doi:10.11659/jjssx.10E024042

·基础研究·

miR-205对结肠癌细胞增殖、迁移和上皮间质转化的调控作用研究

买尔旦·赛力木[1],金 钟[1],阿里旦·艾尔肯[2],柯于必[1] (1.新疆医科大学第一附属医院综合外科,新疆 乌鲁木齐 830054;2.新疆医科大学第一附属医院全科医学科,新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘 要] **目的** 探讨microRNA-205(miR-205)在结肠癌中的表达及其对结肠癌细胞增殖、迁移和上皮间质转化(EMT)的调控作用。**方法** 用qRT-PCR检测结肠癌组织、癌旁组织及结肠癌细胞HT-29中miR-205的表达水平。将HT-29细胞分为3组,转染miR-205模拟物的细胞为miR-205模拟物组,转染miR-205抑制物的细胞为miR-205抑制物组,仅用Lipo2000转染试剂处理的细胞作为Buffer组。采用CCK-8实验和EDU实验检测各组细胞的增殖活力;Transwell实验检测细胞的迁移能力;Western blot检测各组细胞EMT相关蛋白N-cadherin、Vimentin和E-cadherin的表达。**结果** 与癌旁组织相比,结肠癌组织中miR-205的相对表达水平显著下调($P<0.05$)。与Buffer组相比,miR-205模拟物组细胞中miR-205的相对表达水平上调,miR-205抑制物组细胞中miR-205的相对表达水平下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。过表达miR-205显著抑制结肠癌细胞的增殖活力及迁移能力($P<0.05$),而抑制miR-205则促进结肠癌细胞的增殖活力及迁移能力($P<0.05$)。与Buffer组相比,miR-205模拟物组细胞中N-cadherin、Vimentin下调,E-cadherin上调,而miR-205抑制物组细胞中N-cadherin、Vimentin上调,E-cadherin下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** miR-205在结肠癌组织中的表达显著降低,并通过下调结肠癌细胞的增殖、迁移和EMT来发挥其抑癌作用。

[关键词] miR-205;结肠癌;细胞增殖;细胞迁移;上皮间质转化

[中图分类号] R735.35 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-10-13

Regulatory effects of miR-205 on proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells

Maierdan·Sailimu[1], JIN Zhong[1], Alidan·Aierlken[2], KE Yu-bi[1] (1.Department of Comprehensive Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830054, China; 2.Department of General Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830054, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNA-205 (miR-205) in colon cancer and its regulatory effects on the proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of colon cancer cells. **Methods** The expression levels of miR-205 in colon cancer tissues, adjacent normal tissues, and colon cancer cell HT-29 were detected by qRT-PCR. HT-29 cells were divided into three groups, cells transfected with miR-205 mimics were named the miR-205 mimic group, cells transfected with miR-205 inhibitors were named the miR-205 inhibitor group, and cells treated only with Lipo2000 transfection reagent were named the Buffer group. The proliferative activity of cells in each group was detected by CCK-8 assay and EDU assay; the migration invasion ability of cells was detected by Transwell assay; the expressions of EMT-related proteins N-cadherin, Vimentin, and E-cadherin in each group were detected by Western blot. **Results** Compared with adjacent normal tissues, the relative expression level of miR-205 in colon cancer tissues was significantly down-regulated ($P<0.05$). Compared with the Buffer group, the relative expression level of miR-205 in the cells of the miR-205 mimic group was up-regulated, while that in the miR-205 inhibitor group was down-regulated, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Overexpression of miR-205 significantly inhibited the proliferation activity and migration ability of colon cancer cells ($P<0.05$), while inhibition of miR-205 promoted the proliferation activity and migration ability of colon cancer cells ($P<0.05$). Compared with the Buffer group, the levels of N-cadherin and Vimentin were down-regulated and the level of E-cadherin was up-regulated in the cells of the miR-205 mimic group, while the levels of N-cadherin and Vimentin were up-regulated and the level of E-cadherin was down-regulated in the cells of the miR-205 inhibitor group, the differences were all statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of miR-205 in colon cancer tissues is significantly decreased, and miR-205 exerts its tumor-suppressive effects by downregulating the proliferation, migration, and EMT of colon cancer cells.

Keywords: miR-205; colon cancer; cell proliferation; cell migration; epithelial-mesenchymal transition

结肠癌是一种常见且致命的消化系统恶性肿瘤,全球每年有数百万新增病例[1-2]。尽管随着医疗技术的发展,结肠癌的早期诊断和治疗方法有所进步,但其发病率和病死率仍然居高不下[3]。术后复发和转移是导致结肠癌患者预后不佳的主要原因,这也成为了研究和治疗结肠癌的重要难题[4]。目前,传统的治疗

[基金项目] 新医大一附院"青年科研起航"专项基金(2022YFY-QKQN-15)

方式包括手术切除、化疗和放疗,但这些方法在晚期结肠癌中的效果有限[4]。多数患者在接受标准治疗后,癌症仍会复发和扩散[5]。因此,了解其发病机制和寻找更有效的治疗靶点至关重要。研究发现,结肠癌的发生发展涉及多种基因突变和分子通路改变[6],但其具体的分子机制尚未完全阐明。此外,如何有效地控制癌细胞的增殖、迁移和侵袭也是当前研究面临的重大挑战。

微小RNA(microRNA,miRNA)是一类20~24个核苷酸长度的小非编码RNA,广泛参与基因的表达调控[7]。近年来,越来越多的研究表明,miRNA在癌症的发生、发展和转移过程中扮演了关键角色[8]。尤其是在结肠癌中,miRNA的异常表达与癌症的进展密切相关[9]。miRNA通过与目标mRNA结合,抑制其翻译或促进其降解,从而调控细胞增殖、分化、凋亡等重要生命过程[10]。因此,miRNA被认为是结肠癌潜在的诊断标志物和治疗靶点。其中,miR-205作为一种重要的miRNA,在多种癌症类型中表现出不同的功能[11]。有研究报道,miR-205在膀胱癌和胃癌中具有抑癌作用[12-13],而也有报道认为其在肺癌中表现为促癌作用[14]。这种双向功能使得miR-205在结肠癌中的具体作用尚不明确,因此,进一步研究miR-205在结肠癌中的表达及其功能尤为重要。基于此,本研究探讨miR-205在结肠癌中的表达及其对结肠癌细胞增殖、迁移和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)的调控作用,以期为改善结肠癌患者的预后提供新的思路和途径。

1 材料与方法

1.1 材料

miR-205模拟物和抑制物购于上海吉玛公司;HT-29结肠癌细胞株购于上海细胞库;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8,CCK-8)购于日本Dojindo公司;5-乙炔基-2′-脱氧尿苷(5-Ethynyl-2′-deoxyuridine,EDU)染色试剂盒购于江苏凯杰公司;Transwell小室购于美国Corning公司;实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)试剂购于德国Qiagen公司;N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)抗体购于美国Santa Cruz公司。细胞培养基、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、青霉素和链霉素均购于美国Gibco公司。Lipo2000转染试剂购于美国Invitrogen公司。

1.2 临床组织样本

收集2022年我院10例结肠癌患者的新鲜结肠癌组织及其癌旁组织,所有标本均仅供本次试验研究。所有患者均是首次发现大肠肿物,通过检查确诊为肠癌。患者年龄45~70岁,男女比例为6∶4。所有获取的组织样本在手术后立即冷冻并储存于液氮中,直至RNA提取。本研究已获得我院伦理委员会的批准(批准号:20210411-45),患者及家属对本研究知情同意。

1.3 方法

1.3.1 HT-29细胞的培养 将HT-29细胞置于含10%FBS、100 U/mL青霉素及100 μg/mL链霉素的RPMI-1640培养基中,于37 ℃、5%CO_2湿润环境的培养箱中培养。培养期间,每2~3 d更换一次培养基,当细胞汇合度为80%~90%时,用0.25%胰蛋白酶进行消化传代继续培养。将生长至对数期的细胞用于后续研究。

1.3.2 miR-205模拟物和抑制物转染和细胞的分组 将HT-29细胞以1×10^5个/孔的密度接种于6孔板中,待汇合度为60%~70%时,进行转染。将100 nmol/L的miR-205模拟物或抑制物用Lipo2000转染试剂按照其操作说明进行转染。转染后6 h更换新鲜培养基,48 h后进行后续实验。其中,用miR-205模拟物转染的细胞命名为miR-205模拟物组;用miR-205抑制物转染的细胞命名为miR-205抑制物组;仅用Lipo2000转染试剂处理的细胞作为对照,命名为Buffer组。

1.3.3 qRT-PCR法检测miR-205表达 使用TRIzol试剂(美国Invitrogen公司)从组织和细胞中提取总RNA。RNA质量经NanoDrop2000(美国赛默飞公司)检测,A260/A280比值为1.8~2.0。然后,用反转录试剂(美国QIAGEN公司)将1 μg RNA反转录为cDNA。qRT-PCR使用SYBR Green Master Mix(美国QIAGEN公司),引物序列:miR-205正向5′-GGACCCCACATGAGGAAAGG-3′,反向5′-TCTGAAGAAGCACGCACACT-3′,U6作为内参。PCR反应条件:95 ℃预变性10 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,共循环40次。

1.3.4 CCK-8检测细胞增殖情况 将HT-29细胞转染后以5×10^3个/孔的密度接种于96孔板中,每孔加入100 μL含10%FBS的RPMI-1640培养基,孵育12 h后,每孔加入10 μL CCK-8溶液,继续孵育2 h。在450 nm处使用酶标仪测定每个孔的光密度(optical density,OD)。

1.3.5 EDU染色实验 按照EDU染色试剂盒(上海凯杰公司)说明书进行操作。将转染后的HT-29细

胞用10 μmol/L EDU标记4 h,4%多聚甲醛固定。随后透化细胞,并依次加入Apollo反应溶液和Hoechst 33342溶液,对EDU阳性细胞(红色荧光)和细胞核(蓝色荧光)进行染色。最后,用荧光显微镜观察记录,并统计红色荧光细胞数量。

1.3.6 Transwell迁移实验 Transwell小室上层加入100 μL含0.2%FBS的RPMI-1640培养基,将转染后的HT-29细胞悬液(5×10^4个细胞)加入其中。下层加入600 μL含20%FBS的培养基。培养小室置于37 ℃、5%CO_2环境中孵育24 h。染色前用PBS洗涤后,用95%乙醇固定并用0.1%结晶紫染色20 min。在显微镜下选择5个视野计算穿过膜的细胞数目。

1.3.7 Western blot检测蛋白表达 裂解HT-29细胞后,用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)试剂盒(美国赛默飞公司)测定蛋白浓度。从每个样品中取30 μg蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE),随后转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜(美国Millipore公司)。用5%脱脂奶粉封闭1 h,然后用N-cadherin(1∶1 000)、Vimentin(1∶1 000)、E-cadherin(1∶1 000)和内参GAPDH(1∶10 000)抗体孵育过夜。二抗用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗兔抗体,稀释度为1∶3 000。信号通过增强化学发光法(enhanced chemiluminescence,ECL)试剂盒(美国赛默飞公司)显影,图像用ImageJ软件分析。

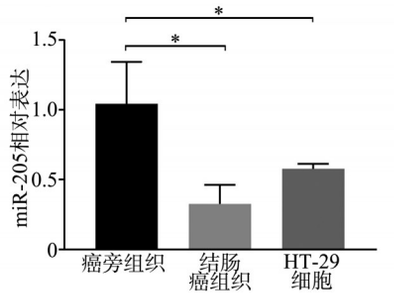
1.4 统计学分析

所有数据使用SPSS 22.0统计学软件进行分析。所有数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析,并用*LSD-t*法进行两两比较,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-205在结肠癌中的表达

与癌旁组织相比,结肠癌组织及HT-29细胞中miR-205的相对表达水平显著下调,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图1。

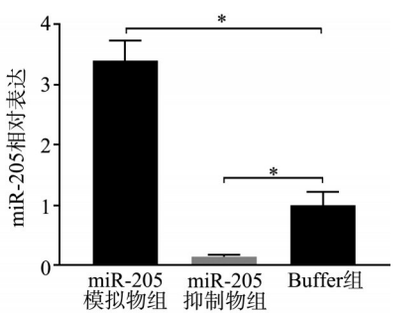


*:$P<0.05$

图1 组织和细胞中miR-205的表达

2.2 miR-205模拟物和抑制物对miR-205表达的影响

与Buffer组相比,miR-205模拟物组结肠癌细胞中miR-205的相对表达水平上调,miR-205抑制物组结肠癌细胞中miR-205的相对表达水平下调,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图2。



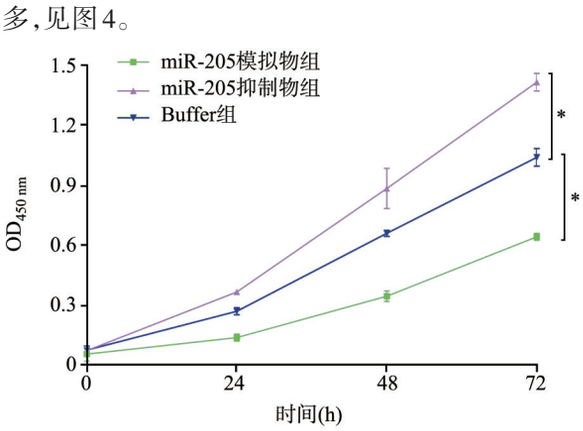
*:$P<0.05$

图2 各组结肠癌细胞中miR-205的表达

2.3 miR-205调节结肠癌细胞的增殖

CCK-8实验结果显示,与Buffer组相比,miR-205模拟物组细胞的增殖活力($OD_{450\ nm}$)显著下调($P<0.05$),而miR-205抑制物组细胞的增殖活力($OD_{450\ nm}$)显著上调($P<0.05$),见图3。

EDU实验结果显示,与Buffer组相比,miR-205模拟物组结肠癌细胞(红色荧光)的数目明显减少,miR-205抑制物组结肠癌细胞(红色荧光)的数目明显增多,见图4。



*:$P<0.05$

图3 各组结肠癌细胞的增殖活力

2.4 miR-205调节结肠癌细胞的迁移

与Buffer组相比,miR-205模拟物组结肠癌细胞(结晶紫染色)迁移数明显减少,miR-205抑制物组结肠癌细胞(结晶紫染色)迁移数明显增多,见图5。

2.5 miR-205调节结肠癌细胞中EMT相关蛋白的表达

与Buffer组相比，miR-205模拟物组细胞中N-cadherin、Vimentin的表达减少，E-cadherin的表达增加，而miR-205抑制物组细胞中N-cadherin、Vimentin的表达增加，E-cadherin的表达减少，差异均有统计学意义（$P<0.05$），见图6。

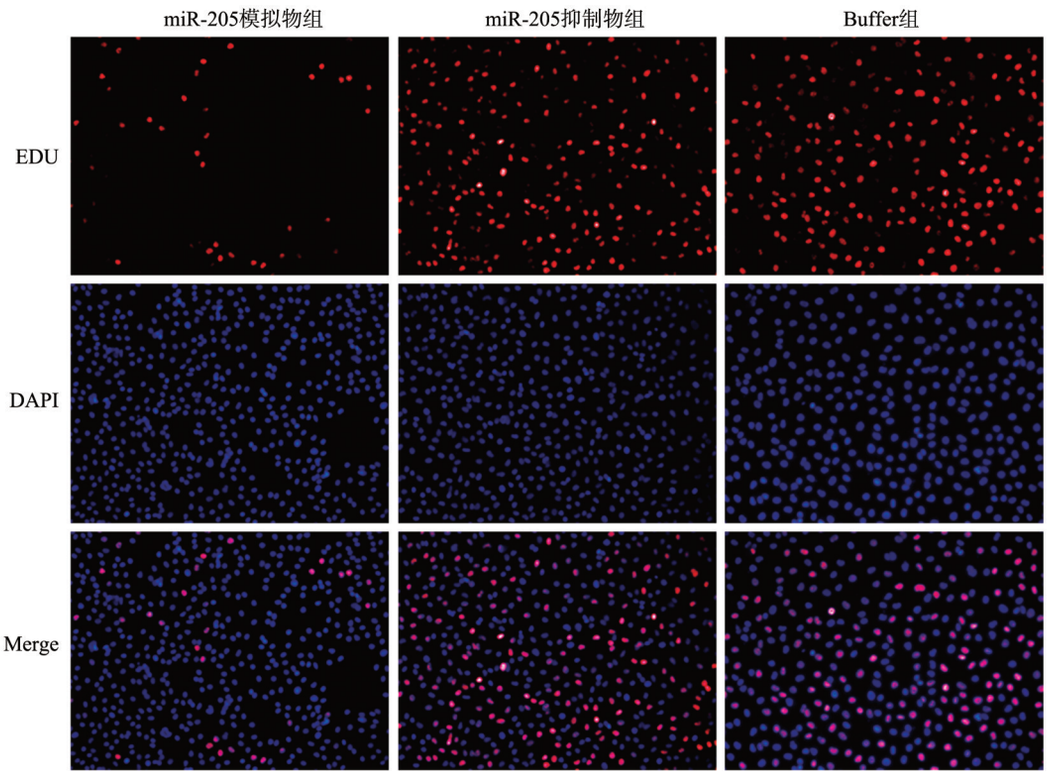


图4 EDU实验检测结肠癌细胞的增殖活力（×200）

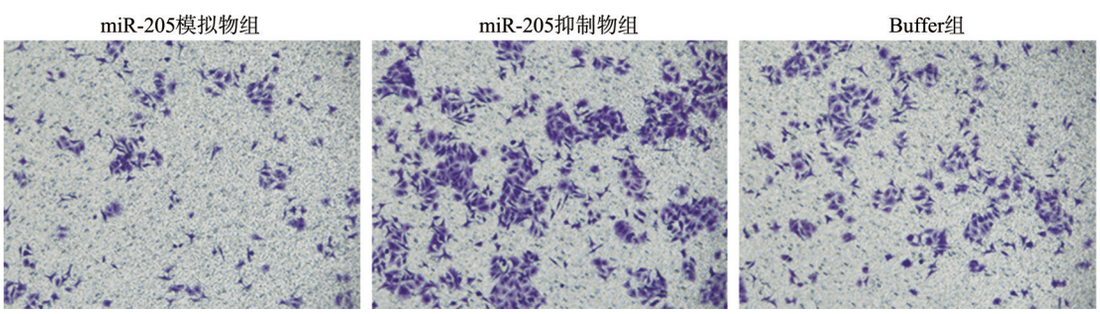
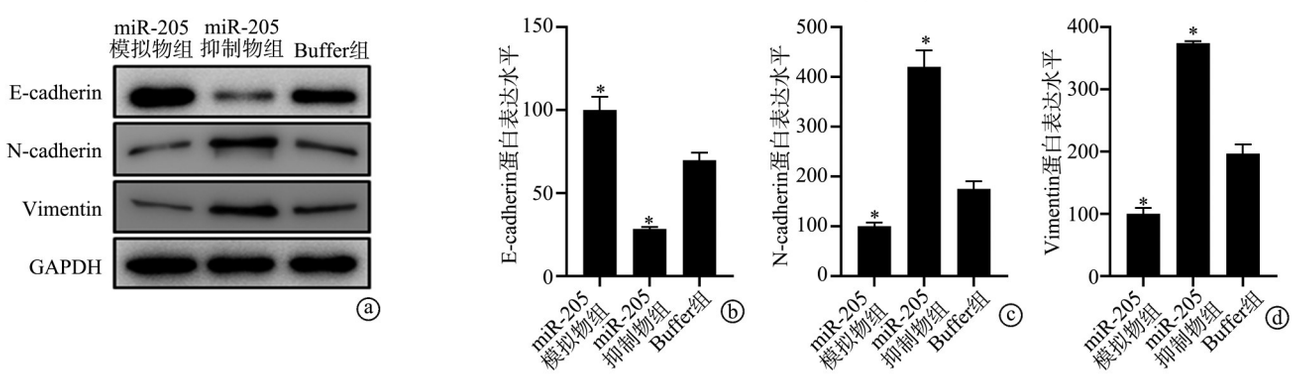


图5 Transwell实验检测结肠癌细胞的迁移能力（×200）



a：免疫印迹蛋白条带；b：E-cadherin蛋白表达；c：N-cadherin蛋白表达；d：Vimentin蛋白表达 *：与Buffer组比较，$P<0.05$

图6 Western blot检测各组细胞E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达

3 讨论

miRNA在多种消化道肿瘤,包括食管癌、胃癌和结肠癌中都扮演着关键角色[7-9,15]。有研究表明,miR-205在胃癌中具有抑癌作用,通过下调相关信号通路降低癌细胞的增殖和迁移能力[13];也有研究显示,miR-205可促进肺癌细胞的增殖和转移[11,14]。因此,其在不同癌症类型中的差异性表达以及作用机制成为研究的热点。

既往大量文献报道miR-205在多种消化道肿瘤组织中表达下调,并在食管腺癌和胃癌中扮演了抑癌基因的角色,表明miR-205可能是一种重要的消化道肿瘤标志物[16-17]。有研究显示,miR-205在胃癌组织或食管癌组织中的表达显著低于正常黏膜组织[13,17]。本研究通过qRT-PCR检测发现,与癌旁组织相比,结肠癌组织中miR-205的表达显著下调,与上述研究一致。

在许多癌症类型中,EMT被认为是肿瘤细胞从原发部位迁移至其他部位的关键步骤[18]。在EMT过程中,细胞间黏附分子的减少和细胞骨架重塑导致上皮细胞获得间质特性,从而增强侵袭和迁移能力[19]。N-cadherin、Vimentin和E-cadherin是典型的EMT标志物,其中N-cadherin是间质细胞的标志物,而E-cadherin则是上皮细胞的标志物[20]。本研究结果显示,miR-205过表达能显著下调N-cadherin和Vimentin,上调E-cadherin,表明miR-205可以通过抑制EMT过程来降低结肠癌细胞的侵袭性;而miR-205抑制物组细胞中的EMT标志物变化则支持了miR-205对EMT过程的负调控作用。miR-205通过调节EMT相关蛋白的表达影响结肠癌细胞的迁移和侵袭能力。本研究中CCK-8和EDU实验显示,miR-205过表达显著抑制结肠癌细胞的增殖活力,而抑制miR-205则促进了细胞增殖活力;Transwell迁移实验结果显示,过表达miR-205显著减少了结肠癌细胞迁移数,而抑制miR-205则增加了结肠癌细胞迁移数。这些结果表明,miR-205通过抑制EMT,限制结肠癌细胞的迁移和侵袭,从而发挥其抑癌作用。

本研究证实了miR-205通过调控EMT标志物(E-cadherin、N-cadherin、Vimentin)抑制结肠癌细胞增殖与迁移,然而其内在调控机制尚无统一定论。Vosgha等[21]认为miR-205对EMT和E-cadherin的调控机制与其靶向ZEB1/2有关,miR-205可通过抑制ZEB1/2解除对E-cadherin的转录抑制。而Fan等[22]则认为在结肠癌细胞中,miR-205对E-cadherin、N-cadherin、Vimentin的调控是通过靶向小鼠双分钟4蛋白实现的[22]。因此,未来需进一步验证miR-205与E-cadherin、N-cadherin、Vimentin的直接或间接互作关系,以阐明其在结肠癌中的多维度调控网络。

然而本研究仍存在一些局限性。首先,本研究主要利用体外细胞模型进行实验,缺乏在体实验的数据支持,因此无法完全反映miR-205在体内的调控作用。其次,本研究虽然探讨了miR-205对EMT相关蛋白表达的调控作用,但尚未深入研究其具体的分子机制。未来的研究应扩大样本量,并结合体内实验进一步验证这些结果,以期更全面、准确地理解miR-205的作用机制。

综上所述,miR-205在结肠癌组织中表达显著降低,并通过下调N-cadherin和Vimentin以及上调E-cadherin的表达,抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭能力,从而抑制其恶性行为。本研究揭示了miR-205可能作为结肠癌抑癌基因的潜力。未来,通过开发以miR-205为靶点的治疗策略,有望为结肠癌患者提供新的治疗选择。

[参考文献]

[1] Sánchez-Guillén L, Arroyo A. Immunonutrition in patients with colon cancer[J]. Immunotherapy, 2020, 12(1): 5-8. doi: 10.2217/imt-2019-0179.

[2] Chen H, Luo J, Guo J. Development and validation of a five-immune gene prognostic risk model in colon cancer[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1):395. doi:10.1186/s12885-020-06799-0.

[3] Yaghoubi A, Khazaei M, Avan A, et al. The bacterial instrument as a promising therapy for colon cancer[J]. Int J Colorectal Dis, 2020, 35(4):595-606. doi:10.1007/s00384-020-03535-9.

[4] Khan FA, Albalawi R, Pottoo FH. Trends in targeted delivery of nanomaterials in colon cancer diagnosis and treatment[J]. Med Res Rev, 2022, 42(1):227-258. doi:10.1002/med.21809.

[5] Sugarbaker PH, Jelinek JS. The radiologist's role in the multidisciplinary team for patients with colon cancer peritoneal metastases[J]. Surg Oncol, 2022, 40:101690. doi:10.1016/j.suronc.2021.101690.

[6] Wang T, Zhang Y, Taaffe DR, et al. Protective effects of physical activity in colon cancer and underlying mechanisms: a review of epidemiological and biological evidence[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2022, 170:103578. doi:10.1016/j.critrevonc.2022.103578.

[7] Han L, Chen S, Luan Z, et al. Immune function of colon cancer associated miRNA and target genes[J]. Front Immunol, 2023, 14:1203070. doi:10.3389/fimmu.2023.1203070.

[8] Kanth P, Hazel MW, Boucher KM, et al. Small RNA sequencing of sessile serrated polyps identifies microRNA profile associated with colon cancer[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2019, 58(1):23-33. doi:10.1002/gcc.22686.

[9] Wang J, Chen X, Xie C, et al. MicroRNA miR-29a inhibits colon cancer progression by downregulating B7-H3 expression: potential molecular targets for colon cancer therapy[J]. Mol Biotechnol, 2021, 63(9):849-861. doi:10.1007/s12033-021-00348-1.

[10] Shi M, Tian P, Liu Z, et al. MicroRNA-27a targets Sfrp1 to induce renal fibrosis in diabetic nephropathy by activating Wnt/β-Catenin signalling[J]. Biosci Rep, 2020, 40(6):BSR20192794. doi:10.1042/BSR20192794.