之后PBS缓冲液再冲洗, 再将TUNEL工作液加入6孔板中37 °C避光孵育60 min, PBS缓冲液再次冲洗, DAPI染色液染色10 min, PBS缓冲液冲洗3次, 每次5 min, 将爬片取出, 抗荧光淬灭剂封片, 免疫荧光显微镜下采集图片。用Image-Pro Plus 6.0

软件随机抽取6个区域分别测定TUNEL荧光数量, DAPI染色细胞核数量, 结果用凋亡率表示(凋亡率(%)=TUNEL荧光数量/DAPI细胞核数量×100%), 每组实验重复3次。

1.2.8 Western blot检测凋亡蛋白表达 使用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液(RIPA裂解液:蛋白酶抑制剂=250:1)裂解各组细胞, 超声震碎10 s, 并使用BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量(中国上海碧云天生物技术有限公司), 加入4×上样缓冲液后100 °C煮沸5 min。聚丙烯酰胺凝胶电泳90 min后, 以220 mA恒定电流湿转90 min至120 min, 使蛋白质转移到PVDF膜上, 再用100 g/L的脱脂牛奶室温封闭2 h。使PVDF膜在凋亡抗体Cleaved Caspase-3、Caspase-3、BCL-2、Bax的一抗中于4 °C孵育过夜。再将膜与特异性二抗在室温下孵育2 h, 使用Gen-share超敏化学发光底物检测试剂盒(中国西安晶彩生物科技有限公司)来开发蛋白质条带, 并使用ImageJ软件量化条带的强度。其中内参选用β-tubulin。

1.3 统计分析

应用SPSS 22.0、GraphPad Prism 8、ImageJ、Image-Pro Plus 6.0统计学软件分析数据。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达人结肠癌细胞SW480中的lncRNA CASC2a含量

转染过表达质粒pcDNA3.1(+)-CASC2a后, 实验组SW480细胞中CASC2a表达量为545.745±58.481明显高于对照组(其中对照组为1)(图1), 数据具有统计学意义(P<0.01)。

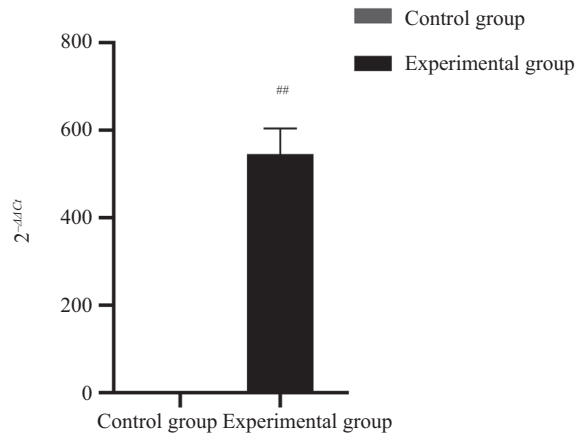
2.2 过表达lncRNA CASC2a后SW480各组细胞增殖能力比较

实验结果见表1和图2, 24、48、72及96 h每个同一时间点实验组细胞增殖能力均低于空白组、对照组, 且数据有统计学意义(P<0.01); 而对照组与空白组的数据间均无明显差异(P>0.05)。同一组细胞在4个不同时间点之间细胞增殖能力数据也有差异(P<0.01), 96 h细胞增殖能力明显较72、48、24 h增加, 即随着时间增加, 增殖能力逐渐增强。证明, 过表达lncRNA CASC2a水平后可以抑制人结肠癌细胞SW480的增殖能力。

2.3 过表达lncRNA CASC2a后SW480各组细胞迁移、侵袭能力比较

结果(图3)显示, 48 h时SW480细胞实验组迁移率(0.213±0.072)均低于空白组(0.438±0.023)、对照组

(0.432±0.012); 48 h后SW480细胞侵袭细胞数实验组(183.667±9.286)也较空白组(324.000±10.677)与对照组(290.500±6.500)减少; 且数据均有统计学意义(图4) ($P<0.01$)。但其中迁移与侵袭实验的空白组与对照



^{##} $P<0.01$, 与对照组比较。
^{##} $P<0.01$ vs control group.

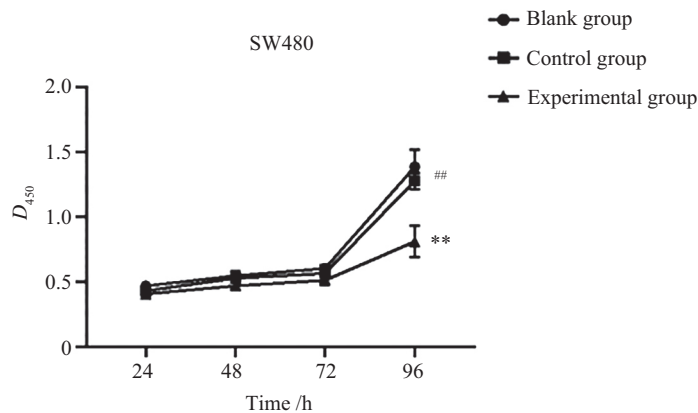
图1 SW480人结肠癌细胞实验组与对照组CASC2a表达情况比较

Fig.1 Comparison of CASC2a expression between SW480 human colon cancer cell experimental group and control group

表1 SW480结肠癌细胞空白组、对照组、实验组的细胞增殖D值
 Table 1 Cell proliferation D values of SW480 colon cancer cell blank group, control group, and experimental group

时间/分组	空白组	对照组	实验组	F值	P值
Time/group	Blank group	Control group	Experimental group	F value	P value
24 h	0.468±0.012 ^a	0.429±0.016 ^a	0.405±0.007 ^b	19.563	$P<0.01$
48 h	0.546±0.032 ^a	0.528±0.036 ^a	0.468±0.028 ^b	4.837	$P<0.01$
72 h	0.602±0.027 ^a	0.564±0.021 ^a	0.511±0.023 ^b	11.075	$P<0.01$
96 h	1.386±0.134 ^a	1.278±0.062 ^a	0.809±0.120 ^b	15.596	$P<0.01$

不同小写字母之间表示不同组之间具有显著性差异($F=41.625, P<0.01$), 相同字母代表组间差异不显著($P>0.05$)。 Different lowercase letters indicate that there is a significant difference between different groups ($F=41.625, P<0.01$), the data with the same letters are not significantly different ($P>0.05$).



^{##} $P<0.01$, 与空白组比较; ^{**} $P<0.01$, 与对照组比较。
^{##} $P<0.01$ vs blank group; ^{**} $P<0.01$ vs control group.

图2 SW480结肠癌细胞空白组、对照组、实验组的细胞增殖情况

Fig.2 Cell proliferation of SW480 colon cancer cell blank group, control group and experimental group

组之间数据均无明显统计学意义($P>0.05$), 排除转染过程对实验的影响, 证明过表达lncRNA CASC2a水平后可以抑制人结肠癌细胞SW480的迁移及侵袭能力。

2.4 过表达lncRNA CASC2a后SW480各组细胞Caspase-3活性比较

结果(图5)显示, 过表达lncRNA CASC2a后, SW480实验组细胞6、12、24、36 h后, Caspase-3活性(0.574 ± 0.043 、 0.735 ± 0.020 、 0.977 ± 0.069 、 2.806 ± 0.152)较对照组(0.325 ± 0.013)相比明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$), 说明过表达人结肠癌细胞中lncRNA CASC2a, 可促进Caspase-3活性增强, 进而诱导细胞凋亡能力。

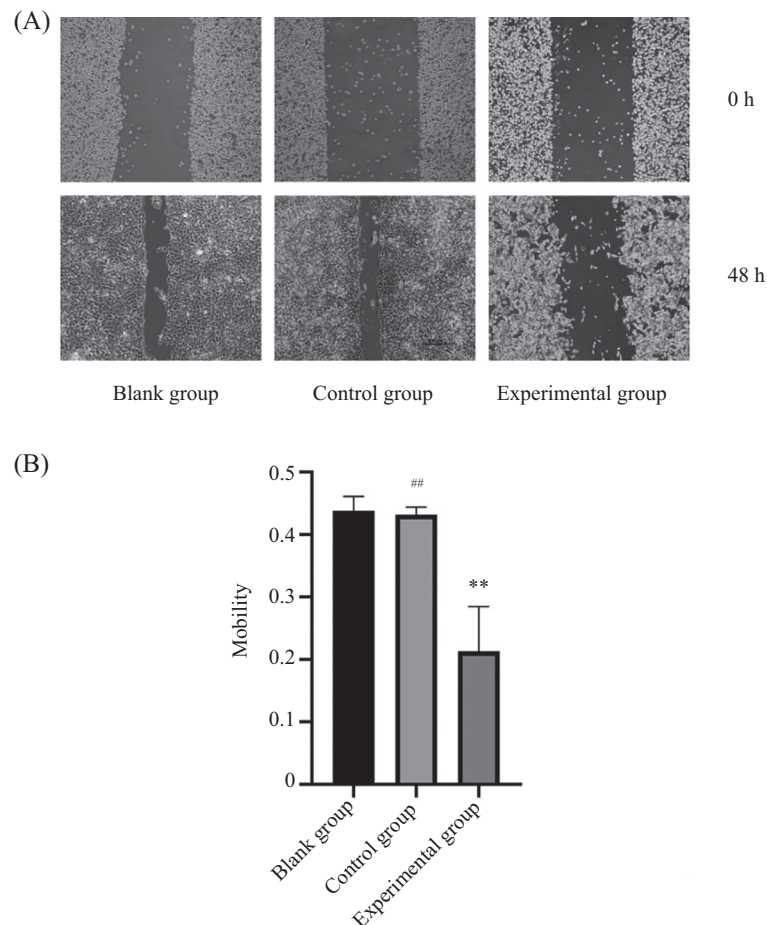
2.5 过表达lncRNA CASC2a后TUNEL法检测SW480各组细胞凋亡能力比较

如图6所示, 过表达lncRNA CASC2a后, TUNEL实验检测SW480细胞实验组凋亡率(0.846 ± 0.219)明显高

于空白组(0.476 ± 0.308)与对照组(0.312 ± 0.177), 而空白组与对照组实验数据均无明显统计学意义($P>0.05$), 证明, 过表达人结肠癌细胞SW480中的lncRNA CASC2a可以诱导细胞凋亡, 且与转染过程本身无关。

2.6 过表达lncRNA CASC2a后SW480凋亡抗体Cleaved Caspase-3、Caspase-3、BCL-2、Bax的表达情况

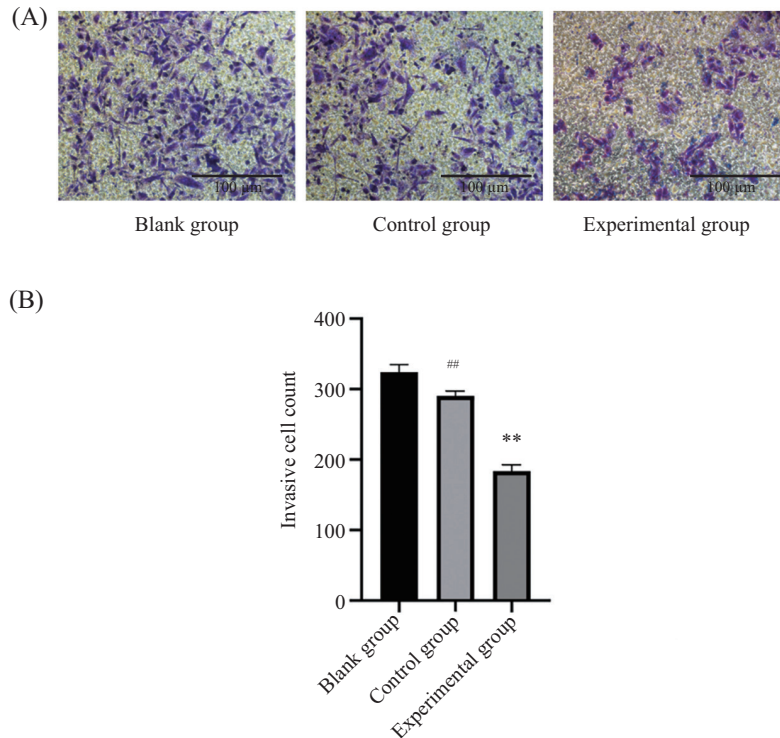
过表达lncRNA CASC2a后, SW480细胞实验组凋亡抗体Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Bax的表达分别为 0.974 ± 0.019 、 1.249 ± 0.211 、 1.191 ± 0.074 均高于空白组(0.773 ± 0.028 、 0.910 ± 0.379 、 0.756 ± 0.167)及对照组(0.735 ± 0.022 、 0.722 ± 0.237 、 0.872 ± 0.221), 而BCL-2的表达量实验组(0.609 ± 0.006)低于空白组(0.899 ± 0.214)及对照组(0.729 ± 0.102)($P<0.05$)(图7)。证明过表达癌细胞中lncRNA CASC2a水平后Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Bax的表达量会增加, BCL-2



A: SW480细胞各组间0 h与48 h时的迁移情况; B: SW480细胞各组间48 h迁移率比较统计图。^{##} $P<0.01$, 与空白组比较; ^{**} $P<0.01$, 与对照组比较。
A: SW480 cell migration between groups at 0 h and 48 h; B: SW480 cell migration statistics comparison between groups. ^{##} $P<0.01$ vs blank group; ^{**} $P<0.01$ vs control group.

图3 SW480结肠癌细胞空白组、对照组、实验组的细胞迁移情况

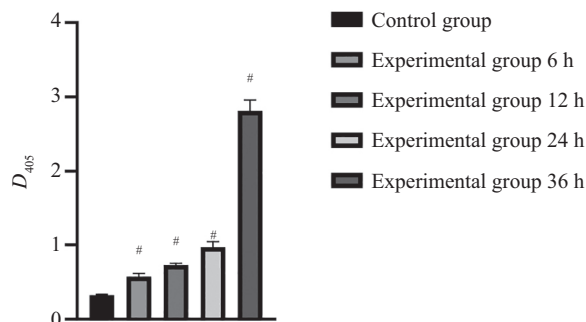
Fig.3 Cell migration of blank, control, and experimental groups of SW480 colon cancer cells



A: SW480细胞各组间48 h时的侵袭情况; B: SW480细胞各组间48 h侵袭细胞数比较统计图。[#] $P < 0.01$, 与空白组比较; ^{**} $P < 0.05$, 与对照组比较。
A: SW480 cell invasion between 0h and 48h; B: SW480 cell invasion statistics comparison between the groups. [#] $P < 0.01$ vs blank group; ^{**} $P < 0.01$ vs control group.

图4 SW480结肠癌细胞空白组、对照组、实验组的细胞侵袭情况

Fig.4 Cell invasion of SW480 colon cancer cell blank group, control group, and experimental group



[#] $P < 0.05$, 与对照组比较。

[#] $P < 0.05$ vs control group.

图5 SW480结肠癌细胞对照组与不同时间点实验组细胞Caspase-3活性

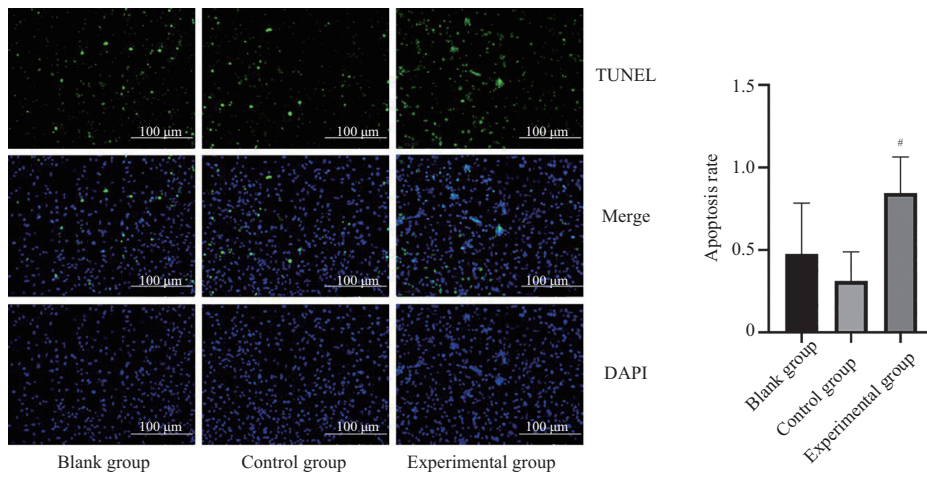
Fig.5 Cell Caspase-3 activity of SW480 colon cancer cell control group and experimental group at different time points

的表达量会减少, 即诱导癌细胞的凋亡, 从而起到一定抑制癌症发生发展的作用。

3 讨论

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种常见的恶性消化道肿瘤, 目前仍是威胁世界健康的一大难题挑战, 在我国对于结直肠癌的治疗还是以手术治疗为主。在过去的几十年里, 人类虽然在攻克癌

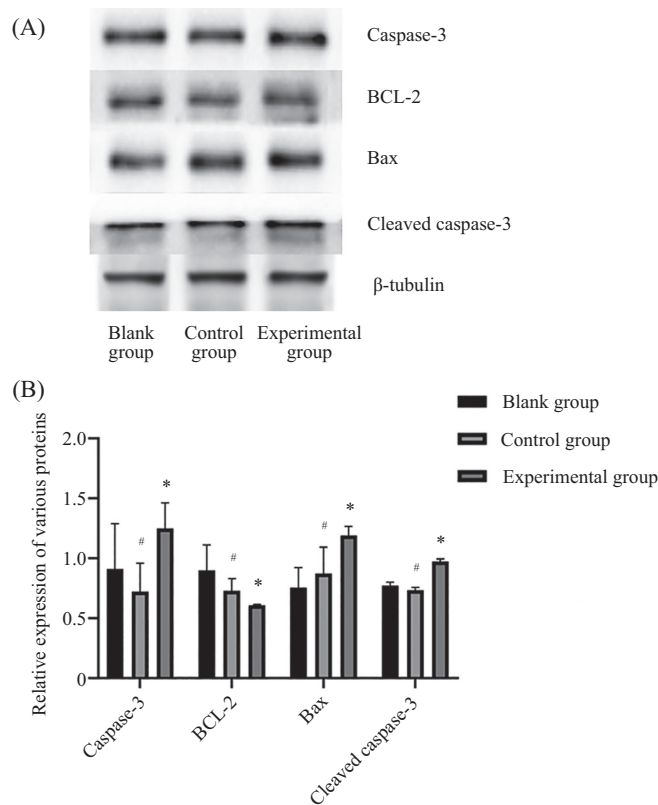
症的险路上取得了进步, 但其依然是造成人类死亡的重要原因。LncRNA属于非编码RNA, 是缺乏有意义的开放阅读框的RNA^[15], 随着研究的不断发现, LncRNA不再一无是处, 其与蛋白质、RNA和脂质相互作用在各类癌症发生发展中的作用逐渐凸显^[16]。如HOX转录反义RNA(Hox transcript antisense RNA, HOTAIR)能够通过与其核心蛋白复合体2(polycomb repressive complex 2, PRC2)直接作用来调控特定



$P < 0.05$, 与空白组比较。

$P < 0.05$ vs blank group.

图6 过表达lncRNA CASC2a后SW480各组细胞TUNEL检测结果
Fig.6 TUNEL results of SW480 cells after overexpression of lncRNA CASC2a



A: SW480细胞各组间凋亡蛋白表达情况; B: SW480细胞各组间凋亡蛋白相对表达量比较统计图。# $P < 0.05$, 与空白组比较; * $P < 0.05$, 与对照组比较。

A: expression of apoptotic protein among groups of SW480 cells; B: Statistical graph of relative expression of apoptotic proteins among groups of SW480 cells. # $P < 0.05$ vs blank group; * $P < 0.05$ vs control group.

图7 SW480结肠癌细胞空白组、对照组、实验组各种蛋白相对表达量

Fig.7 Relative expression of various proteins in SW480 colon cancer cell blank group, control group, and experimental group

的基因影响肿瘤的侵袭和转移^[17], 肺腺癌转录本1(MAL-AT1)被发现与乳腺癌早期转移预测和预后生存相关^[18]。CASC2作为lncRNA家族中的一员,

研究也不断更新, 已有实验证实, lncRNA CASC2过表达后可通过ERK1/2和Wnt/ β -catenin信号通路来抑制胃癌细胞增殖和迁移^[19], 长链非编码RNA CASC2

会通过miR-21/PTEN信号轴发挥抑制肝细胞癌作用等^[20]。但尚未有明确文献报道lncRNA CASC2a对结肠癌细胞的作用方式、机制及影响途径等。

人类发现肿瘤的无限增殖和凋亡受阻是肿瘤恶性生物学行为的根本^[21-22]，因此，研究肿瘤细胞的增殖及凋亡，抑制肿瘤细胞的增殖及加速凋亡发生也逐渐成为人类攻克癌症道路上的一个风向标。本实验围绕lncRNA CASC2a的抑癌基因特性进行研究，拟通过对人结肠癌细胞系转染过表达lncRNA CASC2a的质粒pcDNA3.1(+)-CASC2a来构建lncRNA CASC2a的过表达模型，过表达人结肠癌细胞中lncRNA CASC2a，CCK-8、细胞划痕、Transwell实验探究在细胞增殖、迁移等生物学功能方面的影响。结果证实，过表达人结肠癌细胞中lncRNA CASC2a后可抑制细胞增殖、迁移、侵袭能力，从根本上来说，过表达CASC2a可抑制细胞的增殖从而发挥出一定的抑癌作用。

细胞凋亡又称I型程序性细胞死亡，与细胞增殖共同对维持机体稳态具有重要生物学意义^[23]。结肠癌等多种恶性肿瘤的治疗方式都是通过调控细胞凋亡来完成的^[24-25]。细胞凋亡过程具有一定的复杂性，需要多种酶来参与，间接检测这些酶的活性及表达就成为实验室检测及研究细胞凋亡的主要方法。Caspase-3属于细胞凋亡酶家族中的一员，是由其酶原(procaspase-3)活化后得到的一种诱导细胞凋亡发生的酶^[26]。很多研究证明，恶性肿瘤组织中Caspase-3表达水平更高，因此，Caspase-3作为下调凋亡过程中的关键酶，其活性检测对肿瘤的研究有着非常重要的意义^[27-28]。本实验选择进行Caspase-3活性检测、TUNEL实验来检测细胞凋亡水平，结果均证实，过表达lncRNA CASC2a后可诱导肿瘤细胞的凋亡。细胞凋亡过程除了受到一些酶作用影响外，还有一类十分重要的调节因子，即BCL-2基因家族，它们可以分为两大类，一类是包括Bax等在内的诱导细胞凋亡过程的，还有一类是BCL-2、Mcl2等抑制细胞凋亡进行的^[29]。随着研究不断进展，BCL-2、Bax、Caspase-3三者关系在细胞凋亡过程中的关系进一步深入，三者共同作用在细胞凋亡中发挥重要作用^[30]，故对三者进行相关检测也是实验室研究细胞凋亡的一大主要方法。本实验选取BCL-2、Bax、Caspase-3三种抗体，通过Western blot进行蛋白检测，结果证实，过表达人结肠癌细胞中lncRNA CASC2a

后Bax、Caspase-3蛋白相对表达水平增强，BCL-2蛋白相对表达水平降低，再次在蛋白表达水平上证明，过表达lncRNA CASC2a能诱导细胞凋亡能力，从而起到抑制肿瘤细胞进一步发展的能力，间接证实了CASC2a在结肠癌细胞中的抑癌作用。

综上所述，过表达人结肠癌细胞SW480中的lncRNA CASC2a后可抑制细胞增殖、迁移、侵袭能力，诱导细胞凋亡，起到抑制肿瘤发展的作用。通过本研究希望为结肠癌药物及靶向治疗等方面提供一定的基础依据。

参考文献 (References)

- [1] PONTING C, OLIVER P, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-41.
- [2] MEOLA N, PIZZO M, ALFANO G, et al. The long noncoding RNA Vax2os1 controls the cell cycle progression of photoreceptor progenitors in the mouse retina [J]. *RNA*, 2012, 18(1): 111-23.
- [3] YANG X, SONG J H, CHENG Y, et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 regulates proliferation and migration in oesophageal adenocarcinoma cells [J]. *Gut*, 2014, 63(6): 881-90.
- [4] WANG F, LI X, XIE X, et al. UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(13): 1919-27.
- [5] TOMOSHIGE K, E H D, TAKAMASA I, et al. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor [J]. *Sci Signal*, 2010, 3(107): ra8.
- [6] YUANYUAN G, NANA H, XIAOQIN H, et al. Long non-coding RNA CASC2 regulates cell biological behaviour through the MAPK signalling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2017, doi: 10.1177/1010428317706229.
- [7] WEIYIN G, SHUANGQUAN L, CHENG C, et al. Long non-coding RNA CASC2 regulates Sprouty2 via functioning as a competing endogenous RNA for miR-183 to modulate the sensitivity of prostate cancer cells to docetaxel [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 665: 69-78.
- [8] JIANFENG Z, HAIYAN H, SHIJI T, et al. Overexpression of long non-coding RNA cancer susceptibility 2 inhibits cell invasion and angiogenesis in gastric cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 5235-40.
- [9] LIAO Y, SHEN L, ZHAO H, et al. LncRNA CASC2 Interacts With miR-181a to modulate glioma growth and resistance to TMZ through PTEN pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(7): 1889-99.
- [10] LI P, XUE W, FENG Y, et al. Long non-coding RNA CASC2 suppresses the proliferation of gastric cancer cells by regulating the MAPK signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(8): 3522-9.
- [11] XUEZHI H, ZHILI L, JUN S, et al. Low expression of long noncoding RNA CASC2 indicates a poor prognosis and regulates cell proliferation in non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 9503-10.

- [12] PAOLA B, ANTONIO C, ANTONELLA M, et al. Identification of a novel candidate gene, CASC2, in a region of common allelic loss at chromosome 10q26 in human endometrial cancer [J]. *Human Mutation*, 2004, 23(4): 318-26.
- [13] 张德元, 曹金玉, 刘繁荣. 竞争性内源RNA在肝癌中的研究进展 [J]. *临床与实验病理学杂志*(ZHANG D Y, CAO J Y, LIU B F. Research progress of competitive endogenous RNA in liver cancer [J]. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*), 2016, 32(10): 1145-8.
- [14] FRANCESCO C, LUC C P, ABHIJIT P, et al. The non-coding transcriptome as a dynamic regulator of cancer metastasis [J]. *Cancer Metast Rev*, 2014, 33(1): 1-16.
- [15] CHUNRU L, LIUQING Y. Long noncoding RNA in cancer: wiring signaling circuitry [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(4): 287-301.
- [16] ALLISON J, M K H. The new RNA world: growing evidence for long noncoding RNA functionality [J]. *Trends Genet* 2017, 33(10): 665-76.
- [17] A M C, CHUN-KAN C, AMY C, et al. The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3 [J]. *Nature*, 2015, 521(7551): 232-6.
- [18] 郭浩, 杨堃, 姜志荣, 等. lncRNA CASC2c通过ERK1/2和Wnt/ β -catenin信号通路对胃癌细胞SGC-7901增殖及迁移的影响 [J]. *精准医学杂志*(GUO H, YANG K, JIANG Z R, et al. Effects of lncRNA CASC2c on the proliferation and migration of gastric cancer cell SGC-7901 via ERK1/2 and Wnt/ β -catenin signaling pathways [J]. *Journal of Precision Medicine*), 2018, 33(2): 155-8.
- [19] 何行昌, 朱素华, 李三强. 长链非编码RNA CASC2通过miR-21/PTEN信号轴抑制肝细胞癌[J]. *中国老年学杂志*(He X C, Zhu S H, Li S Q. Long-chain noncoding RNA CASC2 inhibits hepatocellular carcinoma via miR-21/PTEN signal axis [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2019, 39(10): 2467-71.
- [20] ZHEN L, KANGER W, XIELAI Z, et al. Long non-coding RNA cancer susceptibility candidate 2a (casc2a) is a marker of early recurrence after radical cystectomy in patients with urothelial carcinoma of the bladder [J]. *Med Sci Monitor*, 2018, 24: 438-47.
- [21] W G A, PATRYCJA NS. Apoptosis turns 21 [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(12): 1485-6.
- [22] WALDEMAR W, PIOTR T, KRZYSZTOF K, et al. Proliferation and apoptosis of human placental cells exposed to aromatic hydrocarbons [J]. *Ginekol Pol*, 2017, 88(12): 686-91.
- [23] P M A, BAHARE S, MEHDI SR, et al. Programmed cell death, from a cancer perspective: an overview [J]. *Mol Diang Ther*, 2018, 22(3): 281-95.
- [24] CUI M L, YANG H Y, HE G Q. Apoptosis induction of colorectal cancer cells HTL-9 *in vitro* by the transformed products of soybean isoflavones by *Ganoderma lucidum* [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2017, 18(12): 1101-12.
- [25] REBA M, URSZULA D, DEVKUMAR M, et al. ADAM17 is a tumor promoter and therapeutic target in western diet-associated colon cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(2): 549-61.
- [26] Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, et al. Old, new and emerging functions of caspases [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(4): 526-39.
- [27] NORMA O D. Caspase 3 in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 2(9): 738-42.
- [28] QIAN H, FANG L, XINJIAN L, et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy [J]. *Nature medicine*, 2011, 17(7): 860-6.
- [29] MARYANNE D, G C T. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death [J]. *BBA*, 2004, 1644(2/3): 133-47.
- [30] HENG Z, A Y M, DANYE C, et al. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity [J]. *J Neurochem*, 2003, 85(4): 1026-36.