临床研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003609

探寻miR-200a-3p作为结直肠癌的诊断及预后生物标志物的潜在价值

刘洁琼[1]，姚雅俪[2]，曹永清[1]，隋　倩[1]，黄　芳[1]，李　科[1]
（1.长沙市第一医院/中南大学湘雅医学院附属长沙医院血液肿瘤科，长沙　410005；
2.长沙市第一医院中南大学湘雅医学院附属长沙医院妇科，长沙　410005）

【摘　要】目的：阐明 miR-200a-3p 及下游靶基因程序性细胞死亡 4（programmed cell death 4，PDCD4）在结直肠癌（colorectal cancer，CRC）诊断及预后的潜在价值。**方法：**从 2017 年 1 月至 2019 年 9 月在长沙市第一医院接受根治性切除术或姑息性切除术的 CRC 患者中收集包含 120 对 CRC 组织和相应的癌旁正常组织的队列。另 1 个队列包括 50 例诊断为 CRC 的患者；2019 年 1 月至 2020 年 1 月从这些患者手术前后收集术前和术后血清样本。RT-qPCR 检测 CRC 组织和细胞系中 miR-200a-3p 的表达。将靶向 miR-200a-3p（si-miR-200a-3p）和 siRNAs 阴性对照（si-NC），以及 miR-200a-3p 过表达（miR-200a-3p-OE）和 PDCD4 过表达（PDCD4）质粒转染 CRC 细胞。通过 CCK-8 测定、集落形成和 Transwell 细胞侵袭测定来确定 miR-200a-3p 对 CRC 细胞生长的影响。雌性 BALB/c 裸鼠随机分为 3 组：载体组（Vector 组）、miR-200a-3p 过表达组（miR-200a-3p-OE 组）和 miR-200a-3p 过表达+PDCD4 过表达组（miR-200a-3p-OE+PDCD4 组）。构建小鼠远处转移模型，监测肺转移的荧光强度，计数肺转移结节的数量。**结果：**miR-200a-3p 在 CRC 组织和细胞系中上调。miR-200a-3p 高表达与肿瘤大小、肿瘤转移和 TNM 分期显著相关。miR-200a-3p 表达可以作为总生存率（overall survival，OS）（*HR*=2.077，95%CI=1.079~3.998，*P*=0.029）和无病生存率（disease free survival，DFS）（*HR*=2.927，95%CI=1.179~7.270，*P*=0.021）的独立预后生物标志物。功能研究发现 miR-200a-3p 结合 PDCD4 的 3′-UTR 区，并降低 PDCD4 在 CRC 细胞中的表达。PDCD4 过表达抑制 miR-200a-3p 过表达对 CRC 细胞增殖、集落形成、迁移和侵袭的促进作用。与体外结果一致，在转移的小鼠尾静脉注射模型中，miR-200a-3p-OE+PDCD4 组 SW480 细胞的肺定植、肺转移灶较 miR-200a-3p-OE 组明显减少（*P*<0.05）。**结论：**miR-200a-3p 在 CRC 细胞、组织和血清中表达显著增加，并可以作为诊断和预后的生物标志物。miR-200a-3p 过表达通过抑制 PDCD4 表达促进 CRC 进展。

【关键词】miR-200a-3p；程序性细胞死亡 4；结直肠癌；诊断；预后
【中图分类号】R735.3　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-02-08

Potential value of miR-200a-3p as a biomarker for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer

Liu Jieqiong[1], Yao Yali[2], Cao Yongqing[1], Sui Qian[1], Huang Fang[1], Li Ke[1]
(1. Department of Hematology and Oncology, Changsha First Hospital & Changsha Hospital Affiliated to Xiangya School of Medicine, Central South University; 2. Department of Gynecology, Changsha First Hospital & Changsha Hospital Affiliated to Xiangya School of Medicine, Central South University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the potential value of miR-200a-3p and its downstream target gene programmed cell death 4 (PDCD4) in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer (CRC). ***Methods*:** A cohort containing 120 pairs of CRC tissue samples and corresponding adjacent tissue samples were collected from CRC patients who underwent radical resection or palliative resection from January 2017 to September 2019. Another cohort included 50 patients diagnosed with CRC, and preoperative and postoperative serum samples were collected from these patients before and after surgery from January 2019 to January 2020. RT-qPCR was used to measure the expression of miR-200a-3p in CRC tissue and cell lines. CRC cells were transfected with plasmids targeting miR-200a-3p (si-miR-200a-3p) and siRNAs negative control (si-NC) and plasmids with miR-200a-3p overexpression (miR-200a-3p-OE) and PDCD4 overexpression (PDCD4), and Cell Counting Kit-8 assay, colony formation assay, and Transwell assay were used to observe the influence of miR-200a-3p on the growth of CRC cells. Female BALB/c nude mice were randomly divided into Vector group, miR-200a-3p overexpression group (miR-200a-3p-OE group), and miR-200a-3p overexpression+PDCD4 overexpression group (miR-200a-3p-OE+PDCD4 group). A mouse model of distant metastasis was established, and the fluorescence intensity of lung metastasis was monitored, as well as the number of lung metastasis nod-

作者介绍：刘洁琼，Email：Souy09@163.com，
研究方向：恶性肿瘤的发病机制研究。
通信作者：姚雅俪，Email：snowvv707@163.com。
基金项目：湖南省卫生健康委科研计划资助项目（编号：202203102964）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241023.0950.034（2024-10-23）

ules. ***Results***: The expression of miR-200a-3p was upregulated in CRC tissue and cell lines. The high expression of miR-200a-3p was significantly associated with tumor size, tumor metastasis, and TNM stage. The expression of miR-200a-3p could be regarded as an independent prognostic biomarker for overall survival (hazard ratio [*HR*]=2.077, 95%CI=1.079-3.998, *P*=0.029) and disease-free survival (*HR*=2.927, 95%CI=1.179-7.270, *P*=0.021). Functional study revealed that miR-200a-3p could bind to the 3'-UTR region of PDCD4 and reduced the expression of PDCD4 in CRC cells. Overexpression of PDCD4 inhibited the promoting effect of miR-200a-3p on the proliferation, colony formation, migration, and invasion of CRC cells. In the mouse model of metastasis and caudal vein injection, the miR-200a-3p-OE+PDCD4 group had significant reductions in lung colonization and lung metastatic lesions compared with the miR-200a-3p-OE group (*P*<0.05), which was consistent with the *in vitro* results. ***Conclusion***: There is a significant increase in the expression of miR-200a-3p in CRC cells, tissue, and serum, and it can be used as a biomarker for diagnosis and prognosis. Overexpression of miR-200a-3p promotes the progression of CRC by inhibiting PDCD4 expression.

【Key words】miR-200a-3p; programmed cell death 4; colorectal cancer; diagnosis; prognosis

根据最新的全球癌症统计数据，结肠直肠癌（colorectal cancer，CRC）是最常见的诊断癌症之一，也是全球癌症相关死亡的主要原因[1]。尽管针对CRC的临床治疗策略取得了巨大进步，但仍有超过50%的接受切除术的患者发生转移[2]。因此，探索和更好地理解驱动CRC进展的分子机制将有助于通过更好的预后预测和更有效的靶向治疗。微小RNA（microRNA，miRNA）是一类单链非编码RNA，通过结合3'-UTR区域下调目标mRNA地表达[3]。研究表明，miRNA失调显著促进CRC的发展[4]。最近报道了miR-200a-3p在CRC中的潜在致癌功能，表明miR-200a-3p在癌症预后和治疗的重要性[5-6]。程序性细胞死亡4（programmed cell death 4，PDCD4）是一种新的肿瘤抑制基因，在转录和翻译水平抑制肿瘤进展，并调节多种信号转导途径，被认为是一种新的肿瘤抑制基因[7]。在正常生理条件下，PDCD4蛋白主要位于细胞核内，当细胞微环境发生变化时（如细胞恶性增殖），可通过核输出信号转移到细胞质中[7]。PDCD4还可以直接结合肿瘤细胞的核糖体，影响翻译过程，导致肿瘤细胞的凋亡[8]。最近研究证实miR-200a-3p/PDCD4轴介导缺氧/再灌注损伤后心肌细胞凋亡[9]。然而，尚不清楚miR-200a-3p/PDCD4轴是否介导CRC进展。因此，本研究旨在揭示miR-200a-3p/PDCD4轴在CRC中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 对象

从2017年1月至2019年9月在长沙市第一医院（中南大学湘雅医学院附属长沙医院）接受根治性切除术或姑息性切除术的CRC患者中收集包含120对CRC组织和相应癌旁正常组织的队列。另1个队列包括50例诊断为CRC的患者；2019年1月至2020年1月从这些患者手术前后收集术前和术后血清样本；同时获得40例健康受试者和40例新诊断CRC患者的血清。所有CRC患者均经病理确诊，术前均未接受放疗或化疗。标本由本院普外科研究人员收集，切除后立即在液氮中运输，在RNA提取前储存在-80 ℃。本研究经本院伦理委员会审查批准，患者和对照受试者提供知情同意书。

1.2 细胞系和培养

人正常结肠直肠上皮细胞系HCoEpic获自美国典型培养物保藏中心，CRC细胞（HCT116、DLD-1、HT29、LoVo和SW480）获自中国科学院细胞库。HCoEpic细胞在补充有10%胎牛血清的McCoy's 5A培养基（美国Gibco公司）中培养，HCT116、DLD-1、HT29和LoVo细胞在RPMI 1640培养基（美国Gibco公司）中培养，SW480细胞在DMEM/高葡萄糖培养基（美国Gibco公司）中培养。

1.3 细胞转染

由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成靶向miR-200a-3p（si-miR-200a-3p）和siRNAs阴性对照（si-NC）。细胞培养至30%~50%汇合，用siLentFect脂质试剂（美国Bio-Rad公司）转染siRNAs。将miR-200a-3p和PDCD4的全长序列克隆到pcDNA3.1载体（美国Invitrogen公司）中，构建miR-200a-3p过表达（miR-200a-3p-OE）和PDCD4过表达（PDCD4）质粒，同时将空载体用作阴性对照。当细胞达到大约90%汇合时，用Lipofectamine 2000（美国Invitrogen公司）转染质粒。48 h后收获转染的细胞用于随后的实验。

1.4 RNA提取和qRT-PCR分析

使用RNA Isolater总RNA提取试剂盒（南京诺唯赞医疗科技有限公司）从CRC标本和细胞中分离总RNA。通过Nano drop 2000（美国Thermo Fisher Scientific公司）测定提取样品的质量和浓度。对于qRT-PCR分析，使用具有特异性茎环引物的miRNA第一链cDNA合成试剂盒（南京诺唯赞医疗科技有限公司）进行逆转录，然后使用miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix（南京诺唯赞医疗科技有限公司）在LightCycler 96仪器上进行qRT-PCR（瑞士罗氏公司），使用以下循环条件：95 ℃ 5 min；40次循环，95 ℃ 10 s，60 ℃ 60 s；熔化曲线分析。使用$2^{-\Delta\Delta CT}$方法计算相对RNA表达水平，U6作为miRNAs的参照。引物序列如下：U6，F：5'-CTCGCTT

CGGCAGCACA-3′，R：5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′；miR-19b-3p，F：5′-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3′，R：5′-AAGCGACCTGTGCAAATCCATG-3′。

1.5 CCK-8增殖试验

用CCK-8法（美国APExBIO公司）测定CRC细胞的增殖能力。将对数生长期的细胞（每孔1 000个细胞）接种到96孔板中，并将10 μL CCK-8溶液添加到每个孔中，然后在37 ℃下孵育2 h。用分光光度计计算450 nm波长处的吸光度值，共3次。

1.6 集落形成试验

收集CRC细胞，将1×10^3个细胞接种到6孔板中，并在37 ℃下孵育10 d。去除培养基后，用甲醇固定细胞，并用0.1%结晶紫染色。然后计数并记录菌落数。

1.7 细胞迁移和侵袭分析

对于细胞迁移分析，将细胞悬液（1×10^5个细胞）稀释在0.2 mL无血清RPMI1640培养基中，并加入到上部Transwell室中，孵育20 h。使用涂有Matrige（美国BD Bioscience公司）Transwell室进行细胞侵袭分析。转染的细胞常规孵育48 h。孵育后，用甲醛固定细胞30 min，并用结晶紫染色。通过显微镜对穿过滤膜的细胞进行计数。

1.8 荧光素酶报告基因分析

应用萤光素酶报告基因分析来研究PDCD4是否是miR-200a-3p的直接靶标。将PDCD4的3′ UTR序列克隆到pcDNA3.0载体中。随后，用Vector或miR-200a-3p-OE共转染PDCD4载体。通过Centro LB 960微孔板式发光检测仪（德国Berthold公司）评估荧光素酶的相对值。

1.9 Western blot分析

从细胞中提取总蛋白，并使用BCA蛋白检测试剂盒（上海Beyotime公司）进行定量。将等体积的蛋白质样品进行SDS-PAGE电泳，并转移到PVDF膜（美国Millipore公司）上。在5%牛血清白蛋白中封闭1 h后，将膜与下列一抗在4 ℃孵育过夜：PDCD4（1∶1 000；英国Abcam公司）、GAPDH（1∶2 000；美国Proteintech公司）。然后，将膜与山羊抗兔IgG二抗（1∶10 000；美国Proteintech公司）在室温下孵育1 h。使用ECL-Plus蛋白质印迹检测系统（美国GE Healthcare公司）进行密度测定分析。

1.10 动物实验

18只雌性BALB/c裸鼠（6~8周龄）由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，并在无特定病原体条件下饲养。将小鼠随机分为3组，每组6只：载体组（Vector组）、miR-200a-3p过表达组（miR-200a-3p-OE组）和miR-200a-3p过表达+PDCD4过表达组（miR-200a-3p-OE+PDCD4组）。为了构建远处转移模型，将具有载体、miR-200a-3p过表达、miR-200a-3p过表达+PDCD4过表达的SW480细胞（1×10^6个细胞）注射到无胸腺裸鼠的尾静脉中，通过Xenogen IVIS光谱体内成像系统（美国PerkinElmer公司）监测肺转移的荧光强度。8周后，解剖裸鼠的肺，计数肉眼可见的转移结节的数量，并收集转移结节用4%福尔马林固定，包埋在石蜡中，然后切成4 μm切片。使用链霉亲和素-过氧化物酶试剂盒（北京中山生物技术有限公司）进行免疫组织化学分析（immunohistochemical analysis，IHC）。载玻片与特异性针对PDCD4（英国Abcam公司）的抗体一起孵育。采用Ⅸ83倒置显微镜（日本Olympus公司）拍摄代表性照片。

1.11 统计学方法

使用SPSS 19.0软件进行统计分析。当前研究中的所有数据均以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。检验水准$\alpha=0.05$。t检验或单向方差分析用于评估组间差异的显著性。受试者工作特征（receiver operating characteristic curve，ROC）曲线用于分析miR-200a-3p检测的敏感性和特异性。通过卡方检验计算miR-200a-3p表达与CRC临床病理参数的关系；通过Kaplan-Meier法和对数秩检验计算总生存率（overall survival，OS）和无病生存率（disease free survival，DFS）。使用单变量和多变量Cox比例风险回归模型来确定miR-200a-3p或其他临床病理参数对生存率的影响，并评估风险比。

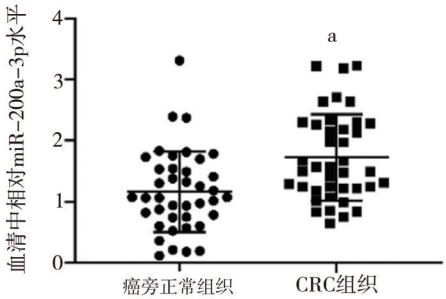
2 结 果

2.1 CRC患者miR-200a-3p表达的临床意义

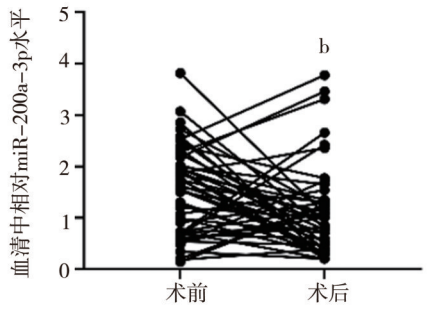
为了确定miR-200a-3p在CRC患者中的临床意义，首先通过随访数据在120例CRC患者队列中验证其表达。与癌旁正常组织相比，miR-200a-3p在CRC组织中显著上调（$P<0.05$）（图1A）。对另1组50例CRC患者手术前后的血清miR-200a-3p水平进行分析，与术前样品相比，术后血清样品中miR-200a-3p减少（$P<0.05$）（图1B）。然后评估另1组40例CRC患者和40例健康受试者中miR-200a-3p的血清表达，发现CRC患者中的血清miR-200a-3p显著高于健康受试者（图1C）。此外，为了评估miR-200a-3p表达作为区分健康人和CRC患者的血清生物标志物的价值，基于40例CRC患者和40例健康受试者的数据生成ROC曲线。miR-200a-3p的曲线下面积（area under curve，AUC）为0.731（95%CI=0.633~0.857）；在截止值为1.184时，约登指数为0.475，灵敏度为65.4%，最佳特异性为87.5%。miR-200a-3p联合CEA检测显示出显著更高的诊断效率，AUC为0.882（95%CI=0.785~0.942）（图1D）。

2.2 随访数据

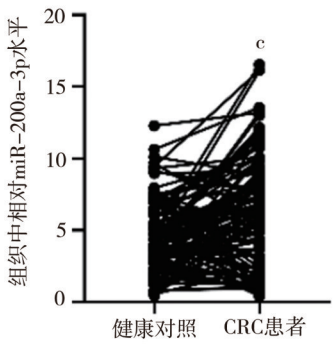
根据miR-200a-3p表达的中位水平，将120例CRC患者队列分为高表达组和低表达组。与miR-200a-3p低表达组相比，miR-200a-3p高表达组的肿瘤直径>5 cm、浸润深度T3/T4、淋巴结转移、远处转移和TNM分期Ⅳ期人数显著增加（$P<0.05$）（表1）。随后，基于120例患者的生存随访信息，Kaplan-Meier生存曲线显示，miR-200a-3p高表达与不良OS和DFS正相关（$P<0.05$）（图2）。单变量Cox回归分析表明，miR-200a-3p表达、浸润深度、淋巴结转移、分化、TNM分期和远处转移是OS的显著危险因素，和miR-200a-3p表达、浸润深度、淋巴结转移、分化、肿瘤大小和TNM分期是DFS的显著危险因素（$P<0.05$）（表2）。多变量分析显示miR-200a-3p表达可以作为OS（$HR=2.077$，95%CI=1.079~3.998，$P=0.029$）和DFS（$HR=2.927$，95%CI=1.179~7.270；$P=0.021$）的独立预后生物标志物（表3）。



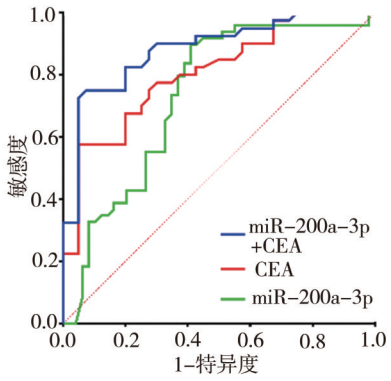
A. 120 个癌旁正常组织和CRC 组织中miR-200a-3p的表达情况



B. 50 例新诊断 CRC 患者手术前后血清miR-200a-3p 水平的变化



C. 健康对照和 CRC患者血清 miR-200a-3p 的相对水平



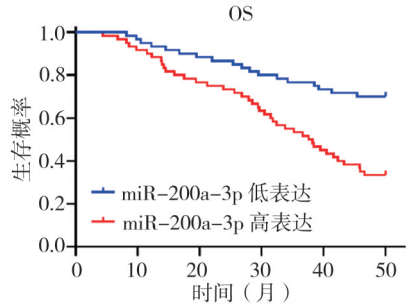
D. 血清 miR-200a-3p 单独或与 CEA 联合对 CRC 的诊断价值

注：a，与癌旁正常组织相比，$P<0.05$；b，与术前相比，$P<0.05$；c，与健康对照相比，$P<0.05$

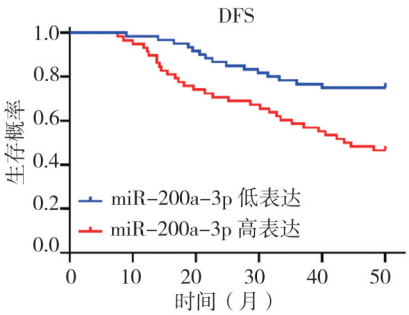
图 1　CRC 组织和血清中 miR-200a-3p 的临床意义

表 1　新鲜冰冻标本中 miR-200a-3p 表达与临床病理特征的关系（n=120）

变量	n	miR-200a-3p 低表达（n=60）	miR-200a-3p 高表达（n=60）	P 值
年龄（岁）	48			0.062
≤60	72	29	19	
>60		31	41	
性别				0.144
女	58	25	33	
男	62	35	27	
肿瘤大小（cm）				0.022
≤5	78	45	33	
>5	42	15	27	
浸润深度				0.001
T1/T2	33	25	8	
T3/T4	87	35	52	
淋巴结转移				0.010
N0	68	41	27	
N1/N2	52	19	33	
远处转移				0.038
M0	111	59	52	
M1	9	1	8	
TNM 分期				0.003
Ⅰ	23	18	5	
Ⅱ	45	23	22	
Ⅲ	43	18	25	
Ⅳ	9	1	8	
分化程度				0.187
中/高	45	19	26	
不良	75	41	34	



A. 基于 120 份临床标本，miR-200a-3p 高表达的 CRC 患者表现出较短的 OS



B. miR-200a-3p 高表达的 CRC 患者表现出较短的 DFS

图 2　Kaplan-Meier 生存曲线

2.3　miR-200a-3p 在体外促进 CRC 的增殖、迁移和侵袭

miR-200a-3p 的表达在 CRC 细胞中明显上调，与 HCoEpic 细胞相比，miR-200a-3p 的表达在 DLD-1 细胞中相对较高，在 SW480 细胞中相对较低（图 3A）。因此，选择 DLD-1 和 SW480 细胞进行进一步研究。用 miR-200a-3p siRNAs 转染 DLD-1 细胞，qRT-PCR 分析证实其成功沉默了 miR-200a-3p（图 3B）。CCK-8 和集落形成试验分析显示，与 si-NC 组相比，si-miR-200a-3p 组 DLD-1 细胞活力和细胞集落数明显降低（P<0.05）（图 3C、D）。Transwell 试验显示 si-miR-200a-3p 组 DLD-1 细胞的迁移和侵袭细胞数明显低于 si-NC 组（P<0.05）（图 3E）。相反，用 miR-200a-3p 过表达质粒转染 SW480 细胞，qRT-PCR 分析证实 miR-200a-3p 明显增加（P<0.05）（图 3F）。与 Vector 组相比，miR-200a-3p-OE 组 SW480 细胞活力、细胞集落数、迁移和侵袭细胞数明显增加（P<0.05）（图 3H、I）。

2.4　miR-200a-3p 靶向 CRC 细胞中的 PDCD4

miR-200a-3p 过表达明显降低 CRC 细胞中 PDCD4 蛋白水平。相反，miR-200a-3p 敲低显示出相反的结果（图 4A、B）。荧光素酶报道基因分析显示，与 Vector 相比，miR-200a-3p-OE 明显降低了 WT 型 PDCD4 序列的荧光素酶报道基因的活性；然而，当 miR-200a-3p 结合位点突变（MUT）时，这种效应消失（图 4C）。

2.5　miR-200a-3p 通过抑制 PDCD4 促进 CRC 细胞的增殖和侵袭

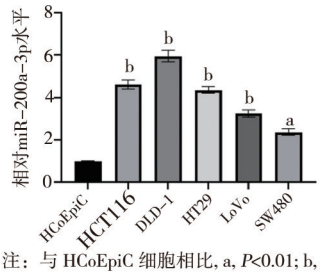
为了进一步探索 miR-200a-3p 和 PDCD4 之间的相互作用，进行了救援实验。结果表明，miR-200a-3p-OE+PDCD4 组 SW480 细胞的细胞活力、细胞集落数、迁移和侵袭细胞数较 miR-200a-3p-OE 组明显降低（P<0.05）（图 5A~C）。与体外结果一致，在转移的小鼠尾静脉注射模型中，miR-200a-3p-OE+PDCD4 组 SW480 细胞的肺定殖、肺转移灶较 miR-200a-3p-OE 组明显减少（P<0.05）（图 5D、E）。肺切片的 IHC 染色证实了 PDCD4 的更高表达导致更少的转移灶形成（图 5F）。

表 2　miR-200a-3p 表达和临床病理变量预测 CRC 患者生存的单变量 Cox 回归分析

变量	OS		DFS	
	HR（95%CI）	*P*	*HR*（95%CI）	*P*
miR-200a-3p	2.660（1.399~5.506）	0.003	3.053（1.287~7.242）	0.011
年龄	1.174（0.626~2.201）	0.616	0.988（0.426~2.291）	0.977
性别	1.531（0.762~3.075）	0.232	1.614（0.710~3.668）	0.253
浸润深度	2.401（1.064~5.416）	0.035	3.033（1.028~8.953）	0.044
淋巴结转移	4.322（2.242~8.334）	<0.001	4.405（1.898~10.222）	0.001
分化程度	0.322（0.174~0.594）	<0.001	0.274（0.119~0.633）	0.002
肿瘤大小	1.049（0.569~1.933）	0.879	2.984（1.288~6.916）	0.011
TNM 分期	4.322（2.242~8.334）	<0.001	4.405（1.898~10.222）	0.001
远处转移	3.932（1.625~9.513）	0.002	–	–

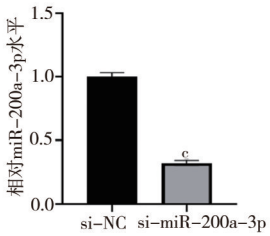
表 3　miR-200a-3p 表达和临床病理变量预测 CRC 患者生存的多变量 Cox 回归分析

变量	OS		DFS	
	HR（95%CI）	*P*	*HR*（95%CI）	*P*
miR-200a-3p	2.077（1.079~3.998）	0.029	2.927（1.179~7.270）	0.021
年龄	1.063（0.558~2.025）	0.853	0.502（0.181~1.394）	0.186
性别	1.284（0.633~2.608）	0.488	1.022（0.390~2.679）	0.964
分化程度	0.474（0.248~0.908）	0.024	0.333（0.131~0.851）	0.022
肿瘤大小	0.933（0.472~1.845）	0.842	1.829（0.686~4.874）	0.227
TNM 分期	3.698（1.793~7.625）	<0.001	3.240（1.185~8.858）	0.022

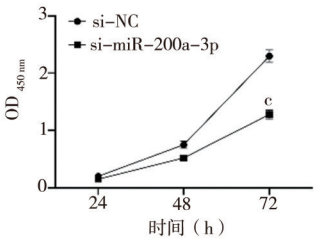


注：与 HCoEpiC 细胞相比，a，P<0.01；b，P<0.001

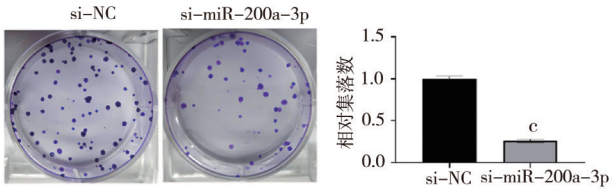
A. miR-200a-3p 在 HCoEpiC、HCT116、DLD-1、HT29、LoVo 和 SW480 细胞系中的表达



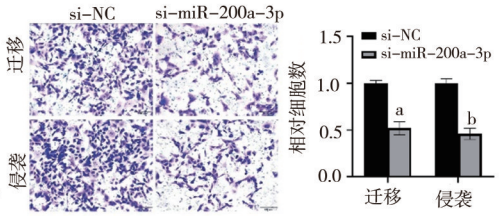
B. qRT-PCR 分析 miR-200a-3p siRNAs 转染 DLD-1 细胞效率



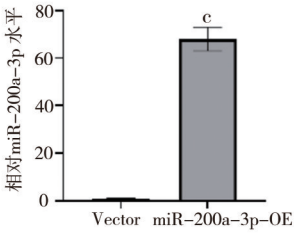
C. CCK-8 分析 miR-200a-3p 敲低对 DLD-1 细胞活力的影响



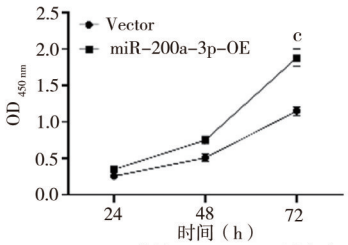
D. 集落形成试验分析 miR-200a-3p 敲低对DLD-1 细胞增殖的影响



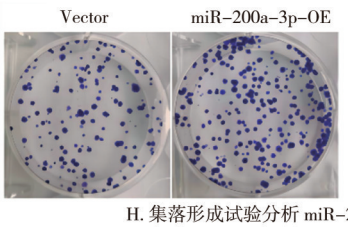
E. Transwell 分析 miR-200a-3p 敲低对 DLD-1 细胞迁移和侵袭能力的影响



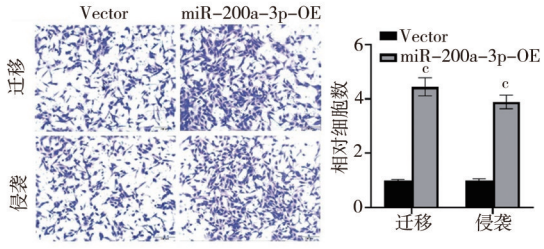
F. qRT-PCR 分析 miR-200a-3p-OE 转染 SW480 细胞效率



G. CCK-8 分析miR-200a-3p 过表达对 SW480 细胞活力的影响



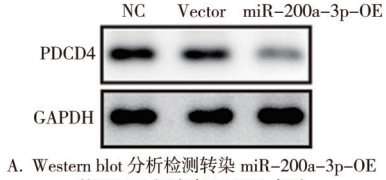
H. 集落形成试验分析 miR-200a-3p 过表达对 SW480 细胞增殖的影响



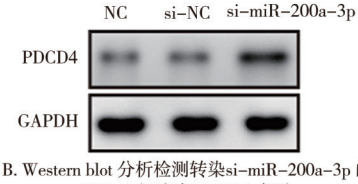
I. Transwell 分析 miR-200a-3p 过表达对 SW480 细胞迁移和侵袭能力的影响

注：与 si-NC 组或 Vector 组细胞相比，a，P<0.05，b，P<0.01，c，P<0.001

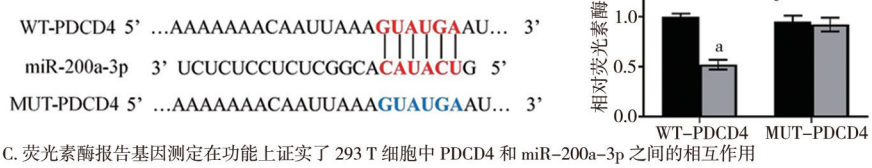
图 3　miR-200a-3p 在体外促进 CRC 的增殖、迁移和侵袭



A. Western blot 分析检测转染 miR-200a-3p-OE 的SW480 细胞中 PDCD4 水平



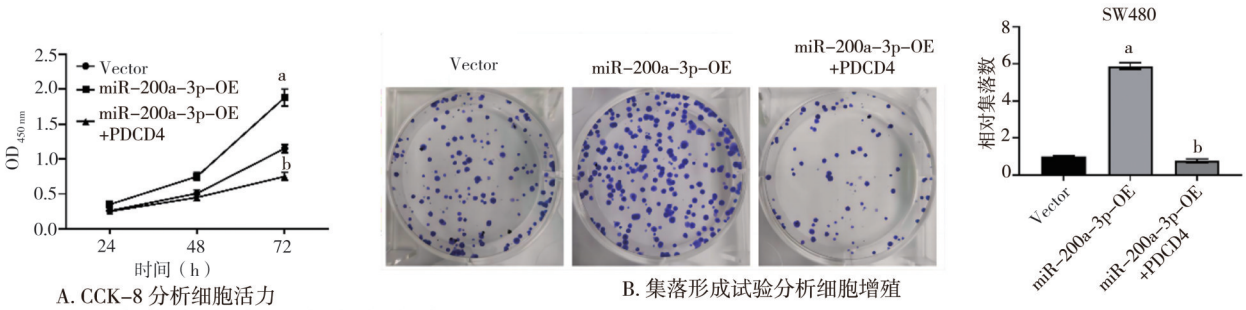
B. Western blot 分析检测转染si-miR-200a-3p 的 DLD-1 细胞中 PDCD4 水平



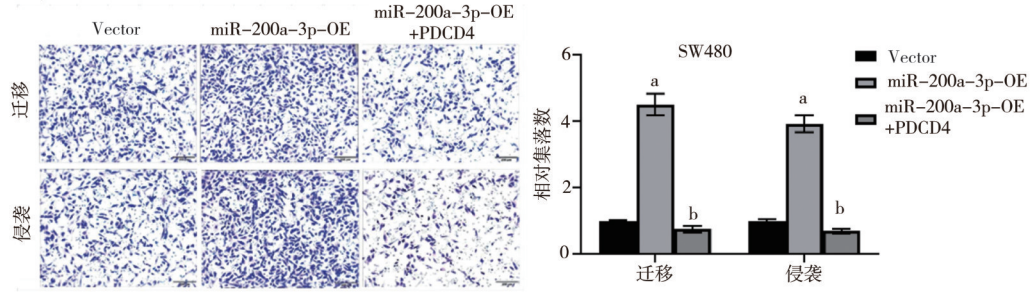
C. 荧光素酶报告基因测定在功能上证实了 293 T 细胞中 PDCD4 和 miR-200a-3p 之间的相互作用

注：与 Vector 组细胞相比，a，P<0.01

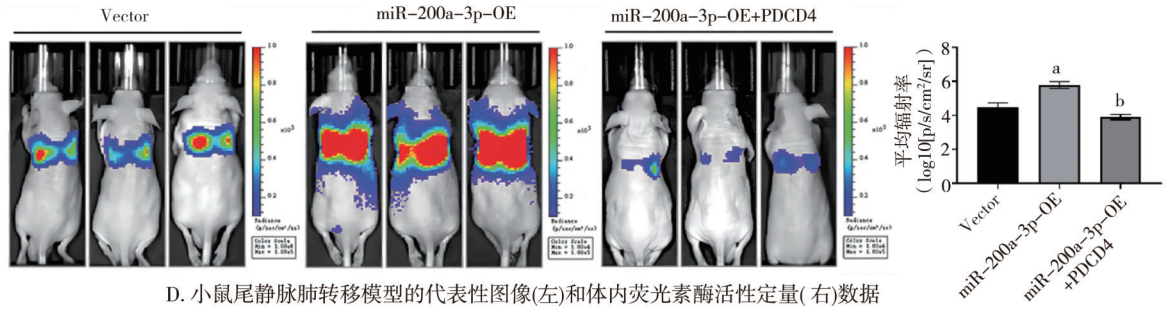
图 4　miR-200a-3p 抑制 PDCD4 活性



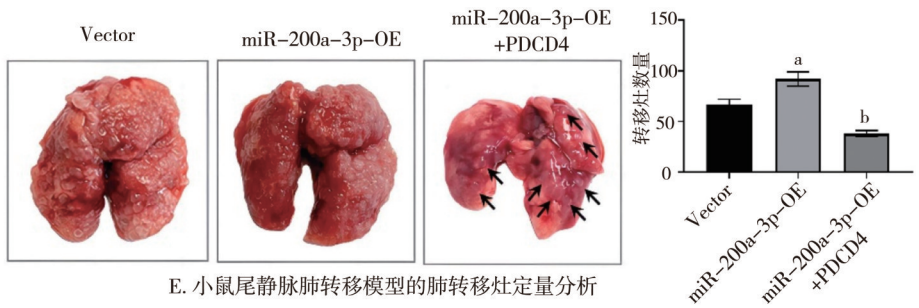
A. CCK-8 分析细胞活力　　B. 集落形成试验分析细胞增殖



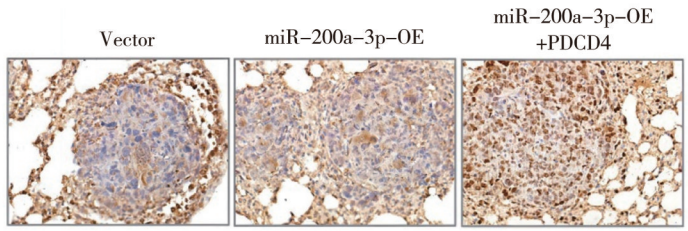
C. Transwell 分析细胞迁移和侵袭能力



D. 小鼠尾静脉肺转移模型的代表性图像(左)和体内荧光素酶活性定量(右)数据



E. 小鼠尾静脉肺转移模型的肺转移灶定量分析



F. 小鼠尾静脉肺转移模型的肺转移灶中 PDCD4 的代表性 IHC 图像

注：a，与 Vector 组细胞相比，$P<0.001$；b，与 miR-200a-3p-OE 组细胞相比，$P<0.001$

图 5　miR-200a-3p 通过抑制 PDCD4 促进 CRC 细胞的增殖和侵袭

3　讨　论

在许多类型的癌症中均报道了 miRNAs 的异常功能和表达谱，包括 CRC[10-12]。miR-200 超家族是 miRNAs 的 1 个关键家族，主要参与调节癌症转移[13]。miR-200a-3p 在多种癌症中过度表达并发挥致癌作用。最近的研究表明，miR-200a-3p 在卵巢癌中具有潜在致癌作用[14]。Lee H 等[15]报道，miR-200a-3p 通过调节双特异性磷酸酶 6 的表达增加了

肝细胞癌细胞对5-氟尿嘧啶的耐药性。miR-200a-3p的致癌作用也通过转录后调节细胞质坍塌应答调停蛋白1的表达在人肝细胞癌中促进了5-氟尿嘧啶治疗后的细胞存活[16]。临床分析显示，miR-200a-3p过表达与CRC患者的肿瘤直径、淋巴结转移和远处转移密切相关，表明miR-200a-3p有助于CRC的增殖和转移。随后，体外功能获得和丧失实验强调了miR-200a-3p在促进CRC细胞增殖、迁移和侵袭中的重要作用。更重要的是，尾静脉注射模型显示miR-200a-3p过表达后，体内远端器官的转移率明显增加。这些体内外结果表明，特异性靶向miR-200a-3p的siRNAs可以有效抑制CRC生长和转移。

先前的研究证实，miR-200a-3p通过抑制其下游靶基因PDCD4调节细胞的增殖、细胞周期进程和凋亡[9]。虽然PDCD4被鉴定为位于细胞核的DNA结合蛋白，但其mRNA的调节发生在细胞质中，通过miR-200a-3p/PDCD4轴改变了被翻译的PDCD4表达量，最终改变了PDCD4蛋白转位入核的量。本研究通过免疫印迹和荧光素酶报告基因揭示了miR-200a-3p过表达明显降低CRC细胞中PDCD4蛋白水平，表明miR-200a-3p上调可以抑制CRC细胞中PDCD4蛋白表达。PDCD4是一种参与程序性细胞死亡的关键蛋白，已知在几种人类癌症中是一种新的肿瘤抑制因子[17]。Wang Q和Yang HS[18]表明，PDCD4通过抑制G1阶段的细胞周期进程来发挥其功能，PDCD4的缺失导致卵巢癌中细胞周期加速。还有研究证明PDCD4可以诱导细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p21和p27的表达，从而抑制细胞周期进程[19]。虽然miR-200a-3p和PDCD4的相关性已经得到证实，但是miR-200a-3p/PDCD4在CRC中的确切机制仍然未知。本研究中，PDCD4过表达消除了miR-200a-3p上调的致癌作用，表明PDCD4至少部分介导了miR-200a-3p在CRC细胞中的致癌作用。

总之，本研究提供了miR-200a-3p在CRC细胞、组织和血清中表达明显增加的证据，并且可以作为诊断和预后的生物标志物。miR-200a-3p过表达通过抑制PDCD4表达促进CRC进展。对miR-200a-3p的进一步研究可能为CRC的诊断和治疗提供新的见解，并显著促进临床实践中的治疗。

参 考 文 献

[1] 李志祥，谢 强，王彬彬，等. 长链非编码RNA AC005062.1通过调控结肠癌转移相关基因1的表达对结直肠癌恶性表型的影响[J]. 安徽医科大学学报，2022，57(5)：736-741.

Li ZX，Xie Q，Wang BB，et al. lncRNA AC005062.1 affects the malignant phenotype of colorectal cancer by regulating the expression of MACC1[J]. Acta Univ Med Anhui，2022，57(5)：736-741.

[2] Hu LL，Liang YT，Wu KL，et al. Repressing PDCD4 activates JNK/ABCG2 pathway to induce chemoresistance to fluorouracil in colorectal cancer cells[J]. Ann Transl Med，2021，9(2)：114.

[3] Huang XJ，Zhu XP，Yu Y，et al. Dissecting miRNA signature in colorectal cancer progression and metastasis[J]. Cancer Lett，2021，501：66-82.

[4] Nassar FJ，Msheik ZS，Itani MM，et al. Circulating miRNA as biomarkers for colorectal cancer diagnosis and liver metastasis[J]. Diagnostics，2021，11(2)：341.

[5] Di ZY，Di MJ，Fu WH，et al. Integrated analysis identifies a nine-microRNA signature biomarker for diagnosis and prognosis in colorectal cancer[J]. Front Genet，2020，11：192.

[6] Li YL，Lu Y，Chen YL. Long non-coding RNA SNHG16 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer via sponging miR-200a-3p[J]. Biosci Rep，2019，39(5)：BSR20182498.

[7] Waghela BN，Vaidya FU，Ranjan K，et al. AGE-RAGEsynergy influences programmed cell death signaling to promote cancer[J]. Mol Cell Biochem，2021，476(2)：585-598.

[8] Long JL，Yin YT，Guo HN，et al. The mechanisms and clinical significance of PDCD4 in colorectal cancer[J]. Gene，2019，680：59-64.

[9] Sun RG，Zhang L. Long non-coding RNA MALAT1 regulates cardiomyocytes apoptosis after hypoxia/reperfusion injury via modulating miR-200a-3p/PDCD4 axis[J]. Biomed Pharmacother，2019，111：1036-1045.

[10] Wai Hon K，Zainal Abidin SA，Othman I，et al. Insights into the role of microRNAs in colorectal cancer（CRC）metabolism[J]. Cancers，2020，12(9)：2462.

[11] Moazzendizaji S，Sevbitov A，Ezzatifar F，et al. microRNAs：small molecules with a large impact on colorectal cancer[J]. Biotechnol Appl Biochem，2022，69(5)：1893-1908.

[12] Fathi S，Guessous F，Karkouri M. Diagnostic value of potential microRNAs in CRC：a Meta-analysis[J]. Microrna，2022，11(3)：190-205.

[13] Cavallari I，Ciccarese F，Sharova E，et al. The miR-200 family of microRNAs：fine tuners of epithelial-mesenchymal transition and circulating cancer biomarkers[J]. Cancers，2021，13(23)：5874.

[14] Shi C，Yang YJ，Zhang L，et al. MiR-200a-3p promoted the malignant behaviors of ovarian cancer cells through regulating PCDH9[J]. Onco Targets Ther，2019，12：8329-8338.

[15] Lee H，Kim C，Kang H，et al. microRNA-200a-3p increases 5-fluorouracil resistance by regulating dual specificity phosphatase 6 expression[J]. Exp Mol Med，2017，49(5)：e327.

[16] Zang YZ，Tai Y，Wan BL，et al. miR-200a-3p promotes the proliferation of human esophageal cancer cells by post-transcriptionally regulating cytoplasmic collapsin response mediator protein-1[J]. Int J Mol Med，2016，38(5)：1558-1564.

[17] Cai Q，Yang HS，Li YC，et al. Dissecting the roles of PDCD4 in breast cancer[J]. Front Oncol，2022，12：855807.

[18] Wang Q，Yang HS. The role of Pdcd4 in tumour suppression and protein translation[J]. Biol Cell，2018，110(8)：169-177.

[19] Yang CG，Dou RZ，Wei C，et al. Tumor-derived exosomal microRNA-106b-5p activates EMT-cancer cell and M2-subtype TAM interaction to facilitate CRC metastasis[J]. Mol Ther，2021，29(6)：2088-2107.

（责任编辑：周一青）