

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.19.004

miR-106a-5p 通过靶向 PTPN3 影响结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭*

韩伟¹ 高翔宇¹ 米星宇¹ 张曼¹ 朱志博¹ 刘瑞廷^{2Δ}

(1 陕西省人民医院医学装备部 陕西 西安 710068; 2 陕西省人民医院普外一科 陕西 西安 710068)

摘要 目的:探究 miR-106a-5p 在结直肠癌(CRC)中的作用和分子机制。**方法:**采用 CancerMIRNome 数据库的 TCGA-project 模块进行 miR-106a-5p 在 CRC 中表达差异性分析和生存预后分析。收集选取陕西省人民医院 2022 年 1 月至 2023 年 6 月共 55 例收治并接受手术切除治疗的 CRC 患者的癌组织和配对癌旁组织。双荧光素酶报告基因检测实验分析 miR-106a-5p 和 PTPN3 靶向关系。将 HCT-116 细胞分为 Control 组, inhibitor-NC 组 (转染 inhibitor-NC), miR-106a-5p inhibitor 组 (转染 miR-106a-5p inhibitor), miR-106a-5p inhibitor+si-NC 组 (共转染 miR-106a-5p inhibitor 和 si-NC) 和 miR-106a-5p inhibitor+si-PTPN3 组 (共转染 miR-106a-5p inhibitor 和 si-PTPN3)。采用 MTT 法检测细胞增殖活性, 采用平板克隆形成实验检测细胞克隆形成数, 采用流式细胞术检测细胞周期分布, 采用 Transwell 实验检测细胞侵袭水平, 采用划痕愈合实验检测细胞迁移水平, 采用 qRT-PCR 分析 miR-106a-5p 和 PTPN3 表达水平, 采用 Western blot 分析 PTPN3、CyclinD1、Cyclin A 和 CDKN4 蛋白表达水平, 采用免疫组织化学染色检测 CRC 组织中 PTPN3 表达水平。**结果:**miR-106a-5p 在 CRC 组织和 HCT-116 细胞中高表达 ($P<0.05$), PTPN3 在 CRC 组织和 HCT-116 细胞中低表达 ($P<0.05$), miR-106a-5p 和 PTPN3 间存在靶向结合位点。与 Control 组和 inhibitor-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor 组细胞 miR-106a-5p 水平和 Cyclin D1、Cyclin A 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), 细胞克隆形成数、细胞增殖活力、细胞相对迁移率和细胞侵袭数量均降低 ($P<0.05$), PTPN3 mRNA 和 PTPN3、CDKN4 的蛋白表达水平均升高 ($P<0.05$), 细胞 G0/G1 期分布比例升高 ($P<0.05$)。与 miR-106a-5p inhibitor+si-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor+si-PTPN3 组细胞 Cyclin D1 和 Cyclin A 蛋白表达水平均升高 ($P<0.05$), 细胞克隆形成数、细胞增殖活力、细胞相对迁移率和细胞侵袭数量均升高 ($P<0.05$), PTPN3 mRNA 和 PTPN3、CDKN4 的蛋白表达水平均降低 ($P<0.05$), 细胞 G0/G1 期分布比例降低 ($P<0.05$)。**结论:**miR-106a-5p 在 CRC 中高表达, PTPN3 在 CRC 中低表达, 通过抑制 miR-106a-5p 表达可以上调 PTPN3 水平, 进而抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词:miR-106a-5p; 结直肠癌; 酪氨酸蛋白磷酸酶非受体型 3 (PTPN3); 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号:R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)19-3619-09

miR-106a-5p Affects the Proliferation, Migration and Invasion of Colon Cancer Cells by Targeting PTPN3*

HAN Wei¹, GAO Xiang-yu¹, MI Xing-yu¹, ZHANG Man¹, ZHU Zhi-bo¹, LIU Rui-ting^{2Δ}

(1 Department of Medical Equipment, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 Department of General Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role and molecular mechanism of miR-106a-5p in colorectal cancer (CRC). **Methods:** The expression difference and survival prognosis of miR-106a-5p in CRC was analyzed by TCGA-project module of CancerMIRNome database. Cancer tissues and paired paracancer tissues of 55 CRC patients who received surgical resection in Shaanxi Provincial People's Hospital from January 2022 to June 2023 were collected and selected. The targeting relationship between miR-106a-5p and PTPN3 was analyzed by Dual luciferase reporter gene assay. HCT-116 cells were divided into Control group, inhibitor-NC group (transfection with inhibitor-NC), miR-106a-5p inhibitor group (transfection with miR-106a-5p inhibitor), miR-106a-5p inhibitor+si-NC group (co-transfection with miR-106a-5p inhibitor and si-NC) and miR-106a-5p inhibitor+si-PTPN3 group (co-transfection with miR-106a-5p inhibitor and si-PTPN3). Cell proliferation activity was detected by MTT assay, the number of cell clone formation was detected by plate clone formation assay, cell cycle distribution was detected by flow cytometry, cell invasion level was detected by Transwell assay, and cell migration level was detected by scratch healing assay. The mRNA expression levels of miR-106a-5p and PTPN3 were analyzed by qRT-PCR. The expression levels of PTPN3, CyclinD1, Cyclin A and CDKN4 were analyzed by Western blot. And the expression levels of PTPN3 in CRC tissues were detected by immunohistochemical staining. **Results:** miR-106a-5p was highly expressed in CRC tissues and HCT-116 cells ($P<0.05$), while PTPN3 was low expressed in CRC tissues and HCT-116 cells ($P<0.05$), and there was a targeted binding site between miR-106a-5p and PTPN3. Compared with Control group and inhibitor-NC group, miR-106a-5p levels and the protein expression levels

* 基金项目:陕西省技术创新引导专项基金项目(2022QFY01-08)

作者简介:韩伟(1984-),男,硕士,副主任技师,主要研究方向:转化医学,E-mail: headfiresss@163.com

Δ 通讯作者:刘瑞廷(1982-),男,博士,副教授,硕士生导师,主任医师,主要研究方向:胃肠道肿瘤,E-mail: fgpeter82Dr@163.com

(收稿日期:2024-04-23 接受日期:2024-05-18)

of Cyclin D1 and Cyclin A in miR-106a-5p inhibitor group were decreased ($P<0.05$). Cell clonal formation number, cell proliferation activity, cell relative mobility and number of cell invasion were decreased ($P<0.05$). PTPN3 mRNA level and the protein expression levels of PTPN3 and CDKN4 were increased ($P<0.05$), and the proportion of cell G0/G1 phase distribution was increased ($P<0.05$). Compared with miR-106a-5p inhibitor+si-NC group, the protein expression levels of Cyclin D1 and Cyclin A in miR-106a-5p inhibitor group were increased ($P<0.05$). Cell clonal formation number, cell proliferation activity, cell relative mobility and number of cell invasion were increased ($P<0.05$). PTPN3 mRNA level and the protein expression levels of PTPN3 and CDKN4 were decreased ($P<0.05$), and the proportion of cell G0/G1 phase distribution was decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** miR-106a-5p is highly expressed in CRC, while PTPN3 is low expressed in CRC. Inhibiting the expression of miR-106a-5p can up-regulate the level of PTPN3, thus inhibiting the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells.

Key words: miR-106a-5p; Colorectal cancer; Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 3 (PTPN3); Proliferation; Migration; Invasion

Chinese Library Classification(CLC): R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)19-3619-09

前言

结直肠癌 (Colorectal cancer, CRC) 是一种常见的恶性肿瘤,其癌症发病率在全球排名第三,死亡率排名第二^[1]。CRC 同时也是一种隐匿性很强的肿瘤,患者出现症状通常已到晚期,近 25% 的 CRC 患者在转移阶段被诊断出来,而有近 50% 的 CRC 患者在诊断后会随着时间的推移继续发展转移^[2]。因此, CRC 的 5 年生存率在很大程度上取决于诊断阶段,通常 I 期生存率约为 90%, IV 期生存率约为 10%,其预后十分严峻^[3-5]。因此,研究新的生物标志物和靶点以提高结直肠癌的早期诊断率和预后效果仍然很重要。

microRNA(miRNA)是一种短的非编码 RNA 分子,参与翻译后基因调控,在癌症的发生、生长和转移中表现出重要功能,影响着肿瘤发生和肿瘤进展^[6],其作为癌症诊断的生物标志物具有潜在效用^[7]。近年来,mRNA 疫苗疗法作为一种新兴的治疗方法成为热点,其具有高安全性、高效率和易于合成的优点,已在抗击新型冠状病毒方面取得了巨大成功^[8,9]。miR-106a-5p 是一种组织差异性 RNA,已有的文献报道其在甲状腺癌^[10]、卵巢癌^[11]和前列腺癌^[12]中高表达,但在肝癌^[13]和胶质瘤^[14]中低表达,但其在 CRC 中的作用还未见报道。本研究前期发现 CRC 患者结肠癌组织中 miR-106a-5p 高表达,故推测 miR-106a-5p 在 CRC 中可能会作为 CRC 促进因子而存在,基于此,本研究旨在通过细胞水平探究 miR-106a-5p 在 CRC 中的具体作用和相关机制。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 试剂 LipofectamineTM 2000 转染试剂(货号:11668019)购自美国 Invitrogen 公司。双荧光素酶检测试剂盒(货号:JKR23008)购自武汉金开瑞生物工程有限公司。inhibitor-NC、miR-106a-5p inhibitor、si-NC、si-PTPN3、PTPN3-WT 和 PTPN3-Mut 委托上海吉玛制药技术有限公司合成。MTT 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。细胞周期检测试剂盒(货号:C1052)购自上海碧云天生物技术股份有限公司。Prime-Script™RT-PCR 试剂盒(货号:RR014A)购自宝日生物技术(北京)有限公司。一抗酪氨酸蛋白磷酸酶非受体型 3(Protein

tyrosine phosphatase non-receptor type 3, PTPN3)(ab202124)、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)(ab226977)、细胞周期蛋白 A(Cyclin A)(ab32386)和周期素依赖性激酶抑制因子 4(Eukaryotic cyclin dependent kinase inhibitor 4, CDKN4)(ab190851)均购自美国 Abcam 公司。

1.1.2 实验细胞 人结直肠癌细胞系选择 HCT-116、SW480、HT-29 和 LOVO,人正常结肠上皮细胞选择 FHC,HCT-116 和 HT-29 细胞采用 McCoy's 5A 培养基,SW480 和 FHC 细胞采用 DMEM 培养基,LOVO 细胞采用 Ham's F-12K 培养基,均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。细胞培养条件:37℃,5% CO₂。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析与临床样本收集检测 采用 Cancer-MIRNome 数据库的 TCGA-project 模块进行 miR-106a-5p 在 CRC 中表达差异性分析和生存预后分析。

收集选取陕西省人民医院 2022 年 1 月至 2023 年 6 月共 55 例收治并接受手术切除治疗的 CRC 患者的癌组织和配对癌旁组织,液氮冻存。所有入组患者的癌组织标本经病理学检查确诊为 CRC,且患者均未接受放疗治疗。55 例入组患者男性 34 例,女性 21 例,年龄(62.37±7.26)岁。本研究经过陕西省人民医院伦理委员会审批通过,所有入组患者对于样本收集均知情同意。采用 qRT-PCR 检测分析组织样本中 miR-106a-5p 和 PTPN3 基因的表达水平;采用 Western blot 和免疫组织化学染色检测分析组织样本中 PTPN3 蛋白表达水平。

1.2.2 细胞分组和转染处理 HCT-116、SW480、HT-29、LOVO 和 FHC 细胞复苏培养后,收集细胞,分别提取总 RNA 和总蛋白,采用 qRT-PCR 检测各细胞系中 miR-106a-5p 和 PTPN3 基因表达水平,采用 Western blot 检测各细胞系中 PTPN3 蛋白表达水平。最后综合选择 HCT-116 为目标细胞进行后续实验。

HCT-116 细胞采用含 10%胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基传代培养,每 2~3 d 更换 1 次新鲜培养基。将 HCT-116 细胞细胞分为 Control 组, inhibitor-NC 组, miR-106a-5p inhibitor 组, miR-106a-5p inhibitor+si-NC 组和 miR-106a-5p inhibitor+si-PTPN3 组。取对数生长期的 HCT-116 细胞转接至 6 孔板,待细胞融合度至 80%左右时,按照 LipofectamineTM 2000 转染试剂说明步骤,分别将 inhibitor-NC 转染至 inhibitor-NC 组, miR-106a-5p inhibitor 转染至 miR-106a-5p inhibitor 组,

miR-106a-5p inhibitor 和 si-NC 共转染至 miR-106a-5p inhibitor+si-NC 组, miR-106a-5p inhibitor 和 si-PTPN3 共转染至 miR-106a-5p inhibitor+si-PTPN3 组, 转染后继续培养 48 h, 采用 qRT-PCR 和 Western blot 验证各组细胞转染效率。

1.2.3 双荧光素酶报告基因检测实验 通过 TargetScanHuman 数据库分析 miR-106a-5p 和 PTPN3 的靶向关系和结合位点。采用 pMIR-REPORT 载体构建 PTPN3 野生型载体 (PTPN3-WT) 和突变型载体 (PTPN3-Mut), 取对数生长期的细胞转接至 24 孔板, 采用 Lipofectamine™ 2000 将 PTPN3-WT 或 PTPN3-Mut 分别与 miRNA-NC 和 miR-106a-5p mimics 共转染至细胞, 继续培养 48 h 后上机检测相对荧光素酶活性。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖 转染后处于对数生长期的各组 HCT-116 细胞按照 3×10^3 个/孔的密度转接至 96 孔板, 每组设置 6 个复孔。继续培养 48 h, 按照试剂盒说明书要求, 每孔加入 10 μ L 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 每孔再加入 110 μ L 的 Formazan 溶解液处理 10 min, 酶标仪检测 490 nm 处各孔的吸光值。

1.2.5 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成数 转染后处于对数生长期的各组 HCT-116 细胞按照 1×10^3 个/孔的密度转接至 6 孔板, 于细胞培养箱中培养, 每隔 3 d 更换 1 次新鲜培养液, 至 7 d 后观察到明显克隆形成后采用 4% 多聚甲醛固定处理 30 min, 再经结晶紫染色 30 min, 光学显微镜下观察、拍照并克隆计数。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期分布 转染后的各组 HCT-116 细胞培养 48 h 后, 离心收集细胞和预冷 PBS 洗涤, 加入预冷的 70% 乙醇固定处理 24 h, PBS 洗涤并重悬细胞, 按照细胞周期检测试剂盒说明加入 500 μ L 的 PI 溶液避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 立即流式细胞仪上机检测分析下细胞周期分布。

1.2.7 Transwell 实验检测细胞侵袭水平 将 Matrigel 基质胶与 McCoy's 5A 培养基按照 1:8 的比例稀释并铺设于 Transwell 上室待凝固后备用。取转染后的各组 HCT-116 细胞, 采用不含胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基稀释后按照 5×10^4 个/孔的密度转接至 Transwell 上室, Transwell 下室加入含 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基, 将板置于细胞培养箱中培养 24 h。采用 4% 多聚甲醛固定处理 30 min, 1% 结晶紫染色处理 20 min, PBS 洗涤 2 次, 自然晾干后光学显微镜下观察、拍照和细胞计数。

1.2.8 划痕愈合实验检测细胞迁移水平 各组转染后的 HCT-116 细胞转接至 6 孔板, 细胞生长融合至 100% 左右, 采用高温灭菌后的 10 μ L 规格移液枪头垂直并快速划线, PBS 轻柔清洗 2 次清除脱落细胞, 6 孔板置于细胞培养箱中继续培养 24 h。在 0 h 和 24 h 时采用光学显微镜分别观察和拍照, 并计算细胞相对迁移距离。

1.2.9 qRT-PCR 分析 miR-106a-5p 和 PTPN3 表达水平 收集转染后培养 48 h 的各组细胞或 CRC 组织, PBS 洗涤后加入 Trizol 提取总 RNA, 采用 PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒进行 cDNA 合成和 PCR 反应, 程序条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共 30 个循环。miR-106a-5p: 上游 5'-GATGCTCAAAA-AGTGCTTAC-3', 下游 5'-TATGGTTGTTCTGCTCTC-3'; U6: 上游 5'-CTCGCTTCGCGCAGCACA-3', 下游 5'-AACGCTTCAC-GAATTTGCGT-3'; PTPN3: 上游 5'-GGACATCTCAGAACA-

CACGCATG-3', 下游 5'-GAAGTCAGCA-AATGAGCG-GACAG-3'; GAPDH: 上游 5'-CCACCCATGGC-AAATTC-CATGGCA-3', 下游 5'-TCTAGACGGCAGGTCTAG-GTC-CACC-3'。以 U6 和 GAPDH 作为内部参考, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因相对表达量。

1.2.10 Western blot 分析 PTPN3 和细胞周期蛋白表达水平 收集转染后培养 48 h 的各组细胞或 CRC 组织, PBS 洗涤后加入 RIPA 裂解液按照试剂盒步骤提取总蛋白, 经过 BCA 定量分析后 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转膜并封闭处理。加入稀释后的一抗 PTPN3 (1:2000)、CyclinD1 (1:1000)、Cyclin A (1:3000) 和 CDKN4 (1:1000) 于 4 $^{\circ}$ C 环境孵育过夜处理, 再加入稀释后的二抗室温孵育 2 h, 洗膜、ECL 发光显影处理并成像。采用 Image J 软件扫描并分析条带灰度值, 以 GAPDH 作为内部参考蛋白。

1.2.11 免疫组织化学染色检测 PTPN3 表达水平 取收集的 CRC 组织和癌旁组织, 按照常规方法制作石蜡切片。经过脱蜡、二甲苯和乙醇水化处理, 柠檬酸钠缓冲液和高温处理进行抗原修复。加入稀释后的一抗 PTPN3 (1:500) 于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜处理, PBS 洗涤后再加入稀释后的二抗室温孵育 1 h, DAB 显色并苏木精复染, 再经过乙醇脱水和二甲苯透明后采用中性树胶封片, 光学显微镜下观察和拍照。

1.3 统计学分析

本研究采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析, 数据均表示为平均值 \pm 标准差, t 检验比较两组间差异, 单因素方差分析比较多组间差异, 事后两两比较采用 LSD 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-106a-5p 和 PTPN3 在结直肠癌组织和细胞中的表达

CancerMIRNome 数据库分析结果显示, CRC 组织中 miR-106a-5p 水平高于正常组织 ($P < 0.001$), miR-106a-5p 低表达的 CRC 患者生存预后更好 ($P = 0.02$), 见图 1。

与癌旁组织比较, CRC 癌组织中 miR-106a-5p 水平升高 ($P < 0.05$), PTPN3 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.2 miR-106a-5p 和 PTPN3 在结直肠癌细胞中的表达

与人 FHC 细胞比较, LOVO、HT-29、HCT-116 和 SW480 细胞中 miR-106a-5p 水平均升高 ($P < 0.05$), PTPN3 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$), 见图 3。综合评估选择 HCT-116 细胞为目标细胞进行后续实验。

2.3 miR-106a-5p 靶向调控 PTPN3 的表达

通过 Target Scan Human 数据库分析, 结果显示 miR-106a-5p 和 PTPN3 间存在结合位点, 见图 4A。双荧光素酶报告基因检测结果显示, PTPN3-WT 与 miR-106a-5p mimics 共转染的细胞相对荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$), 见图 4B。与 Control 组和 inhibitor-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor 组细胞 miR-106a-5p 水平降低 ($P < 0.05$), PTPN3 的 mRNA 和蛋白水平均升高 ($P < 0.05$); 与 miR-106a-5p inhibitor+si-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor+si-PTPN3 组细胞 PTPN3 的 mRNA 和蛋白水平均降低 ($P < 0.05$), 见图 4C-E。

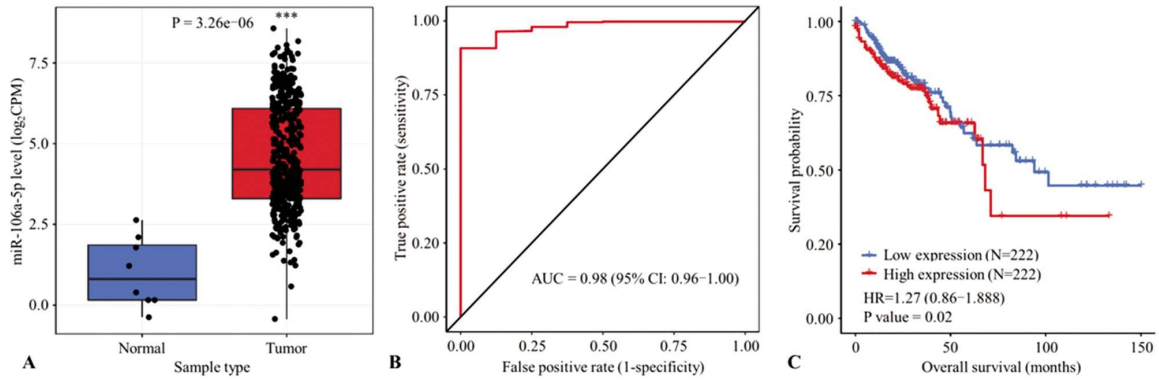


图1 基于 CancerMIRNome 数据库的 miR-106a-5p 与 CRC 的生物信息学分析

Fig.1 Bioinformatics analysis of miR-106a-5p and CRC based on CancerMIRNome database

Note: A: Comparison of the expression levels of miR-106a-5p in normal tissues and CRC tissues; B: ROC curve analysis; C: Analysis of the expression level of miR-106a-5p and survival rate of CRC patients; Compared with normal tissues, *** $P < 0.001$.

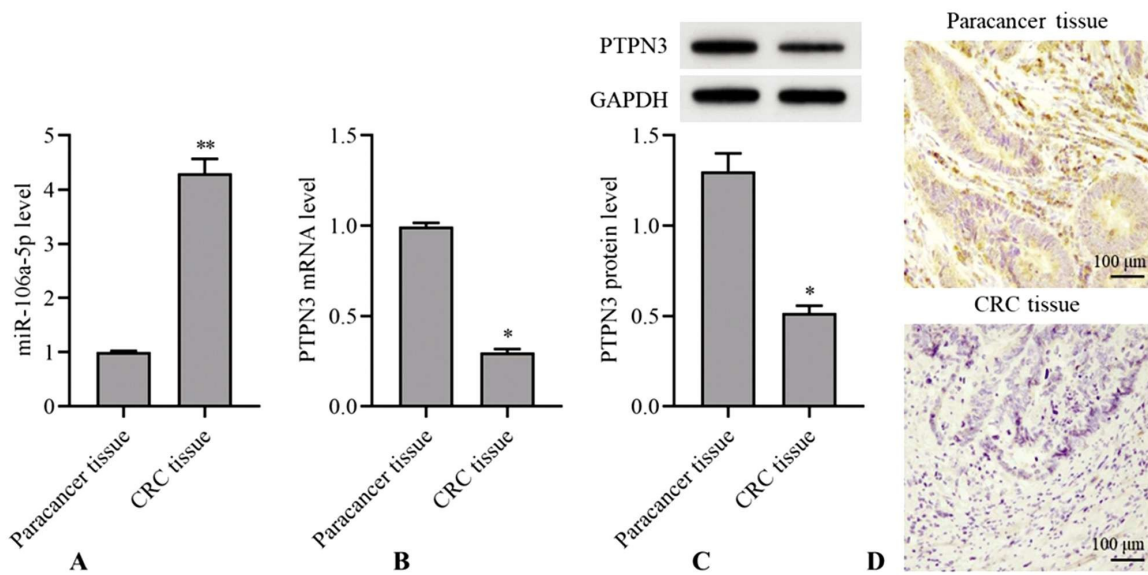


图2 CRC 组织中 miR-106a-5p 和 PTPN3 表达水平

Fig.2 Expression levels of miR-106a-5p and PTPN3 in CRC

Note: A: Expression level of miR-106a-5p; B and C: mRNA and protein expression levels of PTPN3; D: The expression level of PTPN3 protein was detected by immunohistochemical staining; Compared with Paracancer tissue, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

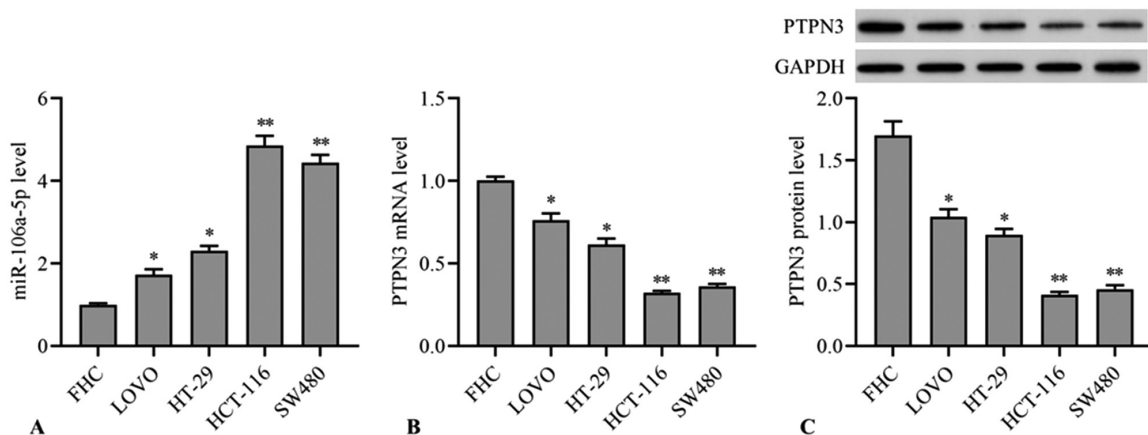


图3 CRC 细胞中 miR-106a-5p 和 PTPN3 表达水平

Fig.3 Expression levels of miR-106a-5p and PTPN3 in CRC

Note: A: Expression level of miR-106a-5p; B and C: mRNA and protein expression levels of PTPN3; Compared with FHC cell, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 沉默 miR-106a-5p 对结直肠癌细胞增殖的影响

与 Control 组和 inhibitor-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor

组细胞克隆形成数和细胞增殖活力均降低 ($P<0.05$); 与 miR-106a-5p inhibitor+si-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor+

si-PTPN3 组细胞克隆形成数和细胞增殖活力均升高 ($P<0.05$), 见图 5。

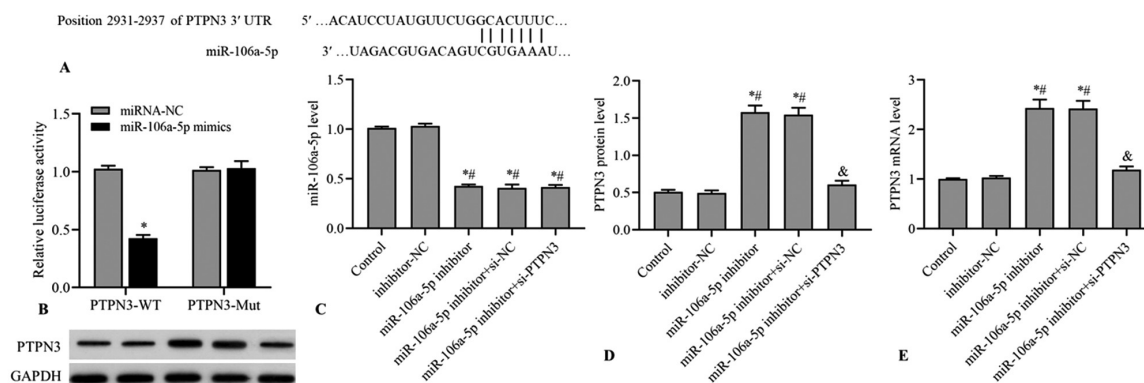


图 4 CRC 细胞中 miR-106a-5p 和 PTPN3 表达水平

Fig.4 Expression levels of miR-106a-5p and PTPN3 in CRC

Note: A: TargetScanHuman database and double luciferase reporter gene assay were used to analyze the targeting relationship between miR-106a-5p and PTPN3. C: Expression level of miR-106a-5p; D and E: mRNA and protein expression levels of PTPN3; Compared with Control group, $*P<0.05$; Compared with inhibitor-NC group, $^{\#}P<0.01$; Compared with miR-106a-5p inhibitor+si-NC group, $\&P<0.01$.

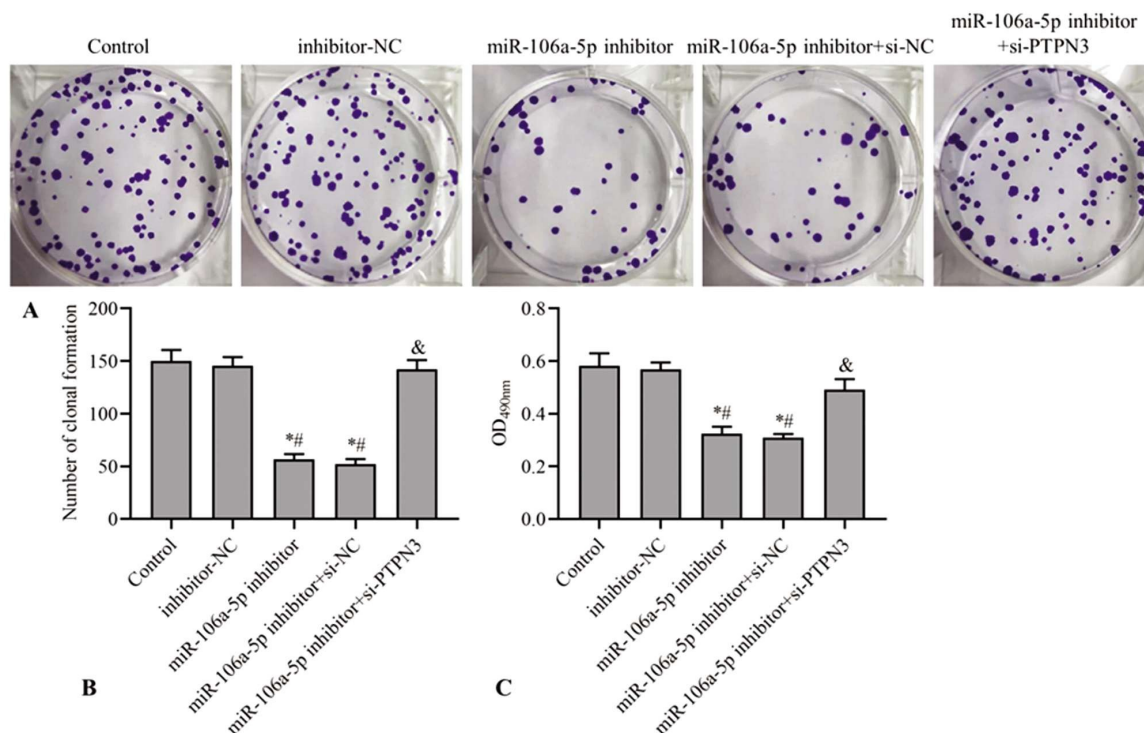


图 5 沉默 miR-106a-5p 对 HCT-116 细胞增殖的影响

Fig.5 Effect of silencing miR-106a-5p on the proliferation of HCT-116 cells

Note: A and B: The number of cell clones was detected by plate clone formation assay. C: Cell proliferation activity was detected by MTT assay. Compared with Control group, $*P<0.05$; Compared with inhibitor-NC group, $^{\#}P<0.01$; Compared with miR-106a-5p inhibitor+si-NC group, $\&P<0.01$.

2.5 沉默 miR-106a-5p 对结肠直肠癌细胞周期分布的影响

与 Control 组和 inhibitor-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor 组细胞 G0/G1 期分布比例和 CDKN4 蛋白表达水平均升高 ($P<0.05$), Cyclin D1 和 Cyclin A 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$); 与 miR-106a-5p inhibitor+si-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor+si-PTPN3 组细胞 G0/G1 期分布比例和 CDKN4 蛋白表达水平均降低 ($P<0.05$), Cyclin D1 和 Cyclin A 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$), 见图 6 和图 7。

2.6 沉默 miR-106a-5p 对结肠直肠癌细胞迁移的影响

与 Control 组和 inhibitor-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor 组 HCT-116 细胞相对迁移率降低 ($P<0.05$); 与 miR-106a-5p inhibitor+si-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor+si-PTPN3 组 HCT-116 细胞相对迁移率升高 ($P<0.05$), 见图 8。

2.7 沉默 miR-106a-5p 对结肠直肠癌细胞侵袭的影响

与 Control 组和 inhibitor-NC 组比较, miR-106a-5p inhibitor 组 HCT-116 细胞侵袭数量降低 ($P<0.05$); 与 miR-106a-5p in-

hibitor+si-NC 组比较,miR-106a-5p inhibitor+si-PTPN3 组 HCT-116 细胞侵袭数量升高($P<0.05$),见图 9。

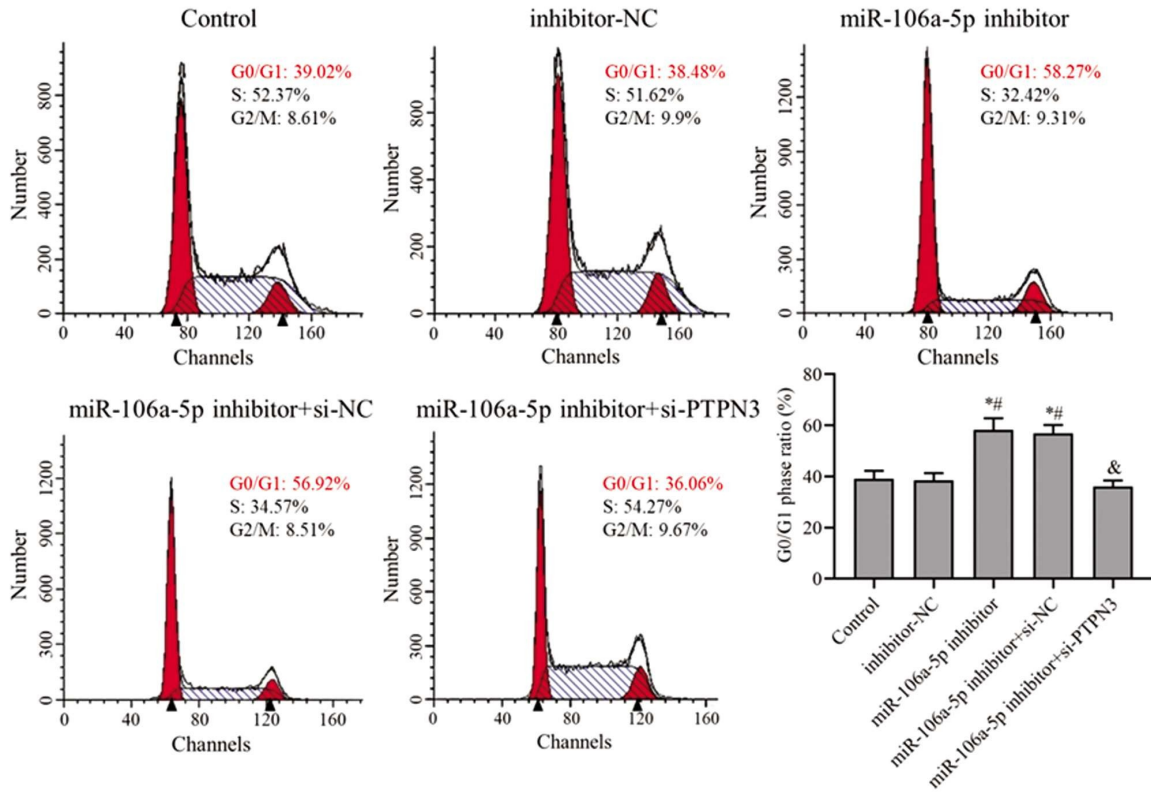


图 6 沉默 miR-106a-5p 对 HCT-116 细胞 G0/G1 期分布的影响

Fig.6 Effect of silencing miR-106a-5p on G0/G1 phase distribution in HCT-116 cells

Note: Compared with Control group, $*P<0.05$; Compared with inhibitor-NC group, $^{\#}P<0.01$; Compared with miR-106a-5p inhibitor+si-NC group, $^{\&}P<0.01$.

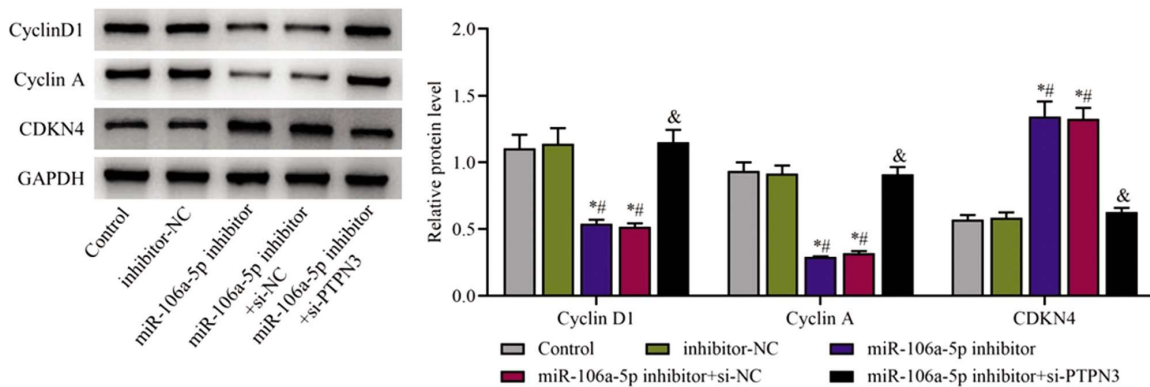


图 7 沉默 miR-106a-5p 对细胞周期蛋白表达的影响

Fig.7 The effect of silencing miR-106a-5p on the expression of cyclin proteins

Note: Compared with Control group, $*P<0.05$; Compared with inhibitor-NC group, $^{\#}P<0.01$; Compared with miR-106a-5p inhibitor+si-NC group, $^{\&}P<0.01$.

3 讨论

结肠直肠癌(CRC)是目前世界上最流行和最严重的癌症之一,也是造成死亡的重要原因^[5]。如果在早期发现 CRC,可以大大降低 CRC 患者的死亡率,因此,广泛的 CRC 早期筛查,对于降低 CRC 的发病率和死亡率大有裨益^[6]。随着现代分子生物学技术的发展,蛋白质、DNA(检测突变和甲基化标记物)、RNA(主要是 microRNA)和肠道微生物组成已经成为 CRC 筛查的主要生物标志物类别^[7]。目前,部分 miRNA 已成为 CRC

患者粪便、血液或肠道微生物群样本中有效的生物标志物,其具有突出的敏感性和特异性。已有相关研究和实践报道,CRC 中表达下调的 miRNA(如 miR-144-3p,miR-425-5p 和 miR-1260b)以及表达上调的 miRNA(如 miR-19a,miR-19b,miR-15b,miR-29a,miR-335 和 miR-18a)显示出的敏感度和特异性水平超过 90%^[17,18]。本研究中,分别研究了 CRC 组织和细胞中 miR-106a-5p 的表达水平,结果发现 miR-106a-5p 在 CRC 组织和 HCT-116 细胞中均高表达,表明 miR-106a-5p 可能是 CRC 的潜在阳性生物标志物。

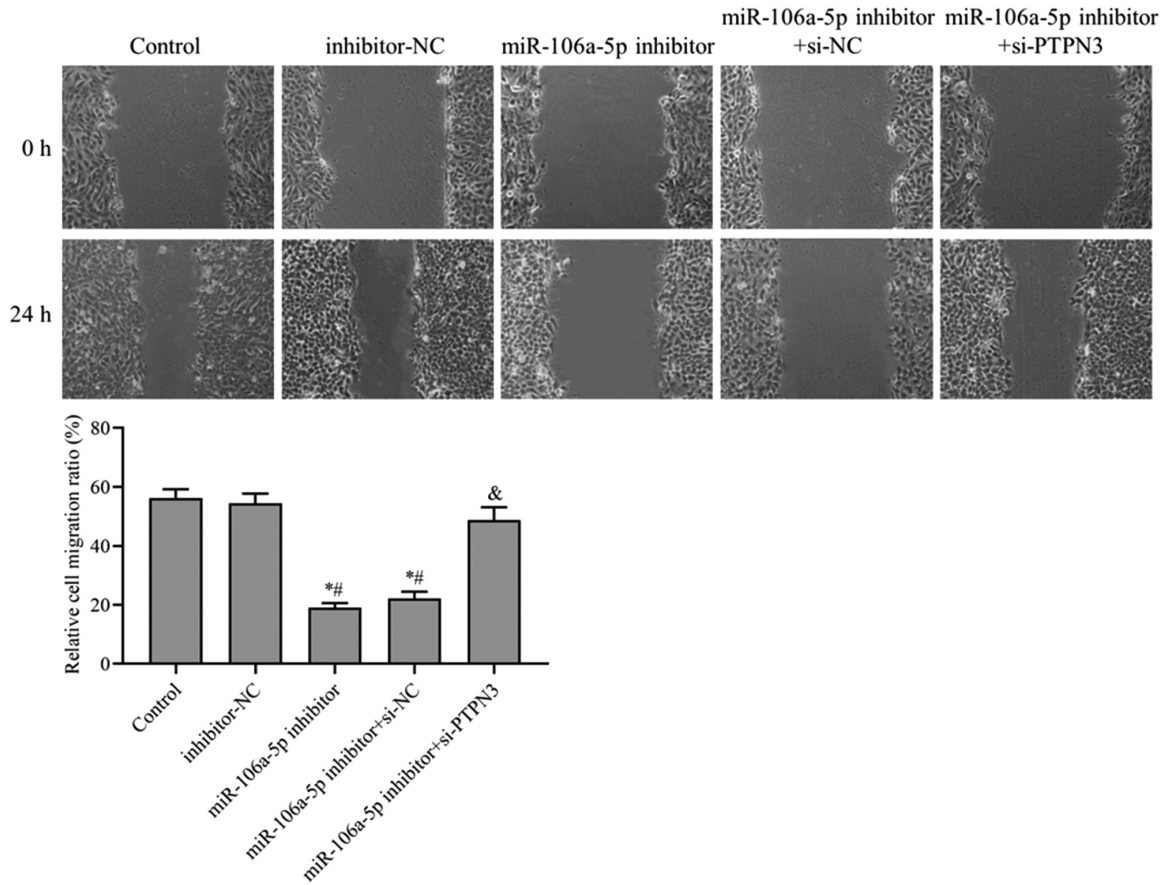


图8 沉默 miR-106a-5p 对 HCT-116 细胞迁移的影响

Fig.8 Effect of silencing miR-106a-5p on HCT-116 cell migration

Note: Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with inhibitor-NC group, # $P < 0.01$;
Compared with miR-106a-5p inhibitor+si-NC group, & $P < 0.01$.

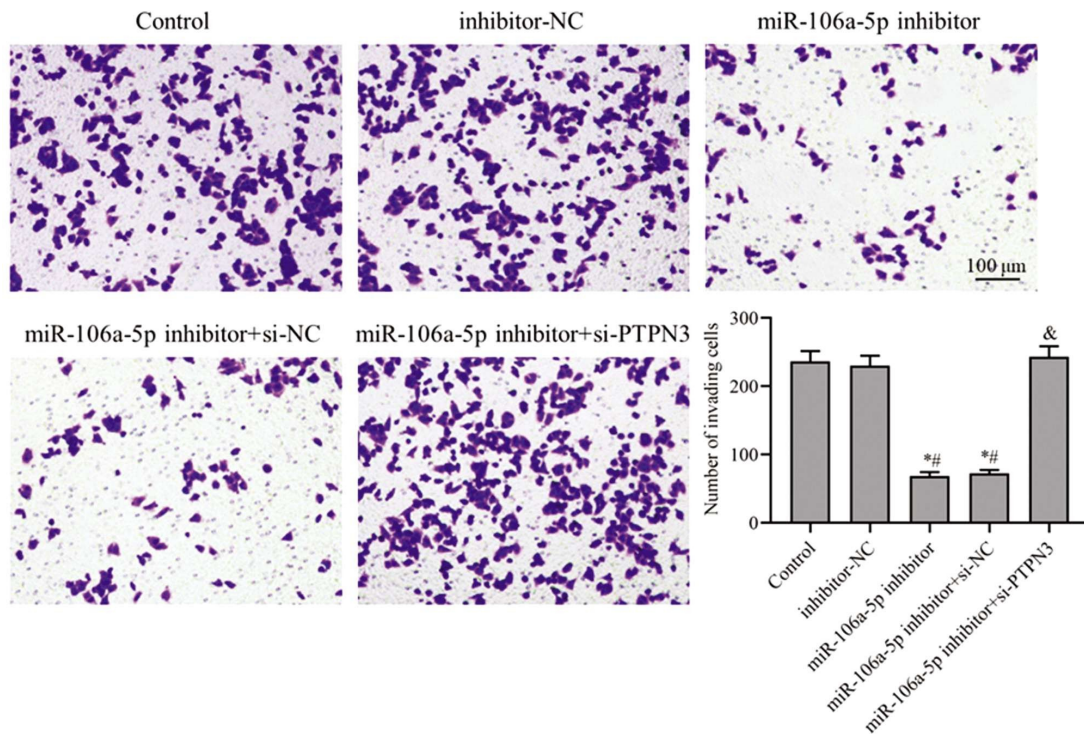


图9 沉默 miR-106a-5p 对 HCT-116 细胞侵袭的影响

Fig.9 Effect of silencing miR-106a-5p on HCT-116 cell invasion

Note: Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with inhibitor-NC group, # $P < 0.01$;
Compared with miR-106a-5p inhibitor+si-NC group, & $P < 0.01$.

miR-106a-5p 是 miR-17 家族的一员, 该家族还包括 miR-17、miR-20、miR-92b 和 miR-106b^[19], 已有的研究显示, miR-17 家族成员是典型的致癌基因^[20]。miR-106a-5p 位于人类 X 染色体上, 在各种肿瘤组织中高表达, 尤其是在消化系统肿瘤^[21]。据报道, miR-106a 在前列腺癌的耐辐射细胞中表达上调^[22]; 对卵巢癌的研究发现, miR-106a-5p 能够通过结合和调控靶基因 ARHGAP24 促进肿瘤的进展^[23]; 另一项研究发现, miR-106a-5p 在三联阴性乳腺癌中高表达, 并与三联阴性乳腺癌预后不良有关^[24]。Hu 等^[25] 研究发现, 在肝细胞癌中 miR-106a-5p 通过靶向调控 SAMD12 和 CADM2 而促进肿瘤的恶性发展; Xu 等^[26] 发现, miR-106a-5p 可能通过靶向抑制 CILF-2, 进而促进髓鞘瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。Tai 等研究发现, 在氧化应激诱导的人多能基质细胞早衰模型中 miR-106a-5p 过表达可以促进 G1/S 转变和 DNA 合成, 使细胞免于生长停滞^[27]。众多的研究报道显示, miR-106a-5p 在多种肿瘤中扮演促癌因子的角色, 而最近有研究表明, miR-106a-5p 参与了 CRC 细胞对 5-氟尿嘧啶耐药性的变化, 但相关机制尚不清楚^[28]。本研究发现 miR-106a-5p 在 CRC 组织和 HCT-116 细胞中均高表达, 通过对 HCT-116 细胞中 miR-106a-5p 抑制表达处理, 结果显示, HCT-116 细胞的增殖活性、克隆形成能力、迁移和侵袭能力均降低, 且细胞周期被阻滞在 G0/G1 期, 影响了细胞正常的复制过程, 这些结果表明抑制 miR-106a-5p 的表达, 可以有助于抑制 CRC 细胞的恶性生物学行为。

酪氨酸蛋白磷酸酶非受体型 3 (PTPN3), 也称为 PTPH1, 是非跨膜蛋白磷酸酶家族的成员之一, 已知参与造血、炎症、细胞分化和致癌转化等多种生理和病理过程^[29]。目前, 多项研究表明 PTPN3 在各种恶性肿瘤中存在差异性表达和双重作用, 对癌症进展和预后至关重要^[30]。在胃癌中, PTPN3 表达显著上调, 且与病理分级呈正相关^[31]。Onishi 等^[32] 体外实验表明, PTPN3 促进胰腺导管腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 在小鼠异种移植模型中 PTPN3 能够促进肿瘤生长。在顺铂和阿霉素耐药的卵巢癌细胞中, PTPN3 表达升高, 且过表达 PTPN3 可以促进和维持细胞产生化疗耐药性^[33]。但也有多项研究表明 PTPN3 在多种癌症中充当潜在的肿瘤抑制基因。PTPN3 已被证明, 在肺癌中可以通过增加 EGFR 内吞降解来限制细胞增殖和侵袭^[34]; PTPN3 通过阻断 AKT 磷酸化来减缓门周胆管癌的恶性发展, 并与门周胆管癌的预后呈正相关^[35]。Zhou 等^[36] 的泛癌研究表明, PTPN3 对癌症的进展和预后具有多种影响, 存在组织差异性, 其潜在过程尚不清楚。本研究结果显示, PTPN3 在 CRC 组织和 HCT-116 细胞中均低表达, 且 miR-106a-5p 与 PTPN3 存在靶向结合关系。在 HCT-116 细胞中抑制 miR-106a-5p 的表达, PTPN3 的表达水平升高, HCT-116 细胞的增殖活性、克隆形成能力、迁移和侵袭能力均降低, 这表明 HCT-116 细胞恶性生物学行为的抑制也可能与 PTPN3 的表达水平升高有关。后续实验在抑制 miR-106a-5p 表达的同时干扰 PTPN3 的表达, 结果发现 HCT-116 细胞的增殖活性、克隆形成能力、迁移和侵袭能力恢复 " 癌性 ", 这也进一步证实抑制 miR-106a-5p 的表达可以上调 PTPN3 的表达水平, 进而抑制 HCT-116 细胞的增殖、迁移和侵袭。

综上所述, miR-106a-5p 在 CRC 中高表达, PTPN3 在 CRC 中低表达, 通过抑制 miR-106a-5p 表达可以上调 PTPN3 水平, 进而抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭。然而本研究仅限于在细胞水平探究 miR-106a-5p 和 PTPN3 在结肠癌细胞中的作用, 并未深入动物水平验证两者的作用和机制。鉴于动物水平代谢调控机制的复杂性, miR-106a-5p 和 PTPN3 在结肠癌中的作用和机制是否与本研究结果一致仍未可知, 这也是未来的研究方向和所需要解析的问题。

参考文献(References)

- [1] Marques A, Cavaco P, Torre C, et al. Tumor mutational burden in colorectal cancer: Implications for treatment [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2024, 197: 104342.
- [2] Ogunwobi OO, Mahmood F, Akingboye A. Biomarkers in colorectal cancer: current research and future prospects [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5311.
- [3] Picard E, Verschoor CP, Ma GW, et al. Relationships between immune landscapes, genetic subtypes and responses to immunotherapy in colorectal cancer[J]. Front Immunol, 2020, 11: 369.
- [4] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [5] Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, et al. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future [J]. Pharmacol Ther, 2020, 206: 107447.
- [6] Li X, Chen R, Li Z, et al. Diagnostic Value of Combining miRNAs, CEA measurement and the FOBT in colorectal cancer screening[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 2549-2557.
- [7] Akbar S, Mashreghi S, Kalani MR, et al. Blood miRNAs miR-549a, miR-552, and miR-592 serve as potential disease-specific panels to diagnose colorectal cancer[J]. Heliyon, 2024, 10(7): e28492.
- [8] Fang E, Liu X, Li M, et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 94.
- [9] Song J, Zhang Y, Zhou C, et al. The dawn of a new Era: mRNA vaccines in colorectal cancer immunotherapy [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 132: 112037.
- [10] Zhu Y, Zhao J, Tan L, et al. LncRNA-HCG18 regulates the viability, apoptosis, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of papillary thyroid cancer cells via regulating the miR-106a-5p/PPP2R2A axis[J]. Pathol Res Pract, 2021, 221: 153395.
- [11] Chao H, Zhang M, Hou H, et al. HOTAIRM1 suppresses cell proliferation and invasion in ovarian cancer through facilitating ARHGAP24 expression by sponging miR-106a-5p[J]. Life Sci, 2020, 243: 117296.
- [12] Yang G, Li T, Liu J, et al. lncRNA MAGI2-AS3 suppresses castration-resistant prostate cancer proliferation and migration via the miR-106a-5p/RAB31 axis[J]. Genomics, 2023, 115(2): 110599.
- [13] Wang X, Chen Y, Dong K, et al. Effects of FER1L4-miR-106a-5p/miR-372-5p-E2F1 regulatory axis on drug resistance in liver cancer chemotherapy [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 24: 449-461.
- [14] 周辉, 李睿春, 颜大钧, 等. miR-106a-5p 靶向 STAT3 抑制胶质瘤细胞增殖和侵袭的机制 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37(20): 2580-2585.

- [15] Li J, Ma X, Chakravarti D, et al. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer[J]. *Genes Dev*, 2021, 35(11-12): 787-820.
- [16] Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(4): 250-281.
- [17] Loktionov A. Biomarkers for detecting colorectal cancer non-invasively: DNA, RNA or proteins? [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2020, 12(2): 124-148.
- [18] Herreros-Villanueva M, Duran-Sanchon S, Martín AC, et al. Plasma MicroRNA signature validation for early detection of colorectal cancer[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2019, 10(1): e00003.
- [19] Liu J, Huang Y, Wang H, et al. MiR-106a-5p promotes 5-FU resistance and the metastasis of colorectal cancer by targeting TGF β R2[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(12): 5622-5634.
- [20] Gruszka R, Zakrzewska M. The oncogenic relevance of miR-17-92 cluster and its paralogous miR-106b-25 and miR-106a-363 clusters in brain tumors[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 879.
- [21] Tang S, Wu WK, Li X, et al. Stratification of digestive cancers with different pathological features and survival outcomes by MicroRNA expression[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24466.
- [22] Hoey C, Ray J, Jeon J, et al. miRNA-106a and prostate cancer radioresistance: a novel role for LITAF in ATM regulation [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(8): 1324-1341.
- [23] Chao H, Zhang M, Hou H, et al. HOTAIRM1 suppresses cell proliferation and invasion in ovarian cancer through facilitating ARHGAP24 expression by sponging miR-106a-5p[J]. *Life Sci*, 2020, 243: 117296.
- [24] Tang T, Wang LX, Yang ML, et al. lncRNA TPTEP1 inhibits stemness and radioresistance of glioma through miR-106a-5p mediated p38 MAPK signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22 (6): 4857-4867.
- [25] Hu J, Xie C, Xu S, et al. Liver fibrosis-derived exosomal miR-106a-5p facilitates the malignancy by targeting SAMD12 and CADM2 in hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2023, 18 (5): e0286017.
- [26] Xu H, Wang F, Wang L. Suppression of miR-106a-5p expression inhibits tumorigenesis via increasing CELF-2 expression in spinal cord glioma[J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(2): 627.
- [27] Tai L, Huang CJ, Choo KB, et al. Oxidative stress down-regulates MiR-20b-5p, MiR-106a-5p and E2F1 expression to suppress the G1/S transition of the cell cycle in multipotent stromal cells [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(4): 457-470.
- [28] Qin Y, Chen X, Liu Z, et al. miR-106a Reduces 5-Fluorouracil (5-FU) sensitivity of colorectal cancer by targeting dual-specificity phosphatases 2 (DUSP2)[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 4944-4951.
- [29] Abdel-Maksoud MA, Ullah S, Nadeem A, et al. PTPN3 in cancer: unveiling its immune-mediated impact on prognosis and dysregulated signaling pathways[J]. *Am J Transl Res*, 2023, 15(11): 6464-6475.
- [30] Yuan B, Liu J, Cao J, et al. PTPN3 acts as a tumor suppressor and boosts TGF- β signaling independent of its phosphatase activity [J]. *EMBO J*, 2019, 38(14): e99945.
- [31] Chen J, Zhao X, Yuan Y, et al. The expression patterns and the diagnostic/prognostic roles of PTPN family members in digestive tract cancers[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 238.
- [32] Onishi H, Iwamoto N, Sakanashi K, et al. PTPN3 could be a therapeutic target of pancreatic cancer [J]. *Anticancer Res*, 2022, 42 (6): 2869-2874.
- [33] Tang X, Qi C, Zhou H, et al. Critical roles of PTPN family members regulated by non-coding RNAs in tumorigenesis and immunotherapy [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 972906.
- [34] Li MY, Peng WH, Wu CH, et al. PTPN3 suppresses lung cancer cell invasiveness by counteracting Src-mediated DAAM1 activation and actin polymerization[J]. *Oncogene*, 2019, 38(44): 7002-7016.
- [35] Sun R, Chen T, Li M, et al. PTPN3 suppresses the proliferation and correlates with favorable prognosis of perihilar cholangiocarcinoma by inhibiting AKT phosphorylation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109583.
- [36] Zhou Z, Lin Z, Wang M, et al. Identification and verification of PTPN3 as a novel biomarker in predicting cancer prognosis, immunity, and immunotherapeutic efficacy [J]. *Eur J Med Res*, 2024, 29(1): 12-32.