LncRNA PRR34-AS1调节miR-296-5p/DDI2轴 对结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

陈海洋 王春梅* 石金升 代贺阳 (沧州市人民医院肿瘤内科,沧州 061000)

摘要 该文旨在探究LncRNA PRR34-AS1调节miR-296-5p/DDI2轴对结直肠癌(CRC)细胞增 殖、迁移和侵袭的影响。qRT-PCR法检测CRC细胞与组织中LncRNA PRR34-AS1、miR-296-5p、 DDI2 mRNA水平; 用双荧光素酶实验检测LncRNA PRR34-AS1与miR-296-5p及DDI2与miR-296-5p的靶向关系;将HCT116细胞分为Control组、sh-NC组、sh-PRR34-AS1组、sh-PRR34-AS1+anti-NC组、sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p组,除Control组外,其余各组转染质粒;用克隆法、划痕法 和Transwell法分别检测HCT116细胞增殖、迁移、侵袭能力;免疫印迹和免疫组化法检测相关蛋白 表达水平;裸鼠成瘤实验检测LncRNA PRR34-AS1对CRC移植瘤生长及对miR-296-5p、DDI2表达 的影响。在CRC细胞和组织中, LncRNA PRR34-AS1、DDI2 mRNA表达水平升高, miR-296-5p表 达水平降低(P<0.05)。在线预测显示, LncRNA PRR34-AS1与miR-296-5p、DDI2与miR-296-5p有 靶向关系。与sh-NC组比较, sh-PRR34-AS1组细胞LncRNA PRR34-AS1、DDI2、PCNA、MMP-2、 MMP-9表达下调, miR-296-5p表达上调, 克隆形成数目、划痕愈合率、侵袭细胞数目降低(P<0.05); 与sh-PRR34-AS1+anti-NC组比较, sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p组miR-296-5p表达下调, DDI2、 PCNA、MMP-2、MMP-9表达上调, 克隆形成数目、划痕愈合率、侵袭细胞数目上升(P<0.05)。 与sh-NC组相比, sh-PRR34-AS1组肿瘤体积更小、质量更低, LncRNA PRR34-AS1、DDI2表达下 调,miR-296-5p表达上调(P<0.05)。抑制LncRNA PRR34-AS1可通过靶向miR-296-5p/DDI2轴,抑制 CRC细胞的增殖、迁移、侵袭。

关键词 结直肠癌; LncRNA PRR34-AS1; miR-296-5p; DDI2; 增殖; 迁移; 侵袭

Effects of LncRNA PRR34-AS1 on the Proliferation, Migration, and Invasion of Colorectal Cancer Cells by Regulating the miR-296-5p/*DDI2* Axis

CHEN Haiyang, WANG Chunmei*, SHI Jinsheng, DAI Heyang (Oncology Department of Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, China)

Abstract This study aims to investigate the effect of LncRNA PRR34-AS1 on the proliferation, migration, and invasion of CRC (colorectal cancer) cells by regulating the miR-296-5p/*DDI2* axis. qRT-PCR was used to detect LncRNA PRR34-AS1, miR-296-5p, and *DDI2* mRNA levels in CRC cells and tissues. Dual luciferase assay was applied to detect the targeting relationships between LncRNA PRR34-AS1 and miR-296-5p, and between *DDI2* and miR-296-5p. HCT116 cells were assigned into Control group, sh-NC group, sh-PRR34-AS1 group, sh-PRR34-AS1+anti-NC group, and sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p group. Except for the Control group, all other groups were transfected with plasmids. The proliferation, migration and invasion of HCT116 cells were detected by cloning method, scratch method and Transwell method, respectively. The expression levels of related proteins were detected by Western blot and immunohistochemistry. The tumor formation of nude mice was applied to detect the effect of LncRNA PRR34-AS1 on the growth of CRC transplanted tumors and on the expression of miR-296-5p and DDI2. In CRC cells and tissues, the expression of LncRNA PRR34-AS1 and *DDI2* mRNA increased, while the expression of miR-296-5p decreased (P<0.05). Online prediction showed that LncRNA PRR34-AS1 had a targeted relationship with miR-296-5p, and *DDI2* had a targeted relationship with miR-296-5p. Compared with the sh-NC group, the LncRNA PRR34-AS1, DDI2, PCNA, MMP-2, and MMP-9 in the sh-PRR34-AS1 group were downregulated, while miR-296-5p was upregulated, the number of clones formed, scratch healing rate, and number of invasive cells reduced (P<0.05). Compared with the sh-PRR34-AS1+anti-NC group, the miR-296-5p was down-regulated in the sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p group, DDI2, PCNA, MMP-2, MMP-9 were upregulated, and the number of clones formed, scratch healing rate, and number of invasive cells increased (P<0.05). Compared with the sh-NC group, the sh-PRR34-AS1 group had smaller tumor volume and lower mass, the LncRNA PRR34-AS1 and DDI2 were downregulated, while miR-296-5p was upregulated (P<0.05). Inhibition of LncRNA PRR34-AS1 can target the miR-296-5p/*DDI2* axis to inhibit the proliferation, migration, and invasion of CRC cells.

Keywords colorectal cancer; LncRNA PRR34-AS1; miR-296-5p; DDI2; proliferation; migration; invasion

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的发病率和死 亡率较高。CRC的病因十分复杂,包括遗传和环境 因素。尽管在早期诊断和治疗(包括化疗、免疫疗 法、抗血管生成药物治疗和手术治疗)方面取得了 进展,但许多CRC患者仍然面临肿瘤复发和转移的 高风险^[1]。高复发率和转移率是晚期CRC患者的主 要风险。在过去的几十年中,虽然人们一直在努力 开发针对CRC的新型筛查技术和治疗药物,但仍需 要针对性的治疗方法,从而提高CRC的临床疗效^[2]。 LncRNA是近年来恶性肿瘤机制研究的热点。研究 表明, LncRNA表达失调是CRC等多种恶性肿瘤的 共同特征,它在调控癌症发生发展中发挥不可或缺 的作用^[3]。研究发现, LncRNA PRR34-AS1在肝细 胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中表达上调, 敲 低LncRNA PRR34-AS1可抑制HCC细胞增殖、迁 移、侵袭和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 说明LncRNA PRR34-AS1在HCC 进展的调节中起着重要作用^[4]。但LncRNA PRR34-AS1在CRC中的作用机制尚未明确, 需进一步探究。 miRNA(microRNA)是一组在人类癌症中起关键作 用的小非编码RNA。据报道, LncRNA可能与一些 miRNA结合,海绵化它们的活性,从而调控生物学 行为^[5]。研究发现, miR-296-5p在CRC组织和细胞中 表达下调, Circ 0071589通过海绵miR-296-5p上调 EN2表达,从而促进CRC细胞的恶性表型和血管生 成^[6]。DDI2是一种天冬氨酸蛋白酶,含有逆转录病

毒蛋白酶样 (retrovirus protease-like, RVP)结构域,在 真核生物中高度保守, DDI2广泛表达并与细胞应激 反应有关。然而, DDI2的功能、调控和下游分子机 制在很大程度上是未知的。DDI2通过激活转录因子 核因子红细胞-2相关因子1(nuclear factor erythroid-2-related factor 1, NRF1)调节蛋白酶体亚基^[7]。研究 证实, miR-3607可能通过抑制DDI2从而抑制CRC肿 瘤发生, 可能作为CRC预测和治疗的新靶点^[8]。经生 物信息学分析发现, LncRNA PRR34-AS1与miR-296-5p、DDI2与miR-296-5p之间分别存在结合位点,可 能具有靶向调控关系,但LncRNA PRR34-AS1能否 调控miR-296-5p/DDI2轴对CRC细胞的增殖、迁移、 侵袭行为产生影响需进一步研究,从而为LncRNA PRR34-AS1作为抗CRC的分子靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

BALB/C小鼠购于山东艾莱克生物科技有限公司,许可证号: SCXK(鲁)2022-0001。

人正常结直肠黏膜细胞FHC(货号:HTX1903C) 购于深圳豪地华拓生物科技有限公司;人结直肠癌细 胞HCT116(货号:JLC-G14470)购于江西江蓝纯生物试 剂有限公司;sh-NC、sh-PRR34-AS1、miR-NC、anti-NC、anti-miR-296-5p质粒购于武汉淼灵生物科技公司; LncRNA PRR34-AS1、miR-296-5p、DDI2、GAPDH、 U6引物序列购于镜像绮点(上海)细胞技术有限公司; 双荧光素酶试剂盒(货号: SB-F6075)购于上海圣尔生 物科技有限公司; 兔抗DDI2(货号: CSB-PA732937LA-01HU)、PCNA(货号: CSB-PA11617A0Rb)、MMP-2(货 号: CSB-PA003258)、MMP-9(货号: CSB-PA002676)抗 体购于武汉华美生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 临床标本 经手术收集24例在沧州市人民医院治疗的CRC患者的癌组织及未被癌细胞浸润且距离肿瘤病灶小于2 cm的癌旁组织作为研究对象,液氮保存。本研究符合沧州市人民医院伦理委员会各项要求且通过审批(批号: K2025-079-02),并经患者本人知情同意。

1.2.2 细胞培养及处理 将HCT116与FHC细胞培养48 h,培养环境为37 °C、5% CO₂,提取RNA,以用于检测检测细胞LncRNA PRR34-AS1、miR-296-5p、DDI2 mRNA水平。

随机将HCT116细胞分为Control组、sh-NC组、 sh-PRR34-AS1组、sh-PRR34-AS1+anti-NC组、sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p组,除Control组外,其 他组转染相对应的质粒48 h,以备后续实验使用。

1.2.3 qRT-PCR检测LncRNA PRR34-AS1、miR-296-5p、DDI2 mRNA表达水平 从各组细胞、组织中 用Trizol试剂分别提取RNA, 检测RNA浓度和纯度, 逆转录引物miR-296-5p: 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA GCC GA-3', 以cDNA为模板扩增, 分别 将GAPDH、U6作内参,引物序列如下:LncRNA PRR34-AS1上游引物5'-GAG GCC ATC TTT GGA AAG TAA A-3', 下游引物5'-AAC GAT GTG AGC CGA GCA-3'; miR-296-5p上游引物5'-GTC ACA GCT CGG AT-3', 下游引物5'-GAG AGG CTA GGC GAA GG-3'; U6上游引物5'-TCC GAT CGT GAA GCG TTC-3', 下游引物5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; DDI2 mRNA上游引物5'-GTA CTC TGT GCG GAG GGA CC-3', 下游引物5'-GTA GAC AAT CTC GCT CTC GGC-3'; GAPDH上游引物 5'-AGC CTC CCG CTT CGC TCT CT-3', 下游引 物5'-GCG CCC AAT ACG ACC AAA TCC GT-3'。 PCR反应条件: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s, 60°C退火30 s, 40个循环。用2-44Ct法估算LncRNA PRR34-AS1、miR-296-5p、DDI2 mRNA相对表达 水平。

1.2.4 数据库分析 经Starbase数据库预测,数据库 网址为: https://rnasysu.com/encori/,查找并确定Ln-cRNA PRR34-AS1与miR-296-5p、DDI2与miR-296-5p的结合关系。

1.2.5 双荧光素酶实验 分别构建LncRNA PRR34-AS1、DDI2野生型(PRR34-AS1-WT、DDI2-WT)和 突变型(PRR34-AS1-MUT、DDI2-MUT)载体,将 HCT116细胞接种在细胞培养板(1.2×10⁶个/孔)上, 37 ℃、5% CO₂条件下培养24 h, Lipofectamine 2000 用于将PRR34-AS1-WT、DDI2-WT、PRR34-AS1-MUT、DDI2-MUT分别与miR-NC、miR-296-5p mimics共转染HCT116细胞,48 h后,检测相对荧光素 酶活性。

1.2.6 克隆法检测细胞增殖情况 将各组转染后 HCT116细胞转移至6孔培养板,37°C、5% CO₂ 条件下培养HCT116细胞至出现克隆,PBS洗涤, 加多聚甲醇室温固定30 min,加结晶紫室温染色 10 min,PBS洗涤,显微镜观察、拍照,统计克隆 形成数。

1.2.7 划痕法检测细胞迁移情况 将转染后的 HCT116细胞接种到6孔细胞培养板(1.2×10⁶个/孔) 上,当细胞融合至85%时,用无菌移液器吸头垂直细 胞平面进行划痕,加FBS培养基,37 ℃、5% CO₂条 件下培养至划痕融合。显微镜观察,拍照,统计划痕 愈合率。

1.2.8 Transwell法检测细胞侵袭情况 用Matrigel 包被小室,接种转染的HCT116细胞于小室上室,下室 加20% FBS培养基,37 °C培养24 h,多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1%结晶紫室温染色30 min。显微镜观察,统 计侵袭细胞数目。

1.2.9 Western blot检测蛋白表达情况 提取各组 HCT116细胞总蛋白, 15 min裂解, 4 °C、13 000 ×g 离心15 min, 检测分离得到上清中的蛋白浓度, 取等 量蛋白行 SDS电泳, 分离完成后转PVDF膜, 室温封 闭1 h, 加PCNA、MMP-2、MMP-9一抗(稀释比例 均为1:2 000), 4 °C过夜孵育, 加二抗(1:5 000稀释), 37 °C孵育1.5 h, 化学发光法显色, 将β-actin作为内 参, 分析蛋白相对表达量。

1.2.10 裸鼠成瘤实验 调整HCT116细胞浓度 为1×10⁷/mL,将有sh-NC或sh-PRR34-AS1转染的 HCT116细胞皮下注射于小鼠右前肢腋下。将小 鼠随机分为sh-NC组、sh-PRR34-AS1组,每组6只。 正常环境饲养,自由饮食饮水,35天后处死小鼠, 分离肿瘤并称重,检测瘤组织中LncRNA PRR34-AS1、miR-296-5p表达水平。

1.2.11 免疫组化 检测CRC组织中DDI2蛋白表 达水平。分离裸鼠体内瘤组织,4%多聚甲醛于4°C 固定24 h,脱水后包埋,切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇 (75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇,分别 浸泡1 min)脱水,过氧化氢室温封闭孵育10 min,室 温下加DDI2抗体(稀释比例为1:1 000)孵育1 h, DAB 显色,苏木素复染,封片,显微镜观察。

1.3 统计学分析

利用SPSS 25.0软件分析数据,以(x±s)表示计 量资料,独立样本t检验比较两组间差异,单因素方 差分析比较多组间差异,SNK-q检验比较组间差异。 P<0.05表示差异显著。

2 结果

2.1 LncRNA PRR34-AS1、miR-296-5p、DDI2 mRNA在CRC细胞和组织中的表达情况

与瘤旁组织比较, 瘤组织LncRNA PRR34-

AS1、DDI2 mRNA表达上调, miR-296-5p表达下调 (P<0.05); 与正常细胞相比, HCT116细胞LncRNA PRR34-AS1、DDI2 mRNA表达上调, miR-296-5p表 达下调(P<0.05); 见图1。

2.2 miR-296-5p分别与LncRNA PRR34-AS1、 DDI2的靶向关系验证

预测显示, LncRNA PRR34-AS1与miR-296-5p以及DDI2与miR-296-5p靶向结合。与PRR34-AS1-WT+miR-NC组比较, PRR34-AS1-WT+miR-296-5p mimics组荧光素酶活性下降(P<0.05); 与 DDI2-WT+miR-NC组比较, DDI2-WT+miR-296-5p mimics组荧光素酶活性降低(P<0.05); PRR34-AS1-MUT+miR-NC组与PRR34-AS1-MUT+miR-296-5p mimics组、DDI2-MUT+miR-NC组与DDI2-MUT+miR-296-5p mimics组的荧光素酶活性无显著 差异(P>0.05)(图2)。

2.3 干扰LncRNA PRR34-AS1对HCT116细胞中 DDI2、miR-296-5p表达的影响

与sh-NC组比较, sh-PRR34-AS1组细胞LncRNA PRR34-AS1、DDI2表达下调, miR-296-5p表达上



^{*}P<0.05, 与癌旁组织比较; *P<0.05, 与FHC比较。

*P < 0.05 compared with tissues adjacent to cancer; *P < 0.05 compared with FHC.

图1 LncRNA PRR34-AS1、miR-296-5p、DDI2 mRNA在CRC组织、细胞中的表达情况 Fig.1 Expression of LncRNA PRR34-AS1, miR-296-5p and DDI2 mRNA in CRC tissues and cells



*P<0.05,与PRR34-AS1-WT+miR-NC组比较。#P<0.05,与DDI2-WT+miR-NC组相比。

*P<0.05 compared with PRR34-AS1-WT+miR-NC group. [#]P<0.05 compared with the DDI2-WT+miR-NC group. 图2 LncRNA PRR34-AS1、DDI2分别与miR-296-5p的结合位点以及靶向关系验证

Fig.2 The binding sites of LncRNA PRR34-AS1 and DDI2 to miR-296-5p and targeting relationship verification

调(P<0.05);与sh-PRR34-AS1+anti-NC组比较,sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p组miR-296-5p表达下调,DDI2表达上调(P<0.05);见图3。

2.4 LncRNA PRR34-AS1调控miR-296-5p对CRC 细胞增殖、迁移、侵袭行为的影响

与sh-NC组比较, sh-PRR34-AS1组克隆形成数 目、划痕愈合率、侵袭细胞数目降低(P<0.05); 与 sh-PRR34-AS1+anti-NC组比较, sh-PRR34-AS1+antimiR-296-5p组克隆形成数目、划痕愈合率、侵袭细 胞数目上升(P<0.05); 见图4~图7。

2.5 LncRNA PRR34-AS1调控miR-296-5p对CRC 细胞增殖、迁移、侵袭相关蛋白的影响

与sh-NC组比较, sh-PRR34-AS1组PCNA、MMP-2、MMP-9表达下调(P<0.05); 与sh-PRR34-AS1+anti-NC组比较, sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p组PCNA、MMP-2、MMP-9表达上调(P<0.05); 见图8。

2.6 LncRNA PRR34-AS1对裸鼠移植瘤的影响

与sh-NC组比较, sh-PRR34-AS1组肿瘤体积减 小、质量降低, LncRNA PRR34-AS1、DDI2表达下调, miR-296-5p表达上调(P<0.05); 见图9~图11。

3 讨论

CRC是全球第三大常见恶性肿瘤,也是癌症相关死亡的第二大原因。此外,CRC的发病率和死亡率仍在迅速上升。尽管在筛查、诊断和治疗策略的制定方面取得了很大进展,但CRC患者的5年生存率仍然较低。肿瘤生长和转移是CRC患者(尤其是晚

期CRC患者)死亡的主要原因。近年来, CRC的治疗 取得了长足的进步, 但仍面临许多挑战^[9]。为改善 CRC患者预后并提高临床疗效, 探索CRC肿瘤发生 和进展的机制以及开发有效的治疗方法有重要的临 床意义^[10]。

LncRNA充当miRNA的分子海绵, 竞争性结合 miRNA,从而调控其靶向mRNA的表达水平。该过 程间接调节癌症相关基因的表达。部分LncRNA 可通过直接结合miRNA诱导其降解,进而负向调 控靶基因的表达^[11]。QIN等^[12]研究发现, LncRNA PRR34-AS1在HCC中表达上调,并通过miR-296-5p/E2F2/SOX12轴促进HCC进展, LncRNA PRR34-AS1可能是HCC患者的一个潜在的治疗靶 点。YANG等^[13]研究证实, LncRNA PRR34-AS1 在HCC细胞系中的显著高表达,可促进HCC进展。 本研究中, LncRNA PRR34-AS1在CRC细胞、组织 中表达水平升高,与既往研究LncRNA PRR34-AS1 在HCC、急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)和CRC中的表达趋势相一致。进一步的研 究指出, LncRNA PRR34-AS1通过海绵miR-498调 节线粒体延伸因子2(mitochondrial elongation factor 2, MIEF2)表达, 促进线粒体分裂, 介导糖酵解 重编程,最终驱动HCC细胞生长和侵袭;与此同 时,体内小鼠实验验证了以上结果[14]。还有临床研 究报道, LncRNA PRR34-AS1的表达水平异常与 AML的不良预后有关^[15]。本研究中, 沉默LncRNA PRR34-AS1后克隆形成数、划痕愈合率、侵袭细



A: Control组; B: sh-NC组; C: sh-PRR34-AS1组; D: sh-PRR34-AS1+anti-NC组; E: sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p组。*P<0.05, 与sh-NC组比较; *P<0.05, 与sh-PRR34-AS1+anti-NC组比较。

A: Control group; B: sh-NC group; C: sh-PRR34-AS1 group; D: sh-PRR34-AS1+anti-NC group; E: sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p group. *P < 0.05 compared with sh-NC group; #P < 0.05 compared with sh-PRR34-AS1+anti-NC group.

图3 各组细胞中LncRNA PRR34-AS1、miR-296-5p、DDI2表达水平比较

Fig.3 Comparison of the expression levels of LncRNA PRR34-AS1, miR-296-5p and DDI2 in each group of cells



sh-PRR34-AS1 +anti-NC sh-PRR34-AS1+anti-miR -296-5p





图4 各组HCT116细胞增殖情况 Fig.4 Proliferation of HCT116 cells in each group



图5 各组HCT116细胞划痕愈合情况 Fig.5 Wound healing of HCT116 cells in each group

胞数目下降,并且PCNA、MMP-2、MMP-9表达 水平降低,说明抑制LncRNA PRR34-AS1表达可以 抑制CRC细胞增殖、侵袭与迁移;在本研究中,LncRNA PRR34-AS1可能是通过海绵miR-296-5p,进 一步调节线粒体分裂参与糖酵解,从而调控CRC细 胞增殖、侵袭、迁移的。牟映运等^[16]研究证明了 这一点,雷公藤多苷通过降低LncRNA PRR34-AS1 表达水平抑制CRC细胞增殖、促进CRC细胞凋 亡。综合以上研究以及本研究结果,推测LncRNA PRR34-AS1可能是治疗CRC的潜在靶点。

miRNA被定义为一类内源性单链非编码 RNA。miRNA通过结合靶标mRNA的3'-非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR),充当基因表达的关键 调节分子,从而抑制mRNA的翻译或诱导mRNA降解。 最近的研究也证明了miRNA在人类癌症进展中的重 要作用。研究指出,许多miRNA在CRC组织中异位表 达,并参与CRC的发生和发展^[17]。miRNA通过充当癌 基因或抑癌基因来调节癌症的进展。尽管先前的报





*P<0.05, 与sh-NC组比较; *P<0.05, 与sh-PRR34-AS1+anti-NC组比较。</p>
*P<0.05 compared with sh-NC group; *P<0.05 compared with sh-PRR34-AS1+anti-NC group.</p>
图7 比较各组CRC细胞增殖、迁移、侵袭能力



道已经证明了miR-296-5p在癌症中的肿瘤抑制作用, 但miR-296-5p在CRC中的功能和分子机制在很大程 度上仍是未知的^[18]。HAN等^[19]研究报道,miR-296-5p 在CRC组织和细胞中低表达,ALO(Aloperine)通过调 节miR-296-5p/STAT3轴抑制CRC细胞增殖、转移和 EMT,促进细胞凋亡。LI等^[20]证实,过表达miR-296-5p 通过下调MSI1抑制肿瘤发生并增强CRC放射敏感性, 外泌体circ_IFT80通过调节miR-296-5p/MSI1轴促进肿 瘤发生并降低CRC放射敏感性,这可能为治疗CRC提 供新的途径。本研究中,miR-296-5p在CRC细胞、组 织中表达量降低,与文献[19]和[20]结果趋势一致,过 表达LncRNA PRR34-AS1能够抑制miR-296-5p表达, 从而促进CRC细胞增殖、迁移、侵袭。通过双荧光 素酶实验验证发现,LncRNA PRR34-AS1与miR-296-



A: Control组; B: sh-NC组; C: sh-PRR34-AS1组; D: sh-PRR34-AS1+anti-NC组; E: sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p组。*P<0.05, 与sh-NC组比较; *P<0.05, 与sh-PRR34-AS1+anti-NC组比较。

A: Control group; B: sh-NC group; C: sh-PRR34-AS1 group; D: sh-PRR34-AS1+anti-NC group; E: sh-PRR34-AS1+anti-miR-296-5p group. *P < 0.05 compared with sh-NC group; *P < 0.05 compared with sh-PRR34-AS1+anti-NC group.





*P<0.05, 与sh-NC组比较。 *P<0.05 compared with sh-NC group.



5p之间有靶向关系,提示LncRNA PRR34-AS1可能通 过靶向调控miR-296-5p进一步调节CRC细胞的生物 学行为。 DDI2是一种DNA损伤诱导的蛋白质同源物。 DDI2被鉴定为一种切割和激活NRF1的蛋白酶,DDI2 在NRF1通路中有重要作用,DDI2缺失可以通过抑



图10 检测移植瘤组织中DDI2表达情况 Fig.10 Detection of DDI2 expression in transplanted tumor tissues



图11 LncRNA PRR34-AS1对移植瘤生长及LncRNA PRR34-AS1、miR-296-5p、DDI2表达的影响 Fig.11 Effect of LncRNA PRR34-AS1 on the growth of transplanted tumor and the expression of LncRNA PRR34-AS1, miR-296-5p and DDI2

制NRF1介导的反弹反应使乳腺癌细胞对卡非佐米 (carfilzomib, CFZ)诱导的细胞凋亡敏感, DDI2最近被 发现作为一种致癌基因,具有促癌作用[21]。研究发现, 沉默 DDI2 表达可增加 CRC 细胞对 MEK1/2 抑制剂和 PARP1/2抑制剂的药物敏感性,同时对CRC细胞的增 殖能力进行抑制^[22]。另有研究证明, DDI2在CRC的早 期阶段上调, DDI2可能在CRC的致癌中起至关重要的 作用,并可能作为CRC的有前途的治疗靶点[23]。本研 究发现, DDI2与miR-296-5p之间有靶向关系, 双荧光 素酶实验对这一结果进行了验证。本研究发现, DDI2 mRNA在CRC组织和CRC细胞中表达水平上升,与既 往研究报道相同。推测在CRC中, LncRNA PRR34-AS1可能抑制miR-296-5p表达,从而上调DDI2表达 参与CRC的发生发展。小鼠体内实验发现,沉默LncRNA PRR34-AS1表达后,移植瘤的质量、体积均呈 下降趋势,同时移植瘤中LncRNA PRR34-AS1、DDI2 表达下调, miR-296-5p表达上调, 说明抑制 LncRNA PRR34-AS1表达可上调miR-296-5p表达,抑制DDI2表达,进而对CRC细胞的增殖、迁移、侵袭行为进行抑制。

综上,在CRC中沉默LncRNA PRR34-AS1能够 抑制CRC细胞的恶性行为,具体机制可能与LncRNA PRR34-AS1靶向调控miR-296-5p/DDI2轴有关,LncRNA PRR34-AS1可能是治疗CRC的潜在靶点。但本 研究仅通过细胞模型和裸鼠移植瘤实验进行初步探 索,后续仍需进一步的体内实验深入探究。

参考文献 (References)

- BORZACCHIELLO L, VEGLIA TRANCHESE R, GRILLO R, et al. S-adenosylmethionine inhibits colorectal cancer cell migration through mirna-mediated targeting of notch signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(14): 7673-92.
- [2] 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): 117-27.
- [3] LIN X, ZHUANG S, CHEN X, et al. LncRNA ITGB8-AS1 func-

tions as a ceRNA to promote colorectal cancer growth and migration through integrin-mediated focal adhesion signaling [J]. Mol Ther, 2022, 30(2): 688-702.

- [4] ZHANG Z, ZHOU Y, JIA Y, et al. PRR34-AS1 promotes exosome secretion of VEGF and TGF-β via recruiting DDX3X to stabilize Rab27a mRNA in hepatocellular carcinoma [J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 491-505.
- [5] ZHOU Y, SHAO Y, HU W, et al. A novel long noncoding RNA SP100-AS1 induces radioresistance of colorectal cancer via sponging miR-622 and stabilizing ATG3 [J]. Cell Death Differ, 2023, 30(1): 111-24.
- [6] TANG S, KONG P, LI Q, et al. Circ_0071589 contributes to growth, angiogenesis, and metastasis of colorectal cancer through regulating miR-296-5p/EN2 axis [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2023, 37(12): e23509-24.
- [7] RIBEIRO S T, DE GASSART A, BETTIGOLE S, et al. The protease DDI2 regulates NRF1 activation in response to cadmium toxicity [J]. iScience, 2022, 25(10): 105227-44.
- [8] LEI L, ZHAO X, LIU S, et al. MicroRNA-3607 inhibits the tumorigenesis of colorectal cancer by targeting DDI2 and regulating the DNA damage repair pathway [J]. Apoptosis, 2019, 24(7/8): 662-72.
- [9] MA Y, LI Y, TANG Y, et al. Linc00174 facilitates proliferation and migration of colorectal cancer cells via miR-3127-5p/E2F7 axis [J]. J Microbiol Biotechnol, 2021, 31(8): 1098-108.
- [10] YAO B, ZHANG Q, YANG Z, et al. CircEZH2/miR-133b/IGF2BP2 aggravates colorectal cancer progression via enhancing the stability of m6A-modified CREB1 mRNA [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 140-64.
- [11] ALSHAHRANI S H, AL-HADEITHI Z S M, ALMALKI S G, et al. LncRNA-miRNA interaction is involved in colorectal cancer pathogenesis by modulating diverse signaling pathways [J]. Pathol Res Pract, 2023, 251(1): 154898-915.
- [12] QIN M, MENG Y, LUO C, et al. lncRNA PRR34-AS1 promotes HCC development via modulating Wnt/β-catenin pathway by absorbing miR-296-5p and upregulating E2F2 and SOX12 [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 25(1): 37-52.
- [13] YANG X, SONG D, ZHANG J, et al. PRR34-AS1 sponges miR-

498 to facilitate TOMM20 and ITGA6 mediated tumor progression in HCC [J]. Exp Mol Pathol, 2021, 120(1): 104620-40.

- [14] YANG X, FENG H, KIM J, et al. PRR34-AS1 promotes mitochondrial division and glycolytic reprogramming in hepatocellular carcinoma cells through upregulation of MIEF2 [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2024, 56(11): 1604-17.
- [15] NAN FY, GU Y, XU Z J, et al. Abnormal expression and methylation of PRR34-AS1 are associated with adverse outcomes in acute myeloid leukemia [J]. Cancer Med, 2021, 10(15): 5283-96.
- [16] 牟映运,舒涛.雷公藤多苷通过调控 lncRNA PRR34-AS1对 结直肠癌细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 中药材 (MU Y Y, SHU T. The effect of tripterygium glycosides on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells by regulating lncRNA PRR34-AS1 [J]. Traditional Chinese Medicinal Herbs), 2023, 46(4): 994-8.
- [17] XIONG J, ZHANG L, TANG R, et al. MicroRNA-301b-3p facilitates cell proliferation and migration in colorectal cancer by targeting HOXB1 [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 5839-49.
- [18] WANG P, SUN Y, YANG Y, et al. Circ_0067835 knockdown enhances the radiosensitivity of colorectal cancer by miR-296-5p/IGF1R axis [J]. Onco Targets Ther, 2021, 14(1): 491-502.
- [19] HAN W, KONG D, LU Q, et al. Aloperine inhibits colorectal cancer cell proliferation and metastasis progress via regulating miR-296-5p/STAT3 axis [J]. Tissue Cell, 2022, 74(1): 101706-21.
- [20] LI L, JIANG Z, ZOU X, et al. Exosomal circ_IFT80 enhances tumorigenesis and suppresses radiosensitivity in colorectal cancer by regulating miR-296-5p/MSI1 axis [J]. Cancer Manag Res, 2021, 13(1): 1929-41.
- [21] NORTHROP A, VANGALA J R, FEYGIN A, et al. Disabling the protease DDI2 attenuates the transcriptional activity of NRF1 and potentiates proteasome inhibitor cytotoxicity [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(1): 327-41.
- [22] 曹庆. DDI2通过MAPK通路调控结直肠癌细胞的耐药性[D]. 西安: 西北大学, 2021.
- [23] LEI L, CAO Q, AN G, et al. DDI2 promotes tumor metastasis and resists antineoplastic drugs-induced apoptosis in colorectal cancer [J]. Apoptosis, 2023, 28(3/4): 458-70.